



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS  
HIDROETANÓLICO DE *Chenopodium ambrosioides* L. E  
DE *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, FRENTE A CEPAS  
DE *Mycobacterium* sp.**

**Érika da Silva Valério**

Belém-PA  
2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS  
HIDROETANÓLICO DE *Chenopodium ambrosioides* L. E  
DE *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, FRENTE A CEPAS  
DE *Mycobacterium* sp.**

Autor: Érika da Silva Valério

Orientador: Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira

Co-Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém-PA  
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA**

---

Valerio, Érika da Silva, 1987-

Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. e de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *Mycobacterium* sp. *in vitro*. / Erika da Silva Valerio. – 2014.

Orientador: Francisco Martins Teixeira;

Coorientador: Wagner Luiz Ramos Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2014.

1. *Chenopodium ambrosioides*. 2. *Eucalyptus alba*. 3. *Mycobacterium* sp. 4. Atividade Antimicobacteriana. 5. Imunomodulação. I. Título.

CCD: 22. ed. 615.321

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

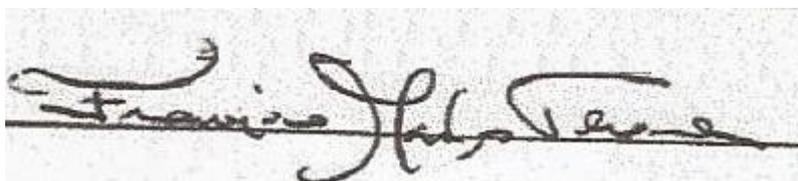
Érika da Silva Valério

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Chenopodium ambrosioides* L. E *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, FRENTE A CEPAS DE *Mycobacterium* sp *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca examinadora



Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira – UFRJ  
Orientador

---

Prof. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa – UFPA  
Examinadora

---

Prof. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro – UFPA  
Examinadora

Belém-PA  
2014

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo e todos, pelo dom da vida e da perseverança.

Aos meus pais, Francisco Valério e Conceição, pelo amor incondicional, auxílio, compreensão, dedicação, incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira pela orientação, incentivo, paciência, amizade, carinho, companheirismo, experiência, apoio, confiança, pela oportunidade. Professor, Obrigada pela convivência e parceria e reitero que a sua orientação foi indispensável no decorrer do curso. O senhor faz parte desta etapa de crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wagner Barbosa um professor respeitado e pesquisador dedicado e incansável, pela oportunidade, colaboração, apoio e contribuições valiosas no decorrer deste trabalho.

Ao professor Dr. Flávio Vasconcelos pela disponibilidade, pela cooperação e pelas contribuições valiosas na análise toxicológica.

À profa. Dra. Cristiane Maia e ao Professor Dr. Washington Pereira pelo apoio.

À Prof. Dra. Ana Carolina Carvalho pela amizade, suporte no Laboratório de Micobactérias da UFRJ e pela oportunidade fornecida.

À Profa. Dra. Michele Mizutano, pela contribuição científica e por ter viabilizado meios para a realização dos ensaios biológicos.

Aos técnicos laboratoriais da UFRJ Regina Finger e Marlei Gomes pelos ensinamentos, experiências transmitidas e compartilhadas, paciência e amizade, pelas contribuições nos ensaios biológicos. E ao técnico laboratorial da UFPA Jailton D'Anunciação pela contribuição fitoquímica.

À equipe do Laboratório de Fitoquímica da UFPA pelo incentivo, companheirismo, conhecimentos compartilhados e amizade.

Aos amigos Dannyel, Vanessa, Ludhmylla e senhora Elza, por tudo ao longo desses dois anos.

Às secretárias da pós-graduação Brasília e Cliciane pela atenção e boa vontade dispensados a todo instante.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPA, Doutorandos em Inovação Farmacêutica e em Química e do Programa de Pós Graduação em Produtos Bioativos e Biotecnologias da UFRJ-Macaé. E aos amigos da Graduação em Farmácia – UFPA. Em especial Adriana Queiroz, Adriana Veiga, Ana Paula, Anderson, Andressa, Andrielle, Jessyca, Joyce, Mariely, Marlon, Viviana.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e à Universidade Federal do Rio de Janeiro, por todo suporte e por me proporcionar uma diversidade de oportunidades.

Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

VALERIO, E. S. Avaliação da atividade dos extratos hidroetanólicos de *Chenopodium ambrosioides* L. e *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *Mycobacterium* sp. *in vitro*, 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

*Chenopodium ambrosioides* e *Eucalyptus alba* são espécies utilizadas na medicina popular para o tratamento da tuberculose e expectoração. O presente trabalho teve o objetivo de determinar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, definir o perfil fitoquímico e avaliar as atividades antimicobacteriana, citotóxica, imunomodulatória e toxicológica *in vivo* dos extratos e frações. Na avaliação físico-química e microbiológica dos extratos de *C. ambrosioides* e de *E. alba*, foram encontrados parâmetros em conformidade com a literatura específica para plantas medicinais. A prospecção fitoquímica dos extratos revelou a presença de saponinas, esteroides, triterpenoides, fenóis e taninos, o extrato de *C. ambrosioides* apresentou também proteínas e aminoácidos, enquanto o extrato de *E. alba* foi positivo para ácidos orgânicos e lactonas. Os resultados do método da microdiluição em caldo e da microdiluição utilizando Alamar Blue evidenciaram moderadas atividades frente à *Mycobacterium fortuitum* do extrato de *E. alba* e da fração acetato de etila (FACe) de *E. alba*; a fração clorofórmica (FCI) de *C. ambrosioides* e a FACe de *E. alba* foram moderadamente ativas frente à *Mycobacterium tuberculosis*. A atividade citotóxica, avaliada pelo método do MTT, demonstrou que os extratos não reduziram a viabilidade celular nas concentrações testadas. No ensaio de imunomodulação, o extrato de *E. alba* apresentou potencial efeito anti-inflamatório, pelos métodos de inibição da produção de NO e TNF $\alpha$ . Não foram detectados sinais de toxicidade oral aguda dos extratos na dose de 2500 mg/kg em camundongos. Estes resultados sugerem o potencial antimicobacteriano da FACe de *E. alba* e imunomodulador do extrato de *E. alba*, e podem servir como subsídio para estudos futuros com vista no isolamento de compostos ativos e elucidação de seus mecanismos.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus alba*, *Mycobacterium* sp., atividade antimicobacteriana, toxicidade, imunomodulação.

## ABSTRACT

VALERIO, E. S. Evaluation of activity of hydroethanolic extracts *Chenopodium ambrosioides* L. and *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, against strains of *Mycobacterium* sp., 2014. 101 f. Dissertation (Master's Degree) - Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2014.

*Chenopodium ambrosioides* and *Eucalyptus alba* are species used in folk medicine for the treatment of tuberculosis and sputum. This study aimed to determine the physical-chemical, microbiological parameters, define phytochemical screening and evaluate antimycobacterial, cytotoxicity, immunomodulation, and toxicity *in vivo* activities of extracts and fractions. In physical-chemical and microbiological evaluation of *C.ambrosioides* and *E. alba* extracts, were found parameters in accordance with the specific literature for medicinal plants. The phytochemical screening of the extracts revealed the presence of saponins, steroids, triterpenoids, phenols and tannins, *C. ambrosioides* extract also showed proteins and amino acids, while the *E. alba* extract was positive for organic acids and lactones. The results of broth microdilution assay and microplate alamar blue assay showed moderates activities against the *Mycobacterium fortuitum* of *E. alba* extract and ethyl acetate fraction (FAcE) of *E. alba*; the chloroform fraction (FCI) of *C.ambrosioides* and the ethyl acetate fraction (FacEA) of *E. alba* were moderately active against the *Mycobacterium tuberculosis*. The cytotoxic activity, evaluated by MTT method, showed that the extracts did not reduce cell viability in the concentrations tested. In the immunomodulation assay, *E. alba* extract presented potential anti-inflammatory effect, by the methods of inhibition the production of NO and TNF $\alpha$ . No signs of acute oral toxicity of the extracts at a dose of 2500 mg/kg in mice were detected. These results suggest the potential antimycobacterial the FAcE of *E. alba* and immunomodulatory of *E. alba* extract and can serve as a resource for future studies, aimed at isolation of active compound and elucidation of their mechanisms of action.

Key words: *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus alba*, *Mycobacterium* sp., antimycobacterial activity, toxicity, immunomodulation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Parede Celular de <i>Mycobacterium</i> .....	5
<b>Figura 2</b> – Modo de transmissão da tuberculose.....	6
<b>Figura 3</b> – Mecanismos de ação dos antibióticos antituberculose de primeira linha. .....	8
<b>Figura 4</b> – Taxa de incidência de tuberculose no mundo em 2012 .....	10
<b>Figura 5</b> – Estrutura dos constituintes monoterpênicos presentes no extrato hexânico de <i>C. ambrosioides</i> .....	17
<b>Figura 6</b> – Estrutura dos principais compostos fenólicos encontrados no extrato do fruto de <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	22
<b>Figura 7</b> – Exsicata da espécie <i>C. ambrosioides</i> L.....	25
<b>Figura 8</b> – Exsicata da espécie <i>E. alba</i> Reinw ex Blume.....	25
<b>Figura 9</b> – Fluxograma referente às atividades desenvolvidas para obtenção e fracionamento do extrato a partir das folhas de <i>C. ambrosioides</i> e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume. ....	32
<b>Figura 10</b> - Esquema simplificado do processo de preparação e execução dos testes fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 11</b> – Distribuição granulométrica da droga vegetal de <i>C. ambrosioides</i> .....	42
<b>Figura 12</b> - Distribuição granulométrica da droga vegetal de <i>E. alba</i> .....	43

<b>Figura 13</b> – Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos estimulados com LPS após tratamento com as frações hexânica e metanólica de <i>C. ambrosioides</i> L.....	61
<b>Figura 14</b> – Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos estimulados com LPS após tratamento com os extratos hidroetanólicos de <i>E. alba</i> e <i>C. ambrosioides</i> L. ....	62
<b>Figura 15</b> - Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos estimulados com LPS após tratamento com as frações hexânica e acetato de etila de <i>E. alba</i> .....	62
<b>Figura 16</b> - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e tratados com extrato bruto de <i>C. ambrosioides</i> e <i>E. alba</i> .....	66
<b>Figura 17</b> – Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e tratados com fração acetato de etila de <i>C. ambrosioides</i> , <i>E. alba</i> e fração hexânica de <i>C. ambrosioides</i> .....	66
<b>Figura 18</b> – Capacidade de inibição da produção de TNF $\alpha$ por macrófagos estimulados com LPS após o tratamento com extrato bruto de <i>E.alba</i> e <i>C. ambrosioides</i> .....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Os constituintes majoritários isolados das espécies do gênero <i>Chenopodium</i> .....	16
<b>Tabela 2</b> – Resultados dos ensaios físico-químicos realizados a partir das folhas de <i>C. ambrosioides</i> L. e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	46
<b>Tabela 3</b> – Determinação do pH e teor de sólidos dos extratos de <i>C. ambrosioides</i> L. e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	48
<b>Tabela 4</b> – Rendimento dos extratos hidroetanólico das folhas de <i>C. ambrosioides</i> L. e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	49
<b>Tabela 5</b> – Prospecção fitoquímica dos extratos brutos de <i>C. ambrosioides</i> L. e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	50
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros microbiológicos dos extratos hidroetanólicos e frações de <i>C. ambrosioides</i> L e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	52
<b>Tabela 7</b> – CIM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAE), fração metanólica (FM) de <i>C. ambrosioides</i> contra <i>M. fortuitum</i> .....	54
<b>Tabela 8</b> – CIM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAE), fração metanólica (FM) de <i>E. alba</i> contra <i>M. fortuitum</i> .. .....	55
<b>Tabela 9</b> – Resultado de CIM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAcE), fração metanólica (FM) de <i>C. ambrosioides</i> contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 .....	57

<b>Tabela 10</b> – CIM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAE), fração metanólica (FM) de <i>E. alba</i> contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	59
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBCA	Extrato bruto de <i>Chenopodium ambrosioides</i>
EBEA	Extrato bruto de <i>Eucalyptus alba</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Instituto Osvaldo Cruz
FAcE	Fração Acetato de Etila
FAcEA	Fração Acetato de Etila de <i>Eucalyptus alba</i>
FCI	Fração Clorofórmica
FCICA	Fração Clorofórmica de <i>Chenopodium ambrosioides</i>
FH	Fração Hexânica

FM	Fração Metanólica
g	Gramma
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
MABA	<i>Microplate Alamar Blue Assay</i>
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
mL	Mililitros
MØ	Macrofágos
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol – sal de tetrazol
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NO	Óxido Nítrico
OECD	
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REMA	Ensaio de Microplaca com Resazurina
TB	Tuberculose
TDO	Terapia Diretamente Observada
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Gênero <i>Mycobacterium</i> .....	3
2.2 Tuberculose.....	5
2.2.1 Epidemiologia da Tuberculose .....	9
2.3 <i>Mycobacterium fortuitum</i> .....	11
2.4 Plantas Medicinais .....	14
2.5 Família Amaranthaceae .....	14
2.6 Gênero <i>Chenopodium</i> .....	15
2.7 <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	16
2.8 Família Myrtaceae .....	19
2.9 Gênero <i>Eucalyptus</i> .....	20
2.9 <i>Eucalyptus alba</i> Reinw ex Blume .....	21
3 OBJETIVOS .....	23
3.1 Objetivo Geral .....	23
3.2 Objetivos Específicos .....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 Material.....	24
4.1.1 Matéria-prima Vegetal .....	24
4.1.2 Reagentes e Soluções .....	26
4.1.3 Equipamentos .....	26
4.2 Métodos.....	27
4.2.1 Processamento do Material Vegetal.....	27

4.3 Caracterização físico-química do pó de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L e <i>Eucalyptus alba</i> Reinw ex Blume .....	28
4.3.1 Determinação da Granulometria das Drogas Vegetais .....	28
4.3.2 Determinação da Perda por Dessecação em Balança por Infravermelho .....	28
4.3.3 Determinação do Teor de Cinzas Totais .....	28
4.3.4 Determinação do Índice de Espuma .....	29
4.4 Obtenção e Caracterização Físico-química do Extrato Hidroetanólico de <i>C. ambrosioides</i> L. e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	30
4.4.1 Obtenção do Extrato Hidroetanólico de <i>C. ambrosioides</i> E <i>E. alba</i> .....	30
4.4.2 Caracterização Físico-Química dos Extratos Hidroetanólicos.....	30
4.4.3 Determinação do pH .....	30
4.4.4 Determinação do Teor de Sólidos .....	30
4.5 Obtenção das Frações Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e Metanólica de <i>C.ambrosioides</i> L e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	31
4.6 Análise Fitoquímica Preliminar .....	33
4.7 Controle de Qualidade Microbiológico dos Extratos e Frações .....	33
4.8 Atividade Antimicobacteriana pelas Técnicas de Microdiluição.....	35
4.8.1 Microdiluição em Caldo .....	35
4.8.2 Microdiluição utilizando Alamar Blue Assay (MABA) .....	36
4.9 Ensaio <i>in vitro</i> de Citotoxicidade .....	37
4.9.1 Cultura Celular e Preparo dos Ensaios de Macrófagos RAW 264.7 .....	37
4.9.2 Teste de Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT .....	38
4.10 Ensaio da Capacidade de Inibição da Produção de Óxido Nítrico (NO) .....	38
4.11 Bioensaio de Análise da Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos.....	39
4.12 Toxicidade Aguda Oral.....	40
4.12.1 Avaliação Anatomo-Histopatológica.....	41
4.13 Análise Estatística .....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42

5.1 Obtenção e Caracterização físico-química da droga vegetal de <i>C. ambrosioides</i> L e <i>E. alba</i> Reinw ex Blume .....	42
5.1.1 Determinação da Distribuição Granulométrica .....	42
5.1.2 Determinação da Perda por Dessecação .....	44
5.1.3 Determinação do Teor de Cinzas .....	44
5.1.4 Determinação do Índice de Espuma .....	45
5.2 Caracterização Físico-química dos Extratos Hidroetanólicos.....	46
5.2.1 Determinação do pH .....	46
5.2.2 Determinação do Teor de Sólidos dos Extratos .....	47
5.3 Rendimento dos Extratos e Frações .....	48
5.4 Análise Fitoquímica Preliminar dos Extratos e Frações .....	49
5.5 Controle de Qualidade Microbiológico dos Extratos e Frações .....	51
5.6 Avaliação da Atividade Antimicobacteriana dos Extratos e Frações .....	53
5.6.1 Microdiluição em Caldo .....	53
5.6.2 Microdiluição Utilizando MABA.....	56
5.7 Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	60
5.7.1 Teste de Citotoxicidade .....	60
5.8 Atividade Imunomoduladora .....	65
5.8.1 Ensaio da Produção de Óxido Nítrico .....	65
5.8.2 Ensaio da Produção de TNF- $\alpha$ .....	68
5.9 Toxicidade Oral Aguda do Extrato de <i>C. ambrosioides</i> e <i>E. alba</i> e Análise Anatomo-Histopatológica .....	70
6 CONCLUSÕES .....	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
8 ANEXOS .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com as estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose, doença negligenciada, ainda causa um número crescente de mortes no mundo e representa um problema de saúde pública (WHO, 2013). Embora a tuberculose tenha cura, o tratamento é longo, com duração de até 12 meses, o que configura uma das causas para o insucesso terapêutico, bem como, a desinformação do paciente quanto à doença, a irregularidade na tomada dos medicamentos, e as reações adversas ao tratamento. Tudo isso leva os pacientes ao abandono ao tratamento (BRASIL, 2011). O esquema terapêutico para o tratamento da tuberculose (TB) preconizado pela OMS consiste na Terapia Diretamente Observada (TDO), que utiliza os medicamentos rifampicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida em dose fixa combinada, com observação diária da ingestão dos medicamentos (BRASIL, 2011; VRANJAC, 2010).

Os estudos para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-tuberculose devem, portanto, buscar encurtar o tempo de tratamento da TB, em casos de co-infecção visa reduzir a interação medicamentosa com os medicamentos antiretrovirais e encontrar alternativas terapêuticas para o tratamento da TB multirresistente (CONDE et al, 2009). Neste contexto, as plantas medicinais são importantes alternativas como recursos terapêuticos frente às doenças negligenciadas, tais como a tuberculose (ALTMANN, 2001).

As plantas medicinais são utilizadas no tratamento de doenças por milhares de pessoas no mundo e representam, muitas vezes, a principal e única fonte de cuidados de saúde. Esta forma de recurso terapêutico é acessível, disponível e culturalmente aceita na medicina popular (WHO, 2014). No Brasil, 80% da população faz uso de algum produto de origem natural, principalmente de plantas, como fonte alternativa no contexto cultural, na medicina popular e na forma de fitoterápicos. O interesse em pesquisas utilizando plantas medicinais tem aumentado nos últimos anos e dentre os fatores que impulsionaram este interesse pode-se destacar a comprovada eficácia de substâncias oriundas de espécies vegetais (FOGLIO et al, 2006).

Dentre as espécies vegetais com ação promissora contra micobactérias, destacam-se *Chenopodium ambrosioides* Linn, já usada na medicina popular para o

tratamento da tuberculose, e *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume que desperta o interesse em estudos científicos de produtos naturais com atividade comprovada frente as micobactérias tuberculosas e não tuberculosas (LAMEIRA e PINTO, 2008; LAWAL et al, 2011)

O Grupo de Pesquisa em Fitoterápicos na Universidade Federal do Pará (GPLAM) vêm trabalhando com diversas espécies vegetais, entre elas a *C. ambrosioides* e *E. alba* que foram investigadas nesse trabalho com finalidade de se obter um insumo farmacêutico ativo para o tratamento da tuberculose e infecções causadas por micobactérias não tuberculosas. Assim, foram avaliadas as atividades biológicas dessas espécies frente ao *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium fortuitum* pelos ensaios microbiológicos, citotóxicos, imunomodulador e toxicológico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Mycobacterium*

Existem cerca de 169 espécies do gênero *Mycobacterium* sp e apenas as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. fortuitum* são patogênicas ao homem, existindo também as espécies saprófitas de solo (EUZEBY, 2004; TRABULSI et al, 2008; MURRAY et al, 2009; JAWETZ et al, 2010). Quanto à classificação, as micobactérias são agrupadas de acordo com as propriedades de crescimento e morfologia colonial. As espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (CMTB) são bactérias de crescimento lento com coloração castanha brilhante ou não pigmentada e patogenicidade conhecida.

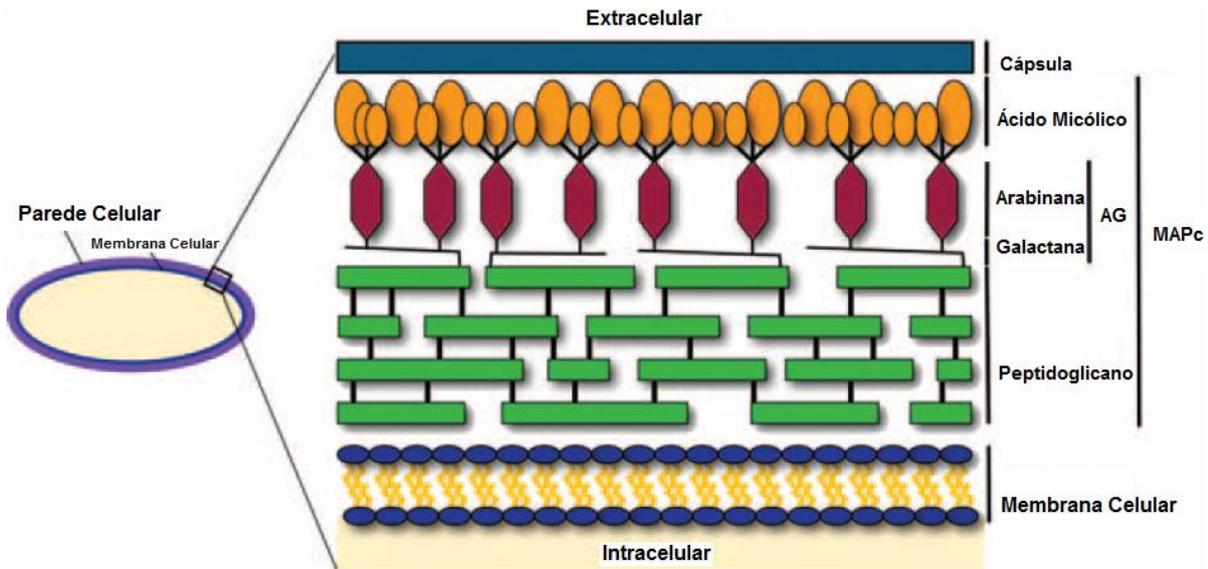
As espécies CMTB são patogênicas aos seres humanos e animais. *M. microti* foi recentemente relatado por infectar não só ratos, mas também humanos. *M. bovis* causa a tuberculose bovina em uma ampla variedade de mamíferos domésticos e selvagens, incluídos seres humanos e bovinos (ABASS et al, 2010). *M. tuberculosis* e *M. africanum* são responsáveis pela tuberculose em seres humanos, sendo que, no mundo, a maioria dos casos de TB são causados por *M. tuberculosis* (CUNHA, 2012; WHO, 2013), enquanto que *M. africanum* é predominantemente isolado em diferentes regiões da África (JONG et al, 2010). As outras micobactérias, também denominadas como micobactérias de não tuberculosas foram assim classificadas devido à velocidade de crescimento em diferentes temperaturas e produção de pigmentos, sendo consideradas em sua maioria como patógenos oportunistas (MURRAY et al, 2009; BROOKS et al, 2010).

As espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, possuem parâmetros similares, que incluem extratos antigênicos, epítomos alvo de anticorpos monoclonais e semelhança de DNA, representam um grupo de espécies comuns, as quais são consideradas pertencentes ao “complexo *M. tuberculosis*” (CMTB). Apesar destas similaridades, as espécies deste complexo diferem entre si quanto aos hospedeiros, distribuição geográfica, fenótipos e patogenicidade (NIEMANN et al, 2000; COUSINS et al, 2003). Dentre estas

espécies, *M. tuberculosis* é a causa mais comum de tuberculose no homem e é o principal foco de identificação laboratorial (KONEMAN et al, 2008).

Já as espécies *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* são agrupadas no grupo de Micobactérias não tuberculosas (MNT) por possuírem velocidade de crescimento relativamente rápida (3 a 7 dias), álcool-ácido resistência, ausência de produção de pigmentos e crescimento a 28°C em ágar Mac Conkey especial (desprovido de cristais violeta). Essas micobactérias são microrganismos pertencentes ao solo e a ambientes aquáticos que contaminam os sistemas hídricos e já foram encontradas em reagentes e soluções de limpeza hospitalar (KONEMAN et al, 2008; PITOMBO et al, 2009).

As micobactérias são bastonetes delgados, aeróbicos não formadores de esporos. Além disso, a resistência a drogas e patogenicidade podem estar relacionadas à composição da sua parede celular, a qual contém grandes quantidades de lipídeos (TORTORA et al, 2011). A parede celular micobacteriana é constituída na camada interna por peptidoglicano ligado de forma covalente ao arabinogalactano (AG), o qual, por sua vez, encontra-se ligado aos ácidos micólicos. Esta estrutura é denominada de complexo micolil arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) (BRENNAN et al, 2003, JANKUTE et al, 2012). A camada mais externa da parede celular é composta pelos ácidos micólicos, que formam uma camada cérea resistente à água. Esta característica torna a bactéria resistente a estresses ambientais, como o ressecamento, e permite a entrada de nutrientes lentamente através dessa membrana, fator que contribui para o lento crescimento das micobactérias (TORTORA et al, 2011). Os ácidos micólicos são componentes lipídicos específicos do envelope celular micobacteriano que garantem a sua impermeabilidade e são essenciais para a sobrevivência das espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. Esses lipídios também são o suporte molecular responsável pela característica de álcool-ácido resistência destes microrganismos e quando ligados ao peptidoglicano (Figura 1) formam uma barreira periférica hidrofóbica, capaz de se ligar e reter o corante fucsina durante a coloração de Ziehl-Nielsen (FONTANA, 2008; WILDNER et al, 2011).

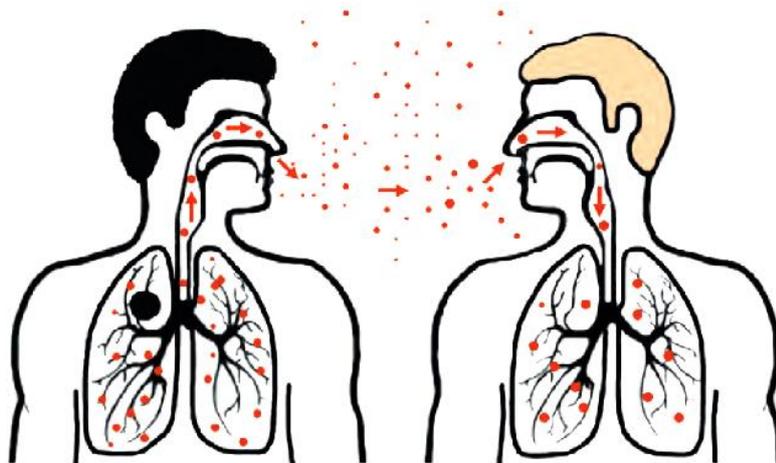


**Figura 1: Parede Celular de *Mycobacterium***

Fonte: Adaptado de Hett e Rubin (2008).

## 2.2 Tuberculose

Segundo o “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) e o “National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), a tuberculose é uma doença pulmonar transmitida, principalmente, pela inalação de gotículas infecciosas suspensas no ar (de 1 a 5 micrometros de diâmetro) expelidas por pacientes com tuberculose pulmonar ou laringeal, ao espirrar, falar ou tossir. Dessa forma, estas partículas microscópicas ficam suspensas no ar durante horas e atingem os alvéolos pulmonares de pessoas susceptíveis (Figura 2). Os principais fatores relacionados com a transmissão são: o número e a concentração de bacilos expelidos; o intervalo de tempo que a pessoa susceptível respira o ar contaminado ( $\geq 8$  horas) e o estado imunológico do indivíduo exposto (CDC, 2013).



**Figura 2** – Modo de transmissão da tuberculose.

**Fonte:** Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention*.

Após atingir os alvéolos pulmonares, os bacilos são capturados por macrófagos alveolares, a maioria dos bacilos são destruídos ou inativados. Contudo, um pequeno número pode multiplicar-se no interior dos macrófagos e são liberados quando ocorre apoptose, estes bacilos podem atingir o sistema linfático ou a corrente sanguínea e, posteriormente, tecidos e órgãos como pulmões, rins, cérebro e ossos (ABBAS et al, 2012).

As micobactérias possuem grande afinidade pelo oxigênio e necessitam deste para o seu desenvolvimento o que acarreta no tropismo deste agente infeccioso para o pulmão (ZOMBINI et al, 2013). No entanto, a tuberculose pode ser extrapulmonar ou pulmonar. Dentre as formas extrapulmonares as mais frequentes são: pleural, linfática, osteoarticular, peritoneal, pericárdica, ganglionar, geniturinária, meníngea, oftálmica, cutânea e intestinal, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença. Ressalta-se, que a forma pulmonar é a apresentação clínica mais comum da doença, independente da faixa etária, sendo também a forma principal de propagação da doença (CAMPOS, 2006; ZOMBINI et al, 2013). A TB também pode ser transmitida via leite de vaca contaminado (ANTUNES, 2002).

Os sintomas clínicos mais comumente relatados por pacientes com tuberculose pulmonar são tosse, febre, dispneia, astenia, sudorese, emagrecimento, dor torácica e hemoptise (BRASIL, 2002).

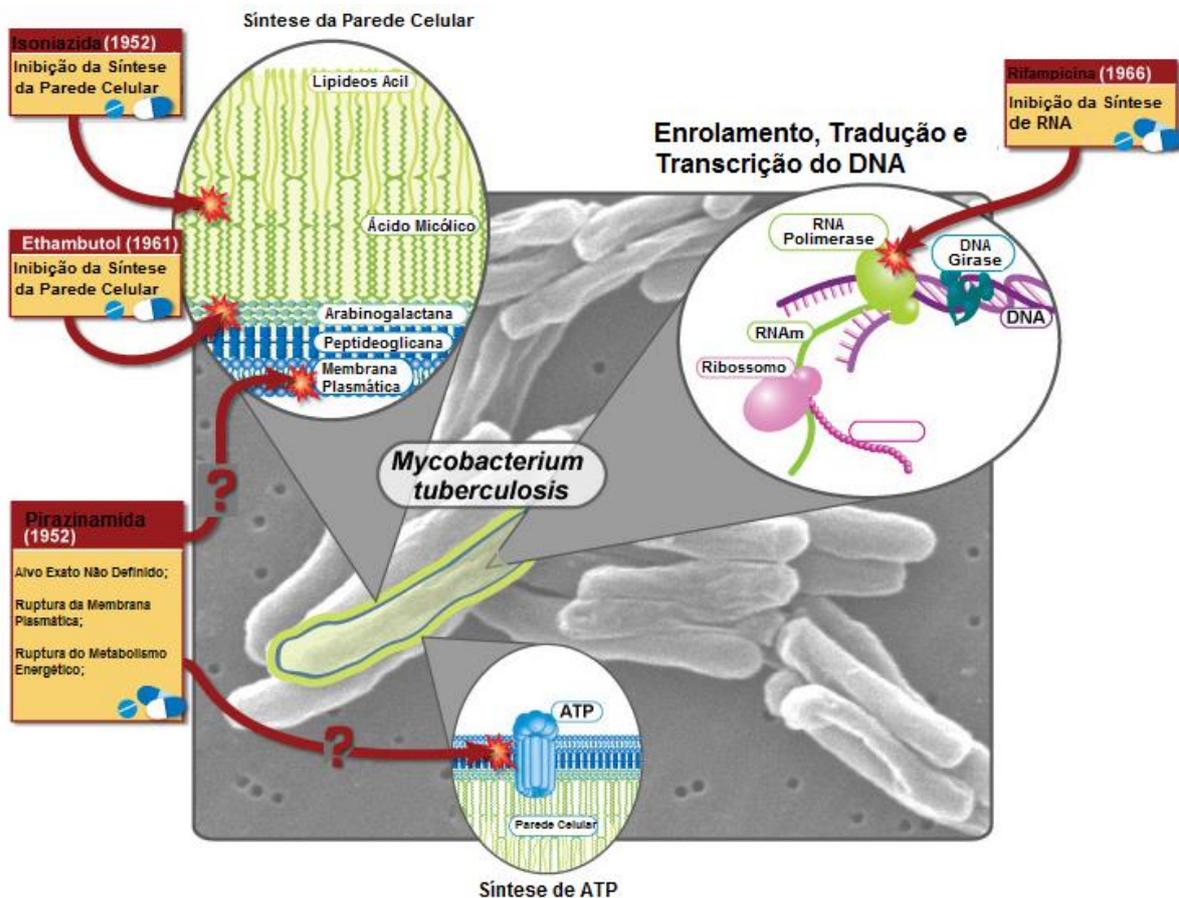
A OMS recomenda como método padrão de diagnóstico a baciloscopia direta do escarro para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em pacientes sintomáticos respiratórios com tosse por três semanas ou mais (WHO, 2013). O Ministério da Saúde preconiza a baciloscopia e cultura em meio Lowenstein-Jensen como métodos de diagnóstico considerado padrão ouro. Quanto método auxiliar, a prova tuberculínica cutânea é realizada em pessoas não vacinadas com BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (BRASIL, 2009). Existem ainda métodos automatizados como o radiométrico BACTEC 460, o qual oferece uma resposta em aproximadamente 7 a 10 dias (BETHLEM et al, 1995). Dentre outros métodos úteis de diagnóstico e susceptibilidade, Franzblau (1997) descreveram a técnica de micro ensaio denominada “Microplate Alamar Blue Assay” (MABA), utilizando o revelador alamar blue, como método rápido, barato e eficaz na avaliação da eficácia *in vitro* de compostos frente às cepas do complexo *M. tuberculosis* e do *M. avium*.

Com relação ao esquema terapêutico de primeira linha (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol) para o tratamento da tuberculose e os mecanismos farmacológicos, o fármaco isoniazida atua inibindo a síntese do ácido micólico da parede celular, a rifampicina inibe a síntese de RNA, a pirazinamida inibe o metabolismo energético da membrana e o etambutol inibe a síntese de arabinogalactana da parede celular (Figura 3) (ZHANG et al, 2006). Dados sobre a toxicidade da associação destas drogas utilizadas para tratamento de TB ainda não foram estudados. Contudo, os efeitos colaterais à medicação das drogas antituberculose, mais comumente relatados são: anorexia, dor abdominal, edema, artralgia, perda de memória, náuseas e vômito, mialgia, hepatomegalia, dentre outros (MACIEL et al, 2009).

Para o tratamento de pacientes com TB, a Terapia Diretamente Observada (TDO) é a metodologia padronizada pela OMS, independentemente da espécie de micobactéria (DE KANTOR, 2010). O esquema terapêutico utilizado na rede pública de saúde é composto nos dois primeiros meses pelo Coxcip 4 (comprimido contendo em dose fixa combinada rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) e nos quatro últimos meses por rifampicina e isoniazida (cápsula contendo 300 mg de rifampicina e 200 mg de isoniazida) (VRANJAC, 2010).

Ferreira e colaboradores (2013) evidenciaram que a taxa de cura com o esquema de tratamento atual é semelhante às taxas do esquema anterior

(rifampicina, isoniazida e pirazinamida nos dois primeiros meses seguido de isoniazida e rifampicina por quatro meses). O percentual de abandono (17,5%),



**Figura 3:** Mecanismos de ação dos antibióticos antituberculose de primeira linha.

**Fonte:** Adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases, (2012).

neste estudo, foi superior a taxa preconizada como adequada (até 5%) o que sugere que o novo tratamento não possui o impacto significativo esperado na adesão ao tratamento.

Segundo Chirinos e Meirelles (2011), os fatores associados ao abandono do tratamento estão relacionados, principalmente, aos aspectos sociodemográficos que interferem diretamente na adesão, tais como, baixa escolaridade, gênero, utilização de fármacos, qualidade do atendimento no sistema de saúde e aos problemas relacionados ao tratamento da doença em si. Com relação à não-adesão ao tratamento Teixeira e colaboradores (2011) concluíram que os fatores relacionados, além daqueles citados por Chirinos e Meirelles, são a faixa etária menor de quarenta

anos, o local de residência, as reações adversas aos medicamentos e o desconhecimento das interações medicamentosas.

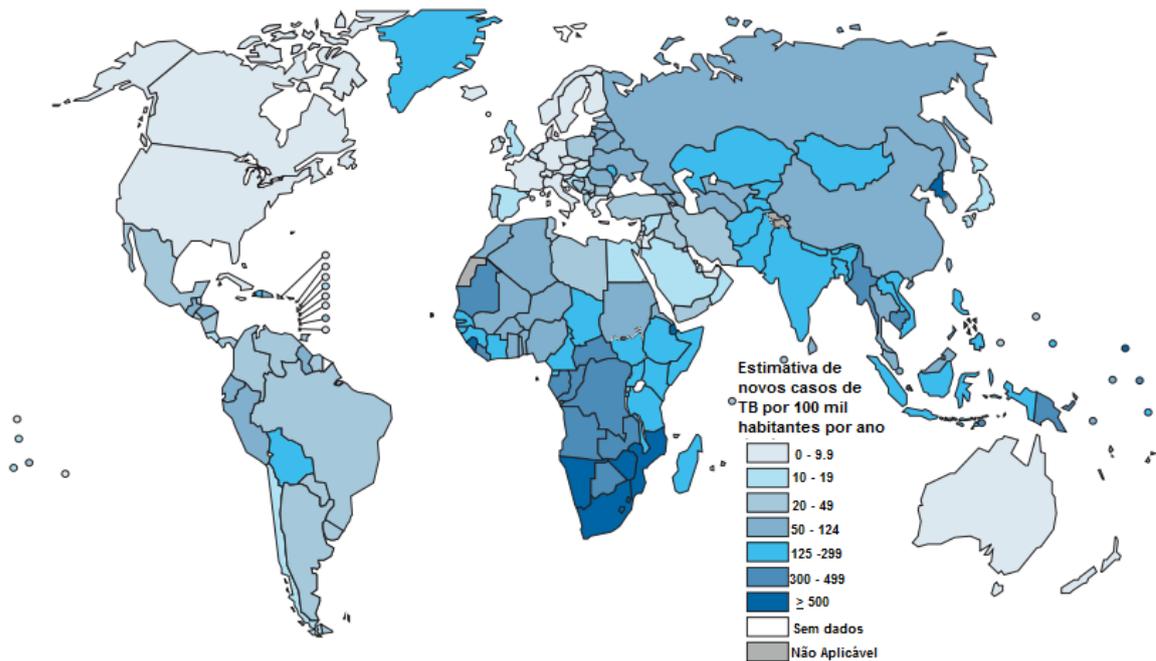
Embora cepas multirresistentes sejam selecionadas constantemente, há quarenta anos não são lançadas novas drogas no combate à tuberculose (WHO, 2013). Assim, se faz necessária a busca de opções terapêuticas contra o microrganismo que atuem de forma rápida e menos tóxica ao homem, reduzindo desta forma, o tempo, os efeitos colaterais e os custos do tratamento. Neste cenário, as plantas medicinais têm se mostrado como uma boa alternativa para o desenvolvimento de medicamentos alternativos para o tratamento da TB.

Estudos recentes demonstraram que espécies vegetais como o óleo de copaíba (*Copaiba* sp.) possuem atividade antimicobacteriana *in vitro* e *in vivo* (DOS SANTOS et al, 2008;CASTILHO, 2010).

Neste contexto, as espécies vegetais amazônicas, em especial *Eucalyptus* sp. e *Chenopodium ambrosioides* são indicadas como possíveis novos agentes antimicobacterianos devido aos relatos etnofarmacêuticos e aos estudos científicos já apresentados associando a utilização destas espécies no tratamento da TB (LEITE et al, 1998; NEWTOM et al, 2000; MCGAW et al, 2008) A descoberta de novas opções terapêuticas para o tratamento da tuberculose constitui grande desafio, pois as micobactérias são microrganismos patogênicos de crescimento lento, cuja parede, rica em lipídeos, constitui-se em verdadeira proteção contra os agentes agressores (HETT e RUBIN, 2008).

### 2.2.1 Epidemiologia da Tuberculose

A TB é uma doença crônica, sendo a segunda principal causa de morte a partir de agente infeccioso no mundo e a primeira entre os pacientes com AIDS. Em 2013, 51 milhões de casos de TB foram diagnosticados em todo o mundo, porém, três milhões de pessoas não tem acesso ao tratamento (WHO, 2013). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 ocorreram 8,6 milhões de novos casos de TB no mundo (Figura 4) com consequente morte de 1,3 milhões de indivíduos. Deste total, 29% foram detectados no sudeste da Ásia, 27% na África, 19% nas regiões do Pacífico Oeste, 26% na Índia e 12% na China.



**Figura 4:** Taxa de incidência de tuberculose no mundo em 2012.

**Fonte:** Adaptado de Organização Mundial da Saúde, 2013.

O Brasil está na lista de 22 países que concentram 80% dos casos mundiais de TB e ocupa o décimo quinto lugar com o maior número de casos. Em 2012, foram registrados 70.047 novos casos da doença e, ao se comparar com os números de 2011, se observa que houve uma redução de 1,8% no número de casos (WHO, 2013). De acordo com o Ministério da Saúde (2013), 66,8% dos pacientes notificados são homens e a doença ocorre principalmente na faixa dos 25 aos 34 anos, em ambos os gêneros. São considerados grupos de risco, indígenas, presidiários, moradores de rua e pessoas com HIV. Os números mais recentes de óbitos são de 2010, quando a taxa de mortalidade por tuberculose foi de 2,4 pessoas por 100 mil habitantes, dentre os quais foram registrados 4,6 mil mortes em decorrência da doença (BRASIL, 2013).

As distribuições dos casos de TB ocorrem em 315 dos 5.564 municípios do País, correspondendo a 70% de todos os casos (SINAN, 2013). Entre as regiões do Brasil, o Sudeste registrou 44,1% dos casos em 2012, seguido pelo Nordeste (27,1%), Sul (12,3%), Norte (11,7%) e Centro-Oeste (4,7%). O estado do Amazonas teve a maior incidência de casos da região Norte, seguido pelo estado do Pará (BRASIL, 2014). Em 2012, o Pará registrou 3.443 novos casos de tuberculose, com incidência de 44,4 casos para cada 100 mil habitantes, número bem superior ao indicado como

aceitável pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que é de 30 casos a cada 100 mil habitantes. Essa incidência foi a quinta maior do país, sendo que as maiores ocorreram no Amazonas (68%), Rio de Janeiro (65%), Pernambuco (49,6%) e Rio Grande do Sul (44,7%) (BRASIL, 2013).

De acordo com os dados da Secretária Estadual de Saúde do Pará (2013) os municípios de Abaetetuba, Ananindeua, Belém, Bragança, Castanhal, Marituba e Santarém são prioridades para o controle da tuberculose pelo Ministério da Saúde, inseridos em uma lista de 181 municípios em todo o Brasil. Os dados mais recentes sobre a mortalidade no Estado do Pará são de 2011, ocorreram 2,7 óbitos por 100 mil habitantes, superando a taxa nacional que é de 2,4. Por outro lado, os percentuais de cura e abandono foram de 71,9% e 7,6%, respectivamente (SESPA, 2013). Em 2012, as maiores taxas de incidência entre as capitais do Brasil, ocorreram em Cuiabá (105,82), seguido por Porto Alegre (105,24), Recife (102,38), Belém (98,34), Manaus (95,28) e Rio de Janeiro (95,13) (SINAN, 2014).

### **2.3 *Mycobacterium fortuitum***

As espécies pertencentes ao complexo *M. fortuitum* que incluem *Mycobacterium houstonense*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium septicum* e *Mycobacterium fortuitum* são saprófitas encontradas no solo e na água, crescem rapidamente (3 a 6 dias) em cultura, não formam pigmento e apresentam alta predisposição para formar biofilme. São raros os casos de infecções sistêmicas em seres humanos. Os casos mais frequentes estão associados às infecções secundárias em tecidos subcutâneos profundos por trauma ou infecções associadas a cateteres venosos, curativos contaminados, dispositivos prostéticos como válvulas cardíacas, diálise peritoneal ou broncoscopia (WITEBSKY e CONVILLE, 2005; MURRAY et al, 2009; BROOKS et al, 2010).

Na Coréia do Sul em 2010, um estudo de investigação em 29 pacientes suspeitos de infecções por micobactérias atípicas associadas a lesões cutâneas foram encontradas e isoladas no material biológico, predominantemente as espécies *M. abscessus* e *M. fortuitum* (LEE et al, 2010). Em um estudo de caso na Venezuela,

Guevara-Patiño (2010) relata infecção após acunpatura em tecidos moles por *M. fortuitum*.

No entanto, há indícios de que dados epidemiológicos sobre infecções por bactérias pertencentes ao complexo *M. fortuitum* são subnotificados. Um dos levantamentos mais recentes no Brasil, feito por Padoveze e colaboradores (2011) relata que, entre os anos de 1999 a 2009 foram notificados 2520 casos de infecções associadas às micobactérias de crescimento rápido, destes, 117 casos foram decorrentes de *M. fortuitum* (13,8%). As infecções por *M. fortuitum* ocorrem, principalmente, durante videocirurgia, mamoplastia e procedimentos invasivos não cirúrgicos. Segundo a ANVISA no período de 1999 a 2009, o Rio de Janeiro foi o estado com o maior número de notificações com 1107 casos e o Pará o terceiro, com 327. Em 2003, teve início a epidemia de casos no Pará, com crescente número de notificações em 2004, sendo Belém um dos 11 municípios responsáveis por 88,8% dos casos no Brasil (ANVISA, 2009).

Dentre as MNT, o complexo *M. fortuitum* é o principal agente causador de infecções secundárias associadas à mamoplastia com acesso convencional ou por videocirurgia, com ou sem implante (ANVISA, 2009). Esta micobactéria de crescimento rápido também está relacionada às infecções por *piercing* (ABBAS et al, 2014), nasal (NGUYEN, 2011), próteses (MACADAM et al, 2007) e infecções renais (SERRA et al, 2007). *M. fortuitum* pode causar ainda pneumonia, abscesso em pacientes imunocomprometidos e com predisposição a doenças pulmonares. Fabian e colaboradores (2011) relataram um caso de uma paciente com derrame pleural hemorrágico decorrente de *M. fortuitum*, sem outro agente patogênico. Há relatos de casos de surtos em ambiente não hospitalar, a exemplo de um surto de infecção em 110 clientes com furunculose decorrente de infecções por *M. fortuitum* em um salão de beleza onde todas as pessoas acometidas haviam sido submetidas a procedimentos como depilação e hidromassagem (WINTHROP et al, 2004).

De acordo com o “Clinical and Laboratory Standards Institute” CLSI (2011) e a ATS “American Thoracic Society” (2007), o método recomendado para identificar a sensibilidade das MCR aos antimicrobianos é o método de macro ou microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em meio líquido, e deve ser realizado somente para as espécies: Complexo *M. avium* (MAC), *M. kansasii*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, e *M. fortuitum*. Para as demais espécies

não se recomenda a realização do teste de susceptibilidade *in vitro* devido à falta de estudos que comprovem a relação entre os resultados do teste *in vitro* e *in vivo*.

Com relação ao tratamento, com frequência ocorre resistência natural a fármacos antimicrobianos utilizados para o tratamento de tuberculose, assim o esquema terapêutico é baseado na susceptibilidade das bactérias da tuberculose aos fármacos antimicrobianos, dos quais destacamos: ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, trimetoprima, sulfametoxazol, linezolida, doxiciclina, claritromicina, azitromicina (por via oral); imipenem, tigeciclina, linezolida, amicacina, ceftioxima (por via parenteral) (BROWN-ELLIOT et al, 2012). Ressalta-se, portanto, a importância do isolamento da cultura, a identificação da espécie correta e a realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos para o tratamento adequado (SCHIAVO, 2012).

Devido à utilização inadequada de antimicrobianos, cepas multirresistentes podem ser continuamente selecionadas. Um estudo de Ramon-Garcia (2006) associa a resistência à estreptomicina de *M. fortuitum* à mutação gênica. Conforme revisado por Brown Elliot e colaboradores (2012), a resistência às quinolonas, dentre elas moxifloxacino e ciprofloxacino, está relacionada ao pré-tratamento com esta classe de antimicrobiano, assim como ocorre com os medicamentos polimixina B e sulfonamidas.

Os dados científicos relatam surtos e a ubiquidade de infecções por *M. fortuitum*. Visto que se trata de um patógeno oportunista ainda sem notificação compulsória e com tratamento não padronizado. Salienta-se a necessidade da pesquisa por compostos para o tratamento de infecções decorrentes de MCR. Em busca de opções para o tratamento contra as MCR, em especial contra as Micobactérias do Complexo *M. fortuitum*, as plantas medicinais são promissoras por apresentarem atividade antimicobacteriana *in vitro*. O extrato etanólico de *Lafoensia pacari* (LIMA et al, 2006), o extrato metanólico de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh e *Eucalyptus torelliana* (LAWAL et al, 2011), são exemplos de plantas que apresentaram atividade frente ao microrganismo.

## 2.4 Plantas Medicinais

As plantas medicinais que possuem relatos etnofarmacêuticos com propriedades farmacológicas comprovadas são candidatas para estudos que podem resultar em sua utilização clínica ou no desenvolvimento de insumos farmacêuticos ativos eficazes e com efeitos adversos reduzidos, sendo necessárias avaliações não clínicas e clínicas (SOUSA et al, 2010). Das espécies da flora amazônica utilizadas na medicina popular e que possuem potencial como novos agentes farmacológicos destacam-se os gêneros *Eucalyptus* (VITTI e BRITO, 2003) e a espécie *Chenopodium ambrosioides* L (YADAV et al, 2007).

## 2.5 Família Amaranthaceae

As espécies representantes desta família exibem características variadas, em sua maioria são arbustos, subarbustos ou trepadeiras, anuais ou perenes (HARWOOD & PALMER, 2011; SIQUEIRA, 2002). A família Amaranthaceae Juss. é considerada tropical e subtropical sendo encontrada principalmente na América e África (GONZALES, 2010; ELIASSON, 2004). Composta por cerca de 160 gêneros, 2360 espécies, sendo 146 destas encontradas no Brasil (FANK-DE-CARVALHO et al, 2012; GONZALES, 2010). A família Amaranthaceae, recentemente, englobou a família Chenopodiaceae, sendo o maior gênero *Chenopodium* L. (60 spp.) (JUDD et al, 2002 apud MARCHIORETTO 2010; APG II). Pelo menos 22 espécies Amaranthaceae são utilizadas na medicina popular. Dentre as espécies medicinais dessa família pode-se citar *C. ambrosioides* L. (FANK-DE-CARVALHO et al, 2012).

Dentre as inúmeras atividades biológicas atribuídas às espécies pertencentes à família Amaranthaceae tem-se a atividade do extrato metanólico de *Amaranthus tricolor* L. (Amaranthaceae) *in vitro* frente à *M. tuberculosis* (MOHAMAD et al, 2011).

## 2.6 Gênero *Chenopodium*

O gênero *Chenopodium* compreende aproximadamente 250 espécies nativas da Europa, Ásia, América do Norte e América do Sul (KADEREIT, 2005; SMITH, 2006), inclui plantas anuais ou perenes, com odor característico e forte, glandular, folhas alternas, multipecioladas, com flores pequenas e verdes (DURETTO, 2011; STANDLEY, 1936). Investigações sobre a composição química das espécies do gênero *Chenopodium* revelaram grande quantidade de constituintes orgânicos, tais como: minerais, aminoácidos, compostos apolares, proteínas, hormônios e vitaminas (KOKANOVA-NEDIALKOVA, NEDIALKOV, NIKOLOV, 2009). Além disso, Dembitsky et al (2008), em estudo sobre a composição química do óleo essencial das folhas de 13 espécies do gênero *Chenopodium*, isolaram e identificaram metabólitos majoritários descritos na Tabela 1.

Yadav et al (2007) relataram que as espécies *C. album*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. botrys*, *C. multifidum*, *C. anthelminticum*, *C. murale*, *C. chilense* e *C. ambrosioides*, apresenta atividade biológica comprovada cientificamente. Dentre os metabólitos majoritários o terpeno ascaridol, seus isômeros cis-ascaridol e trans-ascaridol, limoneno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -terpineno, cânfora,  $\gamma$ -terpineno, pinocarvona são encontrados em espécies do gênero *Chenopodium*, os quais são atribuídas atividades citogenética, citotóxica e hemaglutinante, anti-*T.cruzi*. das espécies *C. multifidum*, *C. anthelminticum* e *C. ambrosioides*.

**Tabela 1** Os constituintes majoritários isolados de espécies do gênero *Chenopodium*

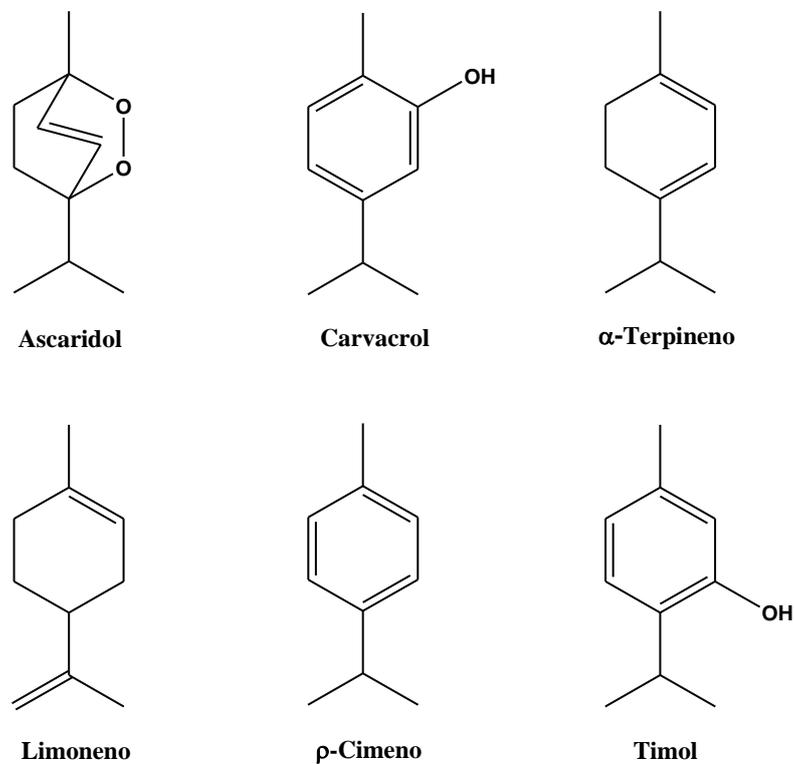
<b>METABOLITOS MAJORITÁRIOS</b>	<b>ESPÉCIES</b>
<b>Ascaridol</b>	<i>C. murale</i> , <i>C. foliosum</i> , <i>C. rubrum</i> , <i>C. missouriense</i> , <i>C. álbum</i> ; <i>C. opulifolium</i> , <i>C. polysperm</i> , <i>C. vulvaria</i> , <i>C. ambrosioides</i>
<b>Cis-Ascaridol</b>	<i>C. ambrosioides</i>
<b>Trans-Ascaridol</b>	<i>C. ambrosioides</i>
<b>Limoneno</b>	<i>C. murale</i> ; <i>C. polyspermum</i> , <i>C. álbum</i> ; <i>C. urbicum</i>
<b>p-cimeno</b>	<i>C. foliosum</i> ; <i>C. quinoa</i> ; <i>C. betrays</i>
<b>α-terpineno</b>	<i>C. rubrum</i> ; <i>C. missouriense</i> ; <i>C. ficifolium</i> ; <i>C. botrys</i>
<b>Cânfora</b>	<i>C. opulifolium</i> ; <i>C. quinoa</i>
<b>γ-terpineno</b>	<i>C. ficifolium</i>
<b>Pinocarvona</b>	<i>C. urbicum</i>

## 2.7 *Chenopodium ambrosioides* L

*Chenopodium ambrosioides* é uma planta herbácea anual ou perene, com aroma característico, ereta, atinge até 1,5 m de altura, com folhas pubescentes de cor verde-escura e canforada (LAMEIRA E PINTO, 2008). Esta planta é nativa da América Central e do Sul, ocorre em todos os países tropicais e temperados (LORENZI e MATOS, 2002). No Brasil, *C. ambrosioides* L. é conhecida como mastruz ou erva de Santa Maria e é amplamente utilizada na medicina popular (SOUZA et al, 2011). Estudos etnofarmacêuticos realizados na comunidade ribeirinha e urbana do município de Igarapé-Miri (Pará) em 2000 e 2008 denotaram o uso de *C. ambrosioides* na forma de chás, sumo e xarope, sendo utilizadas as folhas

para tratar vermes, inflamação uterina, tosse, baque, pneumonia, expurgar catarro, problemas no estômago, gastrite, quebra-dura e tuberculose (BARBOSA et al, 2011). A distribuição é difundida por quase todo o território e a planta possui outros diversos nomes populares: Quenopódio, Erva-de-santa-Maria, Mastruço, Mastruz, canudo, erva-santa e erva-das-lombrigas (LAMEIRA e PINTO, 2008).

Uma análise fitoquímica preliminar por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) feita por Jardim et al (2010) permitiu a identificação de  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno, (Z)-ascaridol, (E)-ascaridol, carvacrol e álcool benzílico presentes no extrato hexânico.



**Figura 5: Estrutura dos constituintes monoterpênicos presentes no extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides***

**Fonte:** Adaptado de DEMBITSKY et al, 2008

Em outro estudo, no óleo essencial foram identificados  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno, álcool benzílico, *p*-cresol, *p*-cimen-8-ol,  $\alpha$ -terpineol, (Z)-ascaridol, (E)-ascaridol, piperitona, carvacrol, acetato de piperitol, (Z)-acetato de carvila, *p*-menta-1,3,8-trieno, limoneno, timol (Figura 6) (JARDIM et al, 2008). *C. ambrosioides* tem elevada

quantidade percentual de monoterpenos, principalmente no óleo essencial (MONZOTE et al, 2009), sendo que o monoterpeno ascaridol é o composto mais abundante no gênero *Chenopodium* (DEMBITSKY et al, 2008).

As atividades biológicas associadas ao monoterpeno ascaridol são efeitos analgésico e sedativo (EFFERTH et al, 2002) e anti-helmíntico (OKUYAMA et al, 1993). Jardim e colaboradores (2008) associaram pela primeira vez em seu estudo a atividade antifúngica do óleo essencial do mastruz ao componente majoritário ascaridol. Outros estudos também demonstraram que esta espécie possui as seguintes atividades: fungicida (JARDIM et al, 2010), nematicida (MAC DONALD et al, 2004), anti*Leishmania amazonensis* e *L. donovani* (MONZOTE 2007; MONZOTE, 2007a), anti*Trypanossoma cruzi* (KIUCHI, 2000; UCHIYAMA, 2009), anti-*Plasmodium falciparum* (POLLACK, 1990), anti*Schistosoma mansoni* (KAMEL et al., 2011), anti-inflamatória (GRASSI et al, 2013), antinociceptivo (SOUZA et al, 2012; GRASSI et al, 2013), imunoestimulatória de macrófagos (CRUZ et al, 2007), antineoplásica (NASCIMENTO et al, 2006) e antibacteriana (LALL & MEYER, 1999; SOUZA et al, 2012a). Além dessas atividades, Lall e Meyer (1999) descreveram a atividade do extrato acetato de etila da planta contra *M. tuberculosis*.

Dados da Literatura sobre o *C. ambrosioides* relatam que a planta medicinal pode ser potencialmente tóxica (VEIGA e PINTO, 2005; SIMÕES et al, 2007). Contudo, Pereira (2010) ao avaliar o tratamento subcrônico com o extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* em ratos observou que o extrato não foi letal nas doses de 5 a 500 mg/kg e não induziu alterações toxicológicas, estes resultados o levaram a sugerir que o uso desta espécie é seguro na dose adequada. O extrato aquoso desta espécie vegetal apresentou efeito citotóxico em cultura de linfócitos (GADANO et al, 2007). A presença de metabólitos secundários monoterpênicos em *C. ambrosioides* com aplicações terapêuticas comprovadas, além de trabalhos que demonstraram a atividade antimicobacteriana desta espécie, associado ao uso popular no combate à tuberculose, sugere o seu potencial antimicobacteriano.

## 2.8 Família Myrtaceae

A Família Myrtaceae encontra-se distribuída em todo o mundo, principalmente em áreas subtropicais e neotropicais, representando uma das principais famílias da flora brasileira com 26 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2002 apud PEREIRA, 2010). Essa família inclui gêneros como *Callistemon*, *Myrtus*, *Psidium*, *Eugenia*, *Syzygium*, *Leptospermum*, *Melaleuca* e *Eucalyptus*, sendo representada por várias espécies medicinais (LANDRUM e KAWASAKI, 1997).

As espécies neotropicais de Myrtaceae são perenes com hábito arbustivo, folhas alternas ou opostas, raramente ternadas ou sub-opostas, com nervura marginal que possuem glândulas secretoras de óleo (GEORGE, 1988), sendo fonte promissora de compostos utilizados em estudos químicos e farmacológicos (LEE et al, 2001; SALIB e MICHAEL, 2004; BEGUM et al, 2002). Classes de substâncias químicas com atividades farmacológicas importantes já foram isoladas de plantas dessa família, tais como flavonoides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e taninos (CRUZ e KAPLAN, 2004). Uma das características marcantes desta família é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (BARROSO et al, 1984).

Segundo Carvalho e colaboradores (2002), muitas espécies dessa família apresentam emprego terapêutico, tais como, anti-inflamatório, antineoplásico, antiviral e são utilizadas na medicina popular no controle de diarreias e outros distúrbios gastrointestinais. Pavan e colaboradores (2009) relataram que a fração acetato de etila de frutos de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) mostrou um efeito inibitório contra cepas de *M. tuberculosis*.

## 2.9 Gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* compreende espécies botânicas que se encontram distribuídas em todo o mundo, principalmente na América tropical, Austrália e em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (COPPEN, 2002), é representado por mais de 900 espécies e subespécies, sendo popularmente conhecido como eucalipto (BROOKER & KLEINIG, 2004).

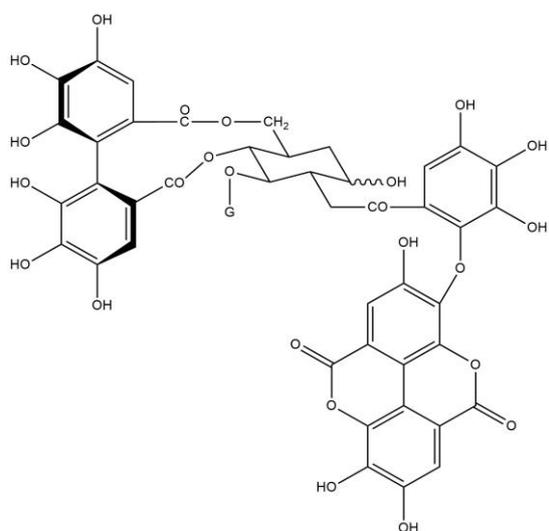
O eucalipto é cultivado para as mais diversas finalidades, tais como, papel, lenha, carvão, aglomerado, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação, quebra-vento e celulose (ANDRADE, 2006). O óleo de eucalipto possui outras utilizações comerciais presentes nas indústrias de perfumaria, sendo largamente utilizado nos produtos de limpeza, como sabões e desinfetantes (VITTI e BRITO, 2003). Os óleos provenientes do eucalipto são utilizados também na medicina popular para tratar resfriado e tosse. Além disso, eles são usados também como insumos farmacêuticos para xaropes, pastilhas, soluções nasais, bochechos e relaxante muscular. O componente das folhas, denominado cineol, demonstra atividades expectorante e descongestionante nasal, proporcionando propriedades antissépticas (ADENIYI e AYEPOLA, 2008). *Eucalyptus* é conhecido por ser rico em compostos bioativos naturais incluindo terpenoides, taninos, flavonoides e derivados floroglucinol (SING, MONIKA & SUSHIL, 1999).

Investigações científicas têm mostrado que os extratos de eucalipto possuem atividades anti-hiperglicêmica, antioxidante, antifúngica, inseticida e antimicrobiana (RAMEZANI et al, 2002; TAKASHI, KOKUBO & SAKAINO, 2004). Estudos realizados com os óleos das folhas de oito espécies de *Eucalyptus* demonstraram atividade antimicobacteriana (LEITE et al, 1998). Dentre as espécies de eucalipto cultivadas em território brasileiro, o *E. alba* Reinw ex Blume é uma espécie que merece atenção devido a escassez de estudos sobre a mesma.

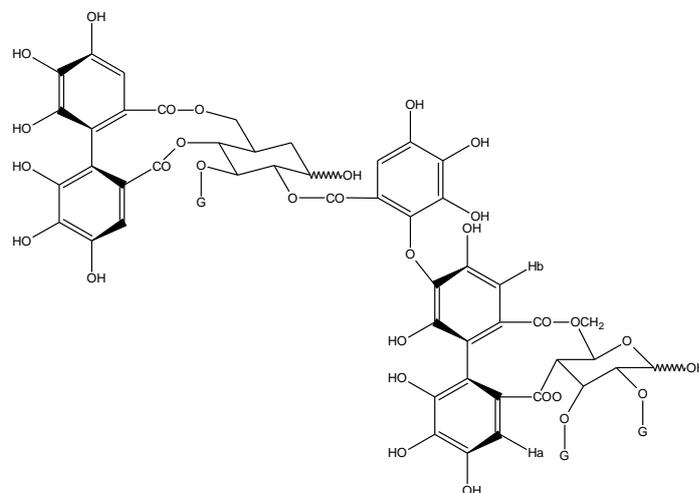
## 2.10 *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume

As espécies de *E. alba* são comumente árvores de porte médio sem dominância apical e de tronco torto, casca lisa e folhas longas (EMBRAPA, 2008). Estudos a respeito da composição do óleo essencial das folhas de *E. alba* demonstraram a ocorrência de diferentes mono e sesquiterpenos em quantidade significativa (SINGH et al, 1983 apud OYEDEJI et al, 1999). Cimanga e colaboradores (2002) realizaram uma análise preliminar por CG/EM e identificaram os componentes majoritários  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, limoneno, *p*-cimeno, 1,8-cineol,  $\beta$ -terpineol,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -cariofileno, espatulenol, globulol, citronelol,  $\alpha$ -eudesmol e  $\beta$ -eudesmol. Neste mesmo estudo os autores evidenciaram a atividade antibacteriana de óleo essencial extraído de *E. alba* contra *Pseudomonas aeruginosa* e chegaram a conclusão de que a atividade do óleo essencial foi mais eficaz que os componentes majoritários 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno e *p*-cimeno, isolados e testados. Yoshida et al (1992) encontraram elagitaninos e taninos hidrolisáveis, incluindo o dímero Oenoteína B, Eucalbaninas A, B e C foram isolados na espécie *E. alba* (Figura 8).

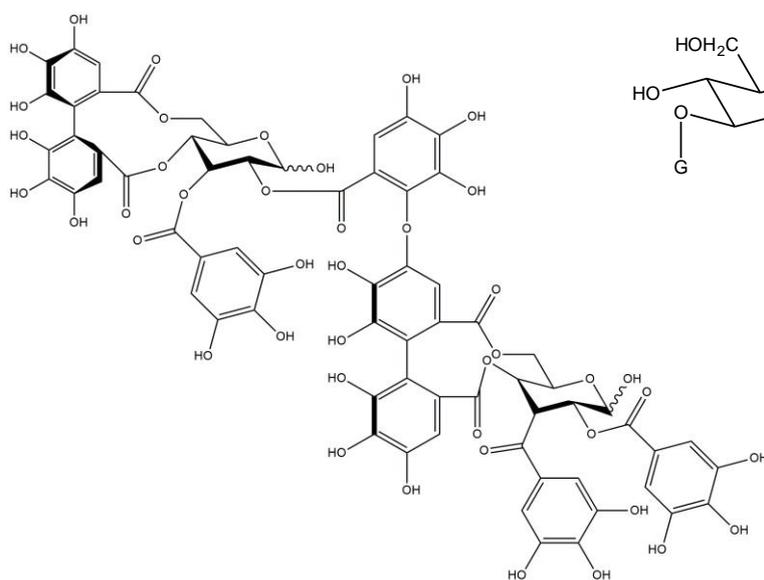
A observação da atividade antimicobacteriana dos compostos monoterpenicos e fenólicos obtidos das espécies do gênero *Eucalyptus*, possui poucos dados na literatura científica, especialmente não há dados para *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume no Brasil. Este fato reforça a importância para a necessidade de aprofundar os conhecimentos fitoquímicos e as possíveis atividades biológicas dos extratos vegetais, visando avaliar o uso como insumo farmacêutico.



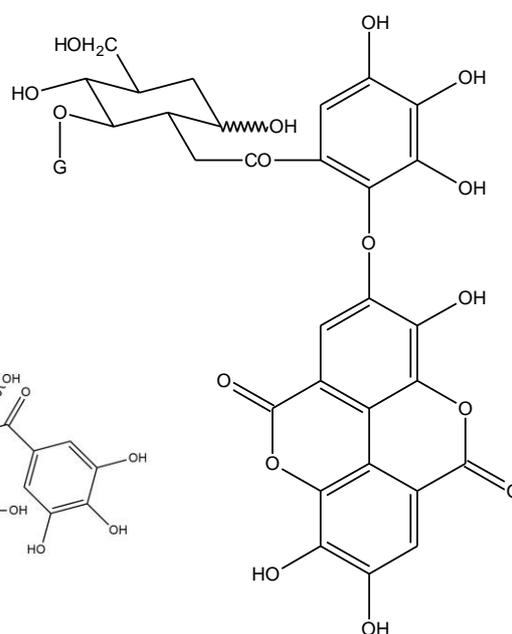
Eucalbanina A



Eucalbanina C



Eucalbanina B



Oenotheina B

**Figura 6: Estrutura dos principais compostos fenólicos encontrados no extrato do fruto de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume**

Fonte: Adaptado de Yoshida et al 1992.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade de extrato hidroetanólico de *Chenopodium ambrosioides* e *Eucalyptus alba* frente a cepas de *Mycobacterium* sp. *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar os controles de qualidade físico-químico e microbiológicos do extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* L. e de *E. alba*;
- Caracterizar a ação dos extratos hidroetanólicos e frações frente às cepas de *Mycobacterium* sp.
- Definir o perfil fitoquímico dos extratos ativos nos testes *in vitro*;
- Determinar a citotoxicidade dos extratos e frações;
- Determinar a atividade anti-inflamatória ou imunomodulatória dos extratos;
- Determinar a toxicidade oral aguda dos extratos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Matéria-prima Vegetal

O material vegetal da espécie *C. ambrosioides* (10 kg) foi obtido no Mercado do Ver-o-Peso, procedente da região metropolitana de Belém-PA, distrito de Icoaraci, coletado no mês de junho de 2012. Este material vegetal forneceu 2,3 Kg de folhas da planta que após a secagem e trituração produziu 525 g de droga vegetal. A identificação de um espécime herborizado foi realizada pela Dra. Silvane Tavares Rodrigues, ficando a exsicata depositada no herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), registrada sob o número IAN188445 (Figura 5).

O material vegetal de *E. alba* (10 kg) foi obtido na Universidade Federal do Pará, próximo a Faculdade de Farmácia-UFPA, Belém Pará, coletado em 9 de outubro de 2012. A seleção do material vegetal forneceu 3 Kg de folhas que após a secagem e trituração produziu 900 g de droga vegetal. A identificação botânica de um espécime herborizado foi realizada pela Dra. Silvane Tavares Rodrigues, ficando a exsicata depositada no herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), registrada sob o número IAN188446 (Figura 7).



**Figura 7: Exsicata da espécie *Chenopodium ambrosioides* L. sob número de registro IAN 188445**

Fonte: Autor, 2013



**Figura 8: Exsicata de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume sob número de registro IAN 188446**

Fonte: Autor (2013)

#### 4.1.2 Reagentes e Soluções

Acetato de etila P.A - Sigma Aldrich, ácido clorídrico (HCl) 5% - Quimex, ácido sulfúrico P.A - Quimex, água destilada, água destilada estéril, água ultra-pura, álcool etílico 70%, clorofórmio P.A - Sigma Aldrich, dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma Aldrich, éter etílico P.A - Labsynth, hexano P.A - Sigma Aldrich, Metanol P.A - Vetec, isopropanol P.A - Vetec. Reativo de Pascová, reativo de Fehling A e B, reativo de Bouchard, reativo de Dragendorff, reativo de Mayer, reativo de Keede, solução de hidróxido de amônia, hidróxido de sódio 1N e 2N, lugol, solução aquosa de Nihidrina a 1%, solução alcoólica de cloreto férrico a 1%, ácido clorídrico concentrado, raspas de magnésio, solução aquosa de vanilina a 1%, azul de toluidina 1%, peróxido de hidrogênio. Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (Himedia), ágar Nutriente (Himedia), ágar Lactose (Himedia), caldo Middlebrook 7H9 (Sigma Aldrich), ágar DMEM/F-12 (GIBCO), soro fetal bovino (Sigma Aldrich), Tubos com meio Ogawa Kudoh (Laborclin), ágar Löwenstein Jensen (Himedia), Isoniazida (Sigma Aldrich), Muller-Hinton II (Himedia), TSA (Himedia), Resazurina (Sigma Aldrich), LPS (Sigma Aldrich), Triton X-100 (Vetec Chemical), Formazan (Sigma Aldrich), Reagente de Griess (Sigma Chemical).

#### 4.1.3 Equipamentos

Estufa termoestabilizada Quimis Q-314M222; estufa modelo S805T (BIOPAR); moinho de facas marca NOGUEIRA, modelo DM JUNIOR; agitador eletromagnético para peneiras (Bertel); balança analítica modelo BK 500 (GEHAKA); forno mufla modelo 355I (ENGRO); potenciômetro modelo pH33B (pHTek); evaporador rotativo com banho-maria modelo 802 série 72025 (Fisatom), bomba de vácuo modelo TE-058; banho de ultra-som Ultrasonic Cleaner modelo 1450 Unique (MaxiClean), balança analítica FA2104N (Bioprecisa); câmara de luz ultravioleta 254-365 nm; liofilizador modelo LIOB003 (LIOBRAS) acoplado a bomba de vácuo modelo VLP-200 e ao filtro de óleo VPOF-110 (Thermo Savent); potenciômetro pH21 pH/mV meter (HANNA), analisador de umidade por infravermelho (GEHAKA IV-2000),

incubadora de CO<sub>2</sub> modelo COM-17AC (Sanyo); câmara de fluxo laminar modelo PA-115 (Pachane); espectrofotômetro (Dynatech MR5000); microscópio óptico (Olympus); Agitador vortex (Scientific Industries); cânula de gavagem.

## **4.2 Métodos**

Esta pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Processamento de Material Vegetal, Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) Farmacotécnico, Fitoquímica e Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA), nos laboratórios de Micobactérias da (UFRJ) e nos laboratórios de Microbiologia – Pólo Ajuda e Instituto Macaé de Metrologia e Tecnologia (IMMT) da UFRJ – Campus Macaé sendo ilustradas no fluxograma apresentado nas Figuras 9 e 10.

### **4.2.1 Processamento do Material Vegetal**

Para a realização do estudo, as folhas frescas foram separadas manualmente dos caules. O material vegetal de cada uma das espécies foi submetido à lavagem em água corrente para a retirada de impurezas macroscópicas e lavadas com álcool etílico a 70% para a retirada de possíveis contaminantes microbiológicos. Posteriormente exposto à temperatura ambiente por 24 horas e em seguida seco em estufa com corrente forçada de ar a uma temperatura de 40 °C durante período de sete dias. O material seco foi triturado em moinho de facas, no Laboratório Central de Extração da Faculdade de química da UFPA para a obtenção da droga vegetal que foi armazenada em recipiente hermeticamente fechado.

### **4.3 Caracterização físico-química das drogas vegetais de *C. ambrosioides* e *E. alba***

#### 4.3.1 Determinação da Granulometria das Drogas

Para calcular a granulometria das drogas, utilizou-se um tamisador. Cerca de 25 g das drogas dos materiais vegetais foram submetidas a uma série de tamises ordenados em ordem crescente de abertura de malha (1700  $\mu\text{m}$ ; 710, 355, 250, 180 e 125  $\mu\text{m}$ ) e agitados por 30 minutos (BRASIL, 2010). O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.3.2 Determinação da Perda por Dessecação em Balança por Infravermelho

O procedimento deve ser iniciado com a retirada da umidade do equipamento, através do programa de pré-aquecimento. Foi pesado cerca de 1 g das drogas que foram distribuídas uniformemente no coletor de alumínio contido no aparelho e foi selecionado o programa de secagem a 105 °C por 15 minutos. Foi registrado o valor da umidade, em percentual, mostrado no *display* do aparelho e o resultado representa a média aritmética e o desvio padrão de três determinações (BRASIL, 2010).

#### 4.3.3 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Nesta análise foram pesados 3 g de cada droga que foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados durante 30 minutos em forno mufla (600 °C), sendo posteriormente resfriados e pesados. As amostras foram distribuídas de maneira uniforme nos cadinhos e incineradas à temperatura de 600°C durante 180 minutos. Após resfriamento em dessecador, os cadinhos foram

pesados e calculou-se a porcentagem de amostra carbonizada em relação à droga seca ao ar. A operação foi repetida até peso constante e o resultado consiste na média aritmética de três determinações em porcentagem (% p/p). A determinação de cinzas totais foi realizada em triplicata.

#### 4.3.4 Determinação do Índice de Espuma

A determinação do índice de espuma seguiu as recomendações da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010). Sendo assim, transferiu-se cerca de 1 g das drogas vegetais para ehrlenmeyer contendo 50 mL de água fervente, mantendo o conteúdo sob fervura moderada durante 15 minutos. Em seguida, resfriou-se o conteúdo que foi filtrado sob algodão, passando para um balão volumétrico de 100 mL, e o volume foi completado com água destilada. Distribuiu-se o decocto obtido em 10 tubos de ensaio com tampa em uma série sucessiva de 1 a 10 mL, ajustando o volume do líquido em cada tubo para 10 mL com água destilada. Os tubos foram tampados e se fez agitação com movimentos verticais vigorosos por 15 segundos. No final, mediu-se a altura da espuma em repouso após 15 minutos.

Segundo a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010) se a altura da espuma de todos os tubos for inferior a 1 cm, o índice de espuma é menor do que 100. Se, em qualquer um dos tubos, a altura da espuma for de 1 cm, a diluição do material nesse tubo ( $A$ ) é o índice observado. O índice de espuma é calculado segundo a fórmula  $1000/A$ , sendo  $A$  o volume, em mL, do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada.

A determinação do índice de espuma foi realizada em triplicata e o resultado consiste na média aritmética e desvio padrão de três determinações.

#### **4.4 Obtenção e caracterização físico-química do extrato de hidroetanólico de *C. ambrosioides* e de *E. alba***

##### 4.4.1 Obtenção do Extrato Hidroetanólico de *C. ambrosioides* e *E. alba*

Foram preparados extratos hidroetanólicos pelo processo de maceração em temperatura ambiente, utilizou-se como líquido extrator uma solução de álcool etílico e água destilada (70%) na proporção de 1:5 partes de droga vegetal. A extração foi realizada por 7 dias, em um recipiente fechado ao abrigo da luz. As tinturas foram concentradas até resíduo em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos concentrados, que foram filtrados sobre filtro milipore de 0,22 µm; congelados e, em seguida, liofilizados para obtenção do extrato seco.

##### 4.4.2 Caracterização Físico-química dos Extratos Hidroetanólicos

###### 4.4.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 e os resultados correspondem à média e o desvio padrão de três determinações.

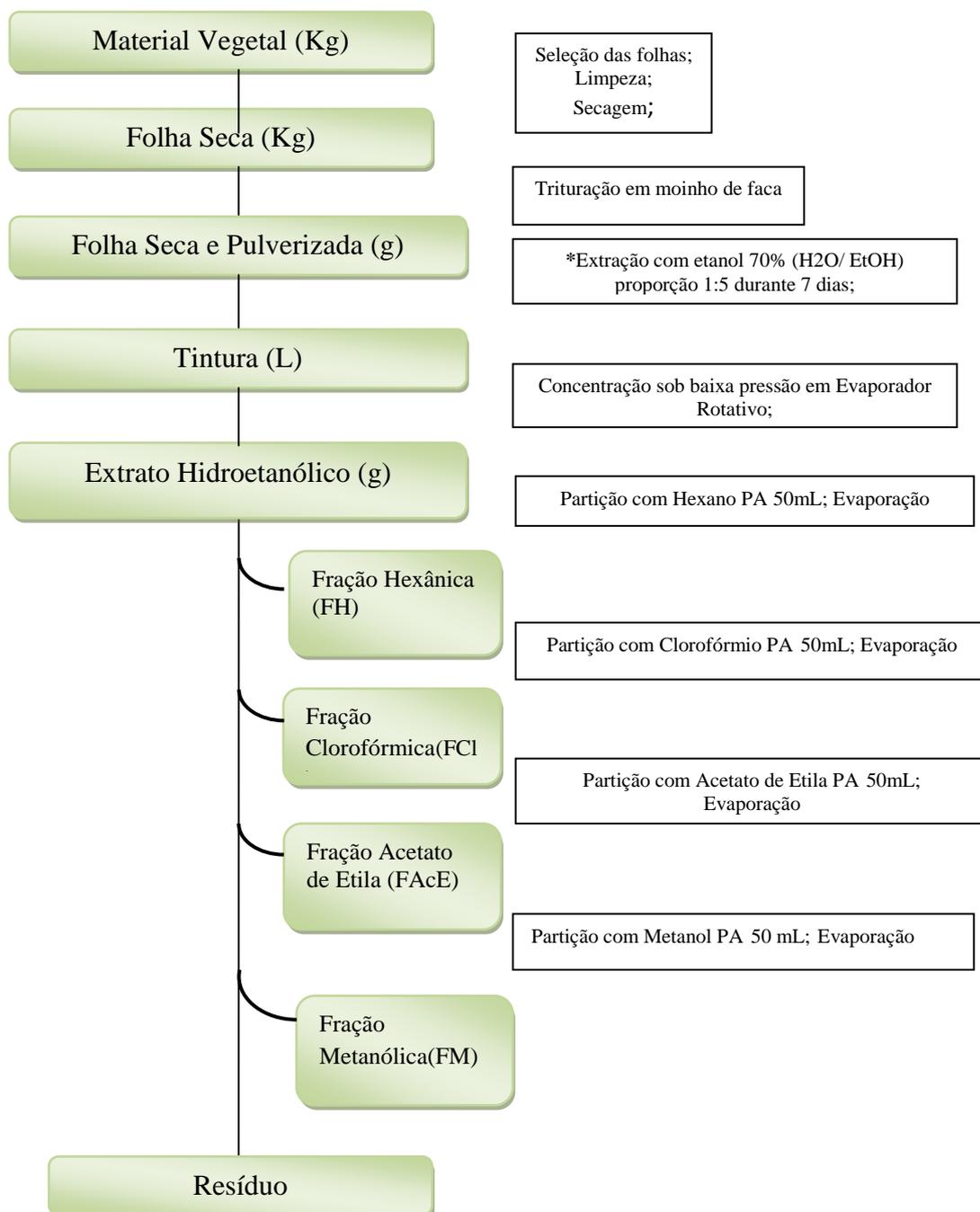
###### 4.4.2.2 Determinação do Teor de Sólidos dos Extratos

Foram preparadas três alíquotas de 2 mL de cada um dos extratos, que em seguida, foram distribuídos uniformemente em um coletor de alumínio, e posteriormente foram processados em um analisador de umidade por infravermelho, a 105°C durante quinze minutos. O valor do teor de sólidos foi dado em percentual,

e o resultado representa a média aritmética e o desvio padrão de três determinações (BRASIL, 2010).

#### **4.5 Obtenção das Frações Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e Metanólica de *C. ambrosioides* e *E. alba***

Para o fracionamento do extrato hidroetanólico foi empregado o método de partição sólido-líquido utilizando solventes em polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). Foram pesados aproximadamente 12,5 g do extrato hidroetanólico seco de *C. ambrosioides* e de *E. alba*. Para o extrato de *C. ambrosioides* foram adicionados sucessivamente alíquotas de 50 mL de cada um dos solventes na ordem citada acima. Assim, a fração hexânica (FH) foi obtida utilizando-se 27 alíquotas de 50 mL de hexano. Logo após, o solvente foi removido em evaporador rotativo. O resíduo foi submetido à partição com 17 alíquotas de 50 mL de clorofórmio e 4 alíquotas de 50 mL de acetato de etila para obter as frações clorofórmica (FCI) e acetato de etila (FAcE), respectivamente. Posteriormente, cada um dos solventes foi removido em evaporador rotativo. A fração metanólica (FM) foi obtida utilizando-se duas alíquotas de 50 mL de metanol. Em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotativo à pressão reduzida. As frações FH, FCI, FAcE e FM foram utilizadas neste estudo. As frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica de *E. alba* foram obtidas utilizando 2, 4, 3 e 5 alíquotas de 50 mL, respectivamente, de cada solvente.



**Figura 9** Fluxograma referente às atividades desenvolvidas para obtenção e fracionamento do extrato a partir das folhas de *C. ambrosioides* e *E. alba*.

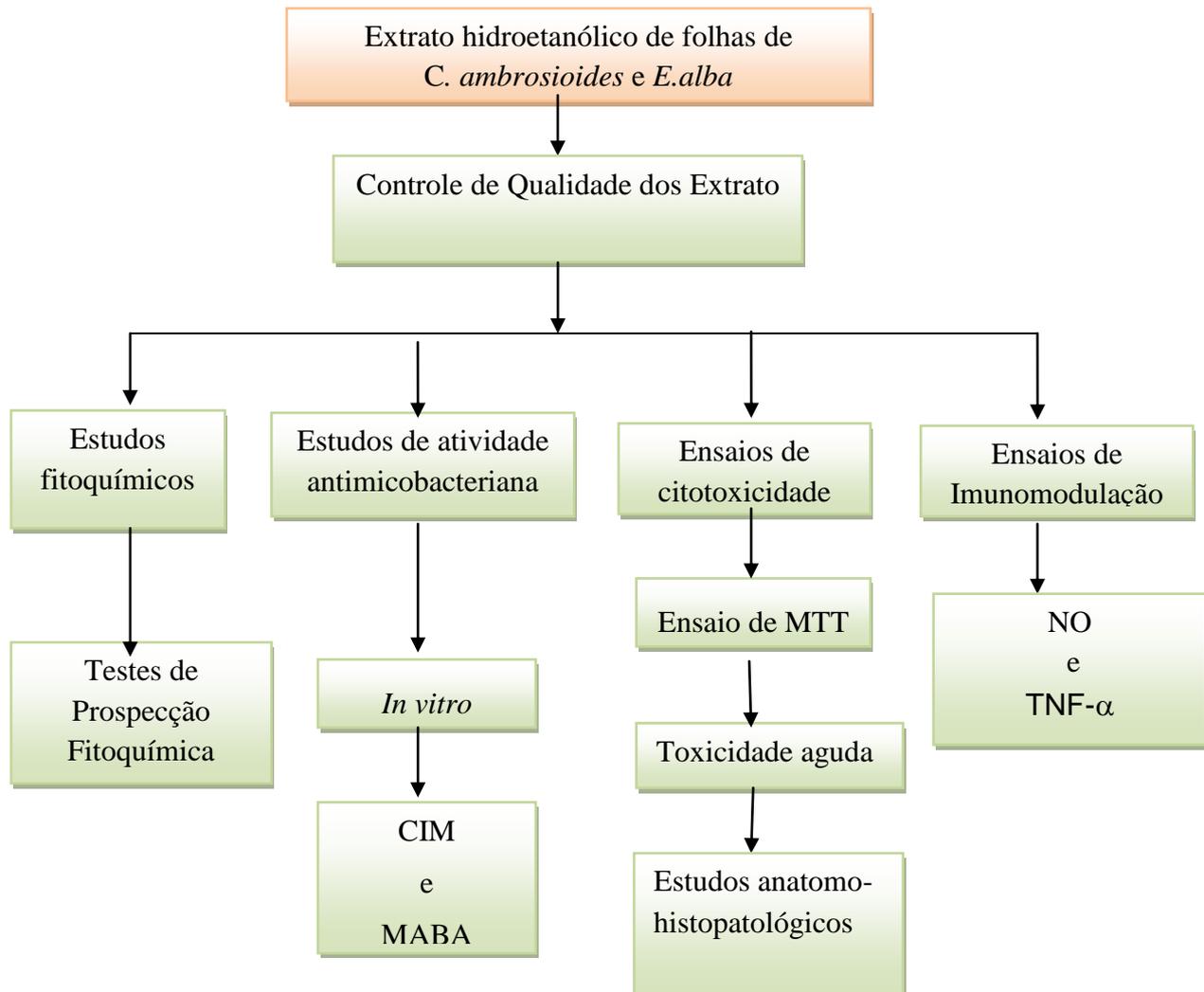
#### **4.6 Análise Fitoquímica Preliminar**

Essas análises objetivaram estabelecer a caracterização de diferentes classes de metabólitos secundários através de reações químicas. Alíquotas dos extratos hidroetanólicos das espécies vegetais foram submetidas à análise fitoquímica preliminar para identificação de metabólitos como: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcaloides, aminoácidos, antraquinonas, catequinas, depsídeos e depsídonas, derivados da cumarina, esteroides, fenóis, flavonoides (antocianinas, antocianidinas, auronas, catequinas (taninos catéquicos), chalconas, flavonas, flavanonas, flavonois, flavanonois, leucoantocianidinas, xantonas), glicosídeos cardíacos, polissacarídeos, proteínas, purinas, saponinas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, taninos e triterpenoides. Investigou-se qualitativamente a presença de metabólitos secundários e as análises foram realizadas em triplicata, na concentração de 5 mg/mL (BARBOSA, 2004).

#### **4.7 Controle de Qualidade Microbiológico dos Extratos e Frações**

A contagem total de microrganismos foi realizada através da metodologia descrita por PINTO et al (2010) e SILVA JUNIOR et al (2011). No procedimento em questão, foram transferidos assepticamente 1g de extrato para 9 mL de caldo lactose em um tubo de ensaio, para frações foram utilizadas proporções obedecendo a razão 1:10. Em seguida, foram realizadas diluições decimais, a partir da primeira (1:100 e 1:1000) de modo que obteve-se diluições em série de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . A análise foi feita utilizando 3 diluições, contudo, em alguns casos o número de diluições pode ser aumentado para facilitar a contagem. Após a homogeneização, foi pipetado 0,1 mL de cada uma das diluições em placas de petri estéril em triplicata contendo Ágar Sabouraud- Dextrose ou Agar Nutriente para contagem de fungos e bactérias, respectivamente. O espalhamento foi realizado com o auxílio de uma alça de drigalski. No caso de pesquisa de bactérias, as placas foram incubadas a 35 °C por 48 a 72 horas; para a pesquisa de fungos a temperatura foi de 25 °C durante 5 a 7 dias. Decorrido este período foi realizada a contagem do número de colônias, com

o auxílio de um contador, calculando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC/g).



**Figura 10.** Esquema simplificado do processo de preparação e execução dos testes fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos *in vivo* e *in vitro*.

## 4.8 Atividade Antimicrobiana pela Técnica de Microdiluição

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para o teste da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas do bacilo álcool-ácido resistente *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e *M. fortuitum* ATCC 6841. As metodologias empregadas foram a de microdiluição em caldo para *M. fortuitum* (ARANTES et al, 2005) e a de Alamar Blue para *M. tuberculosis* (FRANZBLAU et al, 1997), Foram testados os extratos hidroetanólicos das folhas e as frações hêxanica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica de *C. ambrosioides* e *E. alba*.

### 4.8.1 Microdiluição em Caldo

Foram transferidas colônias da cepa de *M. fortuitum* para tubos de 10 mL contendo 1 mL de solução salina completando o volume com solução salina até 9 mL até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondendo aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

Esta pré-cultura foi reservada para a preparação do inóculo, foram transferidos 150µL de pré-cultura para 10 mL de caldo Mueller-Hinton modificado, resultando em uma suspensão com 7 log CFU/ml ( $1 \times 10^7$  CFU/mL).

Foram utilizadas microplacas com 96 poços. Os poços do perímetro externo, na coluna 1 e 12 em linhas A e H foram preenchidos com 200 µL de água destilada estéril para prevenir a desidratação dos poços internos que foram utilizados no experimento. Foram adicionados 100 µL de meio de cultura Mueller-Hinton modificado em todos os poços das colunas 2 a 9 em linha B a G. Os extratos/frações foram inicialmente diluídos em 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (v/v), obtendo-se uma concentração de 1000 µg/ml. Destes extratos/frações diluídos a serem testados foram adicionados em triplicata em volume de 100 µL para o poço B, C e D da coluna 2, em seguida, 100 µL dessa mistura foram retirados e colocados no poço B coluna 3 e, assim, sucessivamente até o poço B, C e D da coluna 9, do qual 100 µL foram retirados e desprezados. O inóculo correspondendo ao tubo 0,5 da escala de

McFarland, com aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL foi diluído em meio de cultura 7H9 (1:4) e 100  $\mu$ L desta suspensão bacilar foi adicionada nos poços das colunas 2 a 9 nas linha B a G. Como controles foram utilizados poços contendo somente 200  $\mu$ L de meio de cultura (coluna 10 e 11 da linha B); 100  $\mu$ L de meio de cultura e 100  $\mu$ L de suspensão bacilar (coluna 10 e 11 da linha C e D); 100  $\mu$ L de meio de cultura e 100  $\mu$ L de extrato (coluna 10 e 11 da linha E); 100  $\mu$ L de DMSO, 90  $\mu$ L de meio de cultura, 10  $\mu$ L de suspensão bacilar (coluna 10 e 11 da linha F); 100  $\mu$ L de solução bacilar, 90  $\mu$ L de meio de cultura, 10  $\mu$ L de extrato (coluna 10 e 11 da linha G).

As placas foram seladas com filme polietileno, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Os resultados dos testes foram avaliados após 76 horas de incubação (Adaptado de ARANTES et al, 2005).

#### 4.8.2 Microdiluição utilizando Alamar Blue Assay (MABA)

Foram utilizadas microplacas com 96 poços. Os poços do perímetro externo, na coluna 1 e 12 em linhas A e H foram preenchidos com 200  $\mu$ L de água destilada estéril para prevenir a desidratação dos poços internos que foram utilizados no experimento. Foram adicionados 100  $\mu$ L de meio de cultura 7H9 em todos os poços das colunas 2 a 9 em linha B a G. Os extratos foram inicialmente diluídos em 10% de DMSO (v/v), obtendo-se uma concentração de 1000  $\mu$ g/ml. Destes extratos/frações diluídos a serem testados foram adicionados em triplicata foram transferidos em volume de 100  $\mu$ L para o poço B, C e D da coluna 2, em seguida, 100  $\mu$ L dessa mistura foram retirados e colocados no poço B coluna 3 e, assim, sucessivamente até o poço B, C e D da coluna 9, do qual 100  $\mu$ L foram retirados e desprezados. O inóculo correspondendo ao tubo 0,5 da escala de McFarland, com aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL foi diluído em meio de cultura 7H9 (1:4) e 100  $\mu$ L desta suspensão bacilar foi adicionada nos poços das colunas 2 a 9 nas linha B a G. Como controles foram utilizados poços contendo somente 200  $\mu$ L de meio de cultura (coluna 10 e 11 da linha B); 100  $\mu$ L de meio de cultura e 100  $\mu$ L de suspensão bacilar (coluna 10 e 11 da linha C e D); 100  $\mu$ L de meio de cultura e 100  $\mu$ L de extrato (coluna 10 e 11 da linha E); 100  $\mu$ L de DMSO, 90  $\mu$ L de meio de cultura, 10  $\mu$ L de suspensão bacilar (coluna 10 e 11 da linha F); 100  $\mu$ L de solução

bacilar, 90 µL de meio de cultura, 10 µL de extrato (coluna 10 e 11 da linha G). As placas foram incubadas a 37°C por sete dias, e após este período foram adicionados 20 µL de solução reveladora de Alamar Blue em todos os poços. As placas foram reincubadas a 37°C e observadas após 24 horas para verificar a mudança de coloração do azul para rosa. A presença de cor rósea indica crescimento microbiano e a presença de coloração azul, indica ausência de crescimento microbiano, para as cores intermediárias as placas foram reincubadas por mais 24 horas

A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que evitaria uma mudança de coloração (FRANZBLAU et al, 1997).

## **4.9 Ensaios *in vitro* de Citotoxicidade**

### **4.9.1 Cultura Celular e Preparo dos Ensaios de Macrófagos RAW 264.7**

Para avaliar a inibição da Produção de Óxido Nítrico, TNF- $\alpha$  e a viabilidade celular foram utilizados métodos químicos e biológicos, onde os métodos biológicos se basearam na utilização de macrófagos e os químicos se basearam na leitura da absorbância ao final do experimento.

Os macrófagos murinos peritoneais da linhagem celular RAW 264.7 obtidos da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) foram cultivados em meio DMEM F-12, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Células RAW 264.7 (1×10<sup>5</sup> células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços. A placa foi mantida em estufa de 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> por 3 horas para aderência dos macrófagos e estabilidade da cultura. Após este período, o sobrenadante da cultura foi removido cuidadosamente para retirada de células não aderentes e substituído por DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB contendo ou não lipolissacarídeo (1 µg/mL) (LPS, *Escherichia coli*) na ausência ou presença dos extratos/frações. A placa foi mantida em estufa de 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e após 24h de incubação, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação quanto à capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral

(TNF- $\alpha$ ) e citotoxicidade através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Nos experimentos os extratos foram testados nas concentrações de 0,8  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.9.2 Teste de Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT

Para o MTT, as células foram plaqueadas na concentração e condição de cultura citados no item 4.9.1, em um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Após 2 horas para a aderência dos macrófagos, as células foram estimuladas ou não com 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS sozinho ou em combinação com os extratos/frações por 24 horas. Ao final da incubação, 5  $\mu\text{L}$  de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço e 2 h depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados solubilizados por HCl (4 mM) adicionado em isopropanol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm (RASO et al, 2001; MOSMANN et al, 1983). As densidades ópticas (DOs) obtidas foram convertidas em percentual de citotoxicidade, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$100 - ((\text{D.O. amostra} - \text{D.O. Controle -}) * 100 / \text{D.O. Triton} - \text{D.O. Controle -})$$

#### 4.10 Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi medida indiretamente, avaliando-se a concentração de nitrito. Neste teste, 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes (obtido conforme item 4.9.1) foram adicionados a 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess (*p*-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico), recém-preparado. Após 10 min, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de nitrito no sobrenadante foi estimada utilizando como parâmetro uma curva de nitrito de sódio decrescida do valor obtido com os aditivos sem células. Foram utilizados como controle macrófagos estimulados com LPS a 1  $\mu\text{g/mL}$  (negativo) e macrófagos não estimulados (positivo), ambos não

tratados com as amostras (CHI et al, 2001). Também foi utilizado um inibidor padrão de iNOS, L-NMMA (Acetato de NG-Metil-L-Arginina) para comparação da capacidade de inibição da produção de NO (CHI et al, 2001; TSIKAS, 2007).

#### **4.11 Bioensaio de Análise da produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos**

As células L929 (linhagem de fibroblasto murinos) foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante o período adequado para formação de uma monocamada celular. Para o bioensaio, o sobrenadante celular foi retirado e a monocamada celular foi lavada com PBS (Phosphate Buffered Saline) uma vez, para remoção completa de SFB e, posteriormente, tratadas com solução de tripsina 0,025% + EDTA 0,2% (ácido etilenodiamino tetra-acético). As células foram centrifugadas (1200 rpm, 5', 22°C) e ressuspensas em meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 20  $\mu$ g/mL de gentamicina, sendo em seguida, plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL, em microplaca de 96 poços. Após a incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h, o meio de cultura foi removido e 50  $\mu$ L de DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 2  $\mu$ g/mL de actinomicina D foram adicionados em todos os poços, seguidos de 50  $\mu$ L do sobrenadante derivado da cultura celular de RAW 264.7. A microplaca foi novamente incubada por 24h em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, e a produção da TNF- $\alpha$  foi avaliada através da viabilidade celular da L929, através da técnica do MTT (CHEN e SHIAU et al, 2001; MOSMANN, 1983). Para estimar a concentração de TNF- $\alpha$  encontrada nas amostras foi utilizada uma curva padrão com TNF- $\alpha$  recombinante murino.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O Controle positivo foi o sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com 1  $\mu$ g/mL de LPS e não tratados. O Controle negativo foi o sobrenadante da cultura de macrófagos não estimulados e não tratados

#### 4.12 Toxicidade Aguda Oral

Para a avaliação da toxicidade aguda oral utilizou-se as diretrizes de guias para testes de substâncias químicas da OECD número 423, onde foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), fêmeas, divididos em grupos de 5 animais, com peso de 20-30 g. Cada grupo foi mantido em jejum de 12 h e, em seguida, receberam, através de cânula orogástrica, por gavagem as doses de 2500 mg/kg dos extratos hidroetanólicos de *C. ambrosioides* e *E. alba*, diluídos em solução salina 0,9%, dose esta recomendada pela OECD para plantas medicinais (OECD, 2001).

Os animais foram observados inicialmente a cada 15 minutos, durante a primeira hora. Seguida, de intervalo de 1 hora durante 4 horas para avaliação de possíveis alterações comportamentais. Segundo o teste descrito por BRITO (1994), os parâmetros comportamentais observados foram: alerta, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia, resposta ao tato, secreção nasal, piloereção, estereotipia, agressividade, ataxia, sudorese, micção, diarreia e convulsão. Após este período, os animais foram tratados com ração e água *ad libitum*, e observados por um período adicional de 24, 48 e 72 h, seguidos de observação por um período total de 14 dias com o intuito de verificar a possível ocorrência de óbito (OECD, 2001).

Ao final do período os animais foram eutanasiados através da administração intraperitoneal de Cloridrato de Ketamina e xilazina (2:1) na dose de 2,5 mL/kg e os órgãos foram retirados para avaliação anatomo-histopatológica. Os procedimentos de manipulação dos animais seguiram com os princípios éticos na experimentação animal, segundo as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) - Lei Nº 11.794. O protocolo experimental foi aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação do Instituto de Ciências Biológicas- UFPA, sob o número de registro BIO098-12 (ANEXO A).

#### 4.12.1 Avaliação Anatomo-Histopatológica

Após a retirada dos órgãos os mesmos foram fixados em formalina tamponada (solução de formol 10%) e após 24 horas, estes foram resseccionados para a avaliação histopatológica: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina de acordo com os métodos descritos por Bacha e Wood (1990). Os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3 µm em um micrótomo de navalha em aço inox, dispostos em lâminas de vidro lapidadas e submetidos a coloração hematoxilina-eosina e tricômico de Masson, sendo observadas em microscópio óptico.

Estes estudos foram realizados no Laboratório de Patologia Animal do Instituto de Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia.

#### 4.13 Análises estatísticas

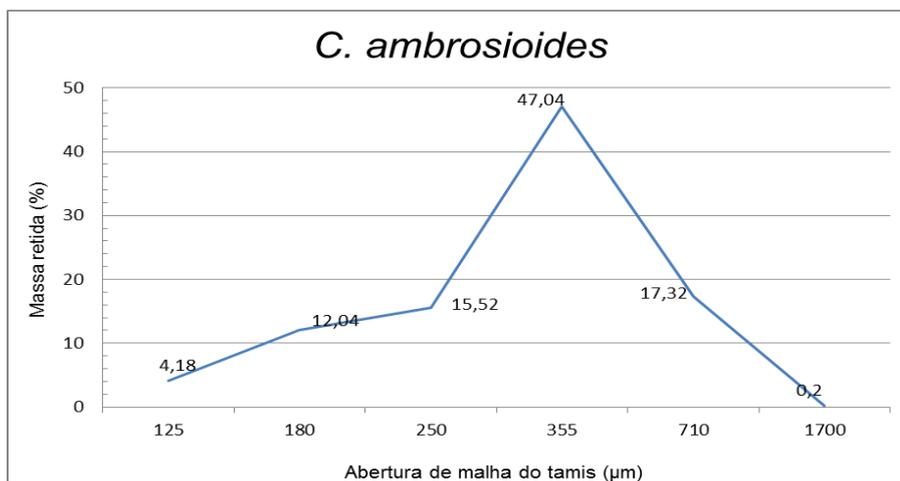
Os dados foram avaliados por análise de variância One-Way ANOVA seguido por Teste de Tukey, sendo considerado significativo  $p < 0.05$ . Foram utilizados Microsoft Office Excel e GraphPad Prism 4.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

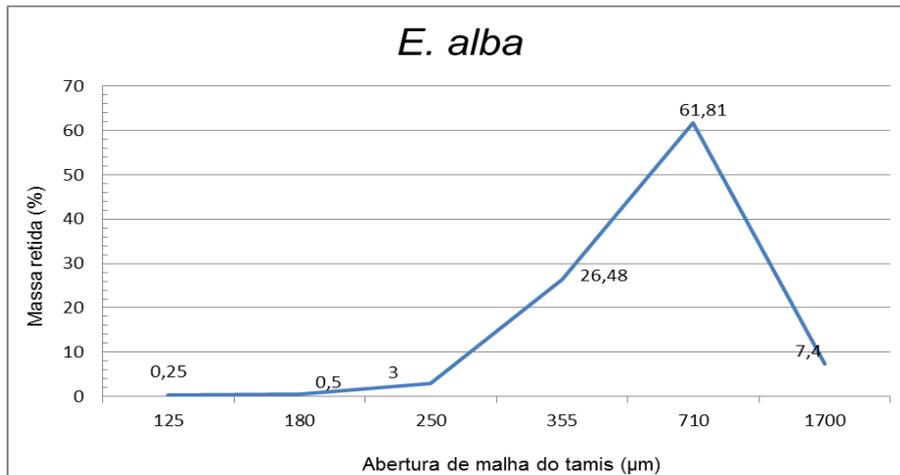
### 5.1 Obtenção e Caracterização físico-química da droga vegetal de *C. ambrosioides* L. e *E. alba* Reinw ex Blume.

#### 5.1.1 Determinação da Distribuição Granulométrica

Pela análise da granulometria da droga vegetal oriunda das folhas de *C. ambrosioides* L. esta foi classificada como pó grosso (Figura 11), visto que passou em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1700  $\mu\text{m}$  e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355  $\mu\text{m}$ . Já a droga vegetal oriunda das folhas de *E. alba* foi classificada como pó moderadamente grosso (Figura 12), uma vez que as partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710  $\mu\text{m}$  e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250  $\mu\text{m}$ . A classificação foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).



**Figura 11:** Distribuição granulométrica da droga vegetal de *Chenopodium ambrosioides*



**Figura 12:** Distribuição granulométrica da droga vegetal de *Eucalyptus alba*

A adequada pulverização da matéria prima vegetal é importante para se conseguir um bom rendimento no processo extrativo dos constituintes químicos encontrados na droga vegetal. Assim, a granulometria da matéria prima vegetal é o parâmetro que determina a superfície de contato para a interação com o solvente empregado na obtenção de insumo farmacêutico padronizado, como tintura e extratos (SANTOS, 2000;ALVES et al, 2010). Além disso, a granulometria de drogas vegetais determina diretamente a eficiência do processo extrativo (SIMOES et al, 2010). Pó muito fino pode entupir o filtro durante o processo extrativo na etapa de filtração. Em contrapartida, a droga pulverizada com tamanho de partícula superior à classificação de pó fino é apropriada para ser submetida a processos extrativos (LIST & SCHMIDT, 2000). No caso das drogas vegetais utilizadas nesta pesquisa a matéria prima moída das espécies *C. ambrosioides* e *E. alba* foram classificadas como pó grosso e moderadamente grosso, respectivamente, o que justifica a escolha da maceração como processo extrativo para obtenção do extrato hidroetanólico. Este método extrativo que utiliza moinho de facas é capaz de triturar a droga vegetal, aumentando a superfície de contato entre a droga vegetal e o líquido extrator.

Não foram encontrados na literatura trabalhos de determinação granulométrica de *C. ambrosioides* L. e *E. alba*, bem como de outras espécies dos gêneros *Chenopodium* e *Eucalyptus*.

### 5.1.2 Determinação da Perda por Dessecação

Esse método visa quantificar os compostos voláteis de qualquer natureza que estejam presentes nas plantas e são eliminados nas condições específicas da monografia. O valor infere, indiretamente, a umidade residual presente em drogas vegetais (BRASIL, 2010). A perda por dessecação da droga vegetal de *C. ambrosioides* foi de 8,9% (Tabela 2). Estes resultados, assim como o trabalho de Okhale et al (2012) que reportaram teor de umidade de 10% para a droga vegetal proveniente das folhas de *C. ambrosioides*, estão em conformidade com a Farmacopéia Brasileira 5ª Edição, a qual preconiza teor máximo de até 14% de umidade para drogas vegetais.

Com relação a outra espécie em estudo, à droga vegetal das folhas de *E. alba*, de acordo com a Farmacopeia Europeia (2007), o máximo de umidade é de 10% (p/p) para drogas vegetais a partir das folhas do gênero *Eucalyptus*. Neste estudo a umidade encontrada para esta droga vegetal foi de 8,2% (Tabela 2), o que não difere da literatura citada. Gambato et al (2014) relataram em seus estudos, a perda por dessecação de 7,2% de droga vegetal proveniente das folhas do *E. camaldulensis*, resultado também dentro do limite preconizado pela literatura oficial. Este parâmetro é importante, pois está diretamente relacionado com a eficiência da conservação da matéria prima vegetal (FARIAS, 2003). Além de indicar que o material das espécies em estudo tiveram armazenamento adequado e secagem eficiente, reduzindo assim os erros na estimativa do peso real do material vegetal, além de servir como parâmetro de qualidade, uma vez que o excesso de água pode contribuir para a ação enzimática, o que acarreta na degradação de constituintes químicos e possibilita o crescimento de fungos e bactérias (SIMOES et al, 2010).

### 5.1.3 Determinação do Teor de Cinzas

O teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem ser produto do metabolismo vegetal ou componentes presentes como contaminantes das drogas vegetais (SIMOES et al, 2010). O teor de cinzas totais do

material vegetal de *C. ambrosioides* foi de 10% e a análise da matéria prima de *E. alba* apresentou como teor de cinzas totais 13% (Tabela 2). Okhale et al (2012) realizou a determinação do teor de cinzas da droga vegetal oriunda das folhas de *C. ambrosioides* e obteve um valor de 14,65%, resultado superior a deste estudo e considerado acima do intervalo aceitável de 10% para drogas vegetais oriundas de folhas descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição. Já a Farmacopeia Européia (2007) estabelece que o valor de teor de cinzas totais aceitável das folhas de *Eucalyptus* sp. é de no máximo 6%. Assim, verifica-se que, neste estudo a droga vegetal do eucalipto, não está adequada ao preconizado nesta literatura oficial.

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes no processo da padronização de parâmetros de qualidade para as drogas vegetais, uma vez alto teor de cinzas pode indicar a presença excessiva de substâncias aderentes. O teor de cinzas da droga vegetal de *E. alba* apresentou um valor superior ao indicado pela monografia oficial, trata-se de um indicativo de inadequação durante os procedimentos de colheita, secagem e transporte dos materiais, ou mesmo devido às diferenças em termos da localização geográfica dos materiais analisados (SHARAPIN et al, 2000).

#### 5.1.4 Determinação do Índice de Espuma

O índice de espuma baseia-se na maior diluição do decocto preparado a partir das especificações da Farmacopeia que, de acordo com as circunstâncias do ensaio, seja capaz de compor um anel de espuma persistente de 1 cm de altura (COSTA, 1994). Segundo Borella et al (2006), o teste infere a propriedade afrogênica (formação de espuma) pois trata-se de uma análise quantitativa comparativa para saponinas, visando estimar a quantidade deste metabólito presente no decocto. O índice de espuma da droga vegetal *C. ambrosioides* revelou altura da espuma em todos os tubos inferior a 1 cm, com um índice de espuma menor que 100 (Tabela 2), indicando pouca quantidade de saponinas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O valor do índice de espuma para a espécie vegetal *E. alba* foi de 200 (Tabela 2), indicando a presença de saponinas no material vegetal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Segundo Szakiel et al (2011), o teor de saponinas em plantas sofre influência de diferentes estímulos ambientais como intensidade da luz, temperatura, disponibilidade de água, tipo e composição química dos níveis de solo, de dióxido de carbono e de oxigênio. Além disso, os métodos analíticos simples e rápidos empregados para determinação de saponinas na padronização do material vegetal visa facilitar o controle de qualidade destes metabólitos secundários.

**Tabela 2.** Resultados dos ensaios físico-químicos realizados a partir das folhas de *C. ambrosioides* L. e *E. alba* Reinw ex Blume.

<b>Teste</b>	<b><i>C. ambrosioides</i></b>	<b><i>E. alba</i> Reinw ex Blume</b>
<b>Perda por Dessecação (%)</b>	8,9% ± 1	8,2% ± 0,3
<b>Cinzas Totais (%)</b>	10% ± 0,005	13% ± 0,005
<b>Índice de Espuma</b>	< 100	200

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão, exceto Índice de Espuma.

## 5.2 Caracterização Físico-química dos Extratos Hidroetanólicos

### 5.2.1 Determinação do pH

O valor do pH foi de  $6,60 \pm 0,03$  do extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides*. O que sugere a presença de compostos fracamente ácidos (Tabela 3). O valor de pH encontrado para o extrato hidroetanólico de *E. alba* foi de  $3,82 \pm 0,01$ . Sugerindo a presença de compostos ácidos no extrato de eucalipto (Tabela 3). Gambato e colaboradores (2014) encontraram valor de pH de 5,46 para o extrato hidroetanólico de *E. calmadulensis*. Essa acidez pode ser resultado do sinergismo dos metabólitos secundários, dentre estes, pela presença de ácidos orgânicos, os quais podem se

constituir de qualquer ácido carboxílico orgânico, incluindo ácidos de cadeia longa e aminoácidos, de estrutura geral R-COOH (DIBNER e BUTTIN, 2002).

Fatores como pH e a presença de substâncias químicas contaminantes podem afetar qualquer componente de uma solução, influenciando na sua estabilidade (CAMELO, 2010). Os resultados obtidos são de relevância para a realização de ensaios biológicos, uma vez que o pH deve estar definido e ajustado para se alcançar resultados confiáveis e reprodutíveis.

O pH dos extratos foram corrigidos nos ensaios biológicos.

### 5.2.2 Determinação do Teor de Sólidos dos Extratos

Os percentuais de resíduos secos do extrato de *C. ambrosioides* e *E. alba* foram 3,6% e 11%, respectivamente (Tabela 3). Não foram encontrados na literatura trabalhos de teor de sólidos de extrato de *C. ambrosioides* e espécies do gênero *Chenopodium* para confrontar com os resultados obtidos neste trabalho. Ao comparar o valor deste parâmetro com dados de outras espécies do gênero de *Eucalyptus*, o teor de resíduo seco do extrato hidroetanólico de *E. calmadulensis* foi de 2,75% (GAMBATO et al, 2014) resultado que demonstra que o extrato de *E. calmadulensis* estava menos concentrado que o deste estudo.

O teor de sólidos é indicativo do teor de água e substâncias voláteis de produtos de extração da matéria-prima vegetal em análise, estes são dados importantes com relação ao rendimento da extração, uma vez que a secagem influencia na integridade dos componentes celulares, permitindo que estes sejam expostos ao contato com os solventes (HARBORNE et al, 1986; CAMELO, 2010). Sendo assim, esse percentual é um indicativo da concentração do extrato.

Os resultados obtidos neste trabalho tornam-se importantes no processo da padronização de parâmetros de qualidade para os extratos de *C. ambrosioides* e *E. alba*.

**Tabela 3.** Determinação do pH e teor de sólidos dos extratos de *C. ambrosioides* e *E. alba*.

Determinações	<i>C. ambrosioides</i>	<i>E. alba</i>
pH	6.6 ± 0,03	3.2 ± 0,01
Teor de sólidos	3.7% ± 0,3	11%± 0,2

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão.

### 5.3 Rendimento dos Extratos e Frações

A maceração da droga vegetal de *C. ambrosioides* forneceu 33,78 g de um extrato bruto concentrado, representando um rendimento de 6,43%. O fracionamento de 12,5 g do extrato forneceu 1,044 g de fração hexânica, 1,319 g de fração clorofórmica, 0,896 g de fração acetato de etila e 1,835 g de fração metanólica, representando, respectivamente, rendimentos de 8,35%, 10,56%, 7% e 14,68% em relação a 12,5 g de Extrato Bruto. Já a maceração partindo da droga vegetal *E. alba* teve como produto 150 g de um extrato bruto concentrado, representando um rendimento de 16,66%. O fracionamento de 12,55 g do extrato de *E.alba* forneceu 270 mg de fração hexânica, 720 mg de fração clorofórmica, 0,05 mg de fração acetato de etila e 4,23 g de fração metanólica, representando, respectivamente, rendimentos de 2,16%, 5,76%, 0,0004% e 33,84% em relação a 12,5 g de Extrato Bruto.

O rendimento do extrato hidroetanólico das folhas de *C.ambrosioides* e *E.alba* a partir de 10 kg de material vegetal são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Rendimento dos extratos hidroetanólico das folhas de *C. ambrosioides* e *E. alba* Reinw ex Blume.

<b>Material Vegetal</b>	<b><i>C.ambrosioides</i></b>	<b><i>E.alba</i></b>
<b>Droga Vegetal</b>	525 g	900 g
<b>Extrato</b>	33,78 g	150 g
<b>Rendimento</b>	6,43%	16,66%

#### 5.4 Análise Fitoquímica Preliminar dos Extratos e Frações

A prospecção fitoquímica preliminar visa caracterizar um determinado grupo de substâncias presentes em um vegetal pela realização de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou formação de um precipitado característico (FALKENBERG et al, 2007). Com relação à prospecção fitoquímica preliminar, realizada a partir do extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides*, indicou-se a presença de saponinas espumílicas, fenois e taninos, catequinas, cumarinas e esteroides e triterpenoides (Tabela 5). Os resultados desta análise são semelhantes aos estudos de Okhale et al (2012), que observaram na droga vegetal proveniente das partes aéreas de *C. ambrosioides*, a presença dos metabolitos secundários encontrados neste estudo, além de cardenolideos, flavonoides e óleos voláteis. Assim como FELIX SILVA et al (2012), que identificaram no extrato aquoso das folhas desta espécie vegetal, a presença dos metabolitos citados e também de gomas, heterosídeos senevólicos, mucilagens, cumarinas, carotenoides e alcaloides. Já VILLANUEVA et al (2013) ao analisar o extrato etanólico das folhas de *C. ambrosioides* detectaram-se apenas flavonoides, os quais não foram encontrados neste estudo. Os metabolitos secundários terpenos e esteroides também foram encontrados nos estudos de Hallala et al (2010). Muitos derivados terpênicos apresentam propriedades sedativa, antinociceptiva e antidepressiva (DE SOUZA et al, 2007; SOUSA et al, 2007; PERAZZO et al, 2007; LEITE et al, 2008).

**Tabela 5.** Prospecção fitoquímica dos extratos brutos (EB) de *C. ambrosioides* L e *E. alba* Reinw ex Blume.

Classe de metabólito secundário	EB	EB
	<i>C. ambrosioides</i>	<i>E. alba</i>
Ácidos orgânicos	-	+
Saponinas espumídicas	+	+
Açúcares redutores	-	-
Polissacarídeos	-	-
Proteínas e aminoácidos	+	-
Fenóis e taninos	+	+
Flavonoides	-	-
Glicosídeos cardíacos	-	-
Catequinas	-	-
Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas	-	-
Lactonas sesquiterpênicas e outras	-	+
Esteroides e triterpenoides	+	+
Azulenos	-	-
Carotenoides	-	-
Alcaloides	-	-
Purinas	-	-
Depsídeos e depsidonas	-	-
Derivados da cumarina	-	-
Antraquinonas	-	-

A prospecção química do extrato bruto de *E. alba* apresentou resultado positivo para ácidos orgânicos, saponinas espumídicas, fenóis e taninos, lactonas sesquiterpênicas, triterpenos e esteroides que pode ser visualizados na Tabela 5. Não foram relatados na literatura estudos de prospecção fitoquímica do extrato da espécie *E. alba*. Contudo, a prospecção de outras espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* demonstra que no extrato metanólico de *E. globulus* foram encontrados em comum com este estudo, fenóis e taninos, além de flavonoides e alcaloides (SAXENA et al, 2010). Já Lawal et al (2011) identificaram taninos e saponinas, além de cardenolídeos e antraquinonas em extrato das folhas de *E. torelliana*. Gambato et

al (2014) encontraram no extrato hidroetanólico das folhas de *E. camaldulensis* saponinas, óleos, glicosídeos cardiotônicos e compostos fenólicos. Ressalta-se a importância de se encontrar os compostos fenólicos, neste estudo e nos demais citados, visto que, relatos na literatura associam estes metabólitos a atividades biológicas, dentre estas, a atividade antibacteriana (RAHIMI-NASRABADI et al, 2013) e antioxidante (VASQUEZ et al 2008; SANTOS et al, 2012) nas espécies do gênero *Eucalyptus*.

A discordância da presença e da composição de metabólitos secundários de uma mesma espécie vegetal entre os autores citados e a prospecção fitoquímica realizada no presente estudo pode ser decorrente da influência de fatores como condições da coleta, sazonalidade, ciclo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, disponibilidade hídrica, altitude, radiação ultravioleta, nutrientes e poluição atmosférica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

## **5.5 Controle de Qualidade Microbiológico dos Extratos e Frações**

Os resultados referentes a padronização dos extratos quanto aos parâmetros microbiológicos analisados neste estudo estão demonstrados na Tabela 6. Foram observados ausência de bactérias e fungos nos extratos e frações de *C. ambrosioides* e *E. alba*. Estes resultados diferem dos estudos de Migliato et al (2007) e Hubinger et al (2008), em que os autores observaram que não ocorreram crescimento de microrganismos patogênicos, contudo houve crescimento de fungos e bactérias dentro do limite permitido.

O resultado do presente estudo difere também do trabalho de VERDI et al (2013). Estes autores encontraram, em mais de 60% dos produtos de origem vegetal analisados, uma contaminação microbiana acima do limite aceitável. Os autores concluíram que o controle de qualidade microbiológico se faz necessário para definir ações adequadas de boas práticas de fabricação e controle para garantir a qualidade e segurança do produto desde a coleta, armazenamento e manipulação até o produto final. Os resultados de ausência de microrganismos do presente estudo podem ser explicados pela filtração prévia em filtro de poro de 0,22 µm.

Ressalta-se que o controle de qualidade da fração acetato de etila (Fração 1.3) não foi realizado devido ao baixo rendimento da mesma.

**Tabela 6.** Parâmetros microbiológicos dos extratos hidroetanólicos e frações de *C. ambrosioides* L e *E. alba*

<b>Amostra</b>	<b>Bactérias/10mg</b>	<b>Fungos/10mg</b>
EB 1	<1UFC	<1UFC
Fração 1	<1UFC	<1UFC
Fração 2	<1UFC	<1UFC
Fração 4	<1UFC	<1UFC
EB 2	<1UFC	<1UFC
Fração 2.1	<1UFC	<1UFC
Fração 2.2	<1UFC	<1UFC
Fração 2.3	< 1UFC	<1UFC
Fração 2.4	<1UFC	<1UFC

Legenda: EB1 – Extrato Hidroetanólico de *E. alba*; Fração 1 – Fração Hexânica de *E. alba*; Fração 2 – Fração Clorofórmica de *E. alba*; Fração 4 – Fração Metanólica de *E. alba*; EB2 – Extrato Hidroetanólico de *C. ambrosioides*; Fração 2.1 – Fração Hexânica de *C. ambrosioides*; Fração 2.2 – Fração Clorofórmica de *C. ambrosioides*; Fração 2.3 – Fração Acetato de Etila de *C. ambrosioides*; Fração 2.4 – Fração Metanólica de *C. ambrosioides*.

As análises microbiológicas em extratos e frações são importantes, pois identificam a baixa qualidade microbiológica das drogas vegetais disponíveis no comércio, fator decorrente não apenas de falhas no processo de comercialização, mas também da elevada contaminação proveniente das inúmeras etapas da produção (ZARONI et al, 2004).

Reis e Mariot (2001) referem-se a cuidados básicos para redução da contaminação bacteriana de material vegetal como: higiene adequada das mãos dos manipuladores, acondicionamento adequado do material coletado; redução ou eliminação de impurezas provenientes da recém-coleta, secagem eficiente em local limpo, bem ventilado, protegido e ao abrigo da luz; e acondicionamento do material vegetal em recipientes adequadamente limpos. A presença de elevada carga microbiana pode comprometer a estabilidade do produto, o que acarreta na perda da

eficácia terapêutica, por degradação do princípio ativo ou por alteração de parâmetros físicos fundamentais para sua atividade, como exemplo, o pH. A contaminação bacteriana altera também as propriedades físico-químicas do produto, o que interfere na ação terapêutica e na biodisponibilidade do mesmo. Como consequência, pode ocorrer produção de gases, provocando odor desagradável e ação enzimática promovendo lise de metabólitos (PINTO et al, 2010).

A legislação vigente pela RDC 10 de 2010 estabelece parâmetros microbiológicos para insumos farmacêuticos não estéreis, admitindo a presença de carga microbiana que não comprometa a qualidade ou a segurança do usuário, além de comprovar a ausência de microrganismos patogênicos (BRASIL, 2010; PINTO et al, 2010). O controle de qualidade de extratos vegetais é uma etapa imprescindível para a padronização de um insumo farmacêutico ativo (DA SILVA e BANDEIRA, 2013). Neste estudo a filtração do produto para eliminar possíveis contaminações foi importante para os ensaios de avaliação dos extratos e frações frente as bactérias da tuberculose e não tuberculosa.

## **5.6 Avaliação da Atividade Antimicobacteriana dos Extratos e Frações**

Os resultados apresentados seguem a faixa de corte preconizada por FRANZBLAU et al (1997) como sendo de 2500 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. A atividade de extratos vegetais pode ser classificada como significativa (CIM < 100 µg/ml), moderada (100 < CIM ≤ 625 µg/mL) ou fraca (CIM > 625 µg/mL) (TEKWU et al, 2012).

### **5.6.1 Microdiluição em Caldo**

O extrato e as frações de *C. ambrosioides* foram considerados inativos frente à cepa padrão de *M. fortuitum*. Não foram encontrados na literatura trabalhos com o extrato hidroetanólico e as frações (hexânica, clorofórmica, em acetato de etila e

metanólica) desta espécie ou de extratos de espécies do gênero *Chenopodium*, com atividade inibitória à cepa de *M. fortuitum*. Bem como, não há relatos de atividade frente à cepa de *M. fortuitum* com outras espécies pertencentes à mesma família de *C. ambrosioides*, o que garante um caráter inédito ao presente estudo.

Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAE), fração metanólica (FM) de *Chenopodium ambrosioides* contra *Mycobacterium fortuitum* pela técnica de Microdiluição em Caldo.

Concentração µg/mL	<i>Mycobacterium fortuitum</i>				
	EB	FH	FCI	F AcE	FM
2500	-	-	-	-	-
1250	-	-	-	-	-
625	-	-	-	-	-
312,5	-	-	-	-	-
156,25	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-
39,06	-	-	-	-	-
Controle Negativo	-	-	-	-	-

Legenda: (-) Resultado Negativo para inibição do crescimento bacteriano

Tabela 8: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAcE), fração metanólica (FM) de *Eucalyptus alba* contra *Mycobacterium fortuitum*.

Concentração µg/mL	<i>Mycobacterium fortuitum</i>				
	EB	FH	FCI	F AcE	FM
2500	+	-	-	+	-
1250	+	-	-	+	-
625	+	-	-	+	-
312,5	+	-	-	+	-
156,25	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-
39,06	-	-	-	-	-
Controle Negativo	-	-	-	-	-

Legenda: (-) Resultado Negativo para inibição do crescimento bacteriano; (+) Resultado positivo para inibição do crescimento bacteriano

Os resultados de atividade antimicobacteriana do extrato bruto e frações de *E. alba* demonstram que a fração acetato de etila e o extrato bruto apresentaram atividade antimicobacteriana frente a cepa padrão de *M. fortuitum*, apresentando valores de CIM de 312,5 µg/mL, de acordo com os valores apresentados na Tabela 8. Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a ação de extrato hidroetanólico de *E. alba* frente a cepa de *M. fortuitum*. Assim, optou-se por discutir os resultados em relação a pesquisas semelhantes feitas com plantas do mesmo gênero.

Os resultados são semelhantes ao estudo de Lawal et al (2011), que observaram que o extrato metanólico das folhas de *E. camaldulensis* Dehnh. e *E. torelliana* F. Muell. (Myrtaceae) foram ativos contra a cepa de *M. fortuitum*. Porém, os autores utilizaram o método de difusão em ágar e a concentração inibitória mínima foi de 2000 µg/mL e 1000 µg/mL, valores estes acima dos obtidos neste estudo. Estes extratos também demonstraram atividade contra outras duas espécies

de micobactérias não tuberculosas (*M. smegmatis* ATCC 19420 e *M. abscessus*). Ao analisar os resultados obtidos, observou-se que a fração acetato de etila, mais polar que a fração hexânica e clorofórmica, apresentou um efeito inibitório do crescimento micobacteriano, ao passo que as outras frações foram inativas. A presença de compostos fenólicos na fração acetato de etila, se pode sugerir que a atividade antimicobacteriana apresentada por esta fração possa estar relacionada à presença de substâncias deste grupo de metabólitos secundários. Uma vez que os compostos fenólicos são relatados na literatura por terem efeitos sobre o metabolismo e o crescimento microbiano, dependendo da sua concentração e compostos ativos (REGUANT et al, 2000; ALBERTO et al, 2001).

O extrato de *E. alba* e a fração acetato de etila tiveram o mesmo valor de CIM frente a cepa de *M. fortuitum*. Esta fração foi efetiva também frente à cepa virulenta de *M. tuberculosis* o que pode ser sugestivo de uma inespecificidade quanto ao alvo. O resultado é importante, uma vez que na literatura não foram encontrados estudos sobre o perfil de sensibilidade de compostos contra as micobactérias de crescimento rápido que as difere daquele observado na cepa de *M. tuberculosis*. Haja vista que, drogas utilizadas no tratamento para a tuberculose podem ser ineficazes contra infecções secundárias causadas por *M. fortuitum* (BROWN-ELLIOT, 2012). Os mecanismos farmacológicos envolvidos são mudanças na permeabilidade da parede celular, presença de  $\beta$ -lactamases, aminoglicosídeo acetiltransferases e bombas de efluxo, os quais podem ocorrer com mais frequência que mutações, bem como ocorre no *M. tuberculosis* (KATOCH et al, 2004).

#### 5.6.2 Microdiluição Utilizando MABA

A fração clorofórmica de *C. ambrosioides* apresentou atividade considerada moderada como agente antimicobacteriano. A fração apresentou CIM de 625  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 9). Quando os resultados obtidos são comparados aos observados por Lall e Meyer (1999), nota-se discordância em relação ao potencial das amostras testadas. Esses autores relataram a atividade do extrato acetona das folhas de *C. ambrosioides*, pelo método radiométrico, frente à cepa sensível H37Rv na

concentração de 500 µg/mL e contra a cepa multirresistente de *M. tuberculosis* na concentração de 100 µg/mL, estas diferenças ocorrem, provavelmente, em razão do líquido extrator mais polar ou escolha do método. Conforme demonstrado na Tabela 9, a fração clorofórmica se mostrou moderadamente ativa sobre a espécie testada. A atividade dessa fração pode estar associada à composição química desta amostra, a qual o clorofórmio permitiu a extração de metabólitos apolares e a sua natureza lipofílica facilitou a capacidade de penetrar na parede celular micobacteriana, determinando a atividade antimicobacteriana (PALOMINO et al, 2002).

Tabela 9: Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAcE), fração metanólica (FM) de *Chenopodium ambrosioides* contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

Concentração µg/mL	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>				
	EB	FH	FCI	FAcE	FM
2500	-	-	+	-	-
1250	-	-	+	-	-
625	-	-	+	-	-
312,5	-	-	-	-	-
156,25	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-
39,06	-	-	-	-	-
Controle Positivo	+	+	+	+	+
Controle Negativo	-	-	-	-	-

Legenda: (-) Resultado Negativo para inibição do crescimento bacteriano; (+) Resultado positivo para inibição do crescimento bacteriano

Outros trabalhos relataram a atividade antimicobacteriana de extratos clorofórmicos. Pavan et al (2009) verificaram que 12 extratos clorofórmicos de plantas do Cerrado apresentaram CIM entre 62,5 a 125 µg/mL os quais foram

considerados promissores. Os autores ainda relatam que os terpenos são os compostos apolares frequentemente encontrados nas plantas do Cerrado com atividade anti-tuberculose amplamente descrita (COPP, 2003;. AGUIAR et al, 2005). O estudo de compostos terpênicos com ação antimicrobacteriana permitiu observar que compostos mais lipofílicos são significativamente mais ativos do que compostos mais polares (CANTRELL et al, 2001). Sugere-se, portanto, que a atividade antimicrobacteriana no resultado obtido pode estar relacionada à presença de triterpenos.

Gautam et al (2007) mostraram que os extratos de espécies vegetais de grande variedade de famílias e gêneros têm demonstrado significativas atividades antimicrobacterianas *in vitro* e esta eficácia está de acordo com o conhecimento etnofarmacêutico sobre estas plantas medicinais. A espécie *C. ambrosioides* deste estudo demonstrou atividade frente à cepa de *M. tuberculosis*, resultado que vai ao encontro com o uso na medicina popular para tal finalidade.

A Tabela 10 apresenta as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), de extrato bruto e frações de *E. alba*, frente a cepa padrão de *M. tuberculosis*.

Tabela 10: Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCI), fração acetato de etila (FAE), fração metanólica (FM) de *Eucalyptus alba* contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Concentração µg/mL	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>				
	EB	FH	FCI	F AcE	FM
2500	-	-	-	+	-
1250	-	-	-	+	-
625	-	-	-	+	-
312,5	-	-	-	+	-
156,25	-	-	-	-	-
78,125	-	-	-	-	-
39,06	-	-	-	-	-
Controle Positivo	+	+	+	+	+
Controle Negativo	-	-	-	-	-

Legenda: (-) Resultado Negativo para inibição do crescimento bacteriano; (+) Resultado positivo para inibição do crescimento bacteriano

De acordo com a classificação de Tekwu et al (2012), a fração acetato de etila de *E. alba* é considerada como tendo uma moderada ação antimicobacteriana. Neste estudo esta fração apresentou CIM de 312,5 µg/mL frente a *M. tuberculosis* conforme demonstrado na Tabela 10. Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a ação de extrato hidroetanólico da espécie *E. alba* frente a cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Assim, os resultados foram discutidos baseados na pesquisa feita com plantas dos mesmos gênero e família. Lawal et al (2012) verificaram que os extratos hexânicos das folhas de *E. camaldulensis* e *E. torelliana* inibiram o crescimento da cepa de *M. tuberculosis* (H37Rv) apresentando CIM de 4 e 64 µg/ml, respectivamente. Estes resultados corroboram com Gemechu e colaboradores (2013), que observaram atividade antimicobacteriana do extrato metanólico das folhas de *E. camaldulensis* contra

diferentes cepas de *M. tuberculosis* (H37Rv, SIT73, SIT149, SIT149, SB1176 e Cepas SB1953) utilizando o ensaio de microplaca com resazurina (REMA), técnica do MABA adaptada.

Fyhrquist et al (2014) relataram a atividade antimicobacteriana de extratos brutos e frações de 5 espécies pertencentes ao gênero *Terminalia* (Combretaceae), cujas amostras são ricas em compostos fenólicos tais como, ácido gálico, elagitaninos e ácido elágico glicosilado. O mecanismo de estrutura e atividade de compostos mais polares contra micobactérias ainda não foi descrito (CASTELLAR et al, 2011; MOREIRA et al, 2013).

Portanto, conforme acima, a atividade da FAcE de *E. alba* frente ao *M. tuberculosis* pode estar relacionada aos compostos fenólicos presentes nessa fração, ou ainda ao sinergismo entre os metabólitos secundários presentes. A identificação dessa atividade corrobora dados da literatura referentes ao potencial antimicobacteriano de espécies de *Eucalyptus* e denota o potencial antimicobacteriano da espécie de *E. alba*, contribuindo para o estudo de sua utilização na medicina tradicional para o tratamento de tuberculose.

## **5.7 Avaliação da citotoxicidade *in vitro***

### **5.7.1 Teste de Citotoxicidade (MTT)**

O estudo de citotoxicidade é baseado na utilização de células eucarióticas para realizar o monitoramento da atividade de conjuntos de compostos ou composto isolado, assim como, para determinar se a substância em teste tem efeitos sobre a proliferação celular ou mostrar efeitos citotóxicos diretos que eventualmente conduzam à morte celular. Independentemente do tipo de ensaio de escolha que utiliza células, é importante saber quantas células viáveis são remanescentes no fim do teste. Há uma variedade de métodos de ensaio que podem ser utilizados para estimar o número de células eucarióticas viáveis (RISS et al, 2013). Estudos de citotoxicidade são utilizados como um parâmetro para estimar a hipótese de que os

compostos testados serão tóxicas em modelos experimentais *in vivo* (GREENE et al, 2010).

Neste estudo, para a avaliação da atividade citotóxica das amostras utilizou-se macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7. Com relação ao extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* e *E. alba*, foi observado que o extrato de *C. ambrosioides* foi citotóxico na maior concentração de 100 µg/mL, enquanto o extrato de *E. alba* não apresentou citotoxicidade significativa quando comparado com o controle negativo (Figura 13). A análise *in vitro* revelou uma citotoxicidade com aspecto dose dependente das frações hexânica e metanólica para *C. ambrosioides*, alcançando um percentual de inibição de 42,69% e 26,86% na maior concentração (100 µg/mL), respectivamente para estas frações (Figura 14).

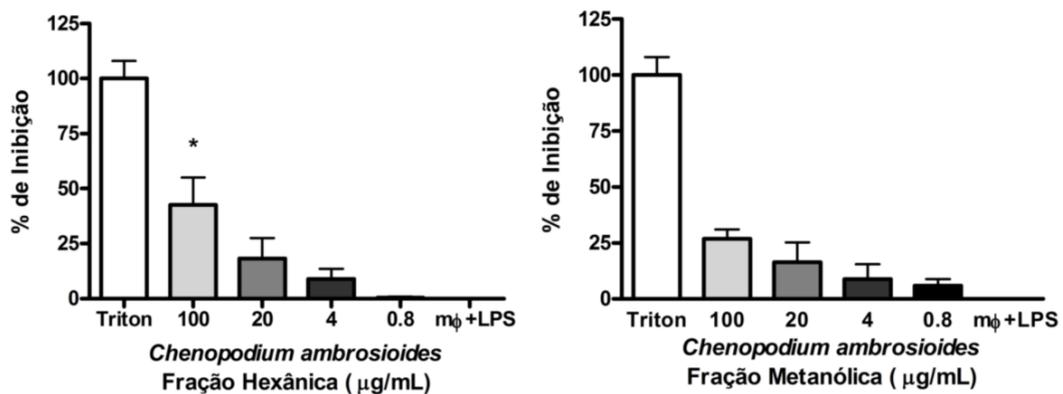


Figura 13. Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos estimulados com LPS após o tratamento com os Extratos Hidroetanólicos de *Eucalyptus alba* e *Chenopodium ambrosioides*. Triton é utilizado como controle positivo. Os dados representam a média da triplicata de um de três experimentos realizados com resultados semelhantes. \*  $p < 0,001$  quando comparado com controle negativo (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extratos ou frações).

Com relação ao extrato hidroetanólico de *E. alba*, se observou que o extrato de *C. ambrosioides* foi citotóxico na maior concentração de 100 µg/mL, enquanto o extrato de *E. alba* não apresentou citotoxicidade significativa quando comparado com o controle negativo (figura 14).

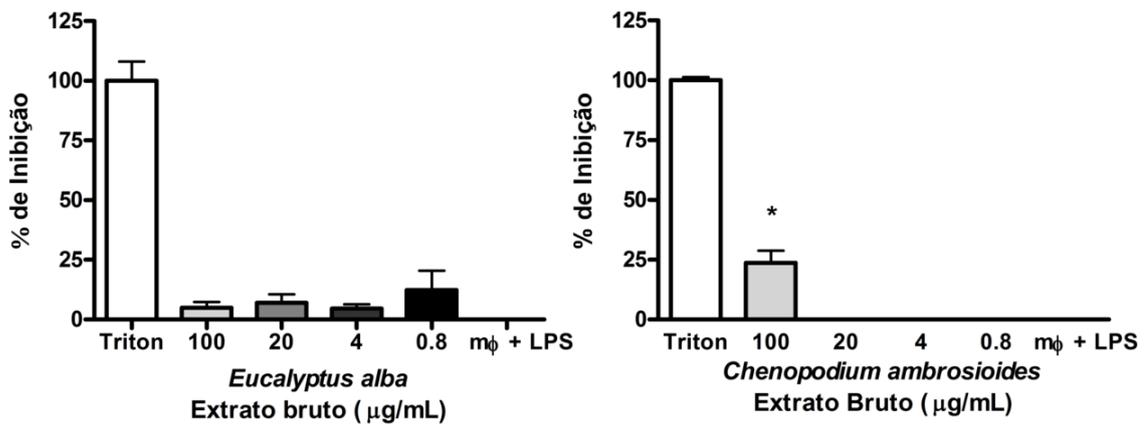


Figura 14. Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos estimulados com LPS após o tratamento com as Frações Hexânica e Metanólica de *C. ambrosioides*. Triton é utilizado como controle positivo. Os dados representam a média da triplicata de um dos três experimentos realizados com resultados semelhantes. \*  $p < 0,05$  quando comparado com controle negativo (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extratos ou frações).

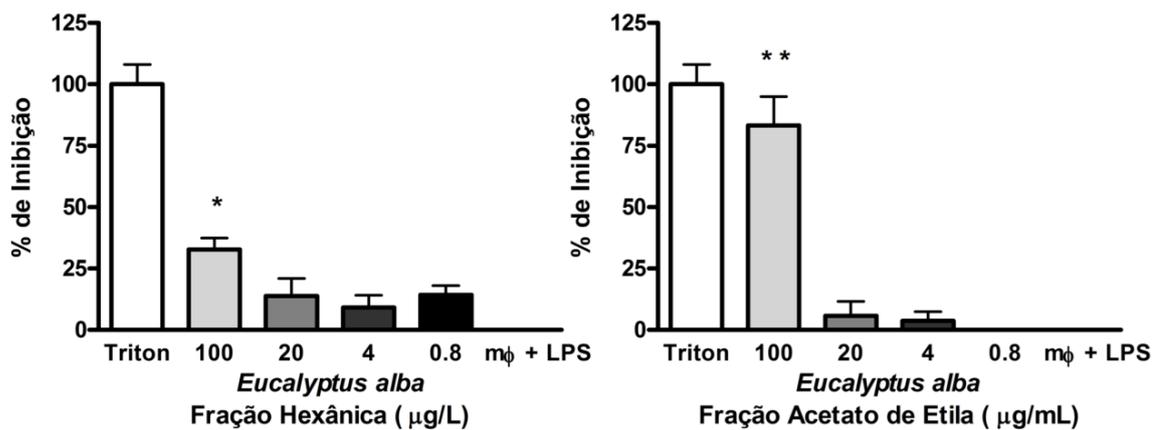


Figura 15. Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos estimulados com LPS após o tratamento com as Frações Hexânica e Acetato de Etila de *Eucalyptus alba*. Triton é utilizado como controle positivo. Os dados representam a média da triplicata de um de três experimentos realizados com resultados semelhantes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  quando comparado com controle negativo (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extratos ou frações).

Embora o extrato bruto de *E. alba* não tenha sido citotóxico, as frações hexânica e acetato de etila provenientes desta espécie apresentaram citotoxicidade na concentração de 100 µg/mL (Figura 15).

Não foi observada ação citotóxica das frações clorofórmica e acetato de etila de *C. ambrosioides*, assim como das frações clorofórmica e metanólica de *E. alba* sobre macrófagos murinos RAW 264.7 utilizando o ensaio do MTT. GADANO et al (2007), em estudo que avaliou a atividade do extrato aquoso de *C. ambrosioides* em

cultura de linfócitos nas concentrações de 1000 – 1 µg/mL, verificaram citotoxicidade e redução do índice mitótico com consequente indução da morte celular. Sowemimo et al (2007) verificaram que o extrato hidroetanólico a 80% de toda a planta de *C. ambrosioides* nas concentrações 50, 500 e 5000 µg/mL, não foi citotóxica contra *Artemia salina* e tampouco mutagênica. Há relatos na literatura de que a espécie pode ser um promissor agente antitumoral (JIA LIANG et al, 2003; KOBA et al, 2009, ABBASI et al, 2012). Monzote et al (2009) verificaram que o óleo essencial de *C. ambrosioides* e os metabólitos ativos ascaridol, carvacrol e óxido cariofileno inibiram o crescimento de macrófagos provenientes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, denotando concentração inibitória média (IC50 de 58,2; 5,5; 32,3 e 2,1 µg/mL, respectivamente. O Resultado desse estudo também demonstrou que o mecanismo de ação citotóxica do óleo e seus componentes está correlacionado com a inibição da função respiratória exercida pelas mitocôndrias no interior das células (MONZOTE et al, 2009).

No presente estudo o extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* foi citotóxico somente na concentração de 100 µg/mL. Contudo, os relatos da literatura denotam citotoxicidade do extrato, do óleo essencial e de compostos isolados desta espécie frente às células eucarióticas, além de atividade antitumoral comprovada. A baixa citotoxicidade do extrato apresentada neste estudo pode estar relacionada à linhagem celular utilizada e ao processo extrativo.

Com relação ao Eucalipto, estudos recentes têm demonstrado que os extratos, o óleo essencial e alguns componentes isolados a partir de *E. benthamii* demonstraram alguma atividade citotóxica (BENYAHIA et al, 2005; DOLL-BOSCARDIN et al, 2012). É importante destacar que algumas espécies do gênero *Eucalyptus* também possuem atividade antitumoral comprovada (BAGHAT et al, 2012; AL-SAYED et al, 2012; WANG et al, 2012; CHEN et al, 2014; SOLIMAN et al, 2014). Os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios para a avaliação da potencialidade de aplicação clínica de um novo produto. Experimentos celulares laboratoriais possibilitam reproduzir condições e reações semelhantes às ocorridas no organismo, podendo, dessa forma, observar e quantificar alterações sofridas pelas células frente a um determinado produto ou medicamento (GOMES et al, 2011).

A partir dos resultados da atividade do extrato hidroetanólico de *E. alba* frente às cepas de *M. tuberculosis* e *M. fortuitum*, e pela ação citotóxica observada

somente na concentração mais elevada frente à linhagem celular de macrófagos, sugere-se que este extrato pode ser melhor estudado visando à sua utilização em formulações fitoterápicas contra infecções causadas por micobactéria causadora da tuberculose, além de sua potencial utilização contra infecções cutâneas ou de tecidos moles causadas por micobactérias não tuberculosas. Não há dados na literatura científica relatando a utilização de formulações farmacêuticas de uso tópico com princípio ativo de plantas medicinais ou compostos isolados empregados no combate às infecções causadas por *M. fortuitum*, considerando que os medicamentos empregados para esta doença são os mesmos medicamentos utilizados por via oral para o tratamento da tuberculose (BROWN-ELLIOT et al, 2012). Embora a fração acetato de etila de *E. alba* tenha sido citotóxica contra RAW 264.7 de uma forma bastante significativa quando comparado ao controle negativo é importante ressaltar que o mecanismo desta inibição da viabilidade de macrófagos precisa ser explorada, uma vez que danos teciduais não foram evidenciados no teste de toxicidade aguda oral *in vivo*.

Os dados obtidos encorajam a realização de estudos posteriores, a fim de determinar as substâncias que contribuem para a atividade antimicobacteriana das frações clorofórmica de *C. ambrosioides* e acetato de etila de *E. alba*, entender o mecanismo de ação e avaliar a toxicidade subcrônica, visando um possível insumo farmacêutico contra *M. tuberculosis* e *M. fortuitum*. Ainda com relação à fração acetato de etila de *E. alba*, que também inibiu a viabilidade de macrófagos murinos, sugere-se a realização de testes de viabilidade celular utilizando outras linhagens de células, tais como células mononucleares de sangue periférico, em especial linfócitos e monócitos, além da realização de testes antineoplásicos utilizando esta fração.

## 5.8 Atividade Imunomoduladora

### 5.8.1 Ensaio da Produção de Óxido Nítrico (NO)

Conforme revisado por Bogdan (2001) as funções do óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* no sistema imune incluem: atividade antimicrobiana; atividade antitumoral; atividade citotóxica (dano tecidual); atividade citoprotetora (preservação de tecidos); atividade imunoestimulatória (pró-inflamatória) e atividade imunossupressora (anti-inflamatória).

O extrato bruto de *C. ambrosioides* inibiu a produção de óxido nítrico pelos macrófagos nas concentrações de 20, 4 e 0,8 µg/mL, conforme apresentado na Figura 16. Porém, curiosamente a maior concentração do extrato não apresentou inibição da produção de óxido nítrico, demonstrando que em doses mais elevadas o extrato foi incapaz de realizar esta ação, uma possível explicação para este resultado pode ser a citotoxicidade observada na concentração de 100 µg/mL (Figura 14).

O extrato bruto de *E. alba* demonstrou *in vitro* capacidade em inibir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos em todas as concentrações testadas, com exceção da menor concentração de 0,8 µg/mL, digno de nota é a característica de inibição ser dose-dependente com uma maior inibição na concentração de 100 µg/mL quando comparado aos macrófagos estimulados com LPS e não tratados com os extratos e frações (Figura 16).

Com relação às frações, observou-se inibição da produção de NO nas frações acetato de etila tanto de *C. ambrosioides* L quanto de *E. alba*, além de inibição também na maior concentração da fração hexânica de *C. ambrosioides* (Figura 17).

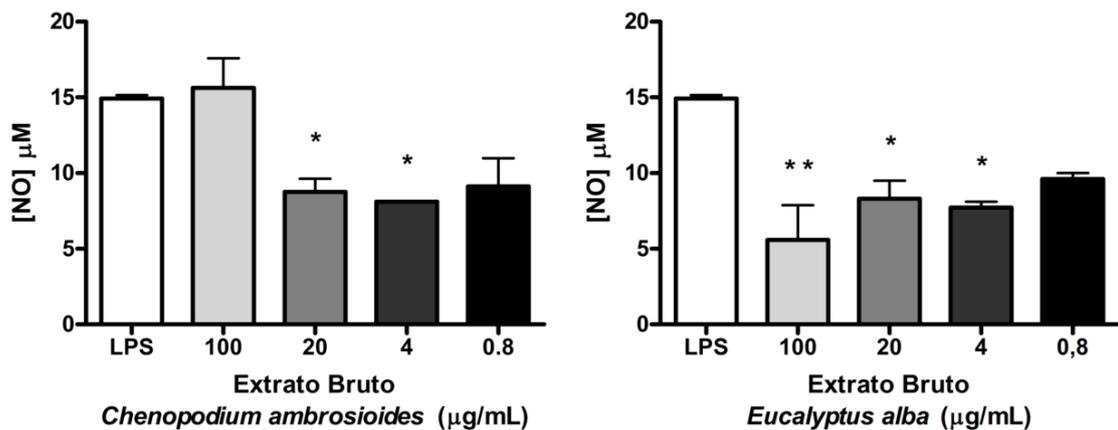


Figura 16. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e tratados com extrato bruto de *Chenopodium ambrosioides* e *Eucalyptus alba*. Os dados representam a média da triplicata de um de três experimentos realizados com resultados semelhantes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com controle (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extratos ou frações).

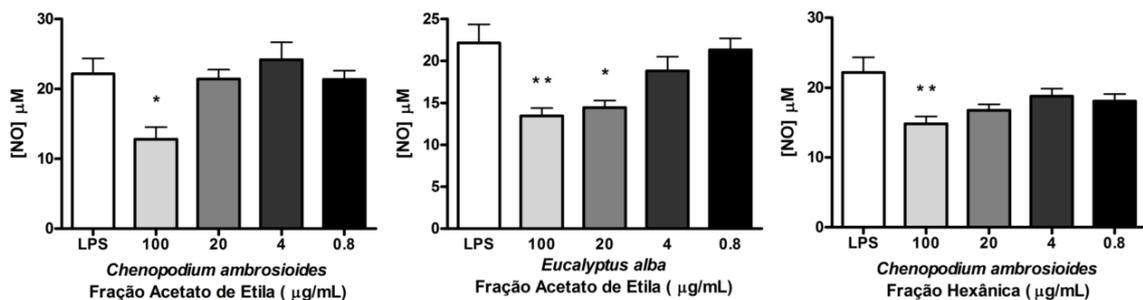


Figura 17. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e tratados com Frações Acetato de Etila de *Chenopodium ambrosioides* L e *Eucalyptus alba* e Fração Hexânica de *Chenopodium ambrosioides*. Os dados representam a média da triplicata de um de três experimentos realizados com resultados semelhantes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com controle (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extratos ou frações).

Os compostos capazes de inibir a produção de NO tem alto potencial como agentes anti-inflamatórios e antioxidantes (HAMALAINEN et al, 2007). Cruz et al (2007) observaram efeito imunoestimulatório do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides in vivo* utilizando camundongos, sendo observado indução da ativação de macrófagos, aumento do recrutamento/proliferação celular em órgãos linfóides secundários como baço e linfonodos, e melhora da habilidade fagocitária destas células, aumentando a produção de óxido nítrico. O presente estudo demonstrou uma ação de inibição dos extratos e frações *in vitro*, o que pode representar uma ação benéfica no caso de regulação da resposta imune induzida

pela presença de constituintes bacterianos, tais como o LPS. Durante a inflamação, a produção de NO aumenta e exerce efeitos pró-inflamatórios e regulatórios. Muitas patologias, incluindo a tuberculose, resultam ou estão relacionadas com um processo inflamatório agudo e/ou crônico, com aumento da produção de mediadores químicos de modo a ocasionar lesão tecidual, disfunção de múltiplos órgãos e em último caso, o óbito (SKIPPEN et al, 2008). Assim, extratos e frações que demonstrem apresentar a capacidade de inibição da produção de óxido nítrico podem ser úteis na contenção de uma resposta inflamatória exacerbada que resulte em prejuízo para o hospedeiro. Alguns insumos derivados de plantas demonstraram-se como NO-indutores ou inibidores por diferentes mecanismos (CALIXTO et al, 2003; NASCIMENTO et al, 2006b). Calixto et al (2003) revisaram que a atividade anti-inflamatória pode estar associada a supressão da produção de NO por down regulation de fatores de transcrição, bloqueio da produção de NO e da atividade e expressão da enzima NO sintetase em macrófagos e redução da produção de NO e expressão do gene de iNOS em macrófagos pela inibição da ativação de proteínas nucleares.

Outras espécies do gênero *Eucalyptus* também demonstraram atividade semelhante à observada no presente estudo. *E. gomphocephala* em sua fração acetato de etila inibiu a produção de NO (20%), 5-LOX (48.0%) e COX-2 (49.7%) em células RAW 267.4 na concentração de 20 µg/mL, o que levou os autores a sugerirem que esta fração pode ser um potencial agente antitumoral devido à sua atividade anti-inflamatória (AL SAYED et al, 2012). VIGO et al (2004) verificaram que o extrato de *E. globulus* inibiu significativamente a produção de NO estimulados por LPS, na linhagem de células de macrófagos murinos J774A.1. O estudo ainda sugere que o mecanismo desta inibição da produção de radicais NO por este extrato pode ser devido à sua atividade de eliminação de radicais livres e/ou pela inibição da transcrição do gene iNOS. O composto isolado citral (3 - 12 µg/mL), um terpenoide, inibiu significativamente a produção de óxido nítrico, induzida por LPS em células RAW 264.7, inibindo a atividade de transcrição e expressão de iNOS, sugerindo que este composto possui ação anti-inflamatória e os seus efeitos podem estar relacionados à inibição da produção de NO pela supressão da ativação de fatores de transcrição (LEE et al, 2008).

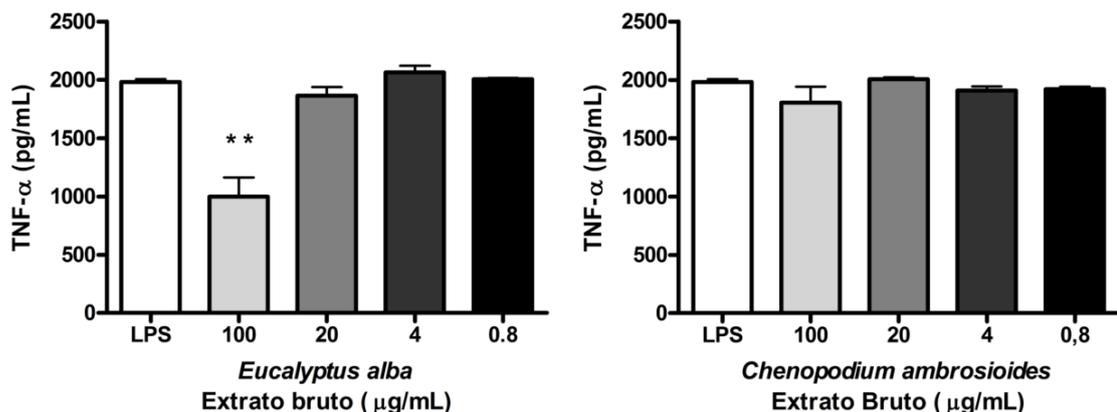
#### 5.8.2 Ensaio da Produção de TNF- $\alpha$

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) desempenha um papel importante no controle inicial e de longa duração da tuberculose. Segundo Galli et al (2008), a atividade imunomoduladora dos monócitos é exercida quando os mesmos promovem a migração, a maturação, a diferenciação e a função de células imunitárias através da secreção de fatores, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas.

Há na literatura muitos estudos sobre a avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos e metabólitos secundários isolados a partir de plantas medicinais. Estes estudos foram realizados por meio de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (NEWMAN et al, 2003; SETTY e SIGAL, 2005).

Moléculas de origem naturais podem ter a capacidade de inibir fatores que contribuem para o processo inflamatório como: citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, fatores nucleares e outras enzimas inflamatórias como iNOS e COX-2, exercendo assim atividade anti-inflamatória (ESTRADA et al, 2010). A Figura 18 demonstra a atividade dos extratos brutos de *E. alba* e *C. ambrosioides* no teste de inibição da produção do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos estimulados por LPS.

Figura 18. Capacidade de inibição da produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados com LPS após



o tratamento com extrato bruto de *E. alba* e *Chenopodium ambrosioides*. Os dados representam a média da triplicata de um de três experimentos realizados com resultados semelhantes. \*\* p < 0,001 quando comparado com controle (macrófagos estimulados com LPS e não tratados com extratos ou frações).

A citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  secretada pelos macrófagos, assim como o NO, causa dano tecidual ou celular quando em altas concentrações (BALKWILL et

al, 2001), com base nos resultados apresentados, pode se afirmar que o extrato bruto de *E. alba* possui capacidade de inibir a produção desta citocina quando utilizado na concentração de 100 µg/mL, sugerindo um potencial efeito anti-inflamatório para este extrato.

O extrato bruto de *C. ambrosioides* não reverteu à ação do estímulo com LPS, e foi incapaz de inibir a produção de TNF-α nas concentrações utilizadas neste estudo. Os dados não estão de acordo com estudos que utilizaram outras espécies do gênero *Chenopodium*, que demonstraram possuir atividade anti-inflamatória.

Em um estudo que utilizou quatro frações, provenientes de sementes de *Chenopodium quinoa*, foram identificadas a presença de 11 saponinas por HPLC-MS. Estas frações nas concentrações 100 e 200 µg/mL inibiram a produção de NO e também a liberação de TNF-α e IL-6 em células RAW 264.7 estimulada por LPS. A partir destes resultados, os autores concluíram que as saponinas de quinoa possuem potente atividade anti-inflamatória de forma dose-dependente e o mecanismo de ação pode estar associado à inibição da superprodução de mediadores inflamatórios, tais como NO, IL-6 e TNF-α (YAO et al, 2014).

O composto isolado monoterpênico, para-cimeno, o qual pode ser encontrado no óleo essencial de *C. ambrosioides*, inibiu *in vitro* a produção de TNF-α quando utilizado na concentração de 53,58 µg/mL, além de IL-6 e IL-1β nas concentrações de 214,32 e 107,16 µg/ml, respectivamente, em células RAW 264.7 estimuladas por LPS. O teste *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6 inibiu significativamente a liberação de TNF-α e IL-1β nas concentrações de 214,32, 107,16 e 53,58 µg/mL. Os autores sugeriram que o mecanismo da atividade anti-inflamatória envolve a modulação de citocinas através do bloqueio do fator de transcrição NF-kB e das vias de sinalização MAP-quinases (MAPK) (ZHONG et al, 2013).

Com relação ao extrato bruto de *E. alba*, observou-se a reverção da ação do estímulo com LPS na concentração de 100 µg/mL, inibindo assim a produção de TNF-α. Considerando que o extrato bruto de *E. alba* inibiu a produção de TNF-α e NO e apresentou baixa citotoxicidade pelo método do MTT, os resultados sugerem um potencial agente anti-inflamatório para este extrato. Uma vez que não há estudos de imunomodulação com espécies do gênero *Eucalyptus* utilizando estes métodos, optou-se por comparar com outras espécies de gênero diferente. Neste sentido, BERNARDES (2014) verificou que o extrato metanólico de *Schinus terebenthifolius* inibiu a produção de TNF-α, NO e apresentou baixa citotoxicidade, o autor utilizou os

mesmos métodos e linhagem de células. Os resultados de tal estudo o levaram a sugerir a capacidade imunofarmacológica do extrato.

Em outro estudo, compostos globulinsina A e eucaglobulina, isolados do extrato aquoso das folhas de *E. globulus*, apresentaram atividade antioxidante e anti-inflamatória quando testados em culturas de células humanas - a linhagem de monócitos THP-1 co-estimuladas com forbol miristato acetato (PMA). Estes compostos suprimiram a produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nas concentrações de 2, 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$  (HASEGAWA et al, 2008). Schmid et al (2012) avaliaram a atividade imunomoduladora do composto isolado, Oenotheina B testado *in vitro* em células RAW 264.7 estimuladas por LPS. Nas concentrações de 10 – 60  $\mu\text{g/mL}$  o composto reduziu a produção de NO, a produção gênica de iNOS e de TNF- $\alpha$ . O mecanismo de ação desta atividade anti-inflamatória por este composto é desconhecido. Este elagitanino é encontrado nas folhas de espécies do gênero *Eucalyptus*.

### **5.9 Toxicidade Oral Aguda dos Extratos de *C. ambrosioides* e *E. alba* e Análise Anatomo-Histopatológica**

Os extratos hidroetanólicos secos das folhas de *C. ambrosioides* e *E. alba* Reinw ex Blume foram avaliados quanto a toxicidade oral aguda em camundongos fêmeas. A triagem farmacológica e comportamental forneceu informações sobre a natureza da ação dos extratos na dose de 2500 mg/kg, sendo o teste realizado de acordo com a avaliação proposta por MALONE e ROBICHAUD (1983) modificado por BRITO (1994).

Os animais tratados com os extratos hidroetanólicos (2500 mg/kg) não demonstraram quaisquer comprometimentos do sistema nervoso central, autônomo ou motor, mudança de comportamento ou outros, durante a avaliação da toxicidade aguda oral.

Após a administração das doses de 2500 mg/kg dos extratos, os animais foram observados durante as 4 horas que se seguiram após gavagem dos extratos hidroetanólicos, os animais tratados não demonstraram nenhum sinal de toxicidade

evidente. Nenhuma morte foi observada durante os 14 dias de experimento, assim, ambos os extratos podem ser considerados de baixa toxicidade (VASCONCELOS, 2002). Segundo a OECD 423, os extratos hidroetanólicos de *C.ambrosioides* e *E. alba* receberam a classificação de toxicidade V ( $DL_{50}$  estimada > 2000 mg/Kg).

Uma vez que não houve mortes ou aparecimento de quaisquer sinais e sintomas de toxicidade com esta dose, avaliado de acordo com o *screening* hipocrático (ANEXO B) e pela avaliação da evolução ponderal, e também pelos resultados anátomo e histopatológicos, não houve necessidade de administração de doses menores do extrato hidroetanólico de *C.ambrosioides* e de *E. alba*.

A literatura sobre *C. ambrosioides* (L) relata que o óleo essencial da planta apresenta efeitos toxicológicos em doses elevadas e uso prolongado (MONTROYA-CABRERA et al, 1996). Neste estudo, o extrato hidroetanólico não apresentou toxicidade aguda oral na concentração de 2500 mg/kg quando testado em camundongos fêmeas. Visto que, não há estudos científicos de avaliação da toxicidade aguda oral desta espécie vegetal com este modelo animal, optou-se por comparar com outros modelos animais. DA SILVA et al, 2014, ao tratarem ratos fêmeas oralmente com extrato aquoso de *C. ambrosioides* nas doses 300, 1000, e 3000 mg/kg não observaram efeito tóxico dependente da dose. PEREIRA et al (2010) realizaram um estudo toxicológico com tratamento subcrônico, utilizando o extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* em camundongos. O tratamento com as dosagens mais elevadas (700 a 1000 mg/kg) induziu alterações no peso, contudo não foi letal, o que levou aos autores a sugerirem que o produto utilizado em doses adequadas é seguro. A toxicidade da espécie *C. ambrosioides* quando observada é associada aos componentes do óleo essencial (MONZOTE et al, 2009, 2011). O composto isolado ascaridol quando testado na dose de 100 mg/kg em camundongos machos induziu hipotermia e atividade motora diminuída, na dose de 300 mg/kg ocasionou a morte dos camundongos (OKUYAMA et al, 1993). Além do exame utilizando o *screening* hipocrático, foram avaliados tanto macro quanto microscopicamente o cérebro e cerebelo, o coração, pulmão, fígado e rins de todos os animais. Características da pele e pelos normais (cor, textura, densidade, espessura, comprimento dos pelos) também foram verificados e não houve alterações nos membros, orelhas, língua, dentes e olhos.

A anatomo-histopatologia torna-se uma ferramenta valiosa para avaliação de dano a um determinado órgão tanto ao nível macroscópico quanto microscópico,

uma vez que inclui neste exame a observação de processos agudos, dentre os quais a inflamação aguda que tem como consequência lesão ou morte celular e a avaliação de processos alérgicos pela presença de eosinófilos e modificações teciduais (CULLING et al, 1985).

Do ponto de vista macroscópico os animais tratados com o extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* não apresentaram alterações anatômicas dos órgãos. Na avaliação microscópica, o coração, os rins e o sistema nervoso central encontravam-se dentro dos limites da normalidade histológica. Houve sinais de esteatose microvesicular e antígeno linfocitário no fígado. Estas discretas alterações possivelmente são em virtude de alguns fatores, tais como alimentação (haja vista que este tipo de ração contém um teor elevado de gordura) ou estresse (decorrente dos procedimentos de manipulação diária). A presença de antígeno linfocitário no fígado pode ser decorrente da qualidade dos animais fornecidos pelo Biotério e não significam sinais de toxicidade ao extrato vegetal, tampouco invalidam os controles. O achado de esteatose microvesicular discreta não alcoólica foi comum também em outros estudos histopatológicos que utilizaram camundongos de ambos os gêneros, provenientes do Biotério Central da UFPA (GOMES, 2011; VILHENA, 2012; SANCHES, 2013). O estudo histológico dos pulmões revelou hiperemia e hemorragia podendo estar associada ao sacrifício.

Os resultados preliminares obtidos no ensaio de toxicidade mostram que o extrato bruto de *C.ambrosioides* não possui toxicidade evidente nos modelos e na concentração (2500 mg/kg) testada. Testes posteriores avaliarão se o extrato apresenta toxicidade *in vivo* em doses repetidas (ensaio de toxicidade oral subcrônico) e outros deverão ser realizados para avaliar o potencial mutagênico, carcinogênico ou teratogênico deste extrato vegetal.

Com relação à outra espécie em estudo, o extrato de *E. alba* também não foram evidentes sinais de toxicidade na dose empregada (2500 mg/kg), corroborando com a classificação do Extrato Hidroetanólico de *E. alba* em baixa toxicidade (toxicidade V), segundo a triagem comportamental e farmacológica no modelo animal camundongo e na dose testada. No que concerne com a análise histopatológica do extrato hidroetanólico de *Eucalyptus*, os animais tratados com o extrato hidroetanólico de *E. alba* não apresentaram alterações anatômicas dos órgãos. Na avaliação microscópica, o coração, os rins e o sistema nervoso central encontravam-se dentro dos limites da normalidade histológica. Houve sinais de

esteatose microvesicular e antígeno linfocitário no fígado, além de presença de hiperemia e hemorragia decorrente do sacrifício, que não está ligada a atividade do extrato. Outras espécies do gênero *Eucalyptus* foram avaliadas em estudo de toxicidade oral aguda e não demonstraram efeito tóxico na dose testada. KABIRU et al (2012) não observaram sinais de toxicidade oral aguda nas doses de 1000 – 5000 mg/kg do extrato metanólico das folhas de *E. camaldulensis* em camundongos e confirmaram a segurança do extrato, uma vez que mesmo na maior dose testada não foram verificadas letalidade.

MACEDO et al (2011) avaliaram, em camundongos *Swiss* albinos, a toxicidade aguda oral do óleo essencial das folhas de *E. citriodora*. A administração oral deste óleo essencial nas doses de 3000 e 2000 mg/kg não apresentaram sinais evidentes de toxicidade durante os dias de observação. Xu et al (2014) testaram os efeitos da toxicidade oral aguda e subaguda do composto isolado de *Eucalyptus*, 1,8 cineol em camundongos. A dose de 3000 mg/kg apresentou baixa toxicidade, e a  $DL_{50}$  foi de 3850 mg/kg. No teste de toxicidade oral subaguda não houve alteração no peso corporal do animal e do peso dos órgãos. O exame histopatológico mostrou a presença de degeneração granular e vacuolar no tecido do fígado e rim na maior dose de 1,8 cineol.

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade oral aguda mostraram que o extrato hidroetanólico das folhas de *E. alba* não possui toxicidade evidente nos modelos e nas concentrações avaliadas. Ressalta-se que a fração acetato de etila de *E. alba* apresentou elevada citotoxicidade pelo método do MTT utilizando a linhagem celular RAW 264.7. Contudo, o extrato hidroetanólico de *E. alba* não demonstrou causar danos teciduais aos órgãos avaliados. Com base nestes resultados, sugere-se a utilização de estudos biológicos futuros empregando o extrato hidroetanólico de *E. alba* com a finalidade de se obter um insumo farmacêutico ativo. A elevada citotoxicidade da fração acetato de etila pode comprometer o seu uso em formulações por via oral, apesar disso, são necessários estudos com esta fração para a sua posterior utilização como insumo em preparações de uso tópico, visto que, observamos uma ação efetiva desta fração sobre a espécie patogênica *M. fortuitum*, que causa infecção cutânea e subcutânea secundária a trauma, além disso, os efeitos citotóxico e anti-inflamatório apresentados por esta fração podem ser interessantes em pesquisas de atividade antitumoral.

## 6 CONCLUSOES

Por meio da caracterização físico-química e microbiológica dos extratos de *C. ambrosioides* e *E. alba* foi possível conseguir especificações dos parâmetros de controle de qualidade dos extratos que atingiram valores aceitáveis quando comparados com a literatura específica para plantas medicinais, sendo estes parâmetros importantes para as etapas de elaboração de um insumo farmacêutico ativo.

A prospecção fitoquímica preliminar do extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* identificou a presença de triperpenoides e esteroides, sendo este metabólitos secundários de interesse farmacológico pois possuem atividade antimicrobacteriana e anti-inflamatória comprovada. Já o estudo da fitoquímica do extrato hidroetanólico de *E. alba* revelou a presença de saponinas, ácidos orgânicos, fenóis e taninos e lactonas sesquiterpênicas.

O extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* não apresentou atividade frente às cepas de micobactérias tuberculosa e não tuberculosa *in vitro*. A análise da atividade antimicrobacteriana da fração clorofórmica de *C. ambrosioides* evidenciou eficácia moderada frente à cepa de *M. tuberculosis*.

Os resultados obtidos através da avaliação da atividade antimicrobacteriana corroboraram a hipótese da ação anti-*M. fortuitum* do extrato bruto das folhas de *E. alba* e permite concluir que a espécie em questão apresenta um potencial biológico importante contra infecções oportunistas decorrentes desta micobactéria. A fração acetato de etila de *E. alba* foi efetiva contra as cepas de *M. tuberculosis* e *M. fortuitum*.

O extrato hidroetanólico de *C. ambrosioides* também não demonstrou atividade citotóxica, tampouco sinal evidente de toxicidade oral aguda em camundongos na dose testada.

Extrato de *E. alba* não apresentou citotoxicidade como também não apresentou sinal evidente de toxicidade aguda em camundongos na dose oral testada. Os ensaios preliminares de avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* identificaram uma potencial ação anti-inflamatória do extrato hidroetanólico de *E. alba*.

A fração acetato de etila de *E. alba* apresentou potencial citotoxicidade quando

utilizada em altas concentrações. Outras frações também apresentaram alguma citotoxicidade aparente em altas concentrações (hêxanica e metanólica de *C. ambrosioides* e hexânica de *E. alba*), enquanto as demais frações não tiveram atividade antimicobacteriana *in vitro* e também não foram citotóxicas.

Os conjuntos dos resultados indicam uma boa perspectiva quanto à segurança e ao uso da fração clorofórmica de *C. ambrosioides* e sugerem estudos posteriores. Fica evidente a necessidade do isolamento dos metabólitos secundários ativos desta fração para observar a atividade antimicobacteriana destes metabólitos puros *in vitro*. Os resultados do extrato hidroetanólico de *E. alba* podem subsidiar estudos visando a utilização deste extrato como insumo farmacêutico. E também para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos com atividade antibacteriana.

E este estudo representa o início da pesquisa em relação aos esforços para se obter um novo fármaco ou fitoterápico com atividade antimicobacteriana, não citotóxico, com atuação na modulação de citocinas inflamatórias e imunomodulatórias.

Por fim, este estudo apresenta resultados obtidos de maneira metódica e científica, fornecendo dados que despertam na comunidade acadêmica a importância de estudar as plantas medicinais usadas pelos nossos ancestrais e abundante na flora brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASS N. A.; SULEIMAN K. M.; EI JALII I. M. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by their *GyrB* polymorphism. **Indian J Med Microbiol** 2010;28:26-9
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 7<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2012. p.
- ABBASS, K.; ADNAN, M. K.; MARKERT, R. J.; EMIG, M.; KHAN, N. A. *Mycobacterium fortuitum* breast abscess after nipple piercing **Can Fam Physician** v.60(1); 2014 Jan
- ABBASI R.; EFFERTH T.; KUHMANN C.; OPATZ T.; HAO X.; POPANDA O.; SCHMEZER P. The endoperoxide ascaridol shows strong differential cytotoxicity in nucleotide excision repair-deficient cells. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2012 Mar 15;259(3):302-10. doi: 10.1016/j.taap.2012.01.006. Epub 2012 Jan 17.
- ADENIYI, B. A.; AYEOLA, O. O. The Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus torelliana* (Myrtaceae) 2008 **Research Journal of Medicinal Plant**, 2: 34-38
- AGUIAR R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. 2005. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry** 66: 2388-2392.
- AKIN, M. A.; AKTUMSEK, A N. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus **African Journal of Biotechnology** Vol. 9 (4) pp. 531-535, 25 January, 2010
- ALBERTO, MR ; FARIAS, ME ; DE NADRA, MCM Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, 2001, Vol.49(9)
- ALONSO, J. R. 1998. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. ISIS. Ediciones SRL, p.238-254.
- ALTMANN, K. H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr Opin Chem Biol**, v.5, p. 424-431, 2001
- ALVES, M. S. M.; MENDES, P. C.; VIEIRA, J. G. D. P.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2010;20:215-21
- ALVARENGA R. F. R; WAN, B.; INUI, T.; FRANZBLAU, S. G.; PAULI; JAKI, B. U. Airborne Antituberculosis Activity of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil **J. Nat. Prod.**, 2014, 77 (3), pp 603–610 March 18, 2014

ALVARENGA F. C. R.; GARCIA E. F.; BASTOS E. M. A. F.; GRANDI T. S. M.; DUARTE M. G. R. 2009. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Rev Bras Farmacog** 19: 442-448

AL SAYED, E.; SINGAB, A. N.; AYOUB, N.; MARTISKAINEN, O.; SINKKONEN, J.; PIHLAJA, K. HPLC–PDA–ESI–MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC **Food Chemistry** 133 (2012) 1017–1024

ATS - American Thoracic Society; An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment and prevention of nontuberculosis mycobacterial diseases. **Am J Respir Crit Care Med.** 2007;175(4):367-416.

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1715-1719, 2006.

ANTUNES, J. L. F. Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica **Hist. cienc. saude-Manguinhos** vol.9 no.3 Rio de Janeiro Sept./Dec. 2002

ANVISA, Infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido: Fluxo de Notificações, Diagnósticos Clínico e Microbiológico e Tratamento. **Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Ministério da Saúde**, 2009

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, n.4, p.399-436, 2003.

ARANTES, V. P.; SATO, D. N.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; LEITE, C. Q. F. Plantas do Cerrado Brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.26, n.3, p.195-8, 2005.

AREMU, A. O.; AMOO, S. O.; NDHLALA, A. R.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea* **Food and Chemical Toxicology** Volume 49, Issue 5, May 2011, Pages 1122–1128

AYISSI, O. B.; NJAYOU, N.F.; LAUFER, S.; MOUNDIPA, P.F.; SCHLUESENER, H.J. A fraction of stem bark extract of *Entada africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells **Journal of Ethnopharmacology** 149 (2013) 162–168

BACHA, W. J. e WOOD, L. M. **Color Atlas of Veterinary Histology**. Lea and Febinger, Philadelphia, 1990, p-269

BALKWILL, F., MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet Review**, (2001) 357: 539-545.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**, Belém – Pa: Revista Científica da UFPA, 2001. Disponível em <http://www.ufpa.br/cientifica>. v. 4, 2004. Acesso em 13 de outubro de 2011.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. **Etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – PA**. In: BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; SILVA, W. B.; FERNANDES, J. G. S.; SOLER, O. **Etnofarmácia – Fitoterapia popular e ciência farmacêutica**. Belém: NUMA/UFPA, 2011. p. 49-16

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1984. v.2. 377p.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; SIDDIQUI, B. S.; SHAHEEN, F.; GHAYUR, M. N. and GILANI, A. H. (2002), Triperpenoids from the leaves from *Psidium guajava*. **Phytochemistry**, 61, 399-403.

BELTAN, E., HORGEN, L.; RASTOGI, N. (2000) Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. **Microb Pathog** 28: 313–318.

BENYAHIA, S.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; LEÓN, F.; QUINTANA, J.; LÓPEZ, M.; HERNÁNDEZ, J. C.; ESTÉVEZ, F.; BERMEJO, J. Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity. **Phytochemistry**. 2005 Mar;66(6):627-32.

BERNARDES, N. R. **Schinus terebinthifolius Raddi: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E POTENCIAL BIOLÓGICO** 2014. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2014.

BETHLEM, N.; BETHLEM, E.P.; RIBEIRO, S.N.; GERHARDT, F.G.; LAPA, E. S. J. R.; MUZY, S.; CÔRREA, J.C.; MAGARÃO, S.L.; GONTIJO, F.P.P.; FONSECA, L.S.; SANT'ANNA, C.C.; HIJAR, M.A. Tuberculose. In: Newton Bethlem, editor. **Pneumologia**. 4a ed. São Paulo: Atheneu. P. 379-448, 1995.

BHAGAT, M.; SHARMA, V.; SAXENA, A. K. Anti-proliferative effect of leaf extracts of *Eucalyptus citriodora* against human cancer cells in vitro and in vivo. **Indian J Biochem Biophys**. 2012 Dec;49(6):451-7.

BOGDAN, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**. 2:906-916.

BOLIGON A. A. AGERTT, V.; JANOVIK, V.; CRUZ, R. C.; CAMPOS, M. M. A.; GUILLAUME, D.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, A. R. S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia* **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 22(1): 45-52, Jan./Feb. 2012 22(1): 45-52, Jan./Feb. 2012

BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A. G; MENEZES, J. R. A.; FRANCA, S. C.; RUPATO, C. B.; SANTOS, P. A. S; LOPES N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Bccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Rev. Bras. Farm.** V.16, n14 out/dez, 2006

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE 2013 Obtido em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ldb2013/matriz.htm>

BRASIL. Resolução nº 10, de 9 de março de 2010: **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL. Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica. Brasília, 2002.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis** (2003) 83, 91–97.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo***. Campina, SP: Editora da UNICAMP, 1994.

BROOKER, M.I.H.; KLEINIG, D.A. Field Guide of *Eucalyptus* **Bloomings Books**, 353, 2<sup>nd</sup> Edition 2004.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S. & MORSE, S. A. JAWETZ, MELNICK E ADELBERG **Microbiologia Médica**. 25<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, McGraw Hill, 2010

BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, VAN SOOLINGEN D, COLE S. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99: 3684-3689

BROWN-ELLIOT, B. A.; NASH, K. A.; WALLACE JUNIOR, R. J. Mycobacteria Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Antimicrobial **Clin. Microbiol. Rev.** 2012, 25(3):545.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose: Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011

BURKILL H. M (1985). The Useful Plants of West Tropical Africa. 2nd edition. Families A-D. **Royal Botanic Gardens**, Kew, London, 1: 366-367.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part 1 Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Medica** 2003 Nov;69(11):973-83.

CAMARGO, J. E. R.; ALFONSO, A. T. N.; ROZAS-ROSO, R. A.; CASTRO, C.; MURCIA, T. R. Efectos citotoxicos in vitro de extractos y fracciones de *Bursera tomentosa* (Jacq.) Triana & Planch., Burseraceae, frente a líneas celulares tumorales humanos **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(4): 588-593, Ago./Set. 2010

CAMELO, S. R. P. **Estudos de pré-formulação e formulação de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy** Dissertação Mestrado em Ciências farmacêuticas, pela Universidade Federal do Pará, Faculdade de Farmácia Belém 2009

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ** 2006;15(1):29-35 2

CANTRELL CL, Franzblau SG, Fischer NH 2001. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med** 67: 685-694.

CASTELLAR A.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; RAMOS, D.F.; LOURENÇO, M. C. S.; LAGE, C. L. S.; JULIÃO, L. S.; BARBOSA, Y. G.; LEITÃO, S. G. 2011. The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Rev Bras Farmacogn** 21: 835-840. 2011

CASTILHO, W. Copaíba se mostra Eficaz Contra Tuberculose **Revista de Pesquisa FAPESC** 2010

CARVALHO A. A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A. F. M; SENA K. X. F. R; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J. S. 2002. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farm Bonaerense** 21: 255-258.

CHEN, Y. J.; SHIAU, S. V. L. The role of endoplasmic reticular  $Ca^{2+}$  stores in cell viability and tumor necrosis factor- $\alpha$  production of the murine macrophage RAW 264.7 cell line **Journal of Biomedical Science** March–April 2000, Volume 7, Issue 2, pp 122-127

CHI, Y. S.; CHEON, B.S.; KIM, H.P. Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. **Biochemical Pharmacology**. 2001, 61, 1195-1203.

CHICHIOCO-HERNANDEZ, C.; WURDASKI, J.; GEVAERT, L.;VERSCHAEVE, L. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of some Philippine medicinal plants **Pharmacognosy Magazine** 2011 Apr-Jun; 7(26): 171–175.

CHIRINOS, N. E. C.; MEIRELLES, B.H.S. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose: uma revisão integrativa **Texto contexto - enferm**. vol.20 no.3 Florianópolis Jult/Sept. 2011

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.213-220, 2002.

CLSI – **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae and Other Aerobic Actinomycetes** Approved standard CLSI document M24-A2- 2011

CONDE, M. B.; MELO, F. A. F. M.; MARQUES, A. M. C.; CARDOSO, N. C.; PINHEIRO, V. G. F.; DALCIN, P. T. R.; MACHADO JUNIOR, A.; LEMOS, A. C. M.; RUFFINO NETTO, A.; DUROVNI, B.; SANT'Anna, C. C.; LIMA, D.; CAPONE, D.; BARREIRA, D.; MATOS, E. D.; MELLO, F. C. Q.; DAVID, F. C.; MARSICO, G.; AFIUNE, J. B.; SILVA, J. R. L.; JAMAL, L. F.; TELES, M. A. S.; HIRATA, M. H.; DALCOMO, M. P.; RABAHI, M. F.; CESAR, M. C.; PALACI, M.; MORRONE, N.; GUERRA, R. L.; DIETZE, R.; MIRANDA, S. S.; CAVALCANTE, S. C.; NOGUEIRA, S. A.; NONATO, T. S. G.; MARTIRE, T.; GALESI, V. M. N.; DETTONI, V. V. **III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia J. bras. pneumol.** vol.35 no.10 São Paulo Oct. 2009

CONWAY, G. A., SLOCUMB, J. C., 1979. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. **Journal of Ethnopharmacology** 1, 241–261

COPPEN, J. J. W **Eucalyptus: The Genus *Eucalyptus* pag 298** Taylor & Francis Inc 2002

COSTA, J. G.; SANTOS, A. C.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; ROBERTS, J. A. Tuberculose em Salvador: custos para o sistema de saúde e para as famílias **Rev. Saúde Pública** vol.39 no.1 São Paulo Jan. 2005

COSTA, P. M. N. **Diagnóstico Molecular da Tuberculose Bovina** Dissertação Mestrado Mestre em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia Lisboa 2009.

COSTA, A.F. 1994. **Farmacognosia. III** vol. 5 ed. Lisboa/ Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian/Oficina A. Coelho Dias S.A

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDII, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. **Int J Syst Evol Microbiol** 53: 1305-1314, 2003

CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P.V.S.; PATRICIO, F.J.; COSTA, G.C.; SOUSA, S.M.; FRAZAO, J.B.; ARAGAO-FILHO, W.C.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves **Journal of Ethnopharmacology**, 111 (2007), pp. 148–154

CRUZ, A.V.M; KAPLAN, M. A. C. 2004. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente** 11: 47-52.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BAAR, W.T. **Cellular pathology techniques.** 4 ed. London: Butterworths, 1985.

CUNHA J. Testes de sensibilidade à pirazinamida em todos os isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* --- uma análise crítica. **Rev Port Pneumol.** 2012. doi:10.1016/j.rppneu.2011.12.002

DA SILVA, A.M.Q.; BANDEIRA, E.S. **Extração e Padronização de Extratos vegetais.** In: TEIXEIRA, F.M. BARBOSA, W.B.; NASCIMENTO, M.S. **Plataforma Tecnológica para o Desenvolvimento de Fitoterápicos: um norte para ações de pesquisa e inovação** Editora CRV 2014 1ª Edição Curitiba PR 122, 23-36

DEBNATH T.; PARK, S.R.; KIM, D.H.; JO, J.E.; LIM, B.O. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Polygonatum sibiricum* **Asian Pacific Journal of Tropical Disease** Volume 3, Issue 4, August 2013, Pages 308–313

DEMBITSKY, V.; SHKROB, I.; HANUS, L.O. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.** 152, 209–215, 2008.

DE KANTOR, P. A.; LOBUE, C. O. Thoen Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, **Latin America and the Caribbean INT J TUBERC LUNG DIS** 14(11):1369–1373 2010

DE SOUZA, D.P.; NOBREGA, F.F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study **Chirality.** 2007 May 5;19(4):264-8.

DE PASCUAL, TJ, GONZALEZ MS, VICENTE S, Bellido IS (1981): Flavonoids from *Chenopodium botrys*. **Planta Med** 41: 389–391

DE PASCUAL TJ, TORRES BC, PEREZ MA (1980): Essential oil of *Chenopodium ambrosoides*. **Riv Ital Essenze Profiumi Pianta Off Aromi Cosmet Aerosol** 62: 123–125.

DE WAARD J. **Micobacterias patógenas y la transmisión por alimentos.** En: **Agentes patógenos transmitidos por alimentos.** Volumen II. Ed. Ma. Refugio Torres Vitela y Alejandro Castillo Ayala; 2010. ISBN 978-970-764-859-

DIBNER, J. J. e BUTTIN, P. 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **J. Appl. Poult. Res.** 11:453–463

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol,** 141: 2407-2412, 1988.

DJOUKENG, J.D., MANSOUR, E.A., TABACCHI, R., TAPONDJOU, A.L., BOUDA, H., LONTSI, D., 2005. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). **J.Ethnopharmacol.** 101, 283–286.

DLUGOVITZKY, D. et al. O. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. **FEMS Immunology And Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 18, p. 203-207, 1997

DOLL-BOSCARDIN, P. M.; SARTORATTO, A.; MAIA, B. H. L. N.S.; PAULA, J. P.; NAKASHIMA, T.; FARAGO, P.V.; KANUFRE, C. C. In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** Volume 2012 (2012), Article ID 342652, 8 pages

DOS SANTOS, A. O.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus **Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.103 no.3 Rio de Janeiro May 2008 Epub Apr 30, 2008**

DURETTO M.F; MORRIS, D. I. **AMARANTHACEAE 2**, Tasmanian Herbarium, Tasmanian Museum & Art Gallery (Ed.) Flora Tasmania Online.

EFFERTH, T., OLBRICH, A., SAUERBREY, A., ROSS, D.D., GEBHART, E., NEUGEBAUER, M., 2002. Activity of ascaridol from the anthelmintic herb *Chenopodium anthelminticum* L. against sensitive and multidrug-resistant tumor cells. **Anticancer Research** 22, 4221–4224.

ELIASSON, U. H.. The evolutionary patterns of the plant family Amaranthaceae on the Galapagos and Hawaiian Islands. **Journal of the Torrey Botanical Society** 131: 105–109, 2004

ESTRADA, H.A.G.; RUIZ, K.N.G.; MEDINA, J.D. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales **Boletín atinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas** 2011 10 (3): 182 – 217 ISSN 0717 7917

EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. European pharmacopoeia. 6.ed. Strasbourg: Council of Europe, c2007. 2 v

EUZEBY, J. P.; TINDALL, B. J.: Status of strains that contravene Rules 27(3) and 30 of the Bacteriological Code. Request for an Opinion. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2004, 54, 293-301.

FABIAN, F.; DE GIORGI,A.; PALA,M.; FRATTI,D.; CONTINI,C. Pleural effusion in an immunocompetent woman caused by *Mycobacterium fortuitum* **Journal of Medical Microbiology** (2011), 60, 1375–1378

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I; SIMOES, C.M.O. **Introducao a analise fitoquimica**. In: SIMOES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianopolis: Editora da UFSC. 2007, p.230-234.

FANK-DE-CARVALHO, M.S. BÁO, S.M.; MARCHIORETTO, S.N.; (2012) **Amaranthaceae as a Bioindicator of Neotropical Savannah Diversity**, 235-262. In **Biodiversity Enrichment in a Diverse World**. Capitulo 10 pag 235-246

FARIAS, M.R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (coord.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, p.197-220, 1999

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª ed. São Paulo: FIOCRUZ, 2010.

FELIX-SILVA, J.; TOMAZ, I.M.; SILVA, M.G.; SANTOS, K.S.C.R.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; CARVALHO, M.C.R.D.; SOARES, L.A.L.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.14, n.3, p.548-555, 2012.

FERREIRA, A.C.G.; da SILVA JÚNIOR, J.L.R.; CONDE, M.B.; RABAHI, M. F. Desfechos clínicos do tratamento de tuberculose utilizando o esquema básico recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil com comprimidos em dose fixa combinada na região metropolitana de Goiânia **J. bras. pneumol.** vol.39 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2013

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, out. 2006.

FONSECA, T.L.; VON GROLL, A.; LEITÃO, G. G.; SCAINI, C. J.; RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A. D. Atividade Antimicobacteriana de Extratos Vegetais Frente A *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium malmoense* **Revista de Ciências da Saúde** v.20, n.1 2008 ISSN impresso 1413-3563, Rio Grande, Brasil.

FONTANA, R. T. As Micobactérias de Crescimento Rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública **Revista Brasileira de Enfermagem**, vol. 61, núm. 3, mayo-junio, 2008, pp. 371-376 Associação Brasileira de Enfermagem Brasília, Brasil

FRANCA, I.S.X.D.; SOUZA, J.A.S.; BAPTISTA, R.S.B.; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais **Rev Bras Enferm**, Brasília 2008 mar-abr; 61(2): 201-8.

FRANZBLAU, S.G., WITZIG, R.S., McLAUGHLIN, J.C., TORRES, P., MADICO, G., HERNANDEZ, A., DEGNAN, M.T., COOK, M.B., QUENZER, V.K., FERGUSON, R.M., and GILMAN, R.H. Rapid low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 1997, 36(2), 362-366.

FYHRQUIST, P.; LAAKSO, I.; MARCO, S. G.; JULKUNEN-TIITTO, R.; HILTUNEN, R. Antimycobacterial activity of ellagitannin and ellagic acid derivate rich crude extracts and fractions of five selected species of Terminalia used for treatment of infectious diseases in African traditional medicine **South African Journal of Botany** 90 (2014) 1–16

FURLANETTO L.V. ; FIGUEIREDO E.E.S. ; JÚNIOR C.A. Conte; SILVA F.G.S.; DUARTE R.S. ; SILVA J.T. ; LILENBAUM W. ; PASCHOALIN V.M.F. Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.64 no.2 Belo Horizonte Apr. 2012

GADANO, A.B.; GURNI, A.A.; CARBALLO, M.A. Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **Journal of Ethnopharmacology** 103, 246–251, 2006.

GADANO, A.; GURNI, A.; LOPEZ NIGRO, M.; LOPEZ, P.; GRATTI, A.; VAN BAREN, C.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. Cytogenetic effects of aqueous extracts of Paico (*Chenopodium multifidum* L.) a medicinal plant. **Pharmaceutical Biology** 38, 7–12, 2000.

GALLI, S. J.; GRIMBALDESTON, M.; TSAI, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology** 8, 478-486 (June 2008)

GAMBATO, G; SALVADOR, M; SOUZA KCB; ANGELI, V W Extrato hidroalcoólico de *Eucalyptus camaldulensis* como ativo fitoquímico no desenvolvimento de dentifrícios **Rev. Bras. Farm.** 95 (1): 580 – 594, 2014.

GAUTAM R, SAKLANI A, JACHAK S M Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents **Journal of Ethnopharmacology** Volume 110, Issue 2, 21 March 2007, Pages 200–234

GBOLADE, A.A.; TIRA-PICOS, V.; NOGUERIA, J.M.F. Chemical constituents of *Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum* herb essential oil from Nigeria **Chemistry of Natural Compounds** September 2010, Volume 46, Issue 4, pp 654-655

GEMECHU A.; MIRUTSE, G.; WORKU, A.; AMENI, G. In vitro Anti-mycobacterial activity of selected medicinal plants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* Strains **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2013, 13:291

GEORGE, A.S. (1988). **Myrtaceae.** In 'Flora of Australia.' Vol. 19, (Australian Government Publishing Service: Canberra.), p. 1.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, L.F.S. **Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae).** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará Belém, 2011.

GONZALEZ, G.J.D. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia **Editorial Universidad Nacional de Colombia** 1ª edição pag 65, 2010.

GREENE N.; ALEO M.D.; LOUISE-MAY S.; PRICE D.A.; WILL Y.G. Using an in vitro cytotoxicity assay to aid in compound selection for in vivo safety studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 20 (2010) 5308–5312

GRASSI, L.T.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BUSS, Z.S.; MONGUILHO, E.D.; FRODE, T.S.; SILVA, K.A.B.S.; SOUZA, M.M. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology** 145 (2013) 127–138

GUEVARA-PATINO, M.; MORAIS, M.S.; FARRERAS, A.; RIVERA-OLIVERO, I.; FERMIN, D.; DE WAARD, J.H. Soft tissue infection due to *Mycobacterium fortuitum* following acupuncture: a case report and review of the literature **J Infect Dev Ctries** 2010; 4(8):521-525

GUPTA PM (1995): 270 **Plantas medicinales Iberoamericanas**. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-Subprograma de Química fina Farmacéutica CYTED, Colombia. pp. 230–237.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The Flavonoids: Advances in Research**; Chapman and Hall: London, 1986. p. 56.  
HARWOOD, R.K. & PALMER, J. (2011). **Amaranthaceae**.

HASEGAWA, T.; TAKANO, F.; TAKATA, T.; NIIYAMA, M.; OHTA, T. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemistry**. 2008 Feb;69(3):747-53. Epub 2007 Oct 22.

HEGAZY AK, FARRAG HF Allelopathic Potential of *Chenopodium ambrosioides* on Germination and Seedling Growth of Some Cultivated and Weed Plants. **Glob. J. Biotech. Biochem.**, 2 (1): 01-09, 2007.

HETT E.C. & RUBIN E.J. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. **Microbiol Mol Biol R** 72: 126–156.

HALLALA, A.; BENALIA,S.; MARKOUK,M.; BEKKOUCHEA,K.; LARHSINIA,M.; CHAITB,A.; ROMANEC,A.; ABBADA,A.; ABDOUNID,M.K.E. Evaluation of the Analgesic and Antipyretic Activities of *Chenopodium ambrosioides* L. **ASIAN J. EXP. BIOL. SCI.**, VOL 1 (1) 2010: 189-192

HAMALAINEN, M.; NIEMINEN, R.; MOILANEN, E. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- $\kappa$ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages **Mediators of Inflammation** Volume 2007 (2007)

HENAO, M.I et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 86. p. 11–9. 2006.

HIGUCHI CT, SANNOMIYA M, PAVAN FR, LEITE SRA, SATO DN, FRANZBLAU SG.: Byrsonima fagifolia Niedenzu Apolar Compounds with Anti-tubercular Activity. **Evid-Based Complement and Altern Med** 2008, 2011:1–5.

HMAMOUCI, M.; LAHLOU, M.; AGOUMI, A. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants **Fitoterapia**, 71 (3) (2000), pp. 308–314

HUANG S, HENDRIKS W, ALTHAGE A, et al. Immune response in mice that lack the interferon-g receptor. **Science** 1993; 259:1742–5.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 690-696, Jul./Set. 2008.

IGNACIO, S. R.; FERREIRA, J.L.; ALMEIDA, M.B.; KUBELKA, C.F. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts **Journal of Ethnopharmacology** 74 (2001) 181–187

IM, NK; LEE, H J Lee; YU M H; KIM, H J; LEE, I S Inhibitory Effect of Fractions from Skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption **Food Sci. Biotechnol.** 20(5): 1211-1217 (2011)

INCZED, J.; LENGYEL. T.; URE, A.M. (EDS.), “**IUPAC – Compendium of Analytical Nomenclature: Definitive Rules**”, 3a. edição, Blackwell Science Ltd., Oxford, 1997, Cap. 1, pp.1-5.

JARDIM, C.M.J.; JHAM, G.M.; DHINGRAB, O.D.; FREIRE, M.M. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Hexane Extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 21, No. 10, 1814-1818, 2010.

JARDIM, C. M.; JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; FREIRE, M. M.; Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **J. Chem. Ecol.**, 2008, 34, 1213

JAWETZ, E. M.B.; JOSEPH, L.M.; EDWARD, A.A.; GEO, F.B.; JANET, S.B.; NICHOLAS, L.O. **Microbiologia Médica** EUA Editora MC GRAW HILL, 2010, Cap 25, p.223

JIMENEZ-OSORNIO, F.M.V.Z.J.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic Activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.24, n.3, p.195-205, 1996.

JONG, B.C.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. **PLoS Negl Trop Dis** (2010) 4(9): e744. doi:10.1371/journal.pntd.0000744

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J.. **Plant systematics. A Phylogenetic approach**. 2 ed. Sunderland, Sinauer Associates. 576 p. 2002

JUNQUEIRA, A.P.F.; PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B.; MAISTRO, E.L. Clastogenicity of Piper cubeba (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology** 2007; 30: 656-63

KABIRU Y. A.; OGBADOYI, E. O.; OKOGUN, J. I.; GBODI, T. A.; MAKUN, H. A. Anti-trypanosomal Potential of *Eucalyptus camaldulensis* **British Journal of Pharmacology and Toxicology** 4(2): 25-32, 2013

KADEREIT, G., GOTZEK, D., JACOBS, S. & FREITAG, H. 2005: Origin and age of Australian Chenopodiaceae. **Organisms, Diversity & Evol.** 5: 59–80

KAMEL, E.G.; EL-EMAM, M.A.; MAHMOUD, S.S.M.; FOUUDA, F.M.; BAYAUMY, F.E. Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosioides*, *Coryza dioscorides* and *Sesbania sesban* **Parasitology International** Volume 60, Issue 4, December 2011, Pages 388–392

KAMIJO R, LE J, SHAPIRO D, ET AL. Mice that lack the interferon-g receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Gue´rin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. **J Exp Med** 1993;178: 1435–40.

KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1/2, p.5-14, 1994.

KATOCH VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian J. Med. Res.**; 2004; 120: 290-304.

KIUCHI, F., ITANO, Y., UCHIYAMA, N., HONDA, G., TSUBOUCHI, A., NAKAJIMA-SHIMADA, J., AOKI, T.. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Natural Products** 65, 509–512, 2002.

KOBA, K., CATHERINE G; RAYNAUD, C.; CHAUMONT, J.P.; SANDA, K; LAURENCE, N. CHEMICAL COMPOSITION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF CHENOPODIUM AMBROSIOIDES L. ESSENTIAL OIL FROM TOGO **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research** vol 44, no 4 (2009)

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z.; NEDIALKOV, P.T.; NIKOLOV, S.D.; The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. **Pharmacognosy Review** 3, 280-306

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6ª. Edição. Editora Guanabara Koogan. 2008

KUMAR, A.B.S.; LAKSHMAN, K.; JAYAVEERA K.N; NANDEESH R.; MANOJ B.; RANGANAYAKULU, D. Comparative in vitro anthelmintic activity of three plants from the Amaranthaceae family. **Archives of Biological Sciences**. 2010; 62: 185-190

LAI, P.K.; CHAN, J.Y.; WU, S.B.; CHENG, L.; HO G.K.; LAU, C.P.; KENNELLY, E.J.; LEUNG, P.C.; FUNG, K.P.; LAU, C.B. Anti-inflammatory Activities of an Active Fraction Isolated from the root of *Astragalus membranaceus* in RAW 264.7 Macrophages **PHYTOTHERAPY RESEARCH** 28: 395–404 (2014)

LALL, N., MEYER, J.J.M. In vitro inhibition of drug sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **Journal of Ethnopharmacology** 66, 347\_ 354, 1999.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. (Ed.). **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 264 p. il.

LANDRUM, L.R. & KAWASAKI, M.L. 1997. **The genera of Myrtaceae in Brazil – an illustrated synoptic treatment and identification keys**. *Brittonia* 49:508-536.

LAWAL, T. O.; ADENIYI, B. A. Adeniyi; IDOWU O. S.; MOODY, J. O. *In vitro* activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and *Eucalyptus torelliana* F. Muell. against non-tuberculous mycobacteria species **African Journal of Microbiology Research** Vol. 5(22) pp. 3652-3657, 16 October, 2011

LEE et al In vitro cytotoxic activity of ginseng leaf/stem extracts obtained by subcritical water extraction **Journal Ginseng Res** (2014) 1e4

LEE, W.J.; KANG, S.M.; SUNG, H.; WON, C. H.; CHANG, S. E.; LEE, M. W.; KIM, M. N.; CHOI, J. H.; MOON, K. C. Non-tuberculous mycobacterial infections of the skin: A retrospective study of 29 cases 2010 **Journal of Dermatology**

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.1573-1579, 2001.

LEITE, M.P.; FASSIN, J.R.J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Rev Bras Farmacogn** 18 (Supl.): 2008- 661-666.

LEITE, C.Q.F.; MOREIRA, R.R.D.; NETO, J.J. Action of *Eucalyptus* oils against *Mycobacterium avium* **Fitoterapia** 1998 Vol (69), 282-283.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRC Press, 2000

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, NovaOdessa—SP, 2002.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boca Raton: CRC, 1989.

LUCAS, E.J.; BELSHAM, S.R.; NICLUGHADHA, E.M.; ORLOVICH, D.A.; SAKURAGUI, C.M.; CHASE, M.W. & WILSON, P.G. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae –preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution** 251: 35-51, 2005.

MACADAM, S.A.; MEHLING, B.M.; FANNING, A.; DUFTON, J.A.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.T.; LENNOX, P.; ANZARUT, A.; RODRIGUES, M. Nontuberculous mycobacterial breast implant infections. **Plast Reconstr Surg.** 2007 Jan;119(1):337-44.

MACDONALD, D., VANCREY, K., HARRISON, P., RANGACHARI, P.K., ROSENFELD, J., WARREN, C., SORGER, G. Ascaridole less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide that is not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology** 92, 215–221, 2004.

MACEDO I.T.; BEVILAQUA C.M.; DE OLIVEIRA L.M.; CAMURÇA-VASCONCELOS A.L.; VIEIRA L. D. A S.; AMÓRA S.D.O.S S. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2011 Jul-Sep;20(3):223-7.

MACIEL, E. L. N.; BRIOSCHI, A. P.; GUIDONI, L. M.; CERQUEIRA, A. C. B.; PRADO, T. N.; FREGONA, G.; DIETZE, R. Fatores associados ao abandono da quimioprofilaxia de TB no município de Vitória (ES): um estudo de coorte histórica **J. bras. pneumol.** vol.35 no.9 São Paulo Sept. 2009

MALONE M. H.; ROBICHAUD R. C. 1983. The pharmacological evaluation of natura products -General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol** 8: 127-147.

MANDAL S, BRADSHAW L, ANDERSON LF, BROWN T, EVANS JT, DROBNIIEWSKI F, SMITH G, MAGEE JG, BARRETT A, BLATCHFORD O, MARCHIORETTO, M.S., SENNA, L. & SIQUEIRA, J.C. 2010. *Amaranthaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000042> (último acesso em 12/06/2013).

MARQUES, R.C.P; MEDEIROS, S.R.B.; DIAS, C.S.; FILHO J.M.B; LIMA, L.F.A Evaluation of mutagenic potential of yangambin and of the hydroethanolic extract of *Ocotea duckei* by the **Ames Test.** **Mutation Research** 2003; 536: 117-20.

MCGAW, L.J.; LALL, N.; MEYER, J.J.M.; ELOFF, J.N. The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections . **J Ethnopharmacol** 2008 119: 482-500.

MICHELIN, D.C.; FINATI, S.C.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; VILEGAS, W.; SALGADO,H.R.N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae **Rev. bras. farmacogn.** vol.20 no.1 Curitiba Jan./Mar. 2010

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, Jan./Mar. 2007

MOHAMAD, S.; ZIN, N. M.; WAHAB, H.A.; IBRAHIM, P.; SULAIMAN, S. F.; ZAHARILUDDIN, A. S. M.; NOOR, S. S. A. Antituberculosis potential of some ethnobotanically selected Malaysian plants **Journal of Ethnopharmacology** Volume 133, Issue 3, 16 February 2011, Pages 1021–1026

MOLINA SALINAS G M; VARGAS VILLARREALJ. Benito David Mata-Cardenas,<sup>a</sup> Pola Becerril-Montes,<sup>a</sup> and Salvador Said-Fernández<sup>a</sup> Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis* **Archives of Medical Research** 37 (2006) 45–49

MONTOYA-CABRERA, M.A.; ESCALANTE-GALINDO,P.; MECKES-FISHER,M.; SANCHEZ-VACA, G.; FLORES-ALVAREZ,E.; REYNOSO-GARCIA, M. Fatal poisoning caused by oil of epazote, *Chenopodium graveolens*. **Gaceta Medicado Mexico**,1996: 132,433–437

MONZOTE, L.; NANCE, M.R.; SCULL, K.; SETZER, W.N. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. **Nat Prod Commun**, 2011 Feb;6(2):281-6.

MONZOTE, L., STAMBERG, W., STANIEK, K., GILLE, L.. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 240, 337–347, 2009.

MONZOTE, L., MONTALVO, A.M., ALMANONNI, S., SCULL, R., MIRANDA, M., ABREU, J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. **Chemotherapy** 52, 130–136, 2006.

MONZOTE, L., MONTALVO, A.M., ALMANONNI, S., SCULL, R., MIRANDA, M., ABREU, J. *In vitro* activity of an essential oil against *Leishmania donovani* **Phytotherapy Research** Volume 21, Issue 11, pages 1055–1058, November 2006a

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

MORAIS, S.M.D; CATUNDA JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.D.; NETO, J.S.M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil **Quím. Nova** vol.29 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2006

MOREIRA RRD; GILMARCIO Z.; MARTINS, ROSEMEIRE C.L. R.; PIETRO, DAISY N.; SATO, FERNANDO R.; PAVAN, SERGIO R.A.; LEITE, WAGNER VILEGAS; CLARICE Q. F. *Leite1 Paepalanthus* spp: Antimycobacterial activity of extracts, methoxylated flavonoids and naphthopyranone fractions Brazilian **Journal of Pharmacognosy** 23(2): 268-272, Mar./Apr. 2013

MOSMANN T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 16: 55-63

MUSA, D. A.; NWODO, F. O. C.; OJOGBANE, E. Phytochemical, antibacterial and toxicity studies of the aqueous extract of *Euclayptus camaldulensis* Dehnh **Asian Journal of Plant Science and Research**, 2011, 1 (3): 1-10

MURRAY P.R., ROSENTHAL, K.S. & PFAÜER, M.A. **Mycobacterium**. In: **Microbiologia Médica**. 6° ed. Guanabara Koogan. 2009, 266 – 269

NASCIMENTO, F.R.F., CRUZ, G.V.B., PEREIRA, P.V.S., MACIEL, M.C.G., SILVA, L.A., AZEVEDO, A.P.S., BARROQUEIRO, E.S.B., GUERRA, R.N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences** 78, 2650–2653, 2006.

NEWMAN DJ, CRAGG GM, SNADER KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. **J Nat Prod** 2003 66: 1022 -1037

NEWTON, S.M.; LAU, C.; WRIGHT, C.W. A review of antimycobacterial natural products **Phytotherapy Research**, 2000, Vol.14(5), pp.303-322 [Periódico revisado por pares] Web of Science

NIAID Encontrado em  
<<<http://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/understanding/pages/transmission.aspx>>>

NIEMANN S, RICHTER E, RÜSCH-GERDES S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. **J Clin Microbiol** 38: 152-157, 2000.

NGUYEN, H.; LE, C.; NGUYEN, H. An Unusual Case of a Cervical Mass Due to Nontuberculous *Mycobacterium fortuitum* Infection **The Permanente Journal** 2008 Fall: 12(4): 49-51

NUNEZ-SELLES, A.J. Antioxidant therapy: myth or reality? J. **Braz. Chem. Soc.** vol.16 no.4 São Paulo July/Aug. 2005

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **OECD guideline (423) for testing of chemicals** - Acute oral toxicity -acute toxic class method(2001).

OKHALE, S.E.; EGHAREVBA, H. O.; ONA, E.C.; KUNLE, O.F. Phytochemical and proximate analyses and thin layer chromatography fingerprinting of the aerial part of *Chenopodium ambrosioides* Linn. (Chenopodiaceae) **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 6(12), pp. 2289-2294, 30 March, 2012

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K; SAITO, W.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M.; Ascaridole as a pharmacologically active principle of Paico, a medicinal Peruvian plant **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 41 (1993), pp. 1309–1311

OYEDEJI, A. O.; EKUNDAYO, O.; OLAWORE, O. N.; ADENIYI, B. A.; KOENIG, W. A. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v.70, p.526-528, 1999.;

PADOVEZE, MC; MADALOSSO, G; HADAD, DJ; BRAVO, E; SILVA, EC; BORBA, HM; SALLAS, J; SAMPAIO, JLM; RIBEIRO, JF; SANTOS, MDS; DUARTE, RS; GOMES, SM; LEÃO, SC; BRILHANTE, VR National evaluation of rapidly growing mycobacteria outbreaks in Brazil **BMC Proceedings** 2011, 5(Suppl 6):P98

PALOMINO JC, MARTIN A, CAMACHO M, PORTAELS F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Ch** 2002: 46: 2720-2722

PARREIRAS, P.M.; ANDRADE G.I.; NASCIMENTO T.F.; OELEMANN MC;;; Gomes HM, Alencar AP, Assis RA, Mota PM, Pereira MA, Lobato FC, Lage AP, Suffys PN. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** vol.107 no.1 Rio de Janeiro Feb. 2012

PATRICIO, F.J.; COSTA, G.C.; PEREIRA, P.V.; ARAGÃO-FILHO, W.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B.; PEREIRA, W.S.; MACIEL, M.C. SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.; REBÊLO, J.M.; GUERRA, R.N.; RIBEIRO, M.N.; NASCIMENTO, F.R. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis* **Journal of Ethnopharmacology** 115 (2008) 313–319

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I.D.; HONDA, N.K.; CARDOSO, C.A.L.; VILEGAS, W.; LEIE, C.R.A.; SATO, D.N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Quím. Nova**, 2009, vol.32, no.5, p.1222-1226. ISSN 0100-4042

PEREIRA, Susan M; DANTAS, Odimariles Maria Souza; XIMENEZ, Ricardo; BARRETO, Mauricio L. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Rev. Saúde Pública** vol.41 suppl.1 São Paulo Sept. 2007

PEREIRA, W.S.; RIBEIRO, B.P.R.; SOUSA, A.I.P.; SERRA, I.C.P.B.; MATTAR, N.S.; FORTES, T.S.; REIS, A.S.; SILVA, L.A.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice **Journal of Ethnopharmacology** 127 (2010) 602–605

PEREIRA, J. C. D.; STURION, J. A.; HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V.; SHIMIZU, J. Y. Características da madeira de algumas espécies de Eucalipto plantadas no Brasil. **Embrapa Florestas**, Documento 38, p 7-10, 2008.

PERAZZO F.F.; LIMA, L.M.; MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V.L.G.; CARVALHO, J.C.T. 2007. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. **Rev Bras Farmacogn** 18: 686-689.

PINTO, T. J. A., KANEKO, T. M., PINTO, A.F. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo, Ateneu, 2010, 7805 p.

PITOMBO, M. B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** vol.31 no.11 Rio de Janeiro Nov. 2009

POLLACK, Y., SEGAL, R., GOLENSER, J. The effect of ascaridole on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. **Parasitol. Res.** 76, 570–572, 1990.

RAMEZANI, H.; SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHL, R.K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora* **Fitoterapia** Volume 73, Issue 3, June 2002, Pages 261–262

RAMON-GARCIA, S.; OTAL, I.; AINSA, J.A. Novel Streptomycin Resistance Gene from *Mycobacterium fortuitum* **Antimicrob Agents Chemother.** Nov 2006; 50(11): 3920–3922. Published online Sep 5, 2006

RAHIMI-NASRABADI M.; POURMORTAZAVI, S.M.; NAZARIAN, S.; AHMADI, F.; & BATOOLI H Chemical Composition, Antioxidant, and Antibacterial Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Eucalyptus oleosa* Leaves **International Journal of Food Properties** Volume 16, Issue 5, 2013

RASO, G. M., MELI, R., DI CARLO, G., PACILIO, M., DI CARLO, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sciences** 68: 921–931.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 10-12.

REGUANT, C.; BORDONS, A.; AROLA, L.; ROZES, N. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine **Journal of Applied Microbiology** Volume 88, Issue 6, pages 1065–1071, June 2000

RISS T.L.; MORAVEC, R. A., BS; NILES, A. L Niles; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L.. **Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual** 2013

SALIB, J.Y.; MICHAEL, H. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. **N. Phytochemistry** vol. 65 issue 14 July, 2004. p. 2091-2093

SALVADOR MJ, DE LOURENÇO CC, ANDREAZZA NL, PASCOAL AC, STEFANELLO ME. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Nat Prod Commun.** 2011 Jul;6(7):977-82.

SANCHES, S.C.C. **Caracterização físico-química e avaliação toxicológica preliminar do copolímero sulfato de condroitina-co-n-isopropilacrilamida para uso farmacêutico**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará Belém, 2013.

SANTOS S.A.O; VILLAVERDE, J.J.; FREIRE, C.S.R.; DOMINGUES M..R.M.; PASCOAL NETO, C; SILVESTRE, A.J.D. Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis* × *E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts **Industrial Crops and Products** Volume 39, September 2012, Pages 120–127

SANTOS, E. V. M. **Extração de matérias-primas vegetais**. In: SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cytel, Santafé de Bogotá, p. 27-60, 2000.

SARAVANAH, S.; PRAKASH B., N.; PANDIKUMAR, P.; KARUNAI R. M.; GABRIEL, P. M.; IGNACIMUTHU, S. Immunomodulatory potential of *Enicostema axillare* (Lam.) A. Raynal, a traditional medicinal plant **Journal of Ethnopharmacology** 140 (2012) 239– 246

SAXENA R; PLATIL P.; KHAN, S.S. Screening for phytochemical analysis of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Embllica officinalis* Gaertn. **Nanobiotechnica Universale** Vol. 1(2), 103-106 (2010).

SCHIAVO, W. **Susceptibilidade Antimicrobiana e Tipagem Molecular de *Mycobacterium fortuitum* Isoladas de Amostras Clínicas de Origem Humana** 2012. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SCHMID Inhibition of NF-κB-dependent cytokine and inducible nitric oxide synthesis by the macrocyclic ellagitannin oenothelin B in TLR-stimulated RAW 264.7 macrophages **Journal of natural products** [0163-3864] 2012 vol:75 iss:5 pg:870 - 875

SERRA, C.; LOI, G.; SADDI, B.; PAUTASSO, M.; MANZIN, A. Unusual Clinical Presentation of *Mycobacterium fortuitum* Infection in an Immunocompetent Woman **J Clin Microbiol**. May 2007; 45(5): 1663–1665. Published online Mar 14, 2007.

SESPA Secretaria de Estado de Saúde Pública Obtido em [http://www.agenciapara.com.br/noticia.asp?id\\_ver=46371](http://www.agenciapara.com.br/noticia.asp?id_ver=46371)

SETTY AR, SIGAL LH. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. **Seminars Arthritis Rheum** 2005 34: 773 - 784.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Cytel, Santafé de Bogotá, 2000. p. 145-157.

SHEN, K. H.; CHEN, Z. T.; DUH, P. D. Cytotoxic Effect of *Eucalyptus citriodora* Resin on Human Hepatoma HEPG2 Cells **The American Journal of Chinese Medicine** Volume 40, Issue 02, 2012

SILVA JUNIOR, O.C.; COSTA, R.M.R.; TEIXEIRA, F.M.; BARBOSA, W.L.R. **Processing and Quality Control of Herbal Drugs and Their Derivatives** In: SHOYAMA, Y. **Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas** INTECHOPEN 2011 Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/quality-control-of-herbal-medicines-and-related-areas>> Acesso em 01 de set de 2014

SILVA-AGUAYO, G.I.; KINGER-MELIVILU, R.; HEPP-GALLO, R. TAPIA-VARGAS, M. Control de *Sitophilus zeamais* con polvos vegetales de tres especies del género *Chenopodium* **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n.10, p.953-960, out. 2005

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. E.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R.; **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**, Eduni-Sul: Porto Alegre, 6ª edição 2010

SINAN 2014, Sistema de Informação de Agravos de Notificação Obtido em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/tuberculose/bases/tubercbr.def>

SINAN 2013, Sistema de Informação de Agravos de Notificação Obtido em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/tuberculose/bases/tubercbr.def>

SING, A. K., MONIKA, K., & SUSHIL, K. (1999). Non-volatile constituents of *Eucalyptus*: A review on chemistry and biological activities. **Journal of Medicinal Aromatic Plant Sciences**, 21, 375–407

SIQUEIRA, J.C. 2002. **Amaranthaceae** In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G. & GIULIETTI, A.M. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**: FAPESP-HUCITEC. p.11-30.

SMITH, B. D. 2006 Eastern North America as an Independent Center of Plant Domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA.

SOLIMAN, F. M.; FATHY, M. M.; SALAMA, M. M.; AL-ABD, A. M.; SABER, F.R.; EL-HALAWANY, A. M. Cytotoxic activity of acyl phloroglucinols isolated from the leaves of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. cultivated in Egypt **Scientific Reports** 4, Article number: 5410

SONAGLIO D, ORTEGA GG, PETROVICK PR, BASSANI VL 2003. **Desenvolvimento tecnológico e produção e fitoterápicos**. In: SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN, MELLO, JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SOUSA, A. J. A. **Uso de plantas medicinais em Benevides - Pará: políticas públicas.** Dissertação (Mestrado em Gestão dos Recursos Naturais e Desenvolvimento Local na Amazônia/PPGEDAM) – NUMA/UFPA, Belém, 2010.

SOUSA, F. C. F.; MELO C. T. V.; CITO, M. C. O.; FELIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Rev. Bras. Farmacognosia.** Dez 2008, vol.18, n.4, p.642-654.

SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI R. 2007. Pharmacological effects of the monoterpene  $\alpha,\beta$ -epoxy-carvone in mice. **Rev Bras Farmacognosia** 2007 17: 170-175.

SOUZA, Z. L.; OLIVEIRA, F. F.; CONCEICAO, A. O.; SILVA, L. A. M.; ROSSI, M. H.; SANTOS, J. S. Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** 11 (July 28, 2012): p20.

SOUZA A. E. F.; NASCIMENTO, H. H. L.; MAYER, K. D. G.; GOMES, M. K. O. Etnobotânica: importância do conhecimento popular nas indicações de plantas medicinais para tratamento de enfermidades de animais de companhia. **Revista de Biologia e Fármacia**, 7: 66-73. (2011).

SOWEMIMO A.A.; FAKOYA F.A.; AWOPETU I.; OMOBUWAJO, O.R.; ADESANYA S.A. Toxicity and mutagenic activity of some selected Nigerian plants. **J. Ethnopharmacol.** (2007).

STANDLEY, P. C. 1916. **North American flora. Chenopodiaceae** 2l: 1-93. New York Botanical Garden, New York, N.y.

STOREY, C.; SALEM, J.I. Lay use of Amazonian plants for the treatment of tuberculosis **Acta amaz;**27(3):175-82, set. 1997

SZAKIEL, A.; PACZKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants **Phytochem Rev** (2011) 10:471–491

TEIXEIRA E.R. **Fatores associados à não-adesão ao tratamento da tuberculose no Distrito Federal e municípios do Entorno - DF : 2006-2008** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde ) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2011

TEKWU, E.M.; ASKUN, T.; KUETE, V.; NKENGFACK, A.E.; NYASSE, B.; ETOA, F.; BENG, V.P. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethnomedically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Ethnopharmacology** 2012: 142,374–382.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R. & CASE, C.L. **Microbiologia.** 10ª edição. Ed. Artmed. 2011

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., MARTINEZ, M.B., CAMPOS, L.C., GOMPERTZ, O.F. & RÁCZ, M.L. **Microbiologia**. 5ª. Edição. Editora Atheneu. 2008.

TSIKAS D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. 2007, 851(1-2), 51-70.

UCHIYAMA, N. Antichagasic Activities of Natural Products *against Trypanossoma cruzi*. **Journal of health Science** Vol.55 n.1 pag 31-39, 2009.

VASCONCELOS, A. L. F. **Estudo farmacológico e toxicológico do extrato acetato de etila de *Spigelia anthelmia* Linn em animais de laboratório**. Fortaleza. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceara. 93p, 2002.

VASQUEZ, G.; SANTOS, J.; FREIRA, M.S.; ANTORRENA, G.; GONZALES-ALVAREZ, J. Extraction of antioxidants from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark Wood **Science and Technology** January 2012, Volume 46, Issue 1-3, pp 443-457

VEIGA JR V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL M.A.M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? **Quim Nova** 28: 519-528.

VERDI, S.; YOUNES, S.; BERTOL, C.D. Avaliação da qualidade microbiológica de cápsulas e chás de plantas utilizadas na assistência ao tratamento da obesidade **Rev. Bras. Plantas Med.** vol.15 no.4 Botucatu 2013

VILHENA, T.C. **Avaliação da toxicidade e estudo das alterações oxidativas na malária experimental *in vivo* induzidas pelo extrato etanólico seco das cascas de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará Belém, 2012.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. 2003. (Documentos Florestais, 17)

VIGO, E.; CEPEDA, A.; GUALILLO, O.; PEREZ-FERNANDEZ, R. et al In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages **JOURNAL PHARMACY AND PHARMACOLOGY** 2004, 56: 257–263

VRANJAC, A. Mudanças no tratamento da tuberculose **Rev. Saúde Pública** vol.44 no.1 São Paulo Fevereiro 2010

YADAV, N., VASUDEVA, N., SINGH, S., SHARMA, S.K., 2007. Medicinal properties of genus *Chenopodium* Linn. **Nat. Prod. Radian.** 6, 131–134.

YAO, Y.; YANG, X.; SHI, Z.; REN, G. Anti-Inflammatory Activity of Saponins from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages Cells **Journal of Food Science** Volume 79, Issue 5, pages H1018–H1023, May 2014

YOSHIDA, T.; MARUYAMA, T.; NITTA, A.; OKUDA, T Eucalbanins A, B and C, Monomeric and Dimeric Hydrolyzable Tannins from *Eucalyptus alba* REINW. **The Pharmaceutical Society of Japan Chemical & pharmaceutical bulletin** 40(7), 1750-1754, 1992-07-25

XU, J.; HU, Z. Q.; YIN, L.Z. Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice **Int J Clin Exp Pathol.** 2014; 7(4): 1495–1501. Published Mar 15, 2014.

WANG, J.; ZHAI, W. Z.; ZOU, Y.; ZHU, J. J.; XIONG, J.; ZHAO, Y.; YANG, G. X.; FAN, H.; HAMANN, M. T.; XIA, G.; HU, J. F. Eucalyptals D and E, new cytotoxic phloroglucinols from the fruits of *Eucalyptus globulus* and assignment of absolute configuration **Tetrahedron Letters** Volume 53, Issue 21, 23 May 2012, Pages 2654–2658

WILDNER L. M.; NOGUEIRA, C. L.; SOUZA, B. S.; SENNA, S. G.; SILVA, R. M.; BAZZO, M. L. MICOBACTÉRIAS: EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO **Rev Patol Tropical, Goiânia** Vol. 40 (3): 207-229. jul.-set. 2011

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.M.; HESLEWOOD, M.M. & QUINN, C.J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution** 251: 3-19, 2005

WINTHROP, K.L.; ALBRIDGE, K.; SOUTH,D.; ALBRECHT,P.; ABRAMS,M.; SAMUEL, M.C.; LEONARD,W,; WAGNER, J.; VUGIA, D.J. The Clinical Management and Outcome of Nail Salon–Acquired *Mycobacterium fortuitum* Skin Infection **Clinical Infectious Diseases** 2004

WITEBSKY, F.G.; CONVILLE, P.S. Rapidly growing mycobacteria. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, editors. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: bacteriology. Washington, DC: ASM Press; 2005. v. 2, p. 1236-69.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO SITES. **Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014- 2023.** (WHO, 2014) Disponível em: [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html/](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html/)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO SITES. **Tuberculosis (TB) Publications 2013. Global tuberculosis control:** (WHO Report, 2013). Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).

JIA-LIANG W, MA DAN-WEI, WANG YA-NAN, ZHANG HONG, HE BING, LI QUN, ZOU ZHI-YAN AND FENG JING Cytotoxicity of Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L against Human Breast Cancer MCF-7 Cells **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, December 2013; 12(6): 929-933

VELAZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

VILLANUEVA, C.E.B.; CASTILLO, F.D.; ESTRADA, H.G. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana **Rev Cubana Plant Med** vol.18 no.4 Ciudad de la Habana oct.-dic. 2013

ZARONI, M; PONTAROLO, R. ABRAHAO, W.S.M STREMEL, D.P Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná **Rev. Bras. Farmacogn.**, V. 14, n. 1, jan.-jun. 2004.

ZHANG, L.; RAVIPATI, A.S.; KOYYALAMUDI, S.R.; JEONG, S.C.; REDDY, N.; SMITH, P.T.; BARTLETT, J.; SHANMUGAM, K.; MÜNCH, G.; WU, M.J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds **Journal of agricultural and food chemistry** 2011 vol:59 iss:23 pg:12361 -7

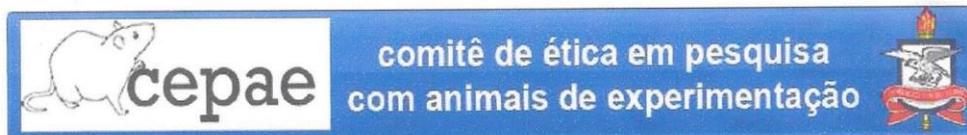
ZHANG, Y.; POST-MARTENS, K.; DENKIN, S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy **Drug Discov Today**. 2006 Jan;11(1-2):21-7.

ZHONG, W.; CHI, G; JIANG, L.; SOROMOU, L. W.; CHEN, N.; HUO, M.; GUO, W.; DENG, X.; FENG, H. p-Cymene Modulates In Vitro and In Vivo Cytokine Production by Inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B Activation **Inflammation** June 2013, Volume 36, Issue 3, pp 529-537

ZOMBINI E. V.; ALMEIDA, C. H. D.; SILVA, F. P. C. V.; YAMADA, E. S.; KOMATSU, N. K.; FIGUEREDO, S. M. Perfil clínico-epidemiológico da tuberculose na infância e adolescência **Rev. bras. crescimento desenvolv. hum.** vol.23 no.1 São Paulo 2013

## ANEXOS

## ANEXO A



PARECER BIO098-12

**Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* E *in vivo* DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Chenopodium ambrosioides* E *Eucalyptus globulus*, FRENTE ÀS CEPAS DE *Mycobacterium bovis***  
Coordenador: Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira

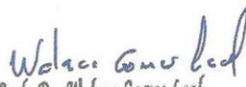
Área Temática: Farmácia

Vigência: 03/2012 a 03/2014

Nº no CEPAE-UFPA: BIO098-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 fevereiro de 2012

  
Prof. Dr. Wallace Gomes Lenti  
Presidente do CEPAE-UFPA

