



FACULDADE PATOS DE MINAS

FARMÁCIA

ALEX ALVES FERNANDES

**ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO PELOS
ENSAIOS PRELIMINARES DE TOXICIDADE FRENTE
À *Artemia Salina* Leach E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Plantago major* L. (Transagem)**

PATOS DE MINAS – MG

2013

ALEX ALVES FERNANDES

**ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO PELOS
ENSAIOS PRELIMINARES DE TOXICIDADE FRENTE
À *Artemia Salina* Leach E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Plantago major* L. (Transagem)**

Artigo apresentado à Faculdade Patos de Minas – FPM - Patos de Minas (MG) como requisito parcial para a conclusão do Curso de Graduação em Farmácia.

Orientadora: Ms.: Janainne Nunes Alves
Co-orientador: Ms.: Taciano dos Reis Cardoso

**PATOS DE MINAS – MG
2013**

581.192 FERNANDES, Alex Alves

F363e **Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios preliminares de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach e atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Plantago major* L. (transagem)/Alex Alves Fernandes - Orientadora: Prof^a. Ms. Janainne Nunes Alves. Patos de Minas: [s.n.], 2013. 43p.**

**Artigo de Graduação – Faculdade Patos de Minas
FPM
Curso de Bacharel em Farmácia**

**1.Toxicologia 2.Caracterização química 3.Metabólitos Secundários 4. *Artemia salina* Leach 5.Fitoterapia
I.Alex Alves Fernandes II.Título**

FACULDADE PATOS DE MINAS - FPM
ALEX ALVES FERNANDES

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO PELOS ENSAIOS
PRELIMINARES DE TOXICIDADE FRENTE À *Artemia Salina*
Leach E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO
ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Plantago major L.* (Transagem)

Artigo Científico aprovado em 06 de novembro de 2013, pela comissão examinadora
constituída pelos professores:

Orientadora:

Prof^a. Janainne Nunes Alves
Faculdade Cidade de Patos de Minas

Examinador:

Prof. Ms. Nathalya Isabel de Melo
Faculdade Cidade de Patos de Minas

Examinador:

Prof. Geraldo da Silva Xavier Neto
Faculdade Cidade de Patos de Minas

“Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha.”

Confúcio

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO PELOS ENSAIOS PRELIMINARES DE TOXICIDADE FRENTE À *Artemia Salina* Leach E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Plantago major* L. (Transagem)

Alex Alves Fernandes¹

Janainne Nunes Fernandes²

Taciano dos Reis Cardoso³

Bernardo Augusto de Freitas Dornelas⁴

Daniela Cristina Silva Borges⁵

RESUMO

Desde a antiguidade as sociedades humanas já acumulavam informações e experiências sobre o ambiente que as cerca, para com ele interagir e prover suas necessidades de sobrevivência. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais acabam por contribuir de forma bastante relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem inicialmente seus constituintes químicos conhecidos. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios preliminares de atividade antibacteriana e de toxicidade frente à *Artemia Salina* Leach, do extrato etanólico das folhas de *Plantago Major* L. (Transagem). Foram realizados ensaios de toxicidade frente à *Artemia Salina*

¹Acadêmico do 8º período do curso de Farmácia da Faculdade Patos de Minas - (FPM). E-mail: alexpharma@outlook.com

²Docente do Curso de Farmácia da Faculdade Patos de Minas - (FPM). E-mail: janainnennunes@yahoo.com.br

³Docente do curso de Farmácia da Faculdade Patos de Minas - (FPM). E-mail: tacionoreis@yahoo.com.br

⁴Docente do curso de Farmácia da Faculdade Patos de Minas - (FPM). E-mail: bernardofarma@yahoo.com.br

⁵Docente do curso de Ciências Biológicas da Faculdade Patos de Minas - (FPM). E-mail: danybio@hotmail.com

Leach e de atividade antibacteriana pela técnica de difusão em disco conforme protocolo descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Também foram verificadas as classes de compostos presentes nas folhas da espécie. Os ensaios fitoquímicos com as folhas de *Plantago Major* L. demonstraram a presença de flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos, que correspondem a classes de metabólitos bastante ativos. No teste de atividade antibacteriana não houve formação de halos de inibição, indicando ausência de atividade antimicrobiana no extrato etanólico de *Plantago Major* L. Já no teste de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach a espécie apresentou uma DL 50 de 15,59 ng/L, valor considerado relativamente perigoso. Portanto, o uso de preparações contendo as folhas de *Plantago Major* L. deve ser cauteloso, visto que, nos testes de toxicidade esta espécie mostrou ser tóxica. Também foi possível concluir que as bactérias *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus* não mostraram sensibilidade ao extrato etanólico das folhas desta espécie. Estudos com especificidade maior devem ser realizados afim de verificar a potencialidade terapêutica de extratos das folhas de *Plantago Major* L.

Palavras-chave: *Plantago major* L., metabólitos secundários, atividade antibacteriana, toxicidade.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as sociedades humanas já acumulavam informações e experiências sobre o ambiente que as cerca, para com ele interagir e prover suas necessidades de sobrevivência. Dentre tantas práticas difundidas pela cultura popular, as plantas sempre tiveram fundamental importância, por inúmeras razões, entre elas suas potencialidades terapêuticas (BADKE *et al*, 2012). Com o desenvolvimento tecnológico, novas maneiras de tratar e curar as doenças foram surgindo, como o uso dos medicamentos industrializados, gradativamente introduzidos no cotidiano das pessoas, através dos profissionais de saúde e campanhas publicitárias dos laboratórios que produziam tais medicamentos (BADKE, 2011).

Porém, mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa e complementar de tratamento em várias partes do mundo, observando-se nas últimas décadas a valorização do emprego de preparações à base de plantas para fins terapêuticos (BADKE *et al*, 2012). Fonseca e Pereira (2004) relatam que de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial utilizam medicamentos à base de produtos naturais no alívio de alguma sintomatologia desagradável. Em contrapartida há uma riqueza muito grande na flora brasileira, estimada em 120 mil espécies, onde apenas 1% desse total tem sido estudado do ponto de vista fitoquímico ou farmacológico.

Os extratos vegetais são alvos de pesquisas nas diversas áreas biológicas, e muitos medicamentos disponíveis hoje no mercado são de origem natural, ou foram obtidos a partir de compostos naturais. Estes compostos têm apresentado atividades similares àquelas de compostos sintéticos disponíveis no mercado, cujo apelo comercial quanto à origem, tradição no uso e atividade fazem com que se mantenham no mercado (TULP; BOHLIN, 2002).

Segundo Farias *et al* (2007) é através de estudos toxicológicos e farmacodinâmicos que se avalia a relação risco/benefício para melhor entendimento do uso das plantas medicinais. O uso pela medicina popular baseado no conhecimento tradicional não é suficiente para a validação das plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros.

Neste cenário em que há um consumo intenso de preparações caseiras para tratamento e/ou prevenção de manifestações diversas, evidencia-se a existência do poderoso arsenal terapêutico da nossa flora. Diante da resistência a agentes antimicrobianos são necessárias mais pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, além do desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções (CUNICO *et al*, 2004).

Entretanto, o uso de plantas medicinais para tratamento e prevenção de doenças deve ser cauteloso visto o potencial que algumas plantas possuem em promover alterações biológicas e tóxicas no organismo. Assim, o presente estudo teve como objetivos realizar ensaios fitoquímicos preliminares biomonitorados pelos ensaios de atividade antibacteriana e de toxicidade frente à *Artemia Salina* Leach, do extrato etanólico das folhas de *Plantago Major* L., conhecida popularmente como transagem, língua de vaca e tranchagem.

1 PLANTAS MEDICINAIS E ATIVOS VEGETAIS

1.1 Plantas Medicinais e toxicidade

O uso de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com finalidade terapêutica ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA *et al*, 2009).

Os medicamentos fitoterápicos provêm de plantas medicinais, sendo obtidos exclusivamente de derivados de drogas vegetais, tais como extrato, tintura, cera, óleo, suco, etc. Estes medicamentos devem oferecer assim como os demais, garantia de qualidade, segurança de uso, composição padronizada além de efeitos terapêuticos comprovados para a população (ANVISA, 2013).

Sabe-se que muitas plantas medicinais contêm substâncias que podem desencadear reações adversas, que podem ser decorrentes dos próprios

componentes presentes na planta, pela presença de contaminantes, adulterantes ou até mesmo, nas preparações caseiras duvidosas. Além disso, deve haver um rigoroso controle de qualidade que vai desde o cultivo da planta até a elaboração do medicamento final (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

Dados do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), mostram que no ano de 2010 no Brasil, ocorreram 1132 casos de intoxicação humana por uso de plantas sendo que desses, 5 foram a óbito (SINITOX, 2009).

1.2 *Plantago major* L.

Plantago major L. é uma herbácea originária na Europa, atualmente difundida por todo o continente Asiático e Americano, além de países como Nova Zelândia e África do Sul. No Brasil ocorre principalmente nas regiões sul, onde teve sua utilização na medicina popular com as mesmas indicações acerca de informações originárias da planta. É conhecida popularmente como “Transagem”, “língua de vaca” ou “tranchagem,” e ocorre espontaneamente nas regiões de clima temperado ou subtropical, sendo facilmente cultivada no Brasil (DERMAEDEROSIAN & BENTLER, 2002). A classificação botânica de *Plantago Major* L. está descrita na Tabela 01.

Tabela 01: Classificação botânica de *Plantago Major* L.

Classificação Botânica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales
Família	Plantaginaceae
Gênero	<i>Plantago</i>
Espécie	<i>Plantago Major</i>
Nomes Populares	Transagem, Língua de vaca, Tanchagem

Fonte: Adaptado de Adjanohoun *et al*, (1983)

Quanto ao aspecto toxicológico de *Plantago Major* L. doses altas podem produzir diarreia e queda de pressão arterial. A ingestão ou contato direto com as partes da planta pode produzir irritações cutâneas e reações alérgicas. A ingestão da semente pode provocar choque anafilático (DUKE, 2000; DERMAEDEROSIAN & BENTLER, 2002).

Morfologicamente a *Plantago major* L. é uma erva com raiz principal inconspícua e raízes secundárias espessas. Seu caule mede de 0,5 a 1,5 cm de comprimento e suas folhas são obovadas com margens crenadas, glabras ou pilosas. Apresenta inflorescência laxa, 6,5 a 7,0 cm de comprimento: escapo (caules que sustentam flores na extremidade) com 11,5 a 18,0 cm de comprimento, inconspicuamente sulcado, glabro; ovário locular, 3 a muitos óvulos por lóculo. Sementes de 6 a muitas, irregulares, coloração castanho escuras e testa rugosa. (ROCHA *et al*, 2002) Os detalhes das partes de *Plantago major* L. estão ilustrados na Figura 01.

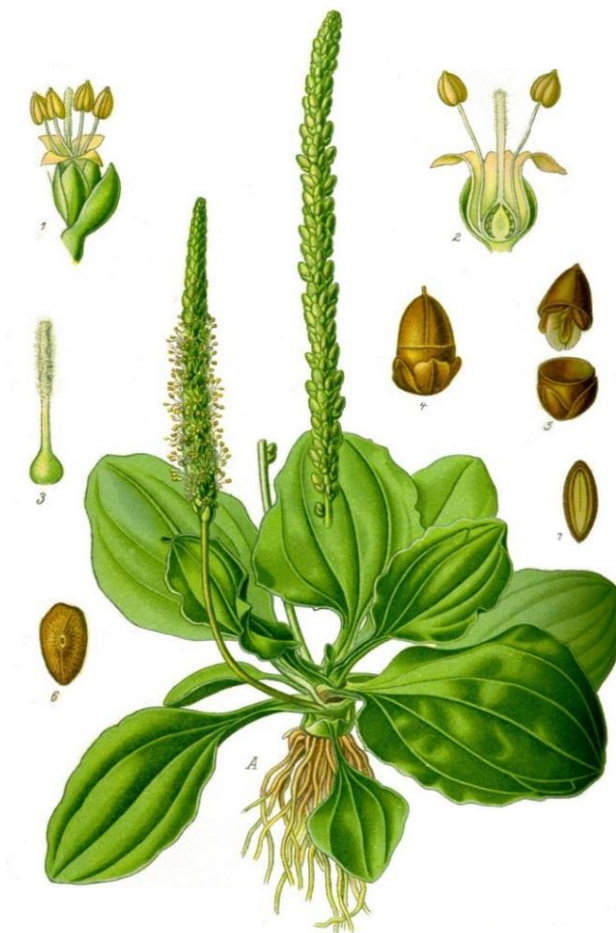


Figura 01: Detalhe da parte aérea (folhas e inflorescências), sementes e raízes de *Plantago Major* L.
Fonte: (ADJANOHOUN *et al*, 1983)

Em todo o mundo o *Plantago major* L. tem sido utilizado para diferentes fins na medicina popular, sendo as atividades biológicas das folhas e sementes de *Plantago Major* L. mais comuns: cicatrização de feridas, antiinflamatórias, analgésicas, antioxidante, fracamente antibiótico, imunomoduladora, antiulcerogênica, anti-hipertensivas, antileucêmica, anticarcinogênica, antiviral, moduladora da imunidade mediada por células, anticandidíase, antitumoral, antinociceptivo (reduzindo a sensibilidade a estímulos dolorosos) e redução dos efeitos imunodeprimidos de drogas anticâncer. Na China tem sido tradicionalmente usada no tratamento de numerosas doenças que variam desde resfriado até hepatite (CHIANG, 2002).

1.3 Ativos vegetais

Os compostos produzidos pelos vegetais podem ser agrupados em duas classes: os metabólitos primários que possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, e os metabólitos secundários, que não fazem parte dos compostos essenciais ao desenvolvimento da espécie. Apesar de haver um controle genético a expressão de metabólitos secundários pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos fisiológicos, evolutivos e ecológicos (TAIZ; ZEIGER, 2006; HARTMANN, 1996).

São diversas as vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos nas plantas, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O balanço entre a formação e a eliminação desses compostos durante o crescimento da planta irá determinar a presença destes, sendo que este equilíbrio sofre influência de fatores como temperatura, água, luz, genéticos, entre outros. Os metabólitos secundários são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, e entre as principais classes de metabólitos secundários estão os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides. Tais compostos produzidos através do metabolismo secundário são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos produzidos pelas plantas. Também desempenham grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores e constituir uma defesa química contra estresse ambiental (CARDOSO *et. al*, 2000; DI STASI, 1995).

1.4 Áreas correlacionadas com estudos de plantas medicinais

O conhecimento sobre plantas medicinais muitas vezes simboliza o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais acabam por contribuir de forma bastante relevante para a divulgação das possíveis propriedades terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem inicialmente seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL *et al*, 2002).

Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm a tradição de consumi-las, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. Indiretamente este tipo de cultura medicinal acaba despertando o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, tais como a botânica, a farmacologia e a fitoquímica. Esta benéfica integração acaba enriquecendo a inesgotável fonte medicinal que compõe a flora mundial (MACIEL *et al*, 2002).

Neste cenário surge um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia: a elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação. Os inúmeros constituintes e extratos contidos nas plantas podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diversos princípios ativos devido a presença de compostos ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios simples, sensíveis e reprodutíveis (GEBHARDT, 2000).

Os bioensaios podem envolver organismos inferiores, ensaios bioquímicos visando alvos moleculares e cultura de células humanas ou animais. O teste adequado dependerá da doença alvo (MACIEL *et al*, 2002).

O teste de toxicidade contra a *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade, devido à elevada sensibilidade deste microcrustáceo (HOCAYEN *et al*, 2012). Também é realizado na avaliação de extratos vegetais,

considerado como um teste rápido, eficiente e econômico e que requer pequenas quantidades de amostras de extratos para os testes (PIMENTA *et al*, 2003).

A resistência a agentes antimicrobianos requer pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, além do desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções microbianas (CUNICO *et al*, 2004).

1.5 Antimicrobianos e resistência bacteriana

As doenças infecciosas afetam milhões de pessoas em todo o mundo ao longo da história da humanidade, apresentando, portanto, mortalidade significativa (BECKER *et al*, 2006).

A descoberta dos antibióticos para o combate de infecções foi de grande importância para a humanidade. No entanto, atualmente a resistência bacteriana tornou-se uma preocupação mundial e um sério problema de saúde pública. A busca por novos tratamentos de infecções bacterianas é um dos desafios da medicina moderna, visto o aumento da resistência aos antimicrobianos que se torna cada vez mais evidente. Considerando a grande diversidade de antimicrobianos que atuam sobre os diferentes microrganismos patogênicos, diversos estudos buscam medicamentos com maior espectro de ação, baixo custo e menor índice de resistência bacteriana (CORDOVA, 2002; NASCIMENTO *et al*, 2000; PAZHANI *et al*, 2004).

Nos ensaios envolvendo atividade microbiana o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são amplamente usados. O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, assim como os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies, dentre estas 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (MENEGOTTO; PICOLI, 2007). A principal espécie deste gênero é o *Staphylococcus aureus*, que possui formato esférico (cocos) e formam grupos com aspecto de cachos de uvas (HARVEY, 2008).

O *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) é uma bactéria Gram positiva conhecida por causar abscessos na pele e tecidos moles, (ANVISA, 2004; CHENG *et al*, 2011) considerado um patógeno humano oportunista e está associado a infecções adquiridas tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Já o gênero *Escherichia* pertence à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram negativos e fazem parte da microbiota normal do colo em humanos e outros animais, no entanto, podem ser patogênicos dentro ou fora do trato gastrintestinal (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; HARVEY, 2008).

Escherichia coli (*E. coli*) compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, a tipagem das linhagens é feita conforme as diferenças em três antígenos estruturais O, K e H. No entanto, nem todas as amostras de *E. coli*, provenientes do intestino humano ou de qualquer outro local do organismo, irão apresentar os três tipos de antígenos simultaneamente (HARVEY, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A *E. coli* consiste em um dos microrganismos mais versáteis já conhecidos, sua mutabilidade possibilita constante adaptabilidade ao meio (SILVEIRA; MARQUES; MACHADO, 2013). São descritos pelo menos cinco classificações de infecção intestinal causadas por patotipos de *E. coli*: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroaderente (EAEC) (HARVEY, 2008).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes fitoquímicos, bem como o processo obtenção dos extratos e os testes de toxicidade frente a *Artemia Salina* Leach, foram desenvolvidos no Laboratório de Química Analítica da Faculdade Patos de Minas (FPM), localizada no município de Patos de Minas/MG-BR na Rua Major Gote nº 1408, Centro.

2.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado para as análises foi composto pelas folhas de *Plantago major* L., a identificação botânica foi feita pela Bióloga e professora Daniela Cristina Silva Borges da Faculdade Patos de Minas (FPM). As plantas de *Plantago*

major L. foram coletadas na comunidade rural de Lagoa dos Estulanos (latitude: 19°06'7"049", longitude: 46°29'5"013") localizada do município de Carmo do Paranaíba/MG em agosto de 2013. As plantas coletadas eram de origem natural, e estavam em terreno com solo medianamente úmido, textura organo-argilosa, com poucas plantas invasoras nas proximidades, recebia boa luminosidade solar e o local livre de acesso de animais. As amostras foram coletadas pela manhã realizando uma abertura no solo com auxílio de uma enxada em volta da planta escolhida. Em seguida as raízes foram lavadas em água corrente e acondicionadas em sacos de papel e conduzidas imediatamente até o laboratório de química analítica da Faculdade Patos de Minas/MG, onde as raízes foram cortadas e descartadas e as folhas lavadas com água destilada.

2.2 Secagem e processamento do material vegetal

Todo o material foi seco em estufa de secagem (OLIDEF CZ) a 40° C e posteriormente triturado em moinho de facas (FAET STIL II).

2.3 Prospecção fitoquímica

Todos os testes foram realizados de acordo com as metodologias propostas por Matos (1997) e Ugaz (1994), com algumas modificações.

2.3.1 Preparo dos Reagentes

a) Reagente de Mayer: Foram misturadas 1,36 g de cloreto de mercúrio (HgCl_2) em 60,0 mL de água destilada e 5,0 g de iodeto de potássio (KI) em 10 mL de água destilada e posteriormente foi feita diluição para 100 mL.

b) Reagente de Wagner: Foram dissolvidas 1,27 g de iodo (I_2) e 2,0 g de iodeto de potássio (KI) em 5 mL de água destilada e então o volume foi completado para 100 mL com água destilada.

c) Solução de cloreto férrico: Foi preparada uma solução a 10% de cloreto férrico ($FeCl_3$) em água destilada.

2.3.2 Obtenção do extrato para prospecção

Foram pesadas 5 g de folhas previamente secas e trituradas de *Plantago Major* L. Estas foram suspensas em 25,0 mL de etanol 92,8% em balão erlenmeyer. O erlenmeyer contendo a mistura foi então levado a banho-maria ($60^\circ C$), com agitação frequente por 12 minutos. Em seguida foi realizada a filtração a quente em papel filtro analítico. A solução obtida foi acondicionada em frascos de vidro âmbar.

2.3.3 Testes Fitoquímicos

Na prospecção fitoquímica preliminar foram adotados os métodos descritos a seguir:

a) Esteroides/triterpenoides: Os testes para identificação de esteroides/triterpenoides foram realizados por meio da reação de Lieberman-Burchard utilizando 2,0 mL do extrato misturado a 2,0 mL de clorofórmio. Posteriormente a solução clorofórmica sofreu filtração gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro. Adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético em tubo de ensaio, e em seguida foi submetido a agitação suave. Foram acrescentadas cuidadosamente três gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, agitando suavemente e observando, se houve desenvolvimento de cores. Formação de coloração azul

evanescente seguida de verde indica a presença de esteroides/triterpenoides respectivamente.

b) Flavonoides: Para a identificação de flavonoides foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (Ácido Clorídrico concentrado e magnésio). Foram adicionados a 2,0 mL do extrato, aproximadamente 200 mg de magnésio com 2,0 mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação deu-se pelo término de efervescência. Coloração que varia de parda a vermelha indica a presença de flavonoides no extrato.

c) Taninos: Para a identificação de taninos foram adicionados a 2,0 mL de extrato em um tubo de ensaio, três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 (cloreto férrico) e promoveu-se forte agitação. A identificação ocorre pela formação de um precipitado de tonalidade azul indicando a presença de taninos hidrolisáveis, e verde, a presença de taninos condensados.

d) Saponinas: Foram adicionados em 2,0 mL do extrato, 2,0 mL de clorofórmio e 5,0 mL de água destilada. A solução foi filtrada para um tubo de ensaio. Em seguida a solução foi agitada permanentemente por 3 minutos. A formação de uma espuma persistente e abundante indica a presença de saponina.

e) Alcaloides: Para a identificação de alcaloides foram utilizados 9,0 mL de extrato. Adicionou-se 2,0 mL de ácido Clorídrico (HCl) a 10% e aqueceu-se por 10 minutos. O material foi resfriado, filtrado, dividido em dois tubos de ensaios e então foram adicionadas algumas gotas dos reativos de reconhecimento: Mayer e Wagner. O aparecimento de uma leve turbidez ou precipitado de coloração roxa, branca a creme e marrom evidencia a possível presença dos mesmos.

3.4 Bioensaios

2.4.1 Obtenção do extrato etanólico (EE) para bioensaios

Para preparo do extrato etanólico (extrato obtido a partir do etanol como solvente), foram colocadas 100,0 g do material vegetal processado em um erlenmeyer, em seguida cobriu-se o material vegetal por completo com álcool 92, 8°. O erlenmeyer foi tampado e o material vegetal permaneceu em maceração por um período de 4 dias, sendo realizada agitação duas vezes ao dia, sempre no mesmo horário. Após esse período o material foi filtrado em sistema a vácuo e o solvente foi totalmente evaporado (CASTRO, *et al*, 2012). Para solubilização do extrato etanólico foi utilizado tween 80, um solvente atóxico a 5% (LOPES *et al*, 2002). Determinou-se o rendimento do EE. A Figura 02 representa um fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico.

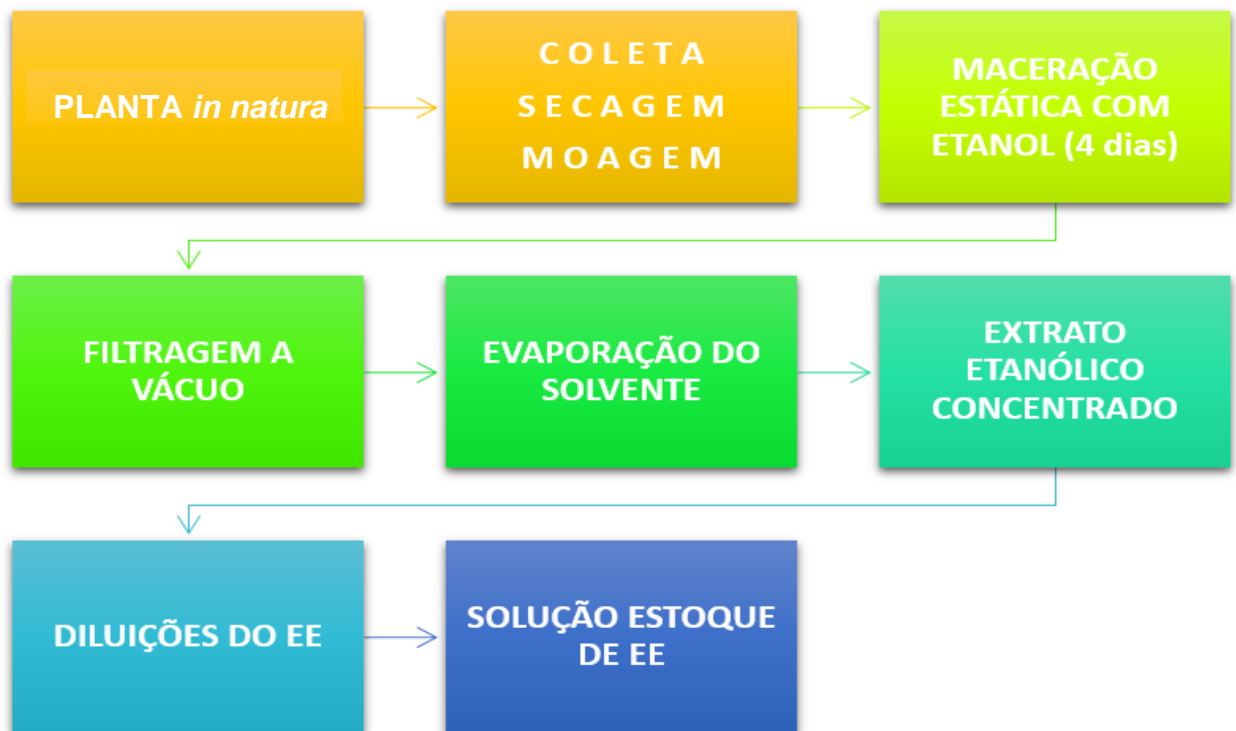


Figura 02: Fluxograma de obtenção do extrato etanólico de *Plantago Major L.*
Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.2 Atividade citotóxica do extrato etanólico frete à *Artemia Salina* Leach

O teste de toxicidade contra larvas de *Artemia salina* Leach, consiste em um importante bioensaio para avaliação preliminar de toxicidade. Para realização dos testes de toxicidade utilizando *Artemia salina* Leach foram feitas adaptações baseadas nas metodologias propostas por Meyer *et al* (1982), Nascimento *et al* (1999) e nas normas da CETESB-SP (1991).

a) Eclosão dos ovos de *Artemia Salina* Leach

Inicialmente foi preparada uma solução salina na concentração de 35 g L⁻¹. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH). Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* Leach e no preparo das demais diluições.

Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a temperatura ambiente. Foi utilizado um recipiente retangular de 15,0 x 7,0 x 8,0 cm, com uma divisória contendo furos de 0,03 cm de espessura, espaçamento de 0,5 cm, distribuídos uniformemente. Foram adicionados 500 mL da solução salina. Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca de 50mg de cistos de *Artemia salina* Leach, o processo foi realizado com cuidado para que os mesmos não ultrapassassem a divisória. Durante as 48 horas um dos lados do recipiente permaneceu sob iluminação por uma lâmpada fluorescente. O lado do sistema que continha os cistos de *Artemia salina* Leach foi coberto com papel alumínio, promovendo a completa ausência de luz, para que ao nascer os microcrustáceos fossem atraídos pela luz do outro lado do sistema, forçando-os a atravessar a divisória. O objetivo desse procedimento foi promover uma homogeneização das condições físicas dos organismos-teste (MILANI E ZIOLLI, 2008).

b) Bioensaio com *Artemia Salina* L.

Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* Leach foram transferidas para tubos de ensaio contendo a solução salina e as amostras a serem testadas. O extrato etanólico foi solubilizado com tween 80, produzindo-se amostras nas seguintes concentrações: 62.5, 125.0, 250.0, 500.0 e 1000.0 ng L⁻¹. Os ensaios foram realizados em triplicata de amostras, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas (LIMA *et al*, 2009).

Os dados de porcentagem de larvas de *Artemia salina* Leach mortas, em relação ao aumento da concentração do extrato aquoso foram ajustados em uma equação linear simples, a qual foi utilizada para estimar a concentração de extrato responsável por matar 50% das artemias – valor representativo da DL 50 (dose letal do extrato para 50% da população). Foi utilizado o método gráfico de análise para obtenção da DL 50. O teste foi acompanhado de um controle negativo, somente com água salina, e um controle positivo, com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) (LIMA *et al*, 2009).

2.4.3 Determinação da atividade antibacteriana

A metodologia empregada na determinação da atividade antibacteriana consta de uma adaptação da proposta por Lins (2011), cujos procedimentos são posteriormente descritos. Os testes de sensibilidade bacteriana foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia da Faculdade Patos de Minas (FPM), localizada no município de Patos de Minas/MG-BR na Rua Major Gote n° 1409, Centro.

a) Microrganismos para os testes de sensibilidade

A sensibilidade antibacteriana dos extratos foi avaliada pela técnica de difusão em disco. Os ensaios foram realizados utilizando cepas das bactérias em estudo de acordo com o protocolo M02-A10 do “Clinical and Laboratory Standards Institute”

(CLSI, 2009) para discos disponíveis no comércio e com o protocolo adaptado para produtos naturais.

As bactérias testadas foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isolados clínicos hospitalares. As bactérias foram armazenadas e conservadas congeladas em freezer (CONTINENTAL RUCT27) na temperatura de -20°C, em caldo Mueller-Hinton (ACUMEDIA) acrescido de 20% de glicerol e em geladeira (CONTINENTAL RUCT27) para repiques frequentes em Ágar Sangue (PRODIMOL) para *Staphylococcus aureus* e MacConkey (PRODIMOL) para *Escherichia Coli*. No momento dos testes as bactérias foram subcultivadas em ágar sangue (MERCKOPLATE) e Tiger (MERCKOPLATE) e incubadas em estufa (FANEM- 502) a 37°C por 24 horas. Todos os procedimentos foram realizados assepticamente em capela de fluxo laminar vertical (PACHANE PCRT2 - ECO).

b) Discos

Os discos de difusão foram feitos a partir de papel filtro estéril, apresentando três milímetros (mm) de diâmetro. Para dissolução do extrato foi utilizado tween 80 produzindo um volume de 200 µL de solução estoque nas concentrações de 37,5 µg/µL, 100 µg/µL e 163,6 µg/µL em seguida estes foram acondicionados em microtubos (EPPENDORF). Os discos de papel filtro previamente esterilizados foram impregnados individualmente com 10µL do extrato etanólico.

c) Preparo de inóculo bacteriano

Os microrganismos isolados foram semeados em ágar Mueller-Hinton (AMH – ACUMEDIA) e incubados em estufa microbiologia (FANEM- 502) a 37°C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, colônias de morfologias semelhantes foram suspensas em soro fisiológico 0,8% estéril, cuja turvação foi ajustada a escala padrão de turbidez 0,5 Mc Farland (PROBAC) ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e, em seguida, com auxílio de swab estéril (ABSORVE®), a suspensão foi semeada na superfície de placas de

petri (20 x 100 mm) contendo AMH, com espessura de quatro milímetros (mm), em três direções.

d) Aplicação de discos

Após a secagem do inóculo, os discos foram distribuídos nas placas, as quais foram incubadas em estufa (FANEM- 502) a 37°C por 24 horas. Posteriormente ao período de 24 horas de incubação, os halos de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos discos foram medidos em mm de diâmetro com auxílio de um paquímetro (MYTUTOYO).

e) Controle de experimento

Ao todo foram realizadas três repetições para cada cepa de bactéria em estudo. Para controle de qualidade e reprodutibilidade foram utilizados como controles positivos os discos comerciais (SENSIDISC): oxaciclina (OXA), ciprofloxacina (CIP), azitromicina (AZI), amoxicilina (AMC), cefepime (CEF) e aztreonam (ATM) e como controle negativo foram utilizados discos de papel filtro impregnados com 10,0 µL do soro fisiológico (0,8%) esterilizado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Prospecção fitoquímica

A avaliação fitoquímica preliminar do extrato alcoólico das folhas de *Plantago Major* L. revelou a presença de triterpenos, taninos, saponinas e flavonoides. As

classes metabólicas encontradas bem como as reações observadas durante os testes são apresentadas na Tabela 03.

Tabela 03. Classes metabólicas e reações observadas nos testes fitoquímicos do extrato das folhas de *Plantago Major L.*

Classes Metabólica	Reação	Resultado
Alcaloides	Formação de coloração verde forte	-
Flavonoides	Formação de coloração parda	+
Taninos	Formação de precipitado de coloração azul	+
Saponinas	Formação de espuma persistente	+
Triterpenos	Formação de coloração verde	+
Esteróides	Sem formação de coloração azul	-

Fonte: Arquivo pessoal.

Nas folhas de *Plantago Major L* foram encontrados flavonoides que de acordo Silva (2002) são responsáveis por propriedades anti-inflamatórias.

A espécie avaliada apresentou taninos, que são compostos fenólicos responsáveis por ação cicatrizante (SORIANO *et al*, 2004). Buffon *et. al* (2001) atribui as ações adstringente, cicatrizante, antimicrobiana e anti-inflamatória de *Plantago Major L* a presença de taninos, que são bons inibidores enzimáticos e atuam como anti-envenenamento por determinados alcaloides e mucilagens (suco viscoso que funciona como anti-inflamatório, cicatrizante e protetor das mucosas).

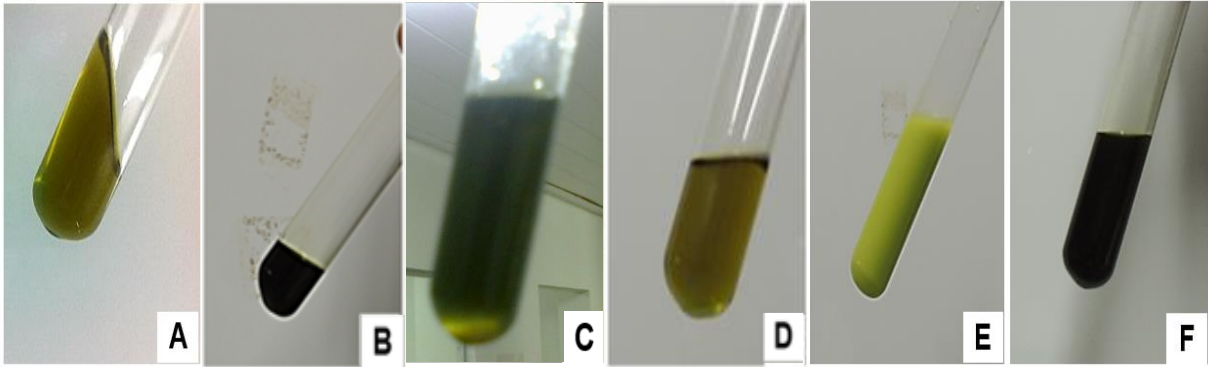


Figura 03: Análises de fitoquímica preliminar.

Fonte: Arquivo pessoal. (A) Triterpenos (B) Esteroides, (C) Flavonoides, (D) Taninos, (E) Saponinas e (F) Alcaloides.

As saponinas, classe de compostos encontrada na espécie de acordo com Silva *et. al* (2011) são responsáveis por inúmeras atividades biológicas, destacando-se as atividades anti-inflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, redutora de colesterol, antiviral, antimicrobiana e antifúngica.

Já os triterpenos são responsáveis por ação diurética, expectorante e anti-inflamatória (LEZCANO *et. al*, 2012). Heitzman apud Paiva (2009) relata que efeito terapêutico também pode ocorrer por efeito sinérgico entre os metabólitos.

Bonfim (2011), relata que nas folhas de *Plantago Major* L., parte mais utilizada da espécie, contém flavonoides, taninos, mucilagens e saponinas, além de serem ricas em ácidos orgânicos, sais de potássio e vitamina C.

A diversidade de metabólitos secundários encontrados na espécie demonstra que *Plantago Major* L., possui um elevado potencial terapêutico justificando sua ação nas diversas enfermidades. O infuso das folhas é utilizado cotidianamente no tratamento de inflamações de boca e garganta, infecções intestinais, como agente antibacteriano, acnes, picadas de insetos e também nas afecções do trato respiratório superior. As flores são utilizadas em quadros de irritações oculares e conjuntivite. As raízes são empregadas no tratamento de dores dentárias e as sementes, são utilizadas na medicina chinesa no tratamento da febre, reumatismo, diarreia e disenteria (LORENZI & MATOS, 2002; DERMAEDEROSIAN & BENTLER, 2002; FREITAS *et al*, 2002; DUKE, 2000).

3.2 Rendimento do extrato de *Plantago Major* L.

Ao final do processo de extração foi calculado o rendimento do extrato etanólico com base nos valores de massa seca, revelando um rendimento de 1,35% de um total de 100,0 g de folhas de *Plantago Major* L.

3.3 Bioensaios

3.3.1 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia Salina* Leach.

O uso adequado de plantas medicinais com propriedades farmacológicas pode trazer benefícios quando utilizadas isoladamente ou associadas aos tratamentos convencionais, no entanto, o uso de tais espécies deve ser realizado em doses terapêuticas pois podem ocorrer intoxicações (RESENDE, sd).

Para determinação a DL 50 o extrato etanólico foi diluído para as seguintes concentrações: 62,5, 125, 250, 500 e 1000 ng/L. Os resultados mostraram que com o aumento da concentração do extrato, houve um aumento da taxa de mortalidade das larvas de *Artemia Salina* Leach. A Tabela 04 apresenta a porcentagem de larvas que vieram a óbito após o período de 24 horas de exposição ao extrato etanólico de *Plantago Major* L. nas concentrações testadas.

Tabela 04. Mortalidade dos microcrustáceos nas concentrações testadas

Concentração do extrato (ng/mL)	Mortalidade (%)
Água Salina (CN)	1,5
62,5	60
125	70
250	80
500	90
1000	100
Dicromato de Potássio (CP)	100

Fonte: Arquivo pessoal. (CN) controle negativo; (CP) controle positivo.

Os resultados foram inseridos no Gráfico 02, onde foi determinada a equação do gráfico através do Microsoft Excel Office 2013 e posteriormente a DL 50 foi calculada. O valor encontrado foi de 11,59 ng/L. Amarante (2011) considera que quando a dose letal 50% (DL 50) for superior a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ a toxicidade é baixa; moderada para DL 50 entre 100 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e muito tóxico quando a DL 50 foi inferior $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto, a espécie é muito tóxica e seu uso deve ser cauteloso.

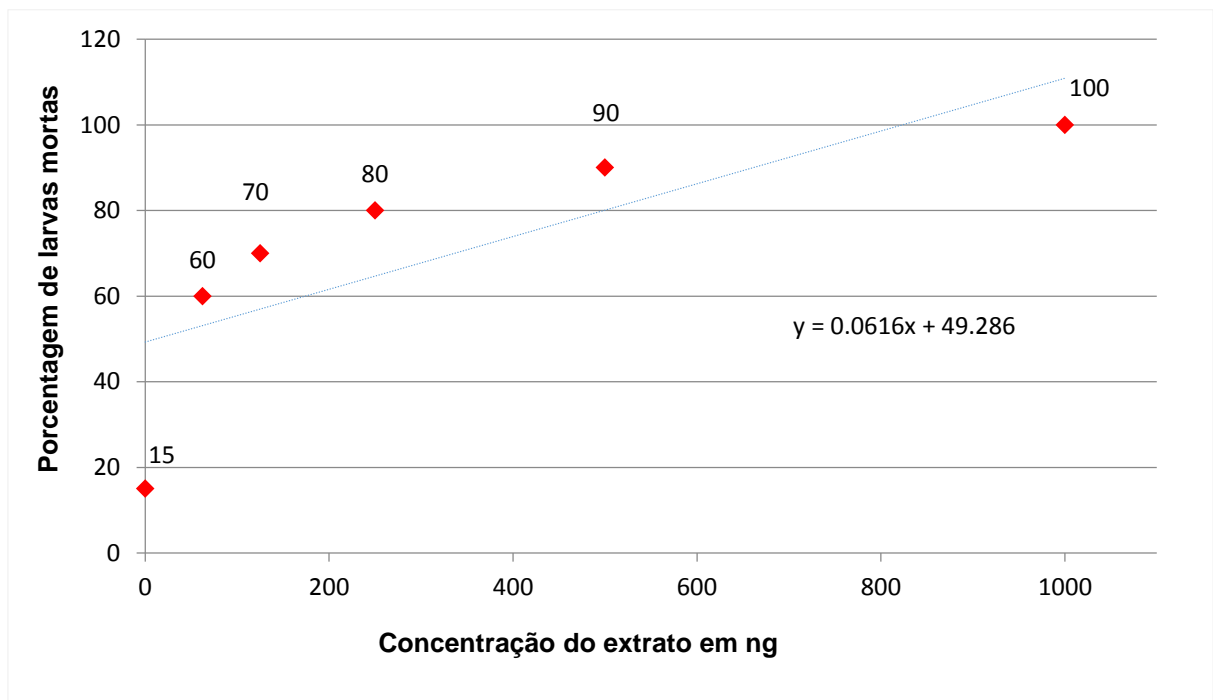


Gráfico 02: Porcentagem de larvas de *Artemia Salina* Leach mortas em relação ao aumento da concentração do extrato etanólico (EE)

Fonte: Arquivo de pessoal.

Mirzaei Masha e Mirzaei Ali, (2013) também encontraram resultados parecidos ao fazer bioensaios comparativos de toxicidade com a parte aérea de extratos de 4 plantas medicinais de ocorrência iraniana (*Plantago major* L., *Artemisia maritime*, *Mentha piperita* e *Borago officinalis*) frente a *Artemia salina* Leach e *Artemia Uramiana*. Neste estudo foram testados os extratos (metanólico, hexânico e em acetato de etila) das quatro plantas nas concentrações: 10, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/L}$. Dentre as plantas estudadas os extrato metanólico e de acetato de etila de *Plantago Major* L. apresentaram toxicidade frente ambos os sistemas (*A. salina* e *A. Uramiana*) revelando a necessidade de realização de novos estudos com esta planta.

3.3.2 Avaliação da atividade antibacteriana

O extrato etanólico de *Plantago Major* L. foi testado para a atividade antibacteriana frente a *E. coli*, uma bactéria Gram negativa relacionada a doenças do trato digestivo caracterizadas por quadros infecciosos graves e *S. aureus*, uma bactéria Gram positiva conhecida por causar abscessos na pele e tecidos moles. (ANVISA, 2004; CHENG *et al*, 2011). Na escolha destes microrganismos foram considerados a indicação popular da planta, sendo que frequentemente a *E. coli* está envolvida em processos de infecções urinária e *S. aureus* em infecções intestinais.

De acordo com os resultados obtidos, o extrato etanólico de *Plantago Major* L. não apresentou uma atividade significativa contra *S. aureus* e *E. coli* nas concentrações testadas (Tabela 05).

Tabela 05. Resultados da atividade antibacteriana dos extratos etanólico de *Plantago Major* L.

Amostra	Concentração	Halos de inibição em milímetro (mm)*	
		<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)
EXTRATO	E1 (37,5 µg/mL)	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	E2 (100 µg/mL)	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	E3(163,3 µg/mL)	0,100 ± 0,033	0,000 ± 0,000
CONTROLES	OXA (1 µg/mL)	0,000 ± 0,000	2,366 ± 0,119
	CIP (5 µg/MI)	0,000 ± 0,000	2,700 ± 0,047
	AZI (15 µg/mL)	0,000 ± 0,000	1,866 ± 0,191
	AMC (30 µg/mL)	2,600 ± 0,082	0,000 ± 0,000
	ATM (30 µg/mL)	3,233 ± 0,054	0,000 ± 0,000
	CEF (30 µg/mL)	3,200 ± 0,047	0,000 ± 0,000
	CN (0 µg/mL)	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Fonte: Arquivo pessoal. Foram calculadas as médias para os valores das três repetições ± erro padrão (Microsoft Excel 2013). (OXA) oxaciclina, (CIP) ciprofloxacina, (AZI) azitromicina, (AMC) amoxicilina/Ácido Clavulânico, (CEF) cefepime, ATM (aztreonam) e CN (soro fisiológico estéril).

O Gráfico 03 apresenta as medidas dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em ágar para *Escherichia coli*. Apenas os controles positivos promoveram inibição contra *Escherichia Coli*, com exceção do extrato etanólico em sua maior concentração (E3), que apresentou discreta formação de halo de inibição (0.100 mm).

Não houve formação de halo de inibição no controle negativo que continha apenas soro fisiológico 0,8% estéril.

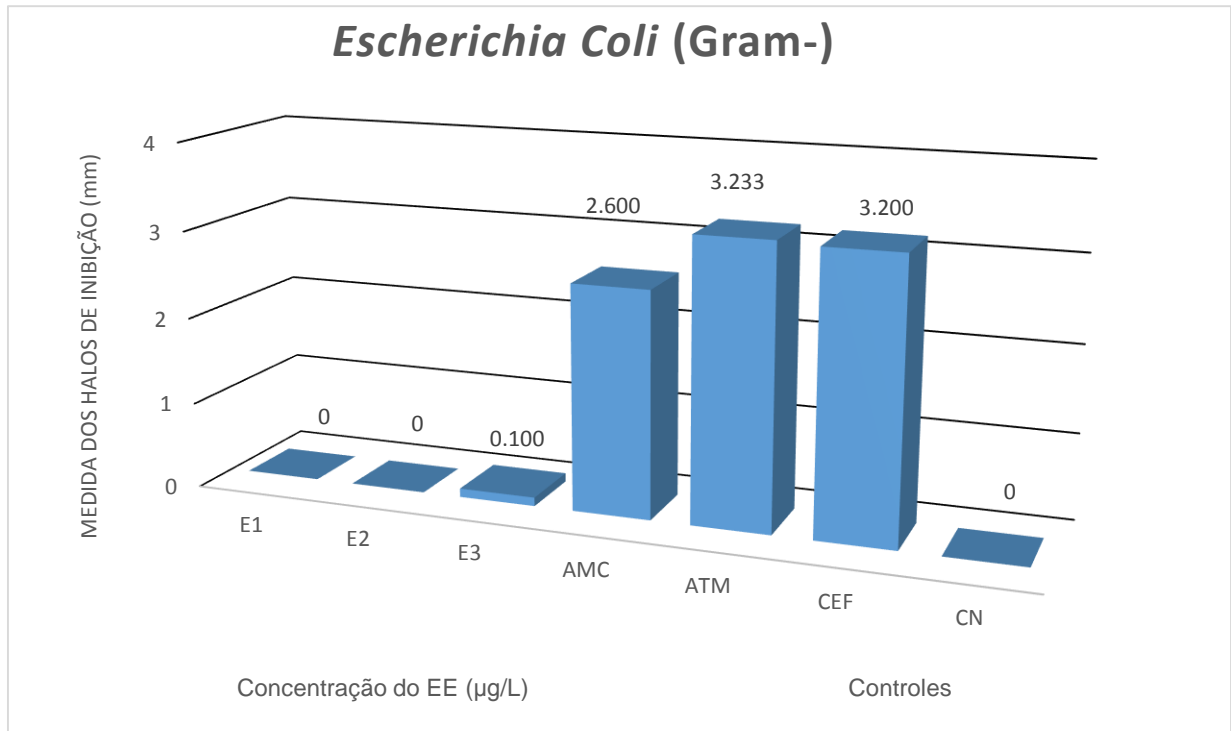


Gráfico 03: Medidas dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em ágar para *Escherichia coli*

Fonte: Arquivo pessoal. Concentração do Extrato Etanólico: E1 (37,5 µg/L), E2 (100 µg/L), E3 (163,3 µg/L) e Controle negativo (CN). Controles Positivos: AMC, ATM e CEF.

O Gráfico 04 apresenta as medidas dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em ágar para *Staphylococcus aureus*. Apenas os controles positivos promoveram inibição contra *S. aureus*. Não houve formação de halo de inibição no controle negativo que continha apenas soro fisiológico 0,8% estéril.

Rios (1988) sugere que diversos antibióticos utilizados clinicamente são ativos a uma concentração de 10 µg/mL. Quando uma substância pura não apresenta atividade a 100 µg/mL, ela não será clinicamente útil. Aqueles extratos vegetais que demonstram atividade a 100 µg/mL possuem uma boa potência, de modo que a determinação dos componentes ativos destes é recomendada.

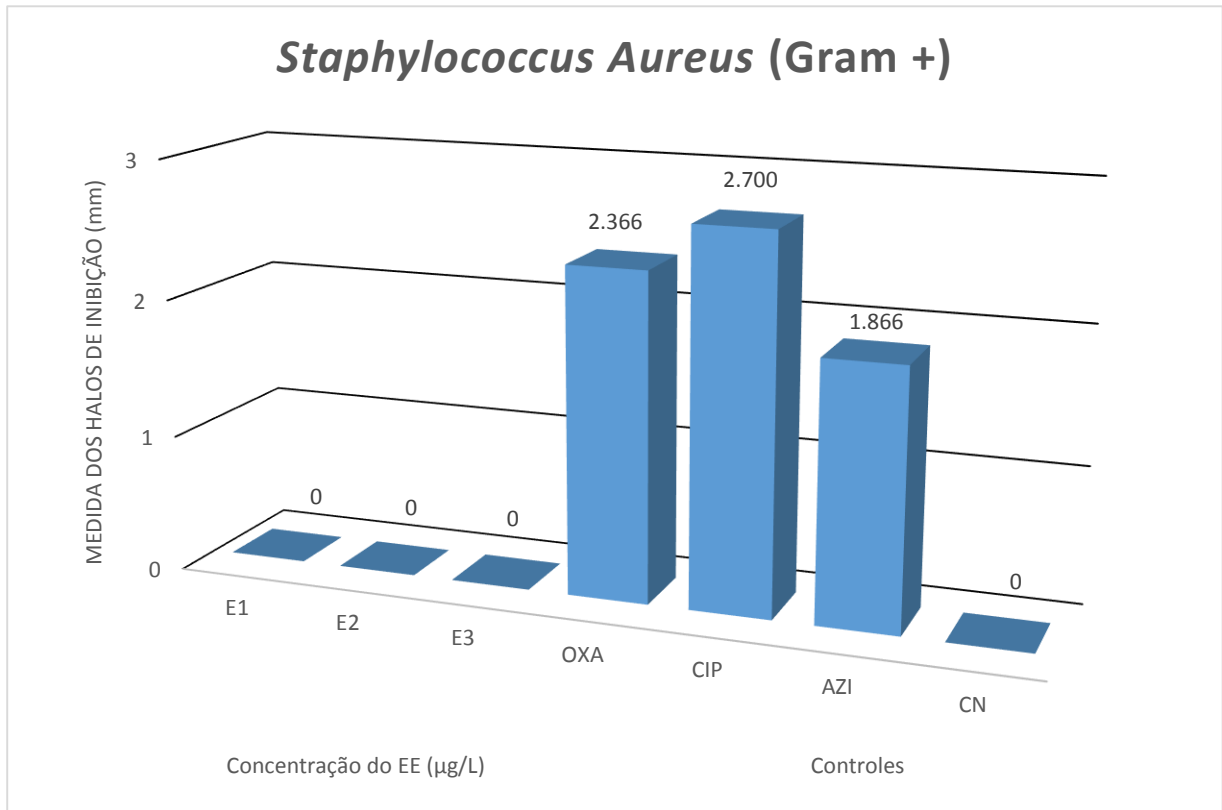


Gráfico 04: Medidas dos halos de inibição (mm) do teste de difusão em ágar para *Staphylococcus aureus* **Fonte:** Arquivo pessoal. Concentração do Extrato Etanólico: E1 (37,5 µg/L), E2 (100 µg/L), E3 (163,3 µg/L) e Controle negativo (CN). Controles positivos: OXA, CIP e AZI.

Assim, considera-se que o efeito antibacteriano de *Plantago Major* L., não deve ser considerado para uso clínico, no entanto este estudo consistiu em uma avaliação preliminar qualitativa, sendo importante ressaltar que o método de difusão em ágar apresenta limitações para substâncias de baixa difusibilidade em ágar, sendo necessária a realização de outros testes, como a concentração inibitória mínima (CIM) ou autobiografia a fim de testar os efeitos antimicrobianos do extrato em estudo (HOSTETTMANN, 1998). O uso errôneo de plantas medicinais com finalidades terapêuticas diversas deve ser evitado, visto que muitas vezes os efeitos referidos àquela espécie podem não ser reais e podem trazer danos à saúde do usuário ao invés de benefícios. No entanto, a utilização de plantas medicinais pela população tem despertado interesse de profissionais de saúde, conforme são detectados crenças sobre os efeitos e a extensão da indicação dessas preparações (OLIVEIRA; ARAÚJO; MOREIRA, 2002). Dessa forma as investigações sobre o potencial terapêutico de

diversas plantas referido pela população vem se intensificando trazendo mais segurança quanto ao uso dessas preparações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas folhas de *Plantago Major* L foram encontradas as seguintes classes de compostos: flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos, que de acordo com a literatura são classes de metabólitos secundários descritas como classes que possuem atividade terapêutica elevada e responsáveis por diversas ações terapêuticas isoladamente ou por sinergismo.

Plantago Major L. apresentou toxicidade frente ao bioensaio com *Artemia Salina* Leach, com cinquenta por cento de mortalidade na concentração de 15,59 ng/L, o que causa preocupação com o seu consumo, pois se trata de uma espécie medicinal extremamente popular.

Os testes de atividade antibacteriana frente a *E. coli*, e *S. aureus* com o extrato etanólico de *Plantago Major* L. não apresentaram inibição significativa nas concentrações testadas. No entanto, o teste realizado é apenas uma avaliação preliminar qualitativa, sendo importante a realização de outros testes com especificidade maior como determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ou autobiografia.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY BIOMONITORED FOR THE PRELIMINARY TESTS OF TOXICITY FRONT *Artemia Salina* Leach AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT OF LEAVES OF *Plantago major* L. (Transagem)

Since ancient human societies have accumulated information and experience on the environment around them to interact with him and meet their survival needs. Observations popular on the use and efficacy of medicinal plants end up contributing quite relevant to the dissemination of the therapeutic properties of plants , often prescribed for medicinal effects they produce, although they did not initially known chemical constituents . The aim of this work was to study phytochemical bioactivity by preliminary tests of antibacterial activity and toxicity on *Artemia Salina* Leach, the ethanol extract of leaves of *Plantago Major* L. (Transagem). Tests of toxicity on *Artemia Salina* Leach and antibacterial activity by disc diffusion technique according to the protocol described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Were also found classes of compounds present in the leaves of species. Assays phytochemicals with the leaves of *Plantago Major* L. demonstrated the presence of flavonoids, tannins, saponins, triterpenes and which correspond to classes quite active metabolites. In the test of antibacterial activity there was no formation of inhibition zones, indicating the absence of antimicrobial activity in the ethanol extract of *Plantago Major* L. In the toxicity test on *Artemia salina* Leach species showed an LD 50 of 15,59 ng/L, which is considered relatively dangerous. Therefore, the use of preparations containing leaves of *Plantago major* L. must be cautious, since in this species toxicity tests proved to be toxic. It was also concluded that the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed no sensitivity to ethanol extract of the leaves of this species. Studies with greater specificity should be conducted in order to verify the therapeutic potential of extracts of leaves of *Plantago Major* L.

Keywords: *Plantago major* L., secondary metabolites, antibacterial activity, toxicity.

REFERÊNCIAS

ADJANOHOOUN, *et al.* Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice (Iles Maurice et Rodrigues). Agence de coopération culturelle et technique, (A.C.C.T.). Paris, p. 214, From the data bank PHARMEL 2 (ref. HP 10), 1983 Disponível em: <http://www.africamuseum.be/prelude/prelude_pic/Plantago_major1.jpg> Acesso em: 20 de ago. de 2013.

AMARANTE, C.B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (Montrichardialinifera). **Acta Amazônica**; v. 41; p. 431-434, 2011.

ANVISA, **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar Salvador, 2004.

ANVISA. **Medicamentos Fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>>. Acesso em: 30/08/2013.

BADKE, *et al.* Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano. **Esc Anna Nery**; vol. 15 n. 1 p. 132-139, 2011.

BADKE, M. R. *et al.* Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto contexto – enfermagem**; vol. 21, n. 2, 2012

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ADORNO, N. Infectious diseases – a global challenge. **International Journal of Medical Microbiology**; v. 296, p. 179-185, 2006.

BONFIM, F. P. G. *et al.* Potencial alelopático de extratos aquosos de *Melissa officinalis* L. e *Mentha x villosa* L. na germinação e vigor de sementes de *Plantago major* L.; **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**; v.13, p.564-568, 2011.

BUFFON, M. C. *et al.* Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “in vitro”; **Visão Acadêmica**; v. 2, n. 1, p. 31-38; 2001.

CARDOSO, M. G. *et al.* Óleos essenciais. **Lavras: Universidade Federal de Lavras - Pró-Reitoria de Extensão**; p. 42, 2000.

CASTRO L. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato aquoso e etanólico de *Acanthospermum Australe*. **Caderno pedagógico**; Lajeado, v. 9, n. 2, p. 153-161, 2012.

CETESB. São Paulo (1991). **Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com Artemia**. Norma Técnica L5.021, São Paulo.

CHENG, A. G. *et al.* A Play in Four Acts: *Staphylococcus aureus* Abscess Formation. **Trends in Microbiology**; v. 19, n. 5, p. 225-232, 2011.

CHIANG, L. C. *et al.* Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. **Antiviral Research**; n. 55, p. 53-62, 2002.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard- 7th edition. CLSI document M02-A10, Wayne, PA 2009.

CORDOVA, C. M. M.; CUNHA, R. A. F. da. Detecção de *Mycoplasma genitalium*, *M. Fermentans* e *M. penetrans* em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil. **J. Brás. Patol. Med. Lab**; n.38 vol.2: p. 119-126, 2002.

CUNICO, M. M. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Rev. Bras. de Farm**; V. 14, n. 2, p. 97-103, 2004.

DERMAEDEROSIAN, A.; BENTLER, J. A. The review of natural products. ed. 2, **Missouri: Faetsand Comparisons**; p. 508-601, 2002.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e ciência**. São Paulo, Ed. Unesp, p.108-119, 1995.

DUKE, A. J. **Herbal Handbook**. Rodale St. Martin's Press. p. 282, 2000.

FARIAS, E.M.F.G. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) In. CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2007, Natal, RN. Anais... Natal: **Sociedade Brasileira de Química**. 2007. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/7/7-600-750.htm>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**; v. 16 n. 7-8, 2004.

FREITAS A. G., *et al.* Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v. 12, supl., p. 64-65, 2002.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claim. **Ent. Exp. Appl**; n. 80, p. 177, 1996.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, ed. 2^a, 2008.

HOCAYEN P. A. S. Efeito da administração oral do extrato de *Baccharis dracunculifolia* na obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) **[dissertação]**. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Estadual do Centro Oeste; 2012.

HOSTETTMANN, K. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. **Lt**; v.70, n.11, p.23-27, 1998.

LEZCANO, *et al.* Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray; **Pastos y Forrajes**; v. 35, n.3, p.283-292, 2012.

LIMA, J. M. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*: **Planta Daninha**: v.27, n.1, p.7-11, 2009.

LINS, M. O. Atividade antimicrobiana e sinérgica de metabólitos de Rutáceae: **dissertação de mestrado**. UFB; 2011.

LOPES, W. B. *et al.* Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte Científico**; Uberlândia, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora. p. 512, 2002.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**; Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC. p. 141, 1997.

MENEGOTTO, F. R. & PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Ver. Bras. Anal Clin**; v. 39, n. 2, p. 147-50, 2007.

MEYER B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **J Med Plant Res**; 1982; 45:31-4.

MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina*. **Banco de dados Puc Rio**; 2008.

MIRZAEI MASHA; MIRZAEI ALI. Comparison of the *Artemia salina* and *Artemia uramiana* bioassays for toxicity of 4 Iranian medicinal plants. **Int. Res. J. Biological Sci**; Vol. 2, n.3, p. 49-54, março 2013.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extract and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol**; Vol. 31, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, I. A; ARAÚJO, M. M. S. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**; vol. 2, n.1, p.41-47, 1999.

OLIVEIRA, C. J.; ARAÚJO, T. L.; MOREIRA, T. M. M. Idosos com hipertensão arterial: interferências em sua qualidade de vida. **Revista Baiana Enfermagem**; v. 17, p. 109-112, 2002.

PAIVA, L. C. A., *et al.* Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral; **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v.19; 2009.

PAZHANI, G. P. *et al.* Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* Type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in Eastern India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**; v.48, n.2, p.681-4, 2004.

PIMENTA, L. P. S. Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**; n. 10 (2-3), p, 209-12, 2003.

RESENDE, A. **O poder curativo das plantas**. São Paulo: Escala, sd.
RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening Methods for Natural Products With Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. **Journal of ethnopharmacology**; v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

ROCHA, J. F. *et al.* ESTUDO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICO EM FOLHAS DE *Plantago major* L. E *Plantago australis* Lam. (PLANTAGINACEAE) **Revista Universidade. Rural**; Série. Ciências da Vida Vol. 22, n.1, p.33-41, 2002.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana. Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu; 2005.

SILVA, R. *et al.* Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico; **Medicina, Ribeirão Preto**; v.35, p. 127-133, 2002.

SILVA, F. M. *et al.* Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus Amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta; **Química Nova**; v. 34, p.1629-1633, 2011.

SILVEIRA, L.; MARQUES, A.; MACHADO, J. Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002-2012. **Inst. Nac. de Saúde**; n. 8, 2ª série, 2013.

SORIANO, M. *et al.* Actividad cicatrizante tópica de los metabolitos secundários em eleextractoeranólico de hojas de senecioculcitoidesweed. **Folia Dermatológica**; v.15; 2004.

SINITOX, Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região. Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf>. Acesso em: 01 set. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2006.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., **Microbiologia**, 5ª ed., Ed. Atheneu, São Paulo, p. 760, 2008.

TULP, M.; BOHLIN, L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drugs discovery? **Trends Pharmacol. Sci**; v. 23, n. 5, 2002.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.42, n.2, São Paulo, 2006.

UGAZ, O. L. **Investigación fitoquímica**. 2.ed. Lima: Pontificia Universidad Catolica del Peru – fondo Editorial, p. 300, 1994.

VEIGA JUNIOR, V. F., *et al.* Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**; São Paulo, v. 28, n. 3, June 2005.

AGRADECIMENTOS

À Deus, dedico o meu agradecimento maior, porque têm sido tudo em minha vida.

Aos meus pais e irmãos pela compreensão, paciência e confiança.

À professora Ms. Janaínne Nunes Alves por acreditar no meu potencial e transmitir suas experiências.

Ao professor Ms. Taciano dos Reis Cardoso, pelo entusiasmo e importantes sugestões que proporcionaram um trabalho mais completo.

Aos professores Bernardo, Nathalya, Geraldo, Rosana, Daniela, Milton, Paulo e Lílian que colaboraram na execução das análises e nas correções do trabalho. Agradeço também ao Biomédico e colaborador da FPM Guilherme, pelo auxílio na obtenção dos isolados clínicos para os testes de atividade antibacteriana.

À responsável técnica Mariele e aos monitores Paulo e Carulina do Laboratório de Química, pela pronta disponibilidade em me auxiliar no decorrer das análises.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram na concretização deste trabalho.

ANEXO

PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO PARA BIOENSAIOS



Figura 04: Folhas de *Plantago Major* L. sendo preparadas para secagem
Fonte: Arquivo pessoal.

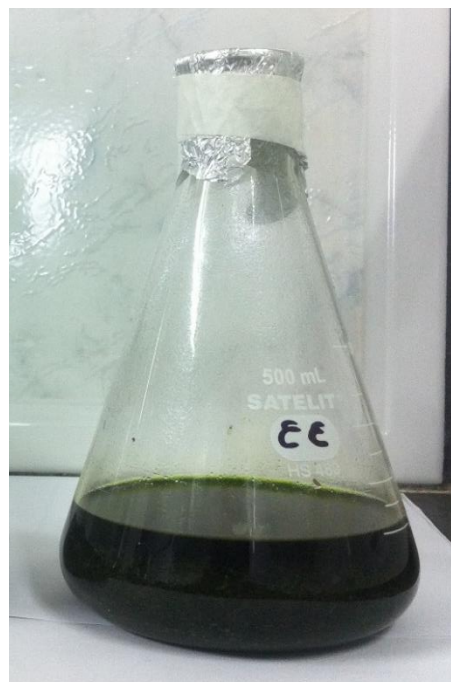


Figura 05: *Plantago Major* L. em maceração estática
Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 06: Filtração a vácuo do extrato etanólico
Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 07: Solubilização do extrato etanólico
Fonte: Arquivo pessoal.

BIOENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA



Figura 08: Disposição dos discos nas placas contendo AMH
Fonte: Arquivo pessoal.

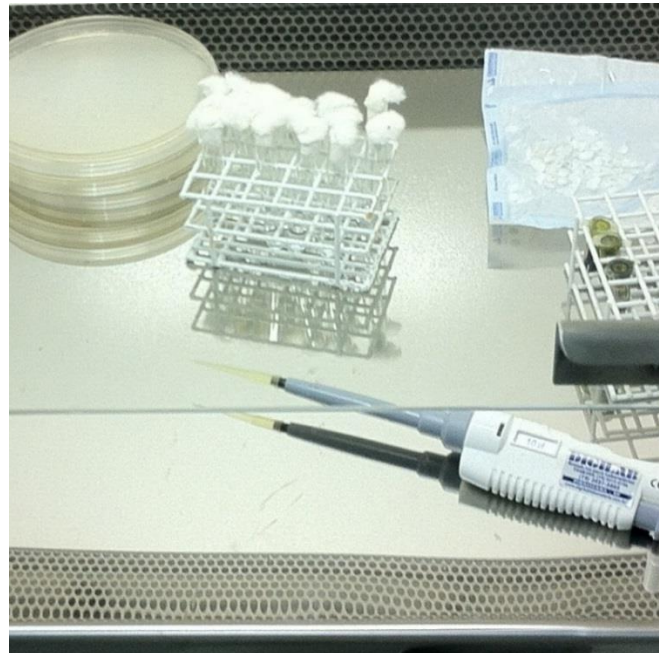


Figura 09: Materiais sendo preparados em capela de fluxo laminar vertical
Fonte: Arquivo pessoal.

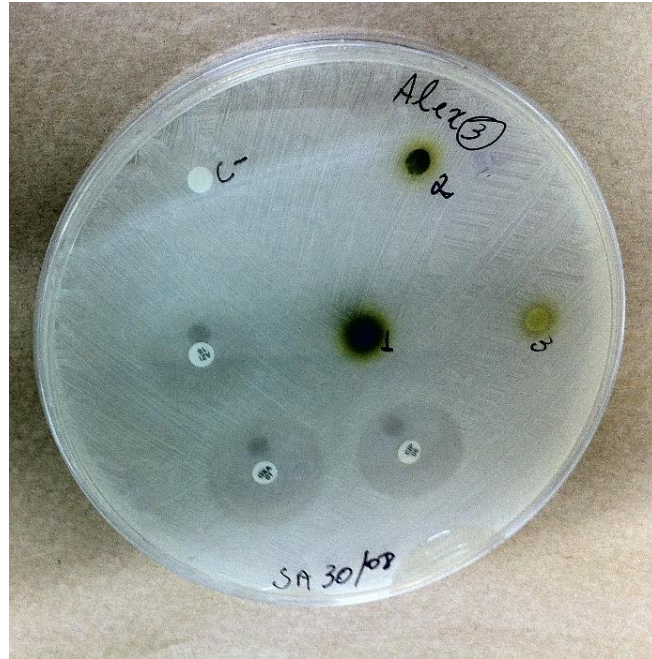


Figura 10: Placa após incubação em estufa microbiológica
Fonte: Arquivo pessoal.

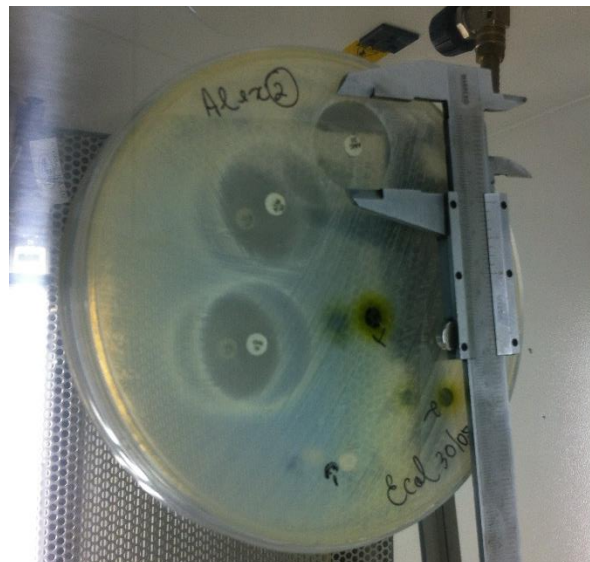


Figura 11: Coleta dos valores das medidas dos halos formados no teste de sensibilidade antibacteriana pelo método de difusão em ágar
Fonte: Arquivo pessoal.

BIOENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE A *Artemia Salina* Leach

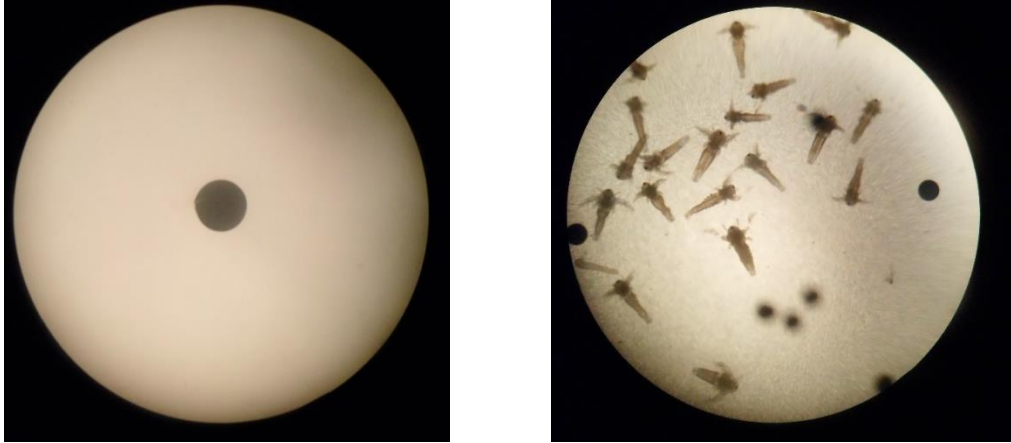


Figura 12: Cisto de *Artemia salina* L. (esquerda), larvas de *Artemia salina* 48 horas após eclosão (direita)

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 12: Contagem das larvas de *Artemia salina* Leach

Fonte: Arquivo pessoal.