

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**  
**BIOATIVOS**

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.  
(Mimosaceae)**

**VIVIANE ARAÚJO DA SILVA**

**JOÃO PESSOA-PB**

**2012**

**VIVIANE ARAÚJO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.  
(Mimosaceae)**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de  
Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS  
BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA**

**ORIENTADORA 1: Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa**

**ORIENTADORA 2: Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**

**JOÃO PESSOA-PB**

**2012**

S586a Silva, Viviane Araújo da.  
Avaliação citotóxica e genotóxica de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Mimosaceae) / Viviane Araújo da Silva.-- João Pessoa, 2012.  
91f. : il.  
Orientadoras: Hilzeth de Luna Freire Pessoa, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz  
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS  
1. Produtos Naturais. 2. Farmacologia. 3. *Mimosa tenuiflora* (jurema preta). 4. Citotoxicidade. 5. Genotoxicidade. 6. Plantas medicinais.

UFPB/BC

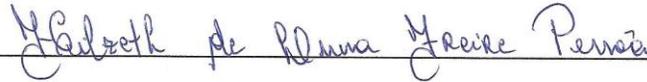
CDU: 547.9(043)

VIVIANE ARAÚJO DA SILVA

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.  
(Mimosaceae)

Dissertação de Mestrado

Banca Examinadora



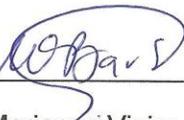
Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa-UEPB

Orientadora 1

---

Profa.Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Orientadora 2



Profa.Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco

Suplente (membro interno)



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho-URCA

Examinador externo

*À minha família e amigos!*

## AGRADECIMENTOS

- ✚ Primeiramente a Deus, o Pai criador, por ter guiado meus passos, ter me conduzido com sua graça e sabedoria nesse caminhar, realizando todos os meus sonhos.
- ✚ Aos meus Pais, Nelson e Dalila, pela educação dada, por todo esforço despojado na minha criação, pela dedicação e incentivo, enfim, por tudo que me tornei até hoje.
- ✚ Ao meu esposo, José, pela paciência e compreensão nesses dias de luta e sacrifício, agradeço a ti por todo amor dado e por sempre me incentivar na minha longa jornada, Te amo.
- ✚ À minha querida irmã, Tayssa, que sempre me ajudou quando podia.
- ✚ Ao meu cachorrinho Petruck por me dar tanto carinho e alegria a cada minuto da minha vida.
- ✚ A minha ilustríssima orientadora, Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa, uma pessoa de um coração gigante, uma pesquisadora exemplar, uma profissional de caráter e companheirismo, que mesmo durante os momentos de turbulência vivido nesses dois anos, não me desamparou e com a persistência e competência que têm está aqui hoje como minha orientadora. Obrigada por tudo chefinha! Nunca esquecerei dos seus ensinamentos!
- ✚ A Professora Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz por toda colaboração e por sempre estar de braços abertos pra nos ajudar, obrigada pela ajuda nos momentos mais difíceis nesses dois anos.
- ✚ A minha orientadora de graduação, Dra. Maria do Socorro Vieira, por todo apoio e incentivo, jamais esquecerei seus ensinamentos.
- ✚ A amiga Isis Gomes Fernandes por ter preparado o extrato da planta, o qual teve

como fruto dessa dissertação.

- ✚ A minha grande amiga, de longos tempos, Andréia Fernanda Ramos de Paula, por todo incentivo e apoio dado, agradeço principalmente por sua amizade.
- ✚ Ao amigo de laboratório, Gregório Fernandes Gonçalves (Guga), pela ajuda e por tanto me ajudar nesse trabalho.
- ✚ A minha querida e inesquecível turma de mestrado, pela intensa jornada de estudos, pelas fofocas em sala de aula, por todo trabalho e emoções que vivemos juntos. Vocês são parte de isso tudo!
- ✚ Aos queridos amigos da turma de mestrado, Paula Salgado, Hellane Fabricia, Abrahão, Patrícia Nérís, grupo inseparável dos seminários, vocês são inesquecíveis, adoro de coração, obrigada por tudo! Valeu cada minuto ao lado de vocês.
- ✚ Aos técnicos do LGM Bosco e Severina pela ajuda e atenção sempre dada.
- ✚ Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelos seus ensinamentos.
- ✚ Aos funcionários do antigo LTF que me ajudaram nos momentos de dificuldades, em especial à Tânia Alves e Caroline Mangueira.
- ✚ Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr Henrique Douglas, Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral, Prof. Dra. Margareth de Fátima Formiga, por terem aceitado o convite e pelas sugestões que muito contribuirão para minha formação e enriquecerão meu trabalho.
- ✚ A Capes e a UFPB pelo apoio financeiro e as condições para a realização do trabalho.

*“De tudo ficam três coisas: A certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que precisamos continuar, a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”*

*(Fernando Pessoa)*

## RESUMO

SILVA, V.A. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Mimosaceae). 2012. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., popularmente conhecida como jurema preta, é uma planta da família Mimosaceae, encontrada principalmente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, sendo esta espécie típica das áreas semi-áridas do Brasil. Na medicina popular, a casca do caule é a principal parte da planta utilizada no tratamento de diversas enfermidades como infecções. O presente trabalho teve como objetivo investigar a citotoxicidade e a genotoxicidade do extrato etanólico bruto (EEB) da *Mimosa tenuiflora* em células procarióticas e eucarióticas com a finalidade posterior de incentivar, com segurança, a sua utilização como fonte de drogas potencialmente terapêuticas ou que atuem como ferramentas farmacológicas. Para tanto, avaliou-se a atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram negativas e Gram positivas de importância clínica, investigou-se o potencial citotóxico utilizando como parâmetro a atividade hemolítica e a fragilidade osmótica (anti-hemolítica), assim como o potencial oxidante e antioxidante em eritrócitos humanos, observou-se o potencial mutagênico e antimutagênico em células bacterianas através do teste de Ames e também avaliou-se o potencial clastogênico e aneugênico através do teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos *in vivo*. Os resultados mostraram que o EEB e os taninos de *M.tenuiflora* tiveram atividade antibacteriana contra toda as linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* testadas, e esta foi caracterizada como forte com CIM variando de 62,5 a 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Na investigação citotóxica do EEB de *M.tenuiflora* observamos que o extrato não induziu um grau significativo de hemólise e ainda protegeu a membrana do eritrócito contra hemólise. Nos testes de atividade oxidante o EEB de *M.tenuiflora* não provocou oxidação da hemoglobina e nos testes de atividade antioxidante o extrato se comportou como um poderoso agente antioxidante. Já na investigação genotóxica, observamos que o EEB da *M.tenuiflora* não foi mutagênico, nem nos testes *in vitro* nem *in vivo* e apresentou efeito antimutagênico em algumas linhagens ensaiadas. Sendo assim, a baixa atividade citotoxicidade e genotoxicidade de *M.tenuiflora* não comprometem seu uso como fonte de droga potencialmente terapêutica.

**Palavras-chave:** *Mimosa tenuiflora*, citotoxicidade, genotoxicidade, plantas medicinais.

## ABSTRACT

SILVA, V.A. Cytotoxic and genotoxic evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Mimosaceae).2012. Dissertation (Master in Bioactive Synthetic and Natural Products - Concentration Area: Pharmacology) - CCS/UFPB, João Pessoa.

*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., popularly known as Jurema preta, is a plant family Mimosaceae, found mainly in the states of Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe and Bahia, which this species is typical of semi-arid areas of Brazil. In folk medicine, the bark of the stem is the main part of the plant used to treat various ailments such as burns and inflammations. This study aimed to investigate the cytotoxicity and genotoxicity of crude ethanolic extract (BSE) and *Mimosa tenuiflora* in prokaryotic and eukaryotic cells in order to encourage later, safely, its use as a source of potentially therapeutic drugs or act as pharmacological tools. To this end, we evaluated the antimicrobial activity against Gram negative and Gram positive clinical importance, investigated the potential cytotoxic utilizing the hemolytic activity and osmotic fragility (anti-hemolytic), as well as potential antioxidant and anti-oxidant in human erythrocytes, there was observed the potential mutagenic and anti-mutagenic in bacterial cells through the Ames test and also evaluated the clastogenic and aneugenic potential using the micronucleus test in peripheral blood of mice *in vivo*. The results showed that the EEB and the tannins of *M.tenuiflora* had antibacterial activity against all strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* tested and this was characterized as strong with MIC ranging from 62,5 to 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . In the investigation of cytotoxic of *M.tenuiflora* it was observed that the extract did not induce a significant degree of hemolysis and even protected the erythrocyte membrane against hemolysis. In tests of the oxidizing activity of *M.tenuiflora*, this plant did not cause oxidation of hemoglobin and tests of the extract antioxidant activity behaved as a powerful antioxidant. In the investigation of genotoxicity, we observed that *M.tenuiflora* was not mutagenic, or *in vitro* tests and *in vivo*. Thus, the extract of *M.tenuiflora* has no cytotoxic or genotoxic that compromise its use as a source of potentially therapeutic drugs.

**Keywords:** *Mimosa tenuiflora*, cytotoxicity, genotoxicity, medicinal plants.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir – Partes aéreas.....**33**
- Figura 2-** **A:** *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Patos-PB); **B:** Caule da *M.tenuiflora*; **C:** Fruto da *M.tenuiflora*; **D:** Inluorescência e folhas de *M.tenuiflora* .....**34**
- Figura 3-** Eritrócitos de camundongos (Controle negativo). .....**60**
- Figura 4-** Eritrócitos de camundongos tratados com ciclosofamida (50mg/kg) – controle positivo. Em destaque observa-se a presença de micronúcleos .....**60**
- Figura 5 -** Eritrócitos tratados com EEB de *M.tenuiflora* a 100 mg/kg.....**61**
- Figura 6 -** Eritrócitos tratados com EEB de *M.tenuiflora* a 200 mg/kg.....**61**

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** – Percentual de hemólise em eritrócitos humanos após o tratamento com EEB de *M.tenuiflora*. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. A comparação dos grupos foi feita pelo teste *t* utilizando o programa Graph Pad Prism versão 4. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (Triton X).....**53**

**Gráfico 2** - Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos do tipo A tratados com EEB de *M.tenuiflora* a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva foi feita em relação a porcentagem de hemólise para cada concentração de NaCl (relativo ao grupo de 100% de hemólise= NaCl 0,12%). Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle. ....**54**

**Gráfico 3** - Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos do tipo B tratados com EEB de *M.tenuiflora* a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva foi feita em relação a porcentagem de hemólise para cada concentração de NaCl (relativo ao grupo de 100% de hemólise= NaCl 0,12%). Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle.....**55**

**Gráfico 4** – Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos do tipo O tratados com EEB de *M.tenuiflora* a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva foi feita em relação a porcentagem de hemólise para cada concentração de NaCl (relativo ao grupo de 100% de hemólise = NaCl 0,12%). Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle.....**55**

**Gráfico 5**- Atividade Oxidante do EEB de *M.tenuiflora* nas concentrações de 10, 100 e  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Como controle positivo foi utilizado a fenilhidrazina (Hb=Hemoglobina, Ph= Fenilhidrazina). Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m analisados pelo teste *t*. \* $p < 0,05$  comparado ao controle negativo.....**56**

**Gráfico 6**- Atividade antioxidante do EEB de *M.tenuiflora* nas concentrações de 10,100 e  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m analisados pelo teste *t*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado a fenilhidrazina.....**57**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Triagem fitoquímica do EEB da *Mimosa tenuiflora* (Willd.).....**50**
- Tabela 2-** Concentração Inibitória Mínima do EEB e de taninos de *M. tenuiflora* sobre linhagens bacterianas.....**52**
- Tabela 3 –** Razão de mutagenicidade (RM) do EEB de *M.tenuiflora* frente às linhagens TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102 de *S. thiphymurium*.....**58**
- Tabela 4 –** Efeito antimutagênico do EEB de *M.tenuiflora* frente às linhagens de *S. thiphymurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102.Os resultados são expressos como razão da mutagenicidade.....**58**
- Tabela 5-** Frequência de eritrócitos micronucleados em 2000 eritrócitos de sangue periférico de camundongos de diferentes grupos experimentais.....**59**
- .

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **EEB**- Extrato etanólico bruto
- **MetHb**- Metahemoglobina
- **Hb**- Hemoglobina
- **ATCC**- American Type Culture Collection
- **UFC** – Unidades formadoras de colônias
- **CIM** – Concentração Inibitória Mínima
- **RM**- Razão da mutagenicidade
- **Ph**- Fenilhidrazina
- **Mt**- *Mimosa tenuiflora*
- **v/v** – volume/volume
- **OMS**- Organização Mundial de Saúde
- **FOE**- Fragilidade osmótica eritrocitária

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>18</b>
2.1	Plantas Medicinais e Fitoterápicos	19
2.2	Antimicrobianos e resistência bacteriana	23
2.3	Antioxidantes	26
2.4	A importância de estudos citotóxicos e genotóxicos	29
2.5	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
3.1	Objetivos gerais	39
3.2	Objetivos específicos	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.1	Material Botânico	41
4.2	Local da Pesquisa	41
4.3	Microrganismos	41
4.4	Inóculo Bacteriano	42
4.5	Eritrócitos humanos	42
4.6	Animais	42
4.7	Preparação do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir	43
4.8	Triagem fitoquímica do EEB de <i>M. tenuiflora</i>	43
4.9	Extrações das substâncias tânicas do EEB de <i>M. tenuiflora</i>	43
4.10	Avaliação da atividade antibacteriana do EEB e dos taninos de <i>M. tenuiflora</i> frente a bactérias de importância clínica	44
4.11	Caracterização da atividade antimicrobiana do EEB de <i>M. tenuiflora</i>	45
4.12	Avaliação citotóxica do EEB de <i>M. tenuiflora</i> em eritrócitos humanos	45
4.13	Avaliação do efeito do EEB de <i>M. tenuiflora</i> sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos	46
4.14	Avaliação do potencial oxidante e antioxidante do EEB de <i>M. tenuiflora</i> em eritrócitos humanos	46
4.15	Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico do EEB de <i>M. tenuiflora</i>	

em células bacterianas através do teste de Ames.....	47
4.16 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico do EEB de <i>M. tenuiflora</i> através do teste do micronúcleo <i>in vivo</i> .....	48
4.17 Análise estatística.....	48
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
5.1 Triagem fitoquímica do EEB de <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.....	50
5.2 Avaliação da atividade antibacteriana do EEB e dos taninos de <i>M. tenuiflora</i> frente a bactérias de importância clínica.....	51
5.3 Caracterização da atividade antimicrobiana do EEB de <i>M.tenuiflora</i> .....	52
5.4 Avaliação citotóxica do EEB de <i>M.tenuiflora</i> em eritrócitos humanos.....	53
5.5 Avaliação do efeito do EEB de <i>M.tenuiflora</i> sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos.....	54
5.6 Atividade Oxidante e Antioxidante do EEB de <i>M.tenuiflora</i> .....	56
5.7 Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico do EEB de <i>M.tenuiflora</i> em células bacterianas através do teste de Ames.....	57
5.8 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico do EEB de <i>M.tenuiflora</i> através do teste do micronúcleo <i>in vivo</i> .....	59
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

# *Introdução*

---

## 1.INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Atualmente, populações de todo o mundo fazem o uso de plantas medicinais para tratar inúmeras doenças e isto se deve principalmente, dentre outros fatores, a falta de acesso aos medicamentos sintéticos devido ao alto custo (VEIGA JUNIOR;PINTO; MACIEL, 2005).

Sabe-se que o uso de antibióticos foi revolucionário no tratamento das infecções bacterianas e crucial para a redução da mortalidade (NATARO e KAPER,1998). Entretanto, seu uso abusivo e indiscriminado pela população contribui para o aumento da resistência microbiana, fator este que dificulta o tratamento de doenças causadas por microrganismos multirresistentes como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Atualmente, a resistência bacteriana vem sendo considerada um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, já que continua a reduzir o número de antibióticos válidos disponíveis. Com base nisso, a busca por novos compostos eficazes no combate a esses microrganismos tem sido alvo de estudo de muitos pesquisadores. Os vegetais são uma excelente fonte destes compostos, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (RISSATO et al., 2004).

O conceito mais perigoso surgido nos últimos tempos foi o de que as plantas medicinais não representam qualquer risco para a saúde humana por serem naturais e por serem utilizadas pela população de todo o mundo desde muito tempo atrás. Com base nisso, é importante verificar atividades citotóxicas e genotóxicas, pois alguns de seus constituintes biologicamente ativos podem ser tóxicos em nível celular (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. é uma planta arbustiva da família Mimosaceae, conhecida popularmente como “jurema preta”. Os constituintes ativos da jurema preta que têm sido descritos são principalmente os esteróides, terpenóides e taninos, sendo este último o principal responsável por um amplo espectro de atividade contra bactérias,

fungos, vírus e protozoários (MECKES-LOZOYA et al., 1990a).

Sabendo que é de grande importância pesquisar novas fontes de produtos naturais eficazes contra microrganismos resistentes e visto que a jurema preta é uma planta bastante utilizada pela população, principalmente do sertão nordestino para o tratamento de infecções, este trabalho tem como objetivo investigar a atividade citotóxica e genotóxica do extrato etanólico bruto (EEB) da casca do caule da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. frente a células procarióticas e eucarióticas.

# *Referencial teórico*

---

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Plantas Medicinais e Fitoterápicos**

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações principalmente dos países em desenvolvimento (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). .

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde, até o ano 2000, 85% das pessoas no mundo utilizaram plantas medicinais para tratar da saúde, 80% das pessoas dos países em desenvolvimento no mundo dependeram da medicina tradicional e/ou complementar para suas necessidades básicas de saúde, e que cerca de 85% da medicina tradicional envolveu o uso de extratos de plantas (SOLER, 2000).

O uso de medicamentos é muito recente e sua comprovação por testes clínicos é ainda mais. Enquanto os medicamentos apresentam, em sua quase totalidade, um único princípio ativo que é responsável pelo seu efeito farmacológico, os extratos vegetais, por exemplo, são constituídos por misturas multicomponentes de substâncias ativas, parcialmente ativas e inativas, que, muitas das vezes, atuam em alvos farmacológicos diferentes. A eficácia destes extratos é o resultado de seu uso, durante muitos anos, por diferentes grupos étnicos (FERREIRA; PINTO, 2010).

A história da descoberta de drogas a partir de produtos naturais tem sido extraordinariamente bem sucedida (GULLO; HUGHES, 2005). Nos últimos 25 anos cerca de 30% dos novos fármacos aprovados são produtos naturais ou derivados destes. Contudo, no que se refere aos fármacos anticancerígenos, esse número sobe

para 42%, de acordo com Newman e Cragg (2007).

As indústrias farmacêuticas foram e continuam sendo beneficiadas pelos conhecimentos populares sobre o uso medicinal das plantas. Recentemente, mostrou-se que 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006, pelo FDA, são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA; PINTO, 2010).

As pesquisas científicas envolvendo estudo de plantas iniciaram na tentativa de comprovar a identidade botânica, composição química e ação farmacológica das drogas vegetais, agrupando aquelas de efeito semelhante. Essas pesquisas buscaram determinar as estruturas químicas envolvidas, a reprodução das estruturas quimicamente ativas e a promoção de modificações estruturais. Esses estudos possibilitaram a proposição de maior atividade terapêutica, junto aos requisitos de qualidade e ausência de toxicidade (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

Segundo a RDC 14/2010, Fitoterapia é a utilização de vegetais em preparações farmacêuticas, como extratos, pomadas, tinturas e cápsulas, empregados no tratamento de doenças, manutenção e recuperação da saúde. Medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecno-científicas ou evidências clínicas. Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (ANVISA, 2010).

No Brasil, a fitoterapia é uma opção medicamentosa que se adequa às necessidades de vários municípios no atendimento primário à saúde (ELDIN; DUNFORD, 2001). De forma geral, os fatores da expansão da fitoterapia devem-se à preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, a crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade, o desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos e o custo relativamente baixo (CAÑIGUERAL et al., 2003; MELO et al., 2007).

A atenção dirigida pelas autoridades e administradores de saúde para o uso de

plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos, por diferentes razões e em diferentes setores. Incentivo em investimentos públicos em plantas medicinais tem sido feito pela OMS desde 1978, observando-se crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica assim como a observação do aumento de seu uso pela população (HOMAR, 2005). Nos países em desenvolvimento, isto resultou principalmente na decisão de levar mais a sério a medicina tradicional e de explorar a possibilidade de utilizá-la em cuidados primários de saúde. Em outros países, as autoridades de saúde foram obrigadas a adotar medidas impostas pelo interesse do público no uso de plantas medicinais (CARVALHO et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2006).

No Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais implantando a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS). Para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condições sócio-econômicas da população. Atualmente, existem programas estaduais e municipais de Fitoterapia, desde aqueles com regulamentação específica para o serviço, implementado há mais de 10 anos, até aqueles com início recente ou com pretensão de implantação. Em levantamento realizado pelo Ministério da Saúde no ano de 2004, em todos os municípios brasileiros, verificou-se que a Fitoterapia está presente em 116 municípios, contemplando 22 unidades federadas (BRASIL, 2006). Alguns trabalhos já são realizados em estados como o Ceará com o objetivo de desvendar o uso de plantas medicinais pela população, encontrando uma alta prevalência de uso (SILVA et al., 2006).

O levantamento da diversidade de plantas e seu uso como medicinal, na região Nordeste do Brasil foi realizado e como resultado foi registrado um total de 483 espécies pertencentes a 79 famílias, nos remetendo para a grande importância da investigação das espécies farmacologicamente ainda não estudadas (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Em relação a movimentação financeira, os fitoterápicos sempre apresentaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. O setor movimenta globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, porém, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano. Em toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão de reais (FEBRAFARMA, 2007).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnofarmacológico); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica, fitoquímica); investigações farmacológicas de extratos vegetais e constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descoberta de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002).

O interesse na diversidade molecular das plantas tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, o qual é responsável pela síntese dos compostos vegetais com atividade biológica. Grupos de compostos de estruturas complexas como alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos, bem como seus derivados, tem sido alvo de investigação a respeito de suas propriedades medicinais, aromáticas e curativas. A diversidade, em termos de estruturas e propriedades químicas, na qual essas substâncias ocorrem na natureza, podem servir para o desenvolvimento de um grande número de produtos naturais de interesse comercial, principalmente fitofármacos (ALVES, 2001).

As plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que são utilizadas na medicina popular e despertam interesse científico pelas suas atividades biológicas (LAPA et al. 2002).

## 2.2 Antimicrobianos e resistência bacteriana

O uso de antimicrobianos foi revolucionário no tratamento das infecções bacterianas e crucial para a redução da mortalidade (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, seu uso abusivo e indiscriminado, tanto em humanos (CHUC et al., 2002) quanto na medicina veterinária (COSTA et al., 2006), contribui para o aumento da resistência antimicrobiana (CHUC et al., 2002). Essa resistência relaciona-se, ainda, à produção de enzimas ( $\beta$ -lactamases e  $\beta$ -lactamases de amplo espectro), que atuam sobre a estrutura das penicilinas, inativando-as, característica que constitui um mecanismo de defesa desses agentes. Emery e Weymouth (1997) constataram que a síntese dessas enzimas era codificada por genes presentes nos plasmídios e/ou cromossomos, portanto transmitidos para as gerações seguintes. Outra forma de resistência está relacionada à composição bioquímica da parede celular bacteriana, as quais conferem impermeabilidade a determinadas substâncias. Ainda, a impenetrabilidade ao antibiótico pode ser aumentada pela diminuição de receptores de membrana para antibióticos e pela existência de proteínas específicas para a exportação de substâncias nocivas ao metabolismo celular, as bombas de efluxo (GILBERT ;McBAIN, 2001)..

A resistência bacteriana é um fenômeno relacionado à formação de cepas não sensíveis aos antibióticos, que são capazes de se multiplicar mesmo na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as provenientes de doses terapêuticas convencionais e ocorre devido à evolução natural dos microrganismos, além do uso desmedido e irracional destes agentes nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (WANNMACHER, 2004; HOEFEL et al., 2006). A elevada atividade metabólica e reprodutiva das bactérias associada a mecanismos de troca de material genético pode favorecer para que os microrganismos desenvolvam ao longo do tempo formas de resistência intrínsecas à estrutura física celular, relacionadas a eventos mutacionais e mesmo à transferência de genes de resistência aos antimicrobianos para outras bactérias (CLOETE, 2003).

Segundo a OMS, mudanças na população microbiana podem levar ao surgimento de microrganismos patogênicos e ao desenvolvimento de novos fatores de

virulência em patógenos antigos, como o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos ou mudanças na habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Atualmente, a resistência bacteriana vem sendo considerada um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, já que continua a reduzir o número de antibióticos válidos disponíveis (BENGHEZAL et al., 2007; OLIVEIRA; SILVA., 2008).

Tem sido grande o impacto clínico e econômico em decorrência da presença de microrganismos resistentes, particularmente no ambiente hospitalar, citando-se *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* como os agentes multirresistentes mais comuns de infecções nosocomiais (BERNARDES et al., 2004; SADER et al., 2001). As infecções causadas particularmente por estes patógenos são um desafio clínico, uma vez que eles apresentam alta capacidade de desenvolver resistência devido a uma maior adaptação sob a pressão seletiva do uso intenso de antimicrobianos e são caracterizados pela suscetibilidade natural a um número limitado de agentes.

A *Escherichia coli* é o membro mais bem conhecido da microbiota normal do intestino humano, mas também é um patógeno gastrointestinal versátil que pode estar envolvido na diarreia infantil, ocasionalmente ocorrendo em proporções epidêmicas em berçários ou enfermarias obstétricas. *E. coli* também pode causar infecções no trato urinário de pessoas ou naquelas cuja resistência está diminuída devido a cirurgias ou exposição à radiação ionizante. As linhagens enteropatogênicas de *E. coli* estão freqüentemente envolvidas nas infecções semelhantes à disenteria e febres generalizadas (TORTORA, 2005).

Essa grande resistência que os microrganismos vêm adquirindo aos mais diversos tipos de antibióticos vem despertando o interesse de pesquisadores a buscar novos medicamentos que sejam eficazes no tratamento de doenças causadas por esses microrganismos. Os vegetais são uma excelente fonte de busca, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos

processos de síntese química (NOVAIS, 2003).

De modo geral, os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade através de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucléicos, inibição da síntese de ácidos nucléicos. Contudo, numerosos estudos têm sido realizados com a finalidade de estabelecer o sítio específico da ação de cada agente antimicrobiano. Esses estudos tornam-se complicados pelas várias modificações que ocorrem nas células expostas a um agente antimicrobiano, tornando-se difícil o estabelecimento do local primário da lesão celular, onde irá ocorrer, como consequência, a deterioração das atividades vitais (PELCZAR et al., 1980).

Os trabalhos relacionados a atividade antimicrobiana de plantas medicinais tiveram início na década de 1940 e logo em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2300 plantas superiores contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam crescimento de um ou mais microrganismos. Cardoso e Santos (1948), avaliaram 100 diferentes extratos vegetais indicado na terapêutica com atividade anti-inflamatória ou cicatrizante. Destes 100 extratos, apenas cinco apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

No Brasil, as pesquisas sobre atividades antimicrobianas de origem vegetal tiveram impulso a partir de trabalhos de Gonçalves de Lima (1959) e de outros pesquisadores como Santana et al. (1968). Esses autores relatavam, contudo, que os estudos relacionados com a atividade biológica de produtos naturais eram escassos em vários países do mundo, tendo havido decréscimo nas prescrições que continham drogas de origem vegetal entre os anos de 1950 e 1960. No entanto, em razão dos crescentes problemas associados ao uso indiscriminado de antibióticos, como os efeitos colaterais, alto custo e a crescente resistência de microrganismos, entre outras questões de saúde pública, os estudos de substâncias oriundas de vegetais superiores adquiriram novas perspectivas (DAVIS, 1994).

Machado et al. (2003) avaliaram 14 extratos de plantas medicinais brasileiras,

utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a microrganismos resistentes de importância médica. O extrato de *Punica granatum* L. (romã) mostrou-se eficiente contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. O óleo essencial de *Artemisia annua* L. foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana e inibiu o crescimento de uma bactéria Gram positiva *Enterococcus hirae* e dos fungos testados (JUTEAU et al., 2002). O óleo essencial das folhas de *S. cuminii* e *Syzygium travancoricum* Gamble foram testados para avaliar suas propriedades antibacterianas. A atividade do óleo essencial de *S. cuminii* foi considerada boa, enquanto do *S. travancoricum* foi moderada (HOLETZ et al., 2002).

Bergonzelli et al.(2003) avaliaram a atividade de 60 óleos essenciais sobre *Helicobacter pylori* e observaram que 30 desses afetavam seu crescimento com zonas de inibição *in vitro*, sua pesquisa também indicou que os óleos essenciais são improváveis para uso com eficiência *in vivo*, mas seus efeitos são relevantes para complementação de terapias instituídas.

*Schinus terebinthifolius*, aroeira, possui atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias destacando-se *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (LIMA et al., 2004).

Os progressos nos estudos da etnofarmacologia, fitoquímica, atividades biológicas, biologia molecular e da estratégia de modificação molecular racional têm sido importantes para compreender e elucidar o mecanismo de ação de princípios ativos obtidos de plantas, como também para o entendimento e identificação dos sítios receptores existentes nas células do hospedeiro. Estes parâmetros propiciam a produção de fármacos naturais, seguros, economicamente acessíveis, estáveis, padronizados e eficientes, ou então, poderão ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas para a produção de antimicrobianos efetivos com efeitos desejáveis e específicos, e, certamente, serão eliminados os efeitos colaterais ou indesejáveis ao hospedeiro, conforme sugere Delle Monache (2001).

### **2.3 Antioxidantes**

O O<sub>2</sub> tem um significado fundamental para os organismos aeróbios, pois participa

da obtenção de energia na forma de ATP, através da cadeia respiratória, como acceptor final de elétrons. Participa também de várias reações metabólicas como a biossíntese de prostaglandinas e esteróides e na oxidação de muitas substâncias aromáticas, entre outras (FLESCHIN et al., 2000).

O metabolismo normal leva a produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ROS) os quais desempenham diferentes funções *in vivo*, particularmente na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular e na sinalização entre as células (ROTH, 1997). Entretanto, a produção aumentada dessas moléculas altamente reativas, se não forem rapidamente sequestradas, pode provocar a oxidação de biomoléculas (proteínas, aminoácidos, lipídios e DNA) que levam a danos celulares e a morte (IGNARO et al., 1999).

Os radicais livres também estão envolvidos em vários processos deletérios ao organismo humano como câncer, aterosclerose, *Diabetes mellitus*, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, desordens neurológicas e processo de envelhecimento (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Finalmente, a presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, mas não como agentes etiológicos e sim como fatores que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos, os quais determinam a continuidade e as complicações de diversos estados patológicos (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Segundo Halliwell (1997), antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz.

No século passado, a partir dos anos 80, deu-se o início às pesquisas com antioxidantes naturais visando à substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos, aos quais se atribuem efeitos deletérios ao organismo animal quando utilizados em doses elevadas (DURAN; PADILLA; 1993). Ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa de biomoléculas e restringir a utilização

dos antioxidantes sintéticos SHAHIDI; ALASALVAR; LIYANA-PATHIRANA, 2007).

O uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes que são produzidos pelas plantas por meio do metabolismo secundário. Atribui-se a presença de compostos fenólicos, com destaque aos flavonoides, a atividade antioxidante dos componentes produzidos pelos vegetais. Esses componentes podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções (CANTERLE, 2005; HALLIWELL, 1997).

A capacidade antioxidante não enzimática do sangue está contida predominantemente nos eritrócitos circulantes. A principal função do sangue é transportar os gases respiratórios,  $O_2$  e  $CO_2$ , entre os tecidos e os pulmões através da hemoglobina. Os eritrócitos contêm enzimas responsáveis pela produção de energia para manter a hemoglobina como oxihemoglobina, a forma reduzida e funcional da proteína (SIEMS; SOMMERBURG; GRUNE, 2000). Entretanto, o íon ferro da hemoglobina está continuamente exposto a altas concentrações de oxigênio, o que resulta na sua lenta oxidação a metahemoglobina (methHB) ou ferrihemoglobina, que é incapaz de se ligar ou transportar oxigênio. Em condições normais o nível de metahemoglobina (methHB) nos eritrócitos é mantido abaixo de 1% da hemoglobina total (MANSOURI; LURIE, 1993).

A formação de methHb *in vivo* pode ser imitada *in vitro* através da exposição de uma suspensão de eritrócitos a um agente oxidante e a quantidade de methHB formada está diretamente relacionada com a extensão do stress oxidativo causado pelo agente. Da mesma forma, a exposição de eritrócitos a agentes antioxidantes presentes em misturas complexas, tais como os extratos vegetais, podem evitar a formação de methHb. A efetividade do extrato em inibir a formação de methHb na presença de um agente oxidante pode ser utilizada como a medida da sua atividade antioxidante (ARBOS et al., 2008; CLARO et al., 2005).

## 2.4 A importância de estudos citotóxicos e genotóxicos

Se populações dos países mais pobres utilizam as plantas medicinais por tradição e/ou ausência de alternativas econômicas viáveis, nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitomedicamentos influenciado pelo modismo de consumo de produtos naturais. Este modismo favoreceu a difusão das promessas de cura através das plantas medicinais para males como a impotência, a ansiedade e a obesidade, algumas vezes em um único extrato. O conceito mais perigoso surgido na mesma época foi o de que as plantas medicinais não representam quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas através de séculos de utilização pela população de todo o mundo (VEIGA JÚNIOR, et al., 2005).

Infelizmente, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008). Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos (AMORIM et al., 2007; COELHO, 1998; CORDEIRO et al., 2005).

Com base nisso, é de grande importância realizar estudos de toxicidade em extratos a base de plantas, pois alguns de seus constituintes biologicamente ativos podem ser tóxicos para o organismo e conterem substâncias químicas conhecidas como mutagênicas ou carcinogênicas.

A detecção de atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Portanto, experimentos capazes de fornecer, com razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização são fundamentais (BENIGNI, 2005).

O eritrócito é um tipo de célula que contém alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991). Por

esta razão, espera-se que eles sejam altamente vulneráveis a reações que envolvem radicais livres e podem ser muito suscetíveis a peroxidação dos lipídios de membrana e hemólise. Dessa forma, a avaliação do potencial citotóxico em eritrócitos humanos constitui um poderoso sistema que pode ser utilizado como um modelo experimental *in vitro* para investigar os efeitos tóxicos e protetores de uma grande variedade de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo. Entretanto, as células possuem um eficiente sistema antioxidante no citoplasma que as tornam excepcionalmente resistentes à peroxidação quando os radicais são produzidos dentro da célula. A ocorrência de hemólise pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO et al., 2005).

Em países desenvolvidos, as drogas vegetais são testadas e avaliadas seguindo-se normas e critérios similares àqueles estabelecidos para medicamentos sintéticos. No entanto, há pouca informação sobre a genotoxicidade de drogas vegetais. Contudo, a avaliação dos efeitos mutagênicos de compostos provenientes de plantas é, sem dúvida, uma atividade fundamental para a redução dos riscos de exposição a esses agentes (MOREIRA et al., 2002).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – MS estabeleceu a “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos” que inclui os estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* utilizando bactérias e células de roedores e de mamíferos (BRASIL, 2004).

A genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram o DNA, processo classificado como mutagênese. Os agentes que mudam a seqüência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de genotóxicos. A palavra mutação pode ser definida como sendo qualquer alteração permanente no DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas podem levar uma série de problemas para o organismo. A probabilidade de uma mutação ser vantajosa é pequena para célula eucariótica, mas existe (SILVA; ERDTMAN; HENRIQUES, 2003).

Está bem documentado que as mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres humanos. Substâncias genotóxicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem interações com os ácidos nucleicos. Devido à sua alta reatividade, podem levar a defeitos hereditários através de mutações em células germinativas, e quando a mutação ocorre em células somáticas, a consequência mais comum é a formação de tumores benignos ou malignos. Além disso, recentemente foi proposto que as mutações em células somáticas podem também estar envolvidas na patogênese de algumas doenças crônicas degenerativas tais como as cardiovasculares e neurodegenerativas (ANDREASSI et al., 2000; ARUOMA, 2003; DE FLORA, 1996, ROSS; MARGOLIS, 2005).

No início dos anos 80, os órgãos de saúde pública e as agências ambientais, em vários países industrializados, acrescentaram a mutagenicidade à lista das propriedades tóxicas a serem avaliadas antes que agentes químicos, aditivos de alimentos e medicamentos, fossem introduzidos no mercado (RIBEIRO, et al., 2003).

Para avaliação da atividade mutagênica existem diversas metodologias, contudo, destacam-se os ensaios que detectam mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*. Este teste tem sido amplamente utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais e caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens revertem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (ZEIGER, 2001; VARELLA, et al., 2004). Várias substâncias mutagênicas primeiramente identificadas pelo teste de Ames mostraram-se carcinogênicas em ensaios com animais (MARON; AMES, 1983).

A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (FEARON; VOGELSTEIN, 1990), havendo alta associação entre respostas positivas em testes de

toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem (MCCANN et al., 1975; PURCHASE et al., 1978).

Estudos realizados em vários laboratórios evidenciaram a relação entre substâncias mutagênicas que também apresentam potencial carcinogênico. Esta correlação está entre 50 e 90 % e depende da estrutura dos agentes testados, dos testes empregados para a detecção dos efeitos dos agentes e da presença de um sistema de ativação metabólica de mamíferos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2004; McCANN et al., 1975; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; WEISBURGER, 1999; WHITE; RASMUSSEN, 1996; ZEIGER; MARGOLIN, 2000).

### **2.5 *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.**

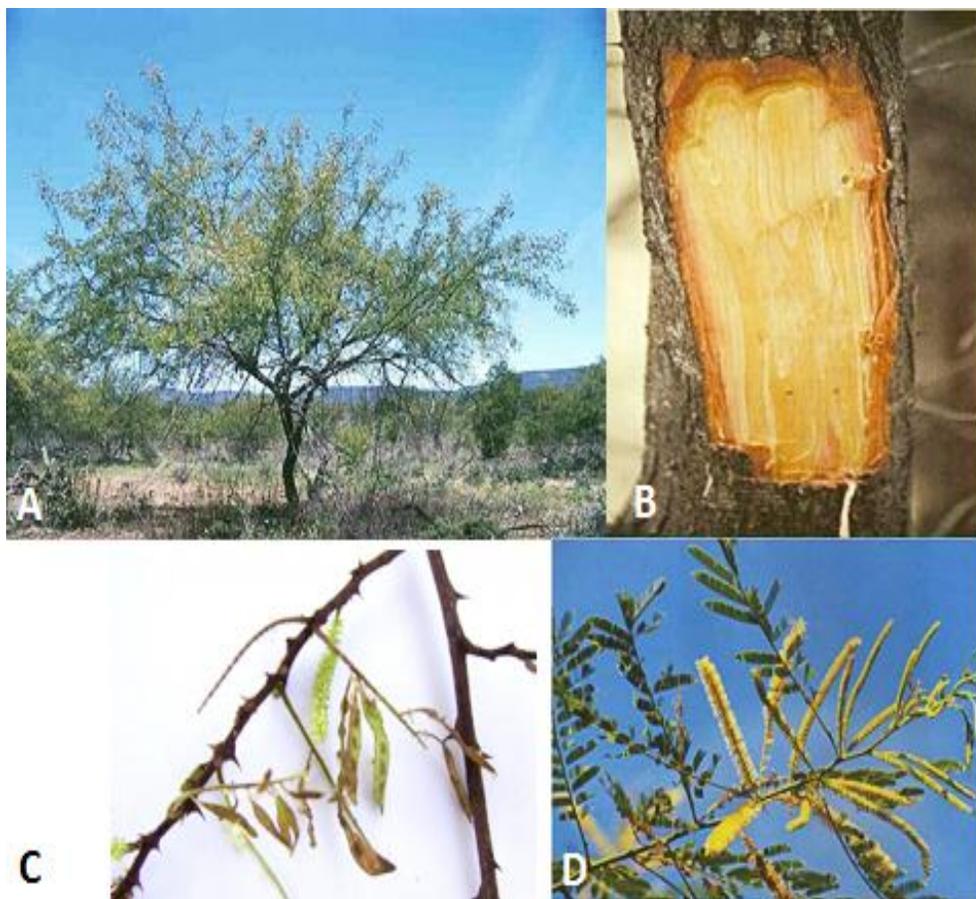
*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Figura 1 e 2) apresenta como sinônimos *Mimosa hostilis* (Mart.) Benth. ou *Acacia hostilis* Benth., popularmente conhecida como jurema preta, é uma leguminosa da família Mimosaceae, subfamília Mimosoideae. Esta espécie é típica das áreas semi-áridas do Brasil, encontrada principalmente na caatinga, resistente à seca e com grande capacidade de rebrota durante todo o ano (CRONQUIST, 1981). É uma arvoreta de 5 a 7 m de altura, de porte arbustivo, formando hastes de mais de 1,5 m de altura, com acúleos esparsos, eretos e bem agudos. Possui caule ereto ou levemente inclinado, com ramificação abundante e apresenta casca rugosa, fendida longitudinalmente, pouco fibrosa. (OLIVEIRA et al., 1999)

**Figura 1-** *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir – Partes aéreas.



Fonte: PEREIRA, A.V.,2010

**Figura 2- A:** *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Patos-PB); **B:** Caule da *M.tenuiflora*; **C:** Fruto da *M.tenuiflora*; **D:** Inflourescência e folhas de *M.tenuiflora*.



Fonte: <http://pistasdocaminho.blogspot.com/2008/11/jurema-preta-rvore-sagrada.html>

No Nordeste brasileiro, algumas tribos indígenas fazem o uso do vinho da jurema ou ajucá, uma “bebida milagrosa”, feita geralmente a partir de representantes de um gênero da família Mimosaceae, cuja principal espécie é a *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., a jurema preta (ALBUQUERQUE, 1997). A substância responsável pela psicoatividade é um alcalóide triptamínico, a N,N-dimetiltriptamina (DMT), inativo quando administrado por via oral (MECKES-LOZOYA et al., 1990a).

Andrade-Lima (1954) define o habitat da espécie no Brasil, afirmando sua distribuição por quase todo o sertão nordestino, em áreas de caatinga. A jurema preta é uma planta encontrada em larga escala, estando disseminada nos estados do Piauí,

Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Simom e Proença (2000) informaram que *M. tenuiflora* ocorre também na Venezuela, Colômbia, América Central e México. Camargo-Ricalde (2000) acrescentam Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicarágua e Panamá.

A jurema preta é encontrada preferencialmente em formações secundárias de várzeas com bom teor de umidade, de solos profundos, alcalinos e de boa fertilidade, com crescimento lento. Suas raízes têm uma alta capacidade de penetração nos terrenos compactos, sendo considerada uma planta com grande potencial como planta regeneradora de terrenos erodidos, é uma espécie indicadora de uma sucessão secundária progressiva ou de recuperação e sua tendência ao longo do processo é de redução da densidade (BEZERRA, 2008).

No nordeste, a jurema preta tem sido explorada para produção de estacas e lenha por apresentar alta densidade básica ( $0,77\text{g/cm}^3$ ) (ARAÚJO et al., 2004), além de que, os caprinos, ovinos e bovinos têm nessa planta, verde ou fenada, um importante componente de suas dietas, especialmente pastejando as rebrotas mais jovens no início das chuvas, bem como as folhas e vagens secas durante o período de estiagem.

Segundo Schultes (1978), no Nordeste brasileiro, acredita-se que a casca de *M. tenuiflora* pode ser utilizada para curar fadiga. Na medicina popular, a casca do caule é a principal parte da planta utilizada no tratamento de diversas enfermidades como infecções. Os usos populares mais tradicionais no México podem ser efetuados por meio de infuso ou através de pó ou pomadas. No primeiro caso, é utilizada para lavar feridas, fazer gargarejos e bochechos contra escoriações na boca e contra parasitas e problemas gastrintestinais. No segundo caso, é aplicada em feridas e queimaduras na pele (DE SOUZA, 2002).

No âmbito comercial, o pó da jurema preta é utilizado em queimaduras de segundo e terceiro grau para inibir a dor e cicatrizar com relativa eficácia; o sabão é utilizado contra dermatoses, acne, manchas, rugas e estrias; a pomada é aplicada em queimaduras leves, na pele com manchas, fungos e herpes; o extrato é empregado contra alergias, eczemas, cicatrizes e como tônico capilar. São também utilizadas cápsulas contra problemas internos como hiperacidez, gastrites, úlcera péptica e

duodenal, colite, hemorróidas e dor de cabeça. Pode ser usado ainda o talco no tratamento de reações alérgicas, erupções, efeitos de reações imunológicas da pele, e arranhões; xampus para fortalecer o couro cabeludo, evitar caspas e a queda de cabelo e creme para regenerar a pele e desvanecer as linhas de expressão. Produtos contendo *M. tenuiflora* têm sido cada vez mais distribuídos pelo mundo (DE SOUZA, 2002). Estudo realizado por Maia (2004) indica que a *M. tenuiflora* apresenta potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral.

Durante os anos 90, estudos farmacológicos e fitoquímicos feitos por um grupo de pesquisas no México relataram a existência de compostos naturais com atividade cicatrizante no córtex da *M. tenuiflora* (Willd.) Poir. Uma série de estudos com experimentos pré-clínicos concluíram que o extrato aquoso e alcoólico das cascas secas da *M. tenuiflora* são particularmente rico em taninos e também apresentam saponinas esteroidais. As atividades biológicas atribuídas a esses extratos foram uma alta atividade antimicrobiana *in vitro* contra uma variedade de microrganismos, leveduras e dermatófitos; e também indução do crescimento de fibroblastos e outras células humanas *in vitro* (MECKES-LOZOYA et al., 1990a,b; LOZOYA et al., 1989).

Segundo Meckes-Lozoya et al.,(1990a), a abundancia de taninos e flavonóides detectada no extrato de *M. tenuiflora* (Willd.) Poir. é a provável responsável pela atividade antimicrobiana verificada em *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* e *Acinetobacter calcoaceticus*, além de fungos como *Microsporum canis*, *gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *rubus* e *Chaetomium indicum*.

Taninos são biopolímeros polifenólicos abundantes em plantas, obtidos da madeira e/ou casca de muitas folhosas e da casca de algumas coníferas os quais possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas (SALUNKHE et al., 1990) e outras macromoléculas em soluções aquosas (SALMINEN;KARONEM, 2011).

Recentemente, estudos clínicos realizados nos hospitais do Instituto Mexicano de Seguridade Social (IMSS) com um teor de taninos padronizados obtido do extrato da casca da *Mimosa tenuiflora* apresentaram excelentes propriedades terapêuticas ao ser aplicado no tratamento de úlceras venosas na perna (RIVERA-ARCE, et al., 2007).

Em relação a toxicidade da jurema preta, Pereira (2010) realizou ensaio toxicológico agudo com o extrato etanólico da casca do caule de *Mimosa tenuiflora* e verificou uma DL<sub>50</sub> de 500 mg/Kg. Os animais expostos à dose letal apresentaram sintomas “pré-morte” como micção constante, piloereção, defecação, cianose, salivação, opacidade de córnea, relaxamento da cauda, taquipnéia, dentre outros. Todos esses sintomas foram observados no período de 24 horas após aplicação do extrato.

# *Objetivos*

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar a citotoxicidade e a genotoxicidade do extrato etanólico bruto (EEB) da casca do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. em células procarióticas e eucarióticas.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Realizar uma triagem fitoquímica do EEB de *M.tenuiflora* com o objetivo de identificar os metabólitos secundários existentes.
- Avaliar a atividade antibacteriana do EEB de *M. tenuiflora* frente a bactérias de importância clínica.
- Caracterizar a atividade antibacteriana em bacteriostática ou bactericida.
- Avaliar a atividade citotóxica do EEB de *M. tenuiflora* em eritrócitos humanos através do teste de hemólise.
- Observar o efeito do EEB de *M. tenuiflora* na fragilidade osmótica eritrocitária.
- Avaliar a atividade oxidante e antioxidante do EEB de *M. tenuiflora*.
- Investigar o potencial mutagênico e antimutagênico do EEB de *M. tenuiflora* através do teste de Ames.
- Avaliar o potencial clastogênico e aneugênico do EEB de *M. tenuiflora* através do teste de micronúcleo *in vivo*.

# *Materiais e métodos*

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material Botânico

As cascas da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. foram coletadas em março de 2010 no Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR, Campus de Patos – UFCG. A excisata da planta foi depositada no Herbário Caririensis Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, com número de registro #3274.

### 4.2 Local da Pesquisa

A triagem fitoquímica do EEB de *M.tenuiflora* foi realizada na UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), campus Natal. O teste de atividade antimicrobiana foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM) da UFPB. Os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados no Laboratório Bioger (UFPB), sendo que o teste de micronúcleo foi realizado no Biotério Prof. Thomas George da UFPB.

### 4.3 Microrganismos

Para determinação da citotoxicidade em células procarióticas foram utilizadas linhagens padrões ATCC (*American Type Culture Collection*) de importância clínica. As linhagens utilizadas foram :

- *Escherichia coli* ATCC 2536;
- *Escherichia coli* ATCC 10536;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25213;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25925.

As linhagens de *Salmonella* utilizadas no teste de Ames foram oriundas do Laboratório de Mutagênese Ambiental DBCG/CBC/UFRN, as linhagens utilizadas

foram:

- *Salmonella typhimurium* TA 97 → his D6610, rfa,  $\Delta$  uvrB, bio<sup>-</sup>, pKM101 (Ap<sup>R</sup>)
- *Salmonella typhimurium* TA 98 → his D3052, rfa,  $\Delta$  uvrB, bio<sup>-</sup>, pKM101 (Ap<sup>R</sup>)
- *Salmonella typhimurium* TA 100 → his G46, rfa,  $\Delta$  uvrB, bio<sup>-</sup>, pKM101 (Ap<sup>R</sup>)
- *Salmonella typhimurium* TA 102 → his G428, rfa, pKM101 (Ap<sup>R</sup>), pAQ1 (Tc<sup>R</sup>)

#### 4.4 Inóculo Bacteriano

Os microrganismos foram inoculados em caldo BHI (HIMEDIA) e incubados a 37°C/24h, a fim de se obter uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland, contendo 1-5 X10<sup>6</sup> UFC/ml.

Os meios de cultura comerciais utilizados para o crescimento das bactérias utilizadas nos experimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.5 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos (A, B, O) foram oriundos de sangue que não pode mais ser utilizado para transfusão (sangue a ser descartado) obtido na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte do sangue foi realizado de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade. Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados por unanimidade pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFPB (CEP-CCS/UFPB, Nº 0130/11).

#### 4.6 Animais

Para a realização dos modelos experimentais, foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss pesando entre 25-35 g, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George da UFPB. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura (21 ± 2 °C) e ciclos claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes

grupos experimentais, ao acaso. O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB (CEPA-CCS/LTF/UFPB, N° 0206/11).

#### **4.7 Preparação do Extrato Etanólico Bruto (EEB) de *M. tenuiflora***

Após a coleta e identificação do material botânico, as cascas da *M. tenuiflora* foram desidratadas em estufa com ar circulante a temperatura média de 45 °C, durante 3 a 4 dias, sendo em seguida submetidas a um processo de pulverização em moinho mecânico, reduzindo-se a pó. O material vegetal seco e pulverizado, com peso de 430 g, foi submetido à maceração exaustiva com 2 litros de etanol (EtOH) a 95 % por 72 h, sendo este processo repetido por três vezes, para obter a máxima extração dos constituintes químicos. A solução extrativa resultante, após filtração, foi concentrada com o auxílio de evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 40 °C, obtendo-se 94,6488g do EEB.

#### **4.8 Triagem fitoquímica do EEB de *M. tenuiflora***

O EEB de *M. tenuiflora* foi ressuspenso em água destilada (soluções a 10 %) para então ser submetido a diversos testes qualitativos de mudança de coloração, excitação por luz ultravioleta e precipitação, para identificação de diversas classes de metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2003). Foi avaliada a presença de saponinas, taninos, gomas, mucilagens, flavonóides, heterosídeos senevólicos, quinonas, lactonas, cumarinas, esteróides, triterpenóides, carotenóides, alcalóides, catequinas e resinas, através de reações químicas específicas (MATOS, 1995).

Para determinar a presença de fenóis o EEB de *M. tenuiflora* foi ressuspenso em metanol 1% e submetido à cromatografia em camada delgada tendo como fase fixa cromatofolhas de sílica gel e várias fases móveis para a triagem de fenóis específicos. O extrato e os padrões foram eluídos em cubas cromatográficas saturadas, utilizando-se solução metanólica de cloreto férrico a 5% para a revelação de taninos e o Reagente A natural para revelação de flavonóides (LIONÇO, DE SOUZA, PETROVICK, 2001).

#### **4.9 Extrações das substâncias tânicas do EEB de *M. tenuiflora***

A extração das substâncias tânicas foi realizada em água, à temperatura de  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ , durante duas horas. Nas extrações, para cada 2 kg de cascas foram adicionados 10 litros de água (relação 5:1). Cada amostra foi submetida à fervura, em um digestor rotativo, com capacidade de 20 litros.

Essa operação foi executada no LTPF (UFCG/CSTR). Cada amostra de casca foi submetida a duas extrações. Assim, a relação final foi de 1:10. Após cada extração, o material foi passado em uma peneira com tecido de “silk screen” e em um tecido de flanela, para a retenção de partículas finas.

O extrato obtido foi homogeneizado e derramado em bandejas de alumínio de 5 x 40 x 60 cm, e posto em uma estufa de ventilação forçada mantida a  $70 \pm 3^\circ\text{C}$ , até a completa evaporação da umidade. O material seco obtido foi moído em um multiprocessador de uso doméstico e peneirado em peneira de 60 *mesh*.

#### **4.10 Avaliação da atividade antibacteriana do EEB e dos taninos de *M. tenuiflora* frente a bactérias de importância clínica**

A atividade antibacteriana do EEB e dos taninos de *M.tenuiflora* em células bacterianas foi avaliado através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição descrita por Eloff (1998). Nas placas de 96 orifícios foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA) e 100  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano. Em seguida, foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  do extrato ou dos taninos na concentração inicial estabelecida de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e também foi feito o controle positivo do experimento onde utilizou-se a estreptomicina, um antibiótico padrão, numa concentração inicial de  $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A partir da concentração inicial foram feitas diluições seriadas à razão de 2 nos orifícios de 1 a 10. Os orifícios das colunas 11 foram utilizados para realizar o controle do crescimento bacteriano e os orifícios da coluna 12 serviu como controle positivo onde foi adicionado estreptomicina, um antibacteriano padrão.

As análises foram realizadas em triplicata e incubadas a  $35-37^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas. Posteriormente, foi realizada a primeira leitura dos resultados e em seguida adicionado 20 $\mu\text{L}$  de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA), preparada com a água destilada estéril. Nova incubação foi feita a  $35-37^\circ\text{C}$  por uma hora

aproximadamente. A concentração inibitória mínima foi revelada pela menor concentração do extrato que promoveu a inibição do crescimento bacteriano, verificado pela manutenção da cor azul.

#### **4.11 Caracterização da atividade antimicrobiana do EEB de *M. tenuiflora*.**

Para saber se o EEB de *M. tenuiflora* possui ação bacteriostática ou bactericida, alíquotas da concentração que produziu inibição do crescimento, ou seja, da CIM, foram plaqueada em placas de Petri contendo Agar Muller Hinton e posteriormente foram postas em estufa a 37°C por 24 horas (MADIGAN; MARTINKO, 2004). Os resultados foram interpretados da seguinte forma:

- Ausência de crescimento bacteriano significa que o extrato possui ação bactericida;
- Presença de crescimento bacteriano significa que o extrato possui ação bacteriostática.

#### **4.12 Avaliação citotóxica do EEB de *M. tenuiflora* em eritrócitos humanos**

Para avaliação citotóxica do EEB de *M.tenuiflora* sobre eritrócitos humanos utilizou-se o teste de hemólise. Para isto, uma amostra de sangue (2 mL) tipo A,B e O foi misturado com NaCl 0,96 %, na proporção de 1:30, e centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em uma concentração final de 0,5 %. As amostras foram adicionadas até obter uma concentração final de 1000, 500, 250, 125 e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram adicionadas a 2 mL da suspensão de eritrócitos. O controle negativo foi montado com suspensão de eritrócitos mais NaCl 0,96 % (0 % de hemólise) e o controle positivo com suspensão de eritrócitos mais 100  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 1% (100 % de hemólise). As amostras foram incubadas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 1h a  $22 \pm 2$  °C. Decorrido este tempo foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm (RANGEL et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem do grau de hemólise

#### **4.13 Avaliação do efeito do EEB de *M. tenuiflora* sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos**

A avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5% dos tipos sanguíneos A, B e O. O EEB de *M.tenuiflora* na concentração de 1000 µg.mL<sup>-1</sup> foi incubado em tubos contendo 2 mL de uma suspensão de eritrócitos e agitadas a 100 rpm por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este tempo, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram então ressuspensos em soluções de cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações (0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84 e 0,96%) e agitadas a 100 rpm, por uma hora a 22 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (DACIE; LEWIS, 2001). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem do grau de hemólise.

#### **4.14 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante do EEB de *M. tenuiflora* em eritrócitos humanos.**

Para investigar o potencial oxidante do EEB de *M. tenuiflora*, diferentes concentrações (10, 100 e 200 µg.mL<sup>-1</sup>) foram diluídas em PBS (11,35 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 24,36 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 7,18 g NaCl para 1 L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL), pH 7,6 e adicionadas a suspensões de eritrócitos (1 mL). Após um período de incubação de 1 h, sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 1h a 22 ± 2 °C, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a porcentagem de metahemoglobina (metHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540nm.

Para investigar o potencial antioxidante após a incubação das diferentes concentrações do EEB de *M.tenuiflora* e hemoglobina por 1 h, foi adicionado um agente oxidante, a fenilhidrazina (Ph) 1 mmol/L (SIGMA). As suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por mais 20 minutos a 25 °C. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos,

diluídas em tampão fosfato (9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 5,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 1 L) e a porcentagem de metHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540nm. Os valores de metHb entre 1,5 e 2,0% foram considerados normais enquanto que valores acima de 5% foram considerados elevados (CAMARGO et al., 2007). A porcentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a vitamina C (20 mmol/L), um comprovado agente antioxidante (WEFFORT-SANTOS, 2008). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t*.

#### **4.15 Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico do EEB de *M. tenuiflora* em células bacterianas através do teste de Ames.**

Suspensões em meio *Nutrient Broth* (DIFCO) de linhagens mutantes de *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102, em fase estacionária, deficientes na síntese do aminoácido histidina ( $\text{His}^-$ ) foram incubadas com concentrações de 100 e 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  do EEB de *M. tenuiflora* a uma temperatura de 37 °C. Após 30 min, as suspensões foram plaqueadas em meio Ágar Mínimo (20 mL meio Vogel-Bonner (10 g  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 100 g ácido cítrico monohidratado, 500 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 175 g  $\text{Na}_2\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  para 1 L), 50 mL glicose 10% v/v, 15 g ágar para 1L), incubadas a 37°C por 48 h. As colônias mutantes ( $\text{His}^+$ ) que restauraram sua capacidade de síntese de histidina (revertentes) foram contadas. Foram plaqueadas suspensões de *S. typhimurium* como controle negativo e suspensões de *S. typhimurium* incubadas na presença de 4-nitroquinolina-1-óxido (0,5  $\mu\text{g}/\text{placa}$ ) (SIGMA), como controle positivo.

Para investigar se o extrato de *M. tenuiflora* apresenta potencial antimutagênico, suspensões de *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102 foram submetidas a duas concentrações do produto (100 e 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) a 37 °C por 30 min. Em seguida as amostras foram incubadas na presença de 4-nitroquinolina-1-óxido por mais 30 minutos, plaqueadas em meio Ágar Mínimo e mantidas a 37°C por 48 h.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Razão de Mutagenicidade (número de colônias revertentes na placa teste/

número de colônias espontâneas no controle negativo). A amostra é considerada mutagênica quando a razão da mutagenicidade for maior ou igual a 2 em pelo menos uma das dose testadas (AMES et al., 1975; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

#### **4.16 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico do EEB de *M. tenuiflora* através do teste do micronúcleo *in vivo***

Para realização do teste de micronúcleo, os animais foram sacrificados com xilasina (5 mg/Kg) de acordo com as normas vigentes para evitar ansiedade ou medo (stress) (ANDRADE et al., 2006) e em seguida foram retiradas amostras de sangue da veia caudal.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com Schmid (1975). Grupos de três machos e três fêmeas receberam por via oral o EEB de *M.tenuiflora* numa dose de 100 mg/kg e 200 mg/kg do peso do animal. O grupo controle negativo recebeu apenas o dispersante da amostra (água) e controle positivo recebeu ciclofosfamida a 50 mg/Kg de peso do animal (SIGMA). Vinte e quatro horas após o tratamento os animais foram sacrificados, o sangue foi colhido da veia caudal para o preparo das lâminas e a contagem de micronúcleos. As lâminas foram coradas com corante panótico e observadas ao microscópio óptico (ZEISS) no aumento de 1000x para a contagem dos micronúcleos. Foram avaliados pelo menos 2000 eritrócitos por animal (HAYASHI et al., 1994). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m).

#### **4.17 Análise estatística**

Para os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade foram feitos pelo menos três experimentos e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). Para comparação dos grupos experimentais utilizou-se o teste *t* do programa Graph Pad Prism 4.0 com resultados significativos aqueles que tiveram valor de  $p < 0,05$ .

# *Resultados*

---

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Triagem fitoquímica do EEB de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.

A triagem fitoquímica de *M.tenuiflora* está representada na Tabela 1.

**Tabela 1-** Triagem fitoquímica do EEB da *Mimosa tenuiflora* (Willd.).

Teste	<i>Mimosa tenuiflora</i>
Saponinas	+++
Fenóis	+++
Taninos pirocatéquicos	+++
Gomas	+++
Taninos pirogálicos	++
Flavonóides	++
Alcalóides	++ (Dragendorff e Bertrand) e + (Bouchard)
Heterosídeos senevólicos	+
Mucilagens	-
Quinonas	-
Lactonas	-
Cumarinas	-
Esteróides e/ou triterpenóides	-
Carotenóides	-
Catequinas/Resinas	-

(+++) = forte presença, (++) = presença moderada, (+) = traços, (-) = reação negativa.

Com base na tabela 1 observamos que a triagem fitoquímica do EEB de *M.tenuiflora* mostrou uma forte presença de saponinas, gomas, fenóis e taninos pirocatéquicos, sendo estes dois últimos compostos, segundo Meckes-Lozoya et al. (1990a), com atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos.

A triagem fitoquímica do EEB de *M.tenuiflora* também mostrou presença moderada de alcalóides, flavonóides e taninos pirogálicos; traços de heterosídeos foram verificados e ausência de mucilagens, quinonas, cumarinas, lactonas, esteróides, carotenóides, catequinas e resinas. O resultado positivo afirma a presença de determinado constituinte na planta; já o resultado negativo, não exclui necessariamente a presença do composto. Talvez a concentração dele na amostra seja menor que a mínima detectável pela técnica empregada.

Na análise qualitativa de fenóis por Cromatografia em Camada Delgada confirmou-se a presença de fenóis, conforme a triagem fitoquímica realizada.

## **5.2 Avaliação da atividade antibacteriana do EEB e dos taninos de *M. tenuiflora* frente a bactérias de importância clínica**

O perfil de sensibilidade das linhagens bacterianas ao EEB e aos taninos de *M. tenuiflora* foi evidenciado pela determinação da CIM para cada linhagem bacteriana testada. Os resultados obtidos na determinação da CIM estão representados na tabela

**Tabela 2-** Concentração Inibitória Mínima do EEB e de taninos de *M. tenuiflora* sobre linhagens bacterianas.

Linhagem Bacteriana	Concentração Inibitória Mínima (CIM) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
	E.E.B	Taninos	C(+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2536	125	250	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	125	62,5	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	250	250	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	250	125	16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	125	250	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213	125	125	32

(E.E.B=Extrato Etanólico Bruto; C(+)= Controle positivo= estreptomicina;)

A atividade antibacteriana foi classificada segundo os métodos de classificação de Sartoratto et al. (2010) onde o extrato é considerado com forte atividade antibacteriana quando apresentar CIM até  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , moderada com CIM entre 600 e  $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e fraca atividade antibacteriana com CIM  $>1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Com base na tabela 2 observamos que tanto o extrato da *M.tenuiflora* quanto a solução dos taninos possuíram ação antimicrobiana contra todas as linhagens testadas. Baseado nos critérios de classificação de Sartoratto et al. (2010) a atividade antimicrobiana foi caracterizada como forte em todas as linhagens ensaiadas.

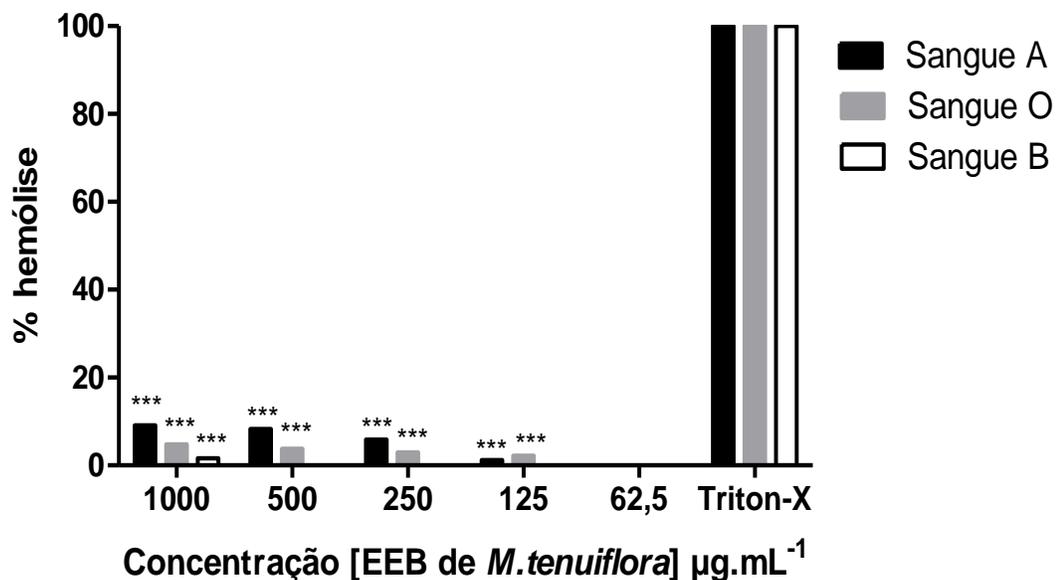
### 5.3 Caracterização da atividade antimicrobiana do EEB de *M.tenuiflora*

A atividade antimicrobiana exercida pelo EEB de *M.tenuiflora* frente às linhagens de *S.aureus*, *P.aeruginosa* e *E.coli* foi considerada bacteriostática, uma vez que essas bactérias cresceram quando alíquotas da concentração inibitória mínima foram plaqueadas.

#### 5.4 Avaliação citotóxica do EEB de *M.tenuiflora* em eritrócitos humanos

Na avaliação da citotoxicidade do EEB de *M.tenuiflora* sobre eritrócitos humanos observa-se que houve uma baixa atividade hemolítica (taxa de hemólise < 20%) em todos os tipos sanguíneos testados (Gráfico 1) quando comparados com o os grupos tratados com Triton-X (C+), indicando que não está havendo danos a membrana celular dos eritrócitos humanos, ou seja, uma baixa toxicidade para células eucarióticas.

No gráfico abaixo observamos que o extrato na concentração de 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não causou hemólise em nenhum dos tipos sanguíneos. Os eritrócitos tipo B foram os que apresentaram menor grau de hemólise frente ao EEB de *M.tenuiflora* e os eritrócitos tipo A foram os mais susceptíveis a tal efeito.



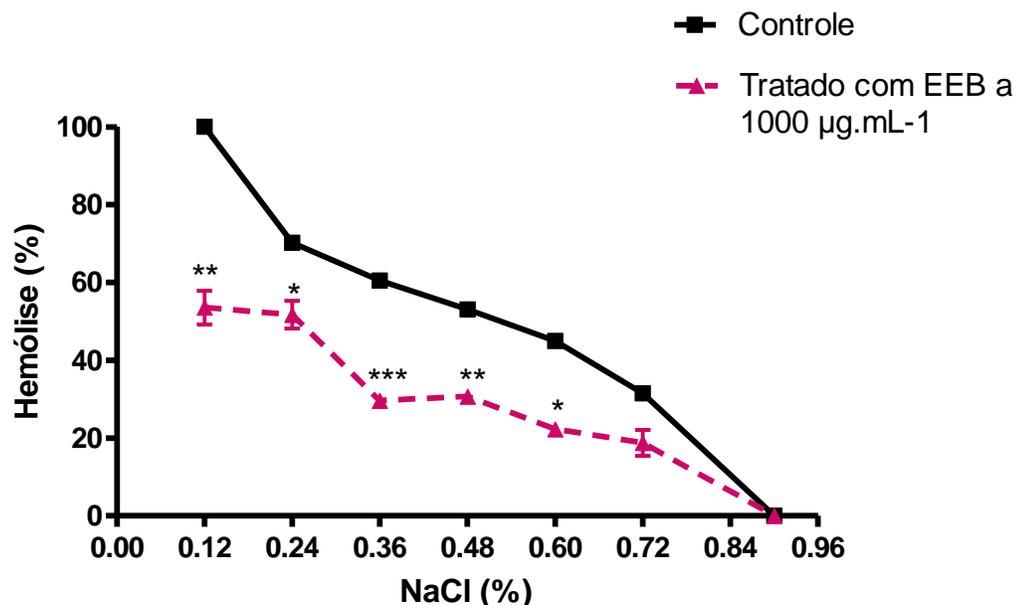
**Gráfico 1** – Percentual de hemólise em eritrócitos humanos após o tratamento com EEB de *M.tenuiflora*. As colunas e as barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. A comparação dos grupos foi feita pelo teste *t* utilizando o programa Graph Pad Prism versão 4. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (Triton X).

No gráfico 1 também observa-se que o grau de hemólise foi dependente da concentração do EEB de *M.tenuiflora*, ou seja, quanto maior a concentração do extrato

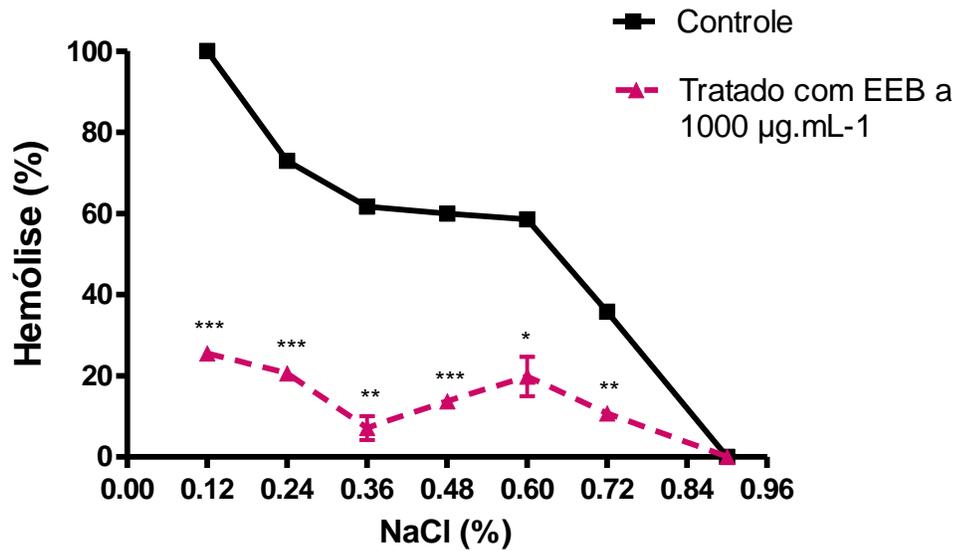
maior o grau de hemólise e mesmo na concentração mais alta,  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , o extrato provocou um baixo grau de hemólise nos eritrócitos. Os resultados foram significativamente diferentes quando comparados com o grupo controle Triton- X (100% de hemólise).

### 5.5 Avaliação do efeito do EEB de *M.tenuiflora* sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos

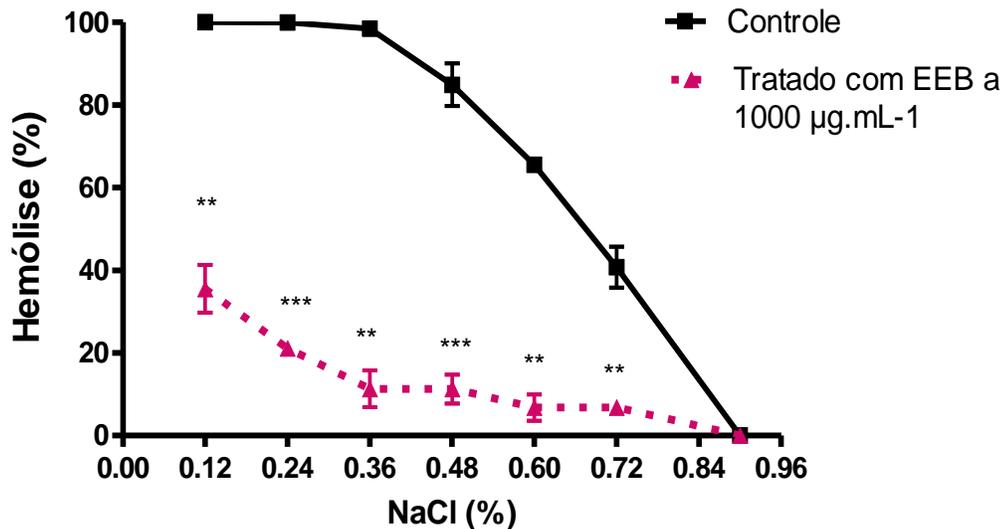
Os ensaios de fragilidade osmótica ou atividade anti-hemolítica mostraram que os eritrócitos tipo ABO previamente tratados com o EEB de *M. tenuiflora*, na concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentaram grau de hemólise significativamente menor do que os grupos controles em quase todas as diferentes concentrações de NaCl testadas (Gráficos 2, 3 e 4). Podemos observar que *M.tenuiflora* foi capaz de proteger até 50% dos eritrócitos humanos contra a hemólise.



**Gráfico 2** - Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos do tipo A tratados com EEB de *M.tenuiflora* a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva foi feita em relação a porcentagem de hemólise para cada concentração de NaCl (relativo ao grupo de 100% de hemólise= NaCl 0,12%). Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com o grupo controle.



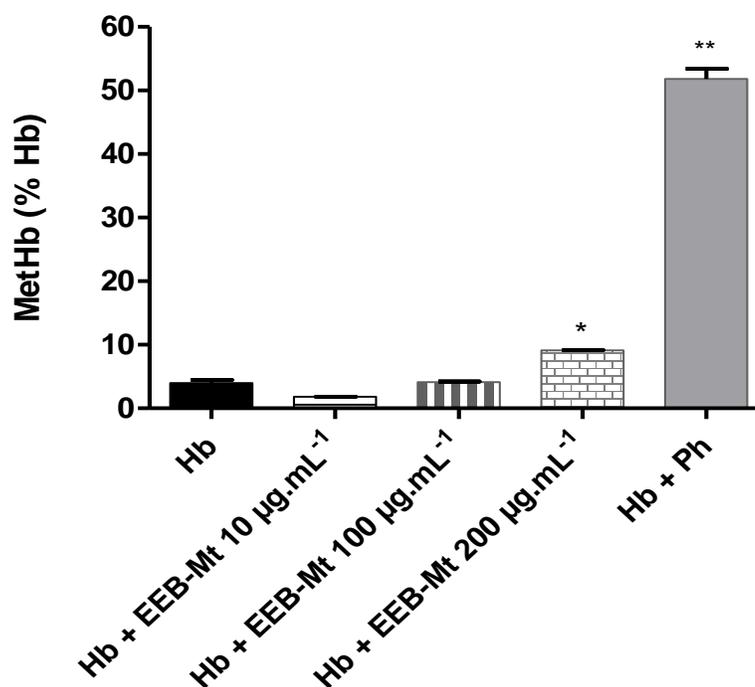
**Gráfico 3** - Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos do tipo B tratados com EEB de *M.tenuiflora* a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. A curva foi feita em relação a porcentagem de hemólise para cada concentração de NaCl (relativo ao grupo de 100% de hemólise= NaCl 0,12%). Cada ponto representa a média ± e.p.m dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com o grupo controle.



**Gráfico 4** – Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos do tipo O tratados com EEB de *M.tenuiflora* a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. A curva foi feita em relação a porcentagem de hemólise para cada concentração de NaCl (relativo ao grupo de 100% de hemólise = NaCl 0,12%). Cada ponto representa a média ± e.p.m dos experimentos em triplicata com intervalo de confiança de 95%. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com o grupo controle.

### 5.6 Atividade Oxidante e Antioxidante do EEB de *M.tenuiflora*

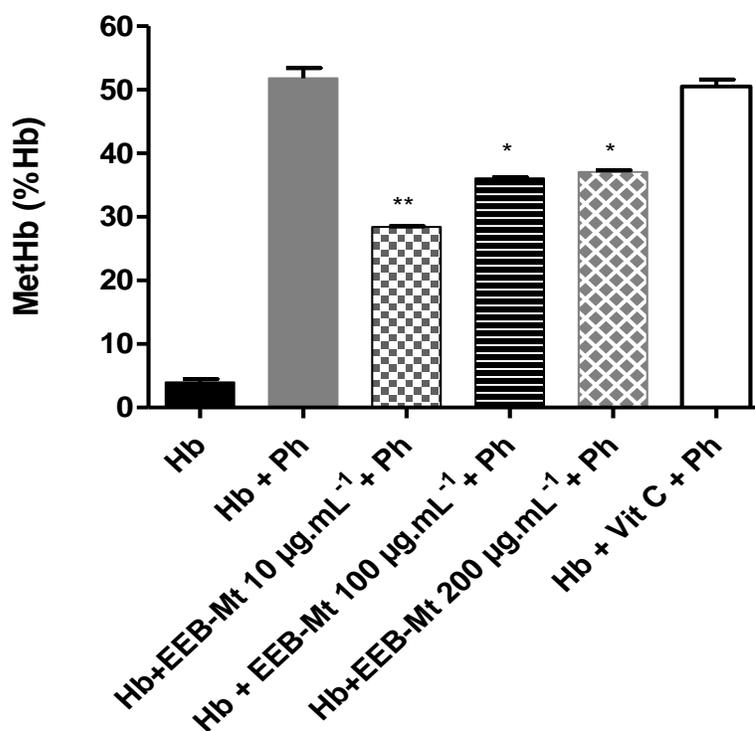
O EEB de *M.tenuiflora* não apresentou efeito oxidante nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  testadas, uma vez que a quantidade de metHb formada não foi significativamente diferente da do controle negativo (Hb) (Gráfico 5). Na concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do EEB de *M.tenuiflora*, apesar de significativamente diferente do controle negativo, a quantidade de metahemoglobina formada foi baixa quando comparada com o controle positivo (Ph). Quando tratado com um agente oxidante, a fenilhidrazina (Ph), observa-se que a quantidade de metHb formada chegou a 50 % em relação a Hb (Controle positivo). Com isso fica evidente que o EEB de *M.tenuiflora* não é um agente indutor de oxidação.



**Gráfico 5-** Atividade Oxidante do EEB de *M.tenuiflora* nas concentrações de 10, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Como controle positivo foi utilizado a fenilhidrazina (Hb=Hemoglobina, Ph= Fenilhidrazina). Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m analisados pelo teste *t*. \* $p < 0,05$  comparado ao controle negativo.

Quando os eritrócitos foram pré-incubados com EEB de *M.tenuiflora*, antes da exposição à fenilhidrazina (Ph), a quantidade de metahemoglobina (metHb) formada foi significativamente menor do que a do controle positivo. Este efeito antioxidante foi

maior do que o encontrado na vitamina C, um reconhecido agente antioxidante que neste caso, na presença da fenilhidrazina, não diminui significativamente a quantidade de metahemoglobina formada comparada com a fenilhidrazina, ou seja, não teve atividade antioxidante. (Gráfico 6).



**Gráfico 6-** Atividade antioxidante do EEB de *M.tenuiflora* nas concentrações de 10,100 e 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Os dados foram expressos como média ± e.p.m analisados pelo teste *t*. \**p*<0,05; \*\**p*<0,01 comparado a fenilhidrazina.

### 5.7 Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico do EEB de *M.tenuiflora* em células bacterianas através do Teste de Ames

O EEB de *M.tenuiflora* tanto na concentração de 100 como de 50 µg.mL<sup>-1</sup> não induziu mutação nas linhagens de *S. thiphymurium* testadas uma vez que a razão de mutagenicidade foi inferior a 2 (Tabela 3), sendo assim o EEB de *M.tenuiflora* não é considerado mutagênico .

**Tabela 3** – Razão de mutagenicidade (RM) do EEB de *M.tenuiflora* frente às linhagens TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102 de *S. thiphymurium*.

Grupos experimentais	RM (TA 97)	RM (TA 98)	RM (TA100)	RM (TA 102)
<b>NQNO (controle positivo)</b>	2,37	33,09	13,07	8,98
<b>EEB - Mt 100 µg.mL<sup>-1</sup></b>	0,42	0,26	0,41	0,42
<b>EEB - Mt 50 µg.mL<sup>-1</sup></b>	0,36	0,73	0,37	0,35

**NQNO = 4-nitroquinolina-1-óxido (0,5 µg/placa), RM = Razão de mutagenicidade, EEB-Mt = EEB de *Mimosa tenuiflora*.**

O tratamento das linhagens de *S. thiphymurium* com EEB de *M.tenuiflora* antes da incubação com o agente mutagênico (NQNO) demonstrou um efeito antimutagênico nas linhagens TA 97, TA 100 e TA 102 uma vez que a razão de mutagenicidade foi menor que 2. Na linhagem TA 98 o EEB de *M.tenuiflora* não apresentou efeito antimutagênico (Tabela 4).

**Tabela 4** – Efeito antimutagênico do EEB de *M.tenuiflora* frente às linhagens de *S. thiphymurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102. Os resultados são expressos como razão da mutagenicidade.

Grupos experimentais	RM(TA 97)	RM (TA 98)	RM(TA 100)	RM (TA 102)
<b>NQNO</b>	2,37	33,09	13,07	8,98
<b>EEB-Mt 100 µg.mL<sup>-1</sup> + NQNO</b>	0	5,3	0,19	0
<b>EEB-Mt 50 µg.mL<sup>-1</sup> + NQNO</b>	0	4,4	0,14	0,01

**NQNO = 4-nitroquinolina-1-óxido (0,5 µg/placa), RM = Razão de mutagenicidade**

### 5.8 Avaliação do potencial clastogênico e aneugênico do EEB de *M.tenuiflora* através do teste do micronúcleo *in vivo*

A presença de micronúcleos em eritrócitos de camundongos no controle positivo não foi influenciada pelo sexo, então os dados foram agrupados para determinar a média de micronúcleos, para calcular o erro padrão da média e para avaliar as diferenças entre os grupos.

Os resultados obtidos mostraram que tanto na dose de 100 como 200 mg/kg o EEB de *M.tenuiflora* não induziu um aumento significativo no número de micronúcleos em relação ao controle negativo, apenas a ciclofosfamida (controle positivo) induziu um significativo aumento na quantidade de micronúcleos (Tabela 5 e Figura 3 a 6).

**Tabela 5-** Frequência de eritrócitos micronucleados em 2000 eritrócitos de sangue periférico de camundongos de diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Número de eritrócitos micronucleados
	(média ± e.p.m.)
<b>Controle (água)</b>	12,0 ± 2,64
<b>Ciclofosfamida (50 mg/Kg)</b>	43,5 ± 5,89**
<b>EEB <i>M.tenuiflora</i> (100 mg/Kg)</b>	8,75 ± 2,12
<b>EEB <i>M.tenuiflora</i> (200 mg/Kg)</b>	9,91 ± 1,06

Os testes foram feitos em triplicata (n=6) com intervalo de confiança de 95%.A comparação dos grupos foi feita pelo teste *t* no programa Graph pad Prism 4.  
\*\**p*<0,01comparado com o controle negativo.

**Figura 3-** Eritrócitos de camundongos (Controle negativo).

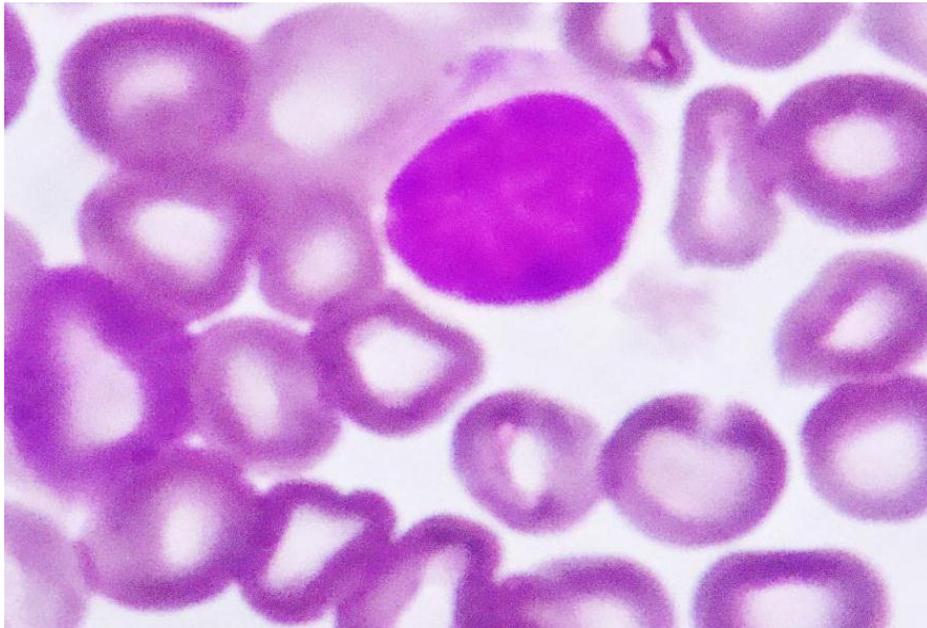


Foto: Geraldo Gonçalves Almeida Filho

**Figura 4-** Eritrócitos de camundongos tratados com ciclofosfamida (50mg/kg) - controle positivo. Em destaque observa-se a presença de micronúcleos

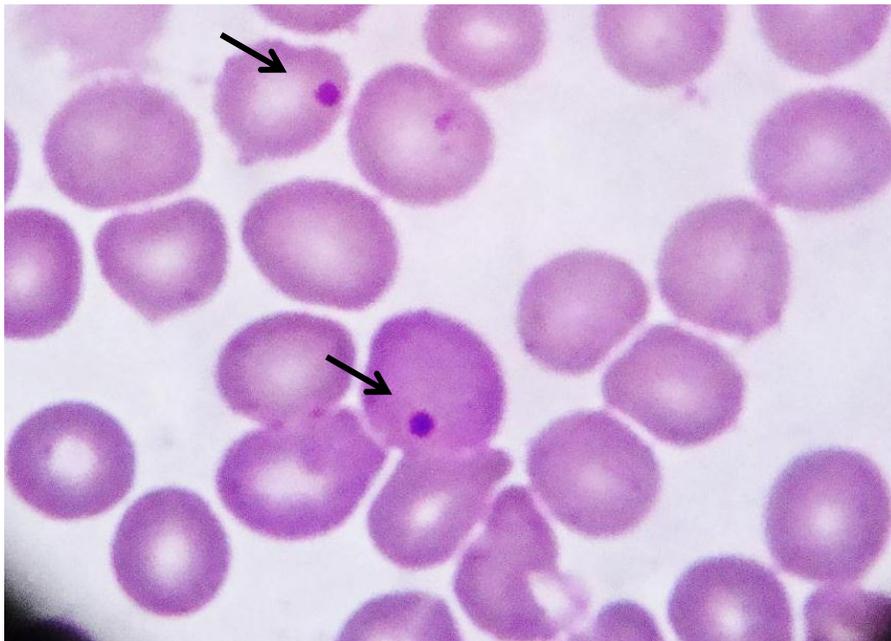


Foto: Geraldo Gonçalves Almeida Filho

**Figura 5** - Eritrócitos tratados com EEB de *M.tenuiflora* a 100 mg/kg.

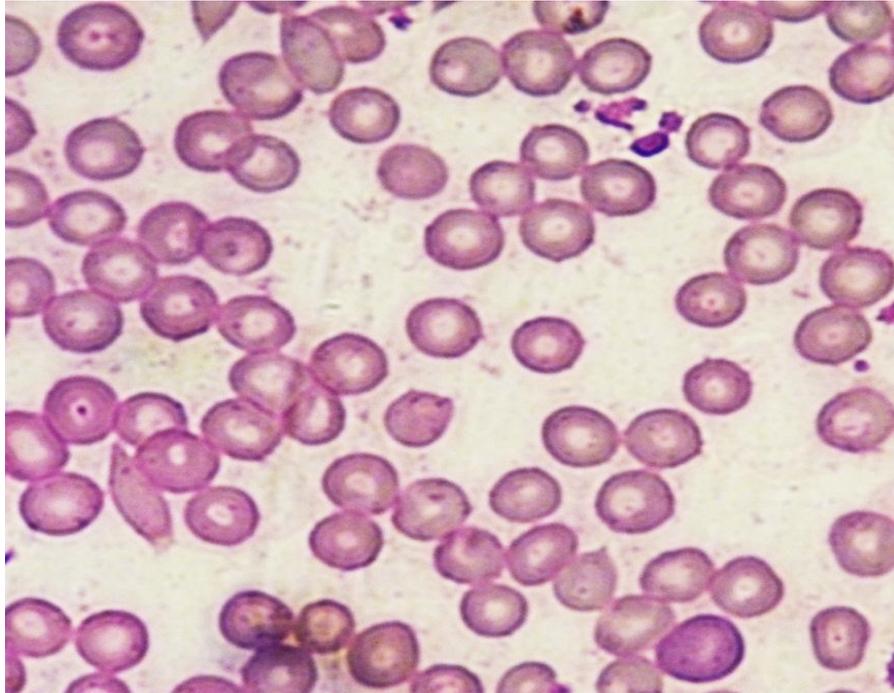


Foto: Viviane Araújo da Silva

**Figura 6** - Eritrócitos tratados com EEB de *M.tenuiflora* a 200 mg/kg

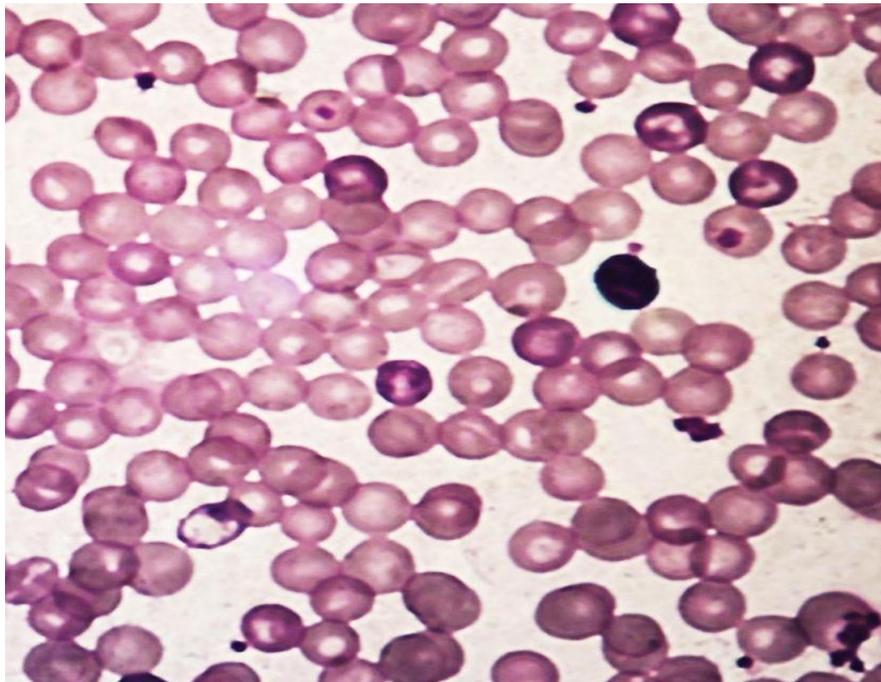


Foto: Viviane Araújo da Silva

# *Discussão*

---

---

## 8. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigados o efeito citotóxico e genotóxico do extrato etanólico bruto (EEB) e/ou dos taninos isolados da casca do caule de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. frente a células procarióticas e eucarióticas. A citotoxicidade foi avaliada através dos efeitos antibacterianos, hemolíticos e oxidantes e a genotoxicidade através dos efeitos mutagênicos, clastogênicos e aneugênicos. Os resultados mais relevantes deste estudo foram a demonstração da atividade bacteriostática do EEB e dos taninos frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, atividade hemolítica baixa em eritrócitos humanos de três tipos sanguíneos do sistema ABO, ausência de efeito oxidante e efeito antioxidante superior ao da vitamina C. Podemos ressaltar ainda a ausência de efeitos mutagênicos, clastogênicos e aneugênicos e efeito antimutagêncio em algumas linhagens ensaiadas.

O poder curativo das plantas é tão antigo quanto o aparecimento da espécie humana na terra. Desde cedo, as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em suas essências, princípios ativos os quais ao serem experimentados no combate às doenças revelaram empiricamente seu poder curativo (BADKE et al., 2011).

A falta de informações adequadas sobre as propriedades das plantas medicinais (principalmente das exóticas), seu consumo concomitante com os medicamentos tradicionais (alopáticos) sem aviso ao médico e, finalmente, a perda do conhecimento sobre os efeitos medicinais e tóxicos das plantas, assim como a capacidade de identificá-las pela migração da população rural para as cidades são fatores preocupantes na utilização de plantas medicinais sem estudos prévios (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

A detecção de atividade citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos e até mesmo modificar a informação genética contida no DNA. A obtenção de dados sobre a toxicidade destes agentes deve ser antecipada por experimentos capazes de fornecer, com razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização (BENIGNI, 2005).

Inicialmente, o EEB de *M.tenuiflora* foi analisado fitoquimicamente para observar a presença de compostos secundários tais como: saponinas, taninos, gomas, mucilagens, flavonóides, heterosídeos senevólicos, quinonas, lactonas, cumarinas, esteróides, triterpenóides, carotenóides, alcalóides, catequinas e resinas. Os resultados revelaram uma grande variedade de constituintes químicos destacando-se a presença de saponinas, gomas, resinas e sobretudo fenóis (dentre os quais flavonóides e taninos) corroborando estudos farmacocímicos de Meckes-lozoya et al. (1990b), Jiang et al. (1991), Camargo-Ricalde (2000) e Bezerra (2008). Meckes-Lozoya et al. (1990b), afirmam ainda que a abundância de taninos e flavonóides encontrados no extrato da jurema preta é o fator provavelmente responsável pela atividade antimicrobiana verificada em *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter calcoaceticus*, além de fungos como *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Thrichophyton mentagrophytes*, *Thrichophyton rubus* e *Chaetomium indicum*. Allaker e Douglas (2009) descreveram alguns fitoquímicos com propriedade antimicrobiana e dentre eles flavonóides e taninos.

Taninos são fenóis comuns em plantas, considerados atóxicos em quantidades e condições normais, com exceção dos fenóis poliméricos, taninos que possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (SALUNKHE et al., 1990).

Simões et al., (2003) afirma que a atividade antimicrobiana apresentada por algumas plantas está diretamente relacionada à presença deste metabólito (tanino), possuindo também caráter bactericida.

Rivera-Arce et al.( 2007) afirmam ainda que o efeito positivo que o extrato da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) possui no tratamento de doenças de pele grave e de úlceras é atribuído ao alto teor de polifenóis encontrados (flavonoides e taninos).

Neste trabalho, a atividade antimicrobiana do EEB e de soluções tânicas de *M.tenuiflora* sobre bactérias multirresistentes foi determinada pelo método de microdiluição, o qual determina a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano (CIM). Os resultados mostraram que todas as linhagens utilizadas foram sensíveis ao EEB de *M.tenuiflora* e a solução dos taninos.

As linhagens *P. aeruginosa* foram as mais resistentes ao EEB de *M. tenuiflora* apresentando CIM de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As linhagens *E. coli* e *S. aureus* foram mais sensíveis ao EEB de *M. tenuiflora* com CIM de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Em relação à solução aquosa dos taninos, *P. aeruginosa* ATCC 8027, *E. coli* ATCC 2536 e *S. aureus* ATCC 25925 apresentaram CIM de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo estas duas últimas linhagens mais sensíveis ao extrato da *M. tenuiflora* do que a solução dos taninos, o que pode ser explicado pela presença no extrato bruto de flavonóides que também apresentam efeito antimicrobiano conforme descrito por Meckes-Lozoya et al. (1990a). *S. aureus* ATCC 25213 e *P. aeruginosa* ATCC 25619 apresentaram frente ao EEB de *M. tenuiflora* CIM de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo esta última linhagem mais sensível a solução aquosa dos taninos do que ao extrato. A linhagem *E. coli* ATCC 10536 foi a mais sensível em relação à solução aquosa dos taninos com CIM de 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o que representa o menor valor de CIM encontrado.

De acordo com Loguercio et al. (2005), o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses: a primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Macedo-Costa (2009) observou que extrato de *M. tenuiflora* possui atividade antimicrobiana frente à diversas linhagens bacterianas formadoras do biofilme dental como: *Streptococcus mitis* (ATCC 9811), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10557), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609) e (ATCC 7469).

Bezerra (2008) estudou o extrato etanólico de *M. tenuiflora* e observou halos de inibição que variaram de 6 a 25 mm frente a linhagens de *S. aureus*. Das amostras testadas, as diluições de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 apresentaram halos superiores ao halo mínimo de 12 mm estabelecido por Silva et al. (2003) para *S. aureus*, enquanto

que as diluições 1:64; 1:128; 1:256; 1:512 apresentaram percentual de atividade de 92%, 72%, 28% e 0% respectivamente. Em estudos realizados por Pereira *et al.* (2009a), os extratos etanólicos de *M. tenuiflora* foram eficazes no tratamento de búfalas com diagnóstico de mastite clínica.

*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* são bactérias que causam diversas patogenicidades e essas são de difíceis tratamentos devido a grande resistência que possuem aos mais diversos tipos de antibióticos. Sendo assim, *M. tenuiflora* se mostrou eficaz com resultados promissores quanto a sua ação antibacteriana, como fonte de compostos biologicamente ativo de amplo espectro com efeito em bactérias Gram positivas e Gram negativas.

A detecção de atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. A avaliação do potencial citotóxico em eritrócitos humanos constitui um modelo experimental *in vitro* eficaz para investigar os efeitos tóxicos e protetores de uma grande variedade de substâncias, visto que, a ocorrência de hemólise no eritrócito pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO *et al.*, 2005).

O teste de hemólise é bastante utilizado para estudos de citotoxicidade em células eucariótica, pois é barato, dinâmico, fácil de aplicar, oferece informação sobre o efeito do extrato sobre a membrana celular e necessita de reagentes e equipamentos rotineiros .

O EEB de *M.tenuiflora* apresentou baixa toxicidade (<20%) frente a eritrócitos humanos do tipo A, B e O, ou seja, não possui a capacidade de causar danos na membrana eritrocitária que levaria ao rompimento e conseqüente morte da célula (Gráfico 1).

Meckes-Lozoya (1990b) relata que o extrato metanólico bruto da casa do caule da *M. tenuiflora*, proveniente da flora mexicana, possui atividade hemolítica máxima de 68% na concentração do extrato a 500 µg.mL<sup>-1</sup> e que a partir dessa dose o grau de hemólise diminui gradativamente. Isto pode ser explicado, pois a planta sofre influência

de diferentes condições de cultivo, coleta, secagem, acondicionamento, o que pode modificar significativamente a complexa composição do material vegetal e/ou do produto derivado.

Gonçalves (2011) mostrou que os taninos de *Mimosa arenosa* (jurema vermelha) induziram baixo grau de hemólise nos tipos sanguíneos A, B e O.

Para obter informações sobre a composição e a estrutura das membranas eritrocitárias, assim como averiguar os efeitos de substâncias na sua integridade, geralmente os pesquisadores usam várias abordagens bioquímicas. Um teste também bastante utilizado, de baixo custo e eficiente na avaliação da estabilidade das membranas (MOECKEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; ALDRICH, 2006; IVANOV et al., 2007) é a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) ou atividade anti-hemolítica. A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) ou atividade anti-hemolítica pode ser definida como a resistência dos eritrócitos à hemólise, avaliada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes de 0,96% a 0% (JAIN, 1986). O controle do volume celular através da eliminação ativa de solutos é um dos mecanismos pelo qual a lise da membrana eritrocitária é evitada *in vivo* (MAKINDE; BOBADE, 1994). As células, quando suspensas em meio hipotônico, aumentam até atingir um volume crítico de hemólise antes de serem lisadas. Assim sendo, a fragilidade celular varia conforme a concentração de sal (JAIN, 1973).

Além de induzir baixos graus de hemólise, os ensaios de fragilidade osmótica mostraram que o EEB de *M.tenuiflora* protegeu a membrana dos eritrócitos humanos dos tipos A, B e O contra hemólise quando comparados com o grupo controle.

Em contraposição, Gonçalves (2011) demonstrou que os taninos de uma outra espécie do mesmo gênero, *M. arenosa*, não apresentaram efeito sobre a fragilidade osmótica da membrana dos eritrócitos humanos dos tipos A, B e O e portanto não sendo capazes de proteger contra hemólise.

Na última década, uma vasta gama de técnicas analíticas tem sido desenvolvidas para medir a atividade antioxidante de extratos vegetais e plantas (BRANDWILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995; PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

A procura por antioxidantes de fontes naturais tem recebido muita atenção e vários esforços têm sido investidos para identificar compostos que possam agir como antioxidantes satisfatórios para substituir os sintéticos (WONG; LEONG; KOH, 2006).

Os eritrócitos humanos constituem um poderoso sistema que pode ser utilizado como um modelo experimental *in vitro* para investigar o potencial antioxidante de extratos vegetais a partir da quantificação da metHb formada (CLARO et al., 2005; ARBOS et al., 2008). Deve-se ter em mente, entretanto, que atividades antioxidantes observadas em eritrócitos não necessariamente refletem as atividades antioxidantes no organismo como um todo. Além disso, existem variações genéticas entre os indivíduos que resultam em expressão gênica alterada levando a efeitos variados e potencialmente indesejados na atividade antioxidante (ARBOS et al. 2008).

Nesse estudo, observamos que o EEB de *M.tenuiflora* não causa oxidação da hemoglobina após sua exposição por lise das membranas eritrocitárias, isto é um dado importante tendo em vista que a oxidação da hemoglobina leva a formação de radicais livres que podem causar danos às demais células e sistemas do organismo humano (SIEMS; SOMMERBURG; GRUNE, 2000).

Os resultados também mostraram que além de não causar a oxidação da hemoglobina, o EEB de *M.tenuiflora* possui atividade antioxidante maior do que o encontrado na vitamina C, considerado poderoso agente antioxidante. Observa-se no gráfico 6 que não houve diferença significativa entre a quantidade de metahemoglobina formada nos grupos tratados com a vitamina C e nos tratados com a fenilhidrazina, ou seja a vitamina C não atuou, neste caso, como um agente antioxidante. Isto pode ser explicado, pois, em alguns casos, como na presença da fenilhidrazina, segundo Claro et al. (2006), a vitamina C não atua como agente antioxidante e ainda pode se comportar como um agente indutor de oxidação aumentando os níveis de metahemoglobina.

Pessuto (2009) avaliou o potencial antioxidante de extratos e de taninos condensados isolados das folhas de *M. ilicifolia* pelo método de DPPH e observou que a fração acetato de etila apresenta capacidade antioxidante, significativa, em

comparação aos extrato bruto e fração aquosa, devido, possivelmente, ao conteúdo em substâncias polifenólicas. A capacidade antioxidante relativa ou total da fração acetato de etila foi estatisticamente comparável à vitamina C, um reconhecido agente antioxidante, o que denota o potencial desta fração, provavelmente pela presença dos taninos condensados.

Os organismos vivos estão frequentemente expostos à substâncias mutagênicas, sendo que muitas delas podem ter origem natural, como por exemplo os fitoterápicos. Considerando que muitos extratos e princípios ativos já descritos de plantas têm sido utilizados como agentes terapêuticos, há um interesse considerável em determinar os riscos que estes podem causar à saúde, levando ao aparecimento de doenças ou mesmo morte em animais e seres humanos. Assim, a avaliação do potencial citotóxico e mutagênico são necessários para assegurar o uso relativamente seguro de plantas medicinais pelo homem (SURH; FERGUSON, 2003). Por outro lado, o consumo destas plantas também podem suprimir, obstruir, ou inverter os processos envolvidos na mutagênese e, finalmente, na carcinogênese que estejam atuando sobre o organismo humano (BOONE et al., 1990; SILVA et al., 2004).

O teste de mutagenicidade ou teste de Ames foi especificamente desenvolvido para detectar mutagênese induzida quimicamente e é amplamente utilizado para identificar substâncias que podem produzir alterações genéticas que levam a mutações gênicas. Um composto é considerado mutagênico quando o aumento na dose está diretamente relacionado com o aumento no número de colônias mutantes em uma ou mais linhagens de *Salmonella thyphimurium* dependentes de histidina (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O teste de Ames é mundialmente utilizado como um método de triagem para determinar o potencial mutagênico de novos compostos químicos e drogas uma vez que existe uma alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem (MCCANN et al., 1975; PURCHASE et al., 1978; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Neste trabalho, os ensaios de mutagenicidade *in vitro* mostraram que o EEB de *M.tenuiflora* não induziu mutações em linhagens de *Salmonella thyphimurium*

deficientes na síntese de histidina, sendo considerado então um agente não indutor de mutação. Nos ensaios de atividade antimutagênica o EEB de *M.tenuiflora* apresentou atividade antimutagênica em três das quatro linhagens de *S. thyphimurium* ensaiadas.

Gonçalves (2011) mostrou que os taninos de *Mimosa arenosa* (Jurema vermelha) não induziu mutações nas linhagens de *S. thyphimurium* na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>, entretanto na concentração de 1000 µg.mL<sup>-1</sup> foi observado um acentuado aumento no número de colônias revertentes indicando que os taninos em concentrações mais elevadas apresentam potencial para induzir mutações gênicas.

Horn e Vargas (2003) analisaram o efeito mutagênico e antimutagênico do extrato aquoso de duas plantas utilizadas na medicina popular brasileira (*Maytenus ilicifolia* e *Peltastes peltatus*) com grande quantidade de flavonóides e taninos em sua constituição, nas concentrações de 25, 75, 125, 250, 375 e 500 mg/placa. Foi observado que as infusões de *M.ilicifolia* e *P.peltatus* apresentaram um efeito mutagênico sinérgico na presença de 4-NQNO (Nitroquinolina-1-óxido). O efeito sinérgico foi maior na linhagem TA100, em ambas as espécies, sendo demonstrado em várias concentrações.

A avaliação da indução de micronúcleos é o principal teste *in vivo* em uma bateria de testes genotóxicos e é recomendado por agências fiscalizadoras em todo mundo como parte da avaliação de segurança dos produtos químicos e naturais. O ensaio, quando realizado corretamente, detecta ambos os efeitos: clastogênicos e aneugênicos (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Micronúcleos em eritrócitos jovens surgem principalmente a partir de fragmentos acêntricos ou cromossomos que são incapazes de migrar seguindo o fuso mitótico durante a divisão celular do tecido hematopoiético (SALAMONE; HEDDLE, 1983; OUANES et al., 2003). Um aumento na frequência de micronúcleo em testes com animais tratados com diferentes substâncias é uma indicação de dano cromossômico induzido (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

As células micronucleadas formadas na medula óssea na presença de agentes clastogênicos podem ser detectadas no sangue periférico de camundongos. O teste de

micronúcleo em sangue periférico apresenta várias vantagens, tais como: facilidade na preparação da amostra com pequena quantidade de sangue, facilidade na contagem, avaliação em vários intervalos utilizando o mesmo animal, avaliação de efeitos cumulativos e detecção rápida (VIKRAM et al., 2007)

No presente estudo, a frequência de eritrócitos micronucleados encontrados nos grupos tratados com EEB de *M.tenuiflora* não foi significativamente diferente do encontrado no controle negativo, indicando assim que o EEB de *M.tenuiflora* não induziu um aumento na formação de eritrócitos micronucleados sendo considerado um produto que não age como uma genotoxina.

# *Conclusões*

---

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- O EEB de *M.tenuiflora* contém uma forte presença de saponinas, gomas, fenóis e taninos pirocatéquicos.
- O EEB e os taninos de *M.tenuiflora* apresentaram forte atividade antibacteriana contra linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, portanto de bactérias Gram positivas e Gram negativas.
- A atividade antibacteriana foi caracterizada como bacteriostática.
- O EEB de *M.tenuiflora* não induziu hemólise e apresentou atividade anti-hemolítica nas condições avaliadas.
- O EEB de *M.tenuiflora* não apresentou efeito oxidante em nenhuma das concentrações testadas e ainda apresentou potencial antioxidante, inclusive maior que o encontrado na vitamina C.
- O EEB de *M.tenuiflora* não foi um agente indutor de mutações *in vitro* e apresentou atividade antimutagênica nas concentrações usadas.
- Nos ensaios *in vivo* de genotoxicidade, o EEB de *M.tenuiflora* não foi considerado um agente indutor de dano cromossomal.

# *Referências*

---

**REFERÊNCIAS**

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Paraíba, v.17, p.114-140, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P. Etnofarmacobotânica de uma Bebida Cerimonial no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.78, p. 86-89, 1997.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N.. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.678-689, 2006.

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D.K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**. v.26, p.179-182, 2006.

ALLAKER, R.P.; DOUGLAS, C.W.I. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**\_ v. 33, p. 8-13, 2009.

ALVES, H.M. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. nº 3, p. 01-06. 2001. Disponível em:<http://sbqensino.foco.fae.ufmg.br> . Acesso em 16 Fevereiro 2010.

AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenesis test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-364, 1975.

AMORIM, M.F.D.; DINIZ, M.F.F.M.; ARAÚJO, M.S.T.; PITA, J.C.L.R.; DANTAS, J.G.; RAMALHO, J.A.; XAVIER, A.L.; PALOMARO, T.V.; JÚNIOR, N.L.B. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 448-54, 2007.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. In: **Animais de laboratório: criação e experimentação**, Fiocruz, Rio de janeiro, p. 255-262, 2006.

ANDRADE-LIMA, D. **Contribution to the study of the flora of Pernambuco** [monografia]. Recife: Faculdade de Odontologia, Universidade Rural de Pernambuco; 1954.

ANDREASSI, M.G.; BOTTO, N.; COLOMBO, M.G.; BIAGINI, A.; CLERICO, A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.35, p.265–9, 2000.

ANVISA. Diretoria colegiada. Resolução-RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília: ANVISA; 2010.

ARAÚJO, L. V. C.; LEITE, J. A. N.; PAES, J. B. Estimativa da produção de biomassa de um povoamento de jurema-preta *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. com cinco anos de idade. **Biomassa & Energia**. v. 1, n. 4, p. 347-52, 2004.

ARBOS, K.A., CLARO, L.M., BORGES, L., SANTOS, C.A.M., WEFFORT-SANTOS, M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**. v.523, p.9-20, 2003.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; SILVA, F.F.; RESSEL, L.B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery (impr.)**. v.15, p. 132-139, jan-mar 2011.

BENGHEZAL, M.; ADAM, E.; LUCAS, A.; BURN, C.; ORCHARD, M.G.; DEUSCHEL, C.; VALENTINO, E.; BRAILLARD, S.; PACCAUD, J.P.; COSSON, P.. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular Microbiology**. v. 9, p. 1336-1342, 2007.

BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**., v.105, p.1767-1800, 2005.

BERGONZELLI, G. E.; DONNICOLA, D.; PORTA, N. et al. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3240-3246, 2003.

BERNARDES, R.C.; JORGE, A.O.C.; LEÃO, M.V.P.; Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. **Revista Biociências**, v.10, p. 73-8, 2004.

BEZERRA, D.A.C. **Estudo Fitoquímico, Bromatológico e Microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. 63f. (Dissertação - Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no Semi-Arido) Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Patos, 2008.

BOONE, C.; KELLOFF, G.; MALONE, W. Identification of candidate cancer chemopreventative agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. **Cancer Research**, v.50, p.2-9, 1990.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Failure of the standard battery of short-term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens. **Toxicology** v.196, p. 1-19, 2004.

BRANDÃO, R.; LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; Nogueira, C. W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug Chem Toxicol**, v. 28, p. 397-407, 2005.

BRANDWILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci Technol**, 28, 25-30. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: PNPIC-SUS. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2006. 92p.

BRAUNWALD, E. et al. **Harrison Medicina Interna**. 15. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

CAMARGO, T.M., ALVES, M.I.F., OLIVEIRA, S.J., OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **RBAC**, v.39, p. 95-98, 2007

CAMARGO-RICALDE, S.L. Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (fabaceae-mimosoideae) en México. **Revista de Biología Tropical**. v.8, n.4, p. 939-54, 2000.

CANTERLE, L.P., 2005. **Erva-mate e atividade antioxidante**. Dissertação de mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, p.99.

CAPASSO, R; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71p.58-65, 2000.

CARDOSO, H.T.; SANTOS, M.L. Estudo sobre a presença de antibióticos nos vegetais. **Bras.Med.**, São Paulo, v.62, p.67-70, 1948.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S.. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v.18, p. 314-19, 2008

CHUC, N. T. et al. Improving private pharmacy practice: a multi-intervention experiment in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 55, p. 1148-1155, 2002.

CLARO, L.M.; LEONART, M.S.; COMAR, S.R. NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C and E on oxidative process in human erythrocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 24, p. 531-535, 2006.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **Int Biodeter Biodegradation**, v.51, p.277-82, 2003.

COELHO, H.L. Farmacovigilância: um instrumento necessário. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, p. 871-875, 1998

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p. 272-78, 2005.

COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York. 1981.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. *Practical Haematology*. London: Churchill Livingstone. 2001.

DAVIS, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, p. 375-382, 1994.

DE FLORA, S. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research**, v.366, p.197–238, 1996

DE SOUZA, R.S.O. **Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* [willd.] poir.): enteógeno, remédio ou placebo? uma abordagem à luz da etnofarmacologia** [monografia]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2002.

DELLE MONACHE, F. Determinação estrutural de produtos naturais através da técnica de ressonância magnética nuclear. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B (eds). **Plantas Medicinais sob a Óptica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 101-146.

DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 44, p. 101-106, 1993.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. 2001. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole.

ELIAS, F.; LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; KOGIKA, M. M.; MIRANDOLA, M. S. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v.34, p.413-418, 2004.

ELOFF, J.N.. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p. 711-713.

EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. A. Detection and clinical signification of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in Tertiary Care medical Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2061-2067, 1997.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 759-767, 1990.

FEBRAFARMA, 2007. Fitoterápico atrai investimentos. Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>. Acessada em Novembro de 2010.

FERREIRA, V.F.; PINTO, A.C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v.33, n.9, p.1829, 2010.

FLESCHEIN, S; FLESCHEIN, M; NITA, S; PAVEL, E; MAGEARU, V.. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roum Biotech Lett**, v. 5, p. 479-495, 2000

GILBERT, P.; MCBAIN, A.J. Biofilms: their impact on health and their recalcitrance toward biocides. **American Journal of Infection Control**, v.29, p.252-255, 2001.

GONÇALVES DE LIMA, O. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XIV. Ocorrência de antibióticos em madeiras de lei do Brasil. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.2, p. 19-33, 1959.

GONÇALVES, G.F. **Avaliação das atividades citotóxica e genotóxica de taninos de *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. (MIMOSACEAE)**. 76 p. (Dissertação-Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, 2011.

GONÇALVES, C. A.; LELIS, R. C. C. Teores de taninos da casca e da madeira de cinco leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.167 - 173, 2001.

GUIMARÃES, J.; MEDEIROS, J.C.; VIEIRA, L.A. Programa fitoterápico farmácia viva no SUS-Betim, Minas Gerais. **Divulgação em Saúde Pública para Debate**, v.36, p. 41-47. 2006.

GULLO, V.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today**. v. 2, p. 2005.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. **Adv. Pharmacol.**, v.38. p.3-20, 1997.

HAYASHI, M.; TICE, R.R.; MACGREGOR, J.T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D.H.; KIRSCH-VOLDERS, M. OLESON, F.B.JR; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**. v. 312, p. 293-304, 1994.

HOEFEL, R.; VIDOTTI, C.C.F.; MENEZES, E.S.; PINHEIRO, S.. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Bol Farmacot**, v. 11. p. 1-4, 2006

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem I Oswaldo Cruz** , v.97, p.1027-1031, 2002.

HOMAR, J.C. Medicinas complementarias o alternativas? Un dilema para el sistema público. **Atención Primaria**, v.35, p. 389-391, 2005.

HORN, R. C.; VARGAS, V. M. F. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. **Mutagenesis**, 18 (2), 113–118, 2003.

IGNARO, L.J.; CIRINO, G. CASINI, A.; NAPOLI, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: na overview. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, p.879-886, 1999.

IVANOV, I.; TOLEKOVA, A.; CHAKAAROVA, P. Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 70, p.641-48, 2007.

JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. 4.ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986. 1221p.

JAIN, N.C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**, v.63, p.411-423, 1973.

JIANG Y, MASSIOT G, LAVAUD C, TEULON JM, GUÉCHOT C, HAAG-BERRURIER M, et al. Triterpenoid glycosides from the bark of mimosa tenuiflora. **Phytochemistry**, v.30, p. 2357-2360,1991.

JUTEAU, F.; MASOTTI, V.; BESSIERE, J.M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Antibacterial and antioxidant activities of Artemisia annua essential oil. **Fitoterapia**, v.73, p. 532-535,2002.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000..

LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., GODINHO, R.O., LIMA, M.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.183-199. 2002.

LIONÇO, MI.; DE SOUZA, TP.; PETROVICK, P.R. Avaliação cromatográfica de polifenóis presentes nas partes morfológicas de *Phyllanthus Niruri*. **Caderno de Farmácia**, v. 17, p.117-120, 2001.

LOGUERCIO A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v.35, n.2, 2005.

LOZOYA, X., NAVARRO, V., ARNASON, J.T., KOURANY, E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret (tepescohuite). I. Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archivos de Investigacion Medica**.v.20, p.87–93, 1989.

MACÊDO-COSTA, M.R.; PEREIRA, M.S.V.;PEREIRA, L.F.;PEREIRA, A.V.; RODRIQUES, O.G. Atividade Antimicrobiana e Antiaderente do Extrato da Mimosa tenuiflora (Willd). Poir. Sobre Microrganismos do Biofilme Dentário. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa,v.9, p.161-165, 2009.

MACHADO TB, PINTO AV, PINTO MCFR, LEAL ICR, SILVA MG, AMARA CF, KUSTER LRM, NETO KR. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p. 279-284, 2003.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; GRYNBERG,V.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica nova**, São Paulo, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. **The Bacteria**. In: BROCK – Biology of Microorganisms, p. 718-814, New Jersey, Prantice Hall, 2004.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora; 2004. p. 237-246.

MAKINDE, M.O.; BOBADE, P.A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, v.57, n.3, p.343-348, 1994.

MANSOURI, A., LURIE, A.A. Concise review : methemoglobinemia. **American Journal of Hematology**. v. 42, p. 7-12, 1993.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**. v. 113, p. 173-215, 1983.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC, 1995.

MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens and mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol.72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

MECKES-LOZOYA M, LOZOYA X, MARLES RJ, SOUCY BREAU C, SEN A, ARNASON JT. N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* Bark (Tepescohuite). **Archivos de Investigacion Medica**, v 2, p.175-177,1990a.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. Propiedades farmacológicas *in vitro* de algunos extractos de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). **Archivos de Investigacion Medica**, v.21, p.163-169, 1990b.

METAN, G.; ZARAKOLU, P.; UNAL, S. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. **Journal of Hospital Infection.**, London, v. 61, p. 93-99, 2005.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. Ribeirão Preto (SP): Tecnomedd; 2004.

MOECKEL, G. W.; SHADMAN R.; FOGEL J. M.; SADRZADEH S. M. H. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences**. v.71, p. 2413-424, 2002.

MOREIRA, R.R.D.; SANTOS, L.E.; VARELLA, S.D.; VARANDA, E.A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoidicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v12, p.11-19, 2002.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mut. Res.** v. 455, p. 29-60, 2000.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 461-477, 2007.

NICOLETTI G, SCHITO G, FADDA, G.; BOROS, S.; NICOLOSI, D.; MARCHESE, A.; SPANU, T.; PANTOSTI, A. MONACO, M.; REZZA, G.; CASSONE, A.; GARACI, E. Bacterial isolates from severe infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a nationwide study in the hospital setting. **Journal of Chemotherapy**, v.18, p.589-602, 2006.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **American Journal of Clinical Nutrition**., v. 53, p. S201-S205, 1991.

NORDBERG, J.; ARNÉR, S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol Med**, v. 31,p. 1287-1312, 2001.

NOVAIS, T.S. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14, supl., pp.08-11, 2003.

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Rev Elet Enferm**, v.10, p.189-197, 2008.

OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, J. M. E.; CHIAVONE-FILHO, O.; MEDEIROS, J. T. N. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia** v.14, p 93-104, 1999.

OSBORN, E.M. On the occurrence of antibacterial substances in green plants. **Br.J.Exp.Pathol.**, London, v.24, n.6, p.227-231, 1943.

OUANES Z, ABID S, AYED I, ANANE R, MOBIO T, CREPPY EE, BACHA H Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. **Mutat Res**, v. 538, p. 63-70, 2003.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2720-2722, 2002.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980.

PEREIRA, A.V. **Estudo da ação dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke sobre cepas microbianas de mastite em búfalas** [dissertação]. Patos: UFCG; 2010.

PEREIRA, A. V.; LÔBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R.; MOTA, R. A.; DE LIMA, E. Q.; DE MEDEIROS, E. S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de juremapreta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**, 76, 341- 346, 2009a.

PERRY, G.; PERRY, A.K.; RAINA, A.; NUNOMURA, T.; WATAYA, L.M. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, p.831-834, 2000.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C.; SOUZA, A. B.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, Vol. 32, No. 2, 412-416, 2009

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269, 337-41, 1999.

PURCHASE, I.F.H.; LONGSTAFF, E.; ASHBY, J.; STYLES, J.A.; ANDERSON, D.; LEVEVRE, P.A.; WESTWOOD, F.R. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. **British Journal of Cancer**, v. 37, p. 873-959, 1978.

RAHMAN. S.Z.; SINGHAL, K.C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsala Reports**, v. 17, p 1-4, 2002.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305-309, 1997.

RIBEIRO FILHO, N. **Resistência bacteriana aos antibióticos**. In: Fernandes, A.T.; Fernandes, M.O.V.; Ribeiro Filho, N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área de saúde. São Paulo (SP): Atheneu, 2000.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: **Mutagênese Ambiental**, p. 21-27. Editora da ULBRA. Rio Grande do Sul, 2003.

RISSATO, S. ; ALMEIDA, M. V. ; SILVA, L. C. Estudo do Óleo Essencial de *Eugenia uniflora* como Subsídio para Aplicação como Fitofármaco. *Salusvita*, v. 23, n. 2, p. 209-222, 2004.

RIVERA-ARCE, E., CHÁVEZ-SOTO, M.A., HERRERA-ARELLANO, A., ARZATE, S., AGÜERO, J., FERIA ROMERO, I.A., CRUZ-GUZMÁN, A., LOZOYA, X. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, p. 523–28, 2007.

ROSS, C.A.; MARGOLIS, R,L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clinical Neuroscience Research**, v.5, p.3-14, 2005.

ROTH, E. Oxygen free radicals and their clinical implications. **Acta Chir. Hung**, v.36, p. 302-305, 1997.

ROVER JÚNIOR, L; HÖEHR, N.F; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p.112-119, 2001.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCOLLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals:

summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-24, 2001.

SALAMONE, M.F.; HEDDLE, J.A. The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol. **Chemical Mutagens**, v. 8, p.111-149, 1983.

SALMINEN, J. P.; KARONEN, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. **Functional Ecology**, 25, 325–338, 2011.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Dietary tannins: Consequences and remedies. Boca Raton. **CRC Press**, p.1-310,1990.

SANTANA, C.F.; GONÇALVES DE LIMA, O.; DALBUQUERQUE, I.L.; LACERDA, A.L. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do liber e de alguns componentes do cerne do Pau d'Arco (*Tabebuia avellanedae*). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 8, n. 2, p. 89-94, 1968.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA,C.;FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35, p.275-280, 2010.

SCALBERT, A. **Phytochemistry** 30, 3875, 1991.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHULTES, R.E. A new narcotic gens from the evolution of the identification of the major south american narcotics plants. **Botanical Museum leaflets**, 1978.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., Washington, v. 55, n. 4, p. 1212-20, 2007.

SIEMS, W.G., SOMMERBURG, O. GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clinical Nephrology**. v. 53, S9-S17, 2000.

SILVA CR, MONTEIRO MR, CALDEIRA-DE-ARAÚJO A, BEZERRA RJAC . Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v.14, p.1-3, 2004.

SILVA J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES J. A. P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Editora alcance, 2003. 422p.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-62, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.R.; STEHMANN, J.R. 2003. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. 5ª Edição, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 174 p.

SIMON, M.F.; PROENÇA, M. Phytogeographic patterns of mimosa (mimosoideae, leguminosae) in the cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude center of endemism? **Biological Conservation**, v. 96, p. 279-296, 2000.

SOLER, O. **Biodiversidade, bioeconomia & fitoterapia**. 2000. 220p. Tese (Doutorado em Ciências Sócio-Ambientais no Programa de Desenvolvimento do Trópico Úmido – PDTU. Núcleo de Altos Estudos da Amazônia – NAEA) – Faculdade de Economia, Universidade Federal do Pará, Belém.

SURH, Y.; FERGUSON, L.R. Dietary and medicinalant imutagens and anticarcinogens: molecularmechanisms and chemopreventive potential - highlightsof a symposium. **Mutation Research**, v.523-4, p.1-8, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, Porto Alegre, Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, Rio de Janeiro, Atheneu, 2004.

VARELLA, S.D.; POZETTI, G.L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food Chemical Toxicology**. v.42, p.2029-35, 2004.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v.28, p.519-28, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464-471, 2008.

VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G. Prior bleeding enhances the sensitivity of peripheral blood and bone marrow micronucleus tests in rats. **Mutagenesis**, v. 22, p. 287-291, 2007.

WANNMACHER, L. 2004. Uso indiscriminado de antibiótico e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos**, v.1, p. 1-6, 2004.

WEFFORT-SANTOS, M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008.

WEISBURGER, J.H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research** v. 437, p. 105-112, 1999.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. SOS-chromotest results in a boader context empirical relationships between genotoxic potency, mutagenic potency and carcinogenic potency. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 27, n. 4, p. 270-305, 1996.

WONG, L.P.; KOH, S. P. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, 99, p. 775–783, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Food safety and Foodborne Illness. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and *and modification*. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57, p.1451-1470, 2005.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? **Mutation Research** v. 492, p. 29-38, 2001.

ZEIGER, E.; MARGOLIN, B.H. The proportions of mutagens among chemicals in commerce. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 32, p. 219-225, 2000.