



UNILAVRAS CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LAVRAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

IGOR VALDIVIA FERREIRA

**PERSPECTIVA DE USO DA *PALICOUREA RIGIDA* NA
ODONTOLOGIA**

LAVRAS – MG

2019

IGOR VALDIVIA FERREIRA

**PERSPECTIVA DE USO DA *PALICOUREA RIGIDA* NA
ODONTOLOGIA**

Projeto de monografia apresentada ao Centro
Universitário de Lavras como parte das
exigências do curso de graduação em
Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Teixeira de
Miranda.

LAVRAS – MG

2019

F383p Ferreira, Igor Valdivia.
Perspectiva de uso da Palicourea rígida na odontologia /
Igor Valdivia Ferreira; orientação de Tatiana Teixeira de
Miranda – Lavras: Unilavras, 2019.
33 f.: il.

Monografia apresentada ao Unilavras como parte das
exigências do curso de graduação em Odontologia.

1. Plantas medicinais. 2. Saúde bucal. 3. Extratos
vegetais. I. Miranda, Tatiana Teixeira de (Orient.). II.
Título.

IGOR VALDIVIA FERREIRA

**PERSPECTIVA DE USO DA *PALICOUREA RIGIDA* NA
ODONTOLOGIA**

Monografia apresentada ao Centro Universitário
de Lavras como parte das exigências do curso de
graduação em Odontologia.

APROVADA EM 18 DE SETEMBRO DE 2019

Orientadora

Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Miranda – UNIFAL

Membro da banca

Profa. Dra. Renata, de Carvalho Fouteaux – UNILAVRAS

LAVRAS – MG

2019

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido aos meus pais e familiares, que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar um diferencial em tudo. A minha orientadora Tatiana Teixeira de Miranda que sempre me auxiliou durante o desenvolvimento desse projeto. A Maria Cristina Mendes Costa, que ajudou na coleta do material vegetal e sempre se colocou à disposição, ao professor Cássio Vicente Pereira que entrou em contato com a Faculdade de Odontologia de Piracicaba para conseguir os microrganismos necessários e também a professora Renata de Carvalho Foureaux por se dispor a compor a banca examinadora do presente trabalho.

RESUMO

Introdução: A *Palicourea rigida* é uma espécie medicinal pouco conhecida e estudada. O gênero possui outras espécies mais estudadas e que possuem vários benefícios já comprovados, principalmente, pelo uso na medicina popular para o tratamento de inflamação e infecção do trato urinário e do aparelho reprodutor feminino. **Objetivos:** Avaliar a atividade antimicrobiana de *P. rigida* e o potencial para interação medicamentosa com fármacos utilizados para o controle de infecções bacterianas e fúngicas. **Metodologia:** Foi obtido o extrato etanólico bruto das folhas de *P. rigida* e diluições em série foram testadas contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Como controle positivo, foram utilizados os antibióticos: ampicilina (10µg/mL) e amoxicilina (10µg/mL) para as cepas bacterianas e o antifúngico cetoconazol (2mg/ml) para a levedura. Realizou-se a comparação da eficiência e sensibilidade do método de difusão em meio sólido e do método de difusão em meio líquido, sendo determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos da planta e dos antibióticos. O potencial de ação dos extratos com os fármacos foi também avaliado. **Resultados:** Apenas no método de microdiluição em caldo foi obtido resultado sinergista, na concentração de 12,5mg/ml de extrato etanólico da planta.

Palavras-chaves: Plantas medicinais, saúde bucal, extratos vegetais

ABSTRACT

Introduction: *Palicourea rigida* is a little known and studied medicinal species. The genus has other species more studied and that have several benefits already proven, mainly by the use in folk medicine for the treatment of inflammation and infection of the urinary tract and female reproductive system. **Objectives:** To evaluate the *P. rigida* antimicrobial activity and the potential for drug interaction with drugs used to control bacterial and fungal infections. **Method:** The crude ethanolic extract of *P. rigida* leaves was obtained and serial dilutions were tested against *Candida albicans* (ATCC 10231), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As a positive control, antibiotics were used: ampicillin (10 μ g / mL) and amoxylin (10 μ g / mL) for bacterial strains and antifungal ketoconazole (2mg / ml) for yeast. The efficiency and sensitivity of the solid diffusion method and the liquid diffusion method was compared, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts and antibiotics was determined. The action potential of the extracts with the drugs was also evaluated. **Results:** Only in the broth microdilution method was a synergistic result obtained at a concentration of 12.5mg / ml of ethanolic extract of the plant.

Key words: Medicinal plants, oral health, plant extracts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Folhas de <i>Palicourea rígida</i> na reserva Biológica UNILAVRAS-BOQUEIRÃO.....	14
Figura 2	Placa de PGA com <i>C. albicans</i> em contato com extrato de <i>P. rigida</i> 25mg/ml.....	20
Figura 3	Placa de BHI com <i>S. mutans</i> em contato com extrato de <i>P. rigida</i> 25mg/ml.....	20
Figura 4	Placa de BHI com <i>S. salivarius</i> em contato com extrato de <i>P. rigida</i> 25mg/ml.....	20
Figura 5	Placa de BHI com <i>S. aureus</i> em contato com extrato de <i>P. rigida</i> 25mg/ml.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Média e desvio padrão do raio dos halos de inibição (mm) dos antibióticos e antifúngico	21
Tabela II	Concentração inibitória mínima em mg/ml da amoxicilina, ampicilina e cetoconazol.....	21
Tabela III	Concentração sub inibitória em mg/ml da amoxicilina, ampicilina e cetoconazol.....	22

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	10
2- REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Plantas Medicinais.....	12
2.2. <i>Palicourea rigida</i> Kunth	13
2.3. Plantas medicinais na Odontologia	15
3- MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Obtenção do extrato vegetal	18
3.1.1 Coleta do Material	18
3.1.2 Preparação do Extrato.....	18
3.1.3 Preparação da Solução Estoque e Diluições	18
3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	18
3.2.1 Microrganismos testes	18
3.2.2 Testes de sensibilidade aos extratos	19
3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	20
3.2.4 Avaliação do potencial para interação medicamentosa	20
4- RESULTADOS	21
5- DISCUSSÃO.....	24
6- CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS	27

1- INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a própria humanidade e possuem um alto potencial fitoterápico que é pouco estudado. Muitas dessas plantas são utilizadas por um grande número de pessoas, sua comercialização vem crescendo e aumentando a facilidade de obtenção do material biológico, com isso, o manejo indevido pode causar grandes transtornos e riscos à sociedade. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, sendo que o controle da comercialização em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais não é levado a sério pelos representantes do poder público (SOUZA, 2019).

Apenas em 2006 a política para o uso de plantas medicinais no serviço público – PNPIC (BRASIL, 2006) foi estabelecida no Brasil. Na área de competência do cirurgião-dentista em 2008, quando o Conselho Federal de Odontologia regulamentou o exercício de práticas integrativas e complementares à saúde bucal (CFO, 2008). O Ministério da Saúde divulgou a relação nacional de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde – RENISUS que lista 71 espécies de vegetais que são amplamente utilizadas pela população brasileira que potencialmente pode gerar produtos de interesse para o SUS. A finalidade da lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (MAZZARI; PRIETO, 2014; ANDRADE, 2018).

A importância das plantas medicinais deve-se não só pela contribuição como fonte natural de fármacos, mas, também, por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nas plantas. A procura por tratamentos medicinais alternativos, como a fitoterapia, é crescente (BADKE, 2008; FENALT, 2016). Cerca de 70% a 90% da população dos países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais na atenção primária a saúde. Tal uso também é observado entre países industrializados, como França, Canadá, Alemanha e Itália (FENALT, 2016).

Incluída nas plantas de uso na medicina popular, a *Palicourea rigida*, conhecida também por bate-caixa, pertence à família *Rubiaceae*, tem sido utilizada a pouco tempo para tratamento de inflamações e infecções do trato urinário e do aparelho reprodutor feminino. O estudo fitoquímico dessa planta mostra que em sua constituição há flavanóides, iridóides,

peptídeos, taninos, cumarinas, terpenoides e esteroides, alcaloides e antraquinonas; ainda constitui uma fonte promissora de substâncias bioativas com atividades antioxidante, antibacteriana, inseticida, antinociceptiva e anti-inflamatória, justificando o uso popular e reunindo características importantes de interesse do SUS (MORAES et. al., 2013, MORAES, 2017).

Na Odontologia, ainda não se tem estudos sobre a utilização e eficácia da *P. rigida* para qualquer tipo de tratamento, tornando importante a verificação de seu potencial de ação sobre os microrganismos comensais da cavidade bucal, o que justifica a realização desse projeto.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas Medicinais

Em estudo realizado por Newman e Cragg (2012) foi mostrado que de 1023 drogas lançadas desde janeiro de 1981 até outubro de 2010, apenas 37% delas tem origem verdadeiramente sintética. A análise demonstrou a contribuição permanente e valiosa da natureza como fonte não só de potenciais agentes quimioterápicos, mas também de compostos que servem de base e inspiração para a semi-síntese ou síntese total de novas drogas. A importância das plantas medicinais deve-se não só por sua contribuição como fonte natural de fármacos, mas, também, por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas.

O Brasil é considerado um país com rica biodiversidade. O número estimado de espécies conhecidas no Brasil gira em torno de 170 a 210 mil espécies. Já o número de espécies que o país abriga é calculado em torno de 1,8 milhões de espécies, indicando que conhecemos apenas 11% da nossa biodiversidade. A cada dia novas espécies são descritas para o Brasil. Para as angiospermas, são descritas em média 169 novas espécies por ano ou, aproximadamente, uma nova espécie a cada dois dias (SiBBR, 2016).

Aproximadamente 74% dos principais produtos medicinais obtidos de fontes vegetais foram descobertos através de orientação baseada em resultados revelados pela medicina popular. Produtos farmacológicos são utilizados nos países em desenvolvimento, países que possuem grande biodiversidade competem em mercados bilionários, como o farmacêutico e o de suplementos alimentares, índice que justifica a busca por novos conhecimentos (BRAZ FILHO, 2010).

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança. Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos científicos para permitir o seu uso seguro e eficaz, carecem de maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (MORAES, 2013).

2.2. *Palicourea rigida* Kunth

O gênero *Palicourea* (Rubiaceae) possui, aproximadamente, 230 espécies de arbustos e arvoretas, distribuídas do México até o nordeste da Argentina. Na América do Sul, um dos centros de dispersão é a região do Planalto-Centro Sul do Brasil, com cerca de 37 espécies (COELHO, 2003). O interesse químico e farmacológico pelo gênero *Palicourea* partiu de verificação que espécies deste gênero, comuns no Cerrado brasileiro, são utilizadas indiscriminadamente para fins medicamentosos por grande parte da população, sem conhecimento ou preocupação com possíveis efeitos tóxicos. Geralmente são utilizadas no tratamento de infecções fúngicas, tosses e dores de estômago. *Palicourea rigida* Kunth (figura 1) é uma das espécies endêmicas do Cerrado brasileiro que está em grande risco de extinção, principalmente no estado de Goiás (GAVILANES, 2016).

Segundo Siqueira (2004), dados ecológicos mostram evidência da susceptibilidade dessa espécie a mudanças de temperatura, indicando que ela será extinta se a temperatura média aumentar em 1,8-2° C. Além disso, por causa da eficácia no tratamento de afecções renais, essa planta está sendo indiscriminadamente coletada pelos habitantes do Cerrado (RODRIGUES, 2001), comprometendo sua sobrevivência.

P. rigida, conhecida popularmente como douradão, douradinha, bate-caixa, chapéu de couro ou gritadeira é utilizada na medicina popular na forma de infusão e decocto das folhas, devido às suas propriedades como depurativo nas doenças renais, expectorante, bronquites, doenças pulmonares e nas inflamações no aparelho reprodutor feminino (SILVA; KATO, 2005).

Na literatura há registro do isolamento do iridoide loganina (LOPES et al, 2004) e triterpenos (BOLZANI et al., 1992), bem como da atividade biológica evidenciada nas frações oriundas do fracionamento ácido-base do extrato bruto etanólico das folhas em diferentes bactérias patogênicas ao homem (SILVA; KATO, 2005).

Rosa et al., (2010) obtiveram o extrato bruto das folhas assim como as frações enriquecidas de alcaloides. Os perfis cromatográficos da fração em acetato de etila e do alcaloide indólico, vallesiachotamina, foram obtidos por CLAE em fase reversa. A fração acetato de etila, após fracionamento resultou no isolamento de dois tipos de flavonoides. Segundo os pesquisadores substâncias antioxidantes estão presentes na fração acetato de etila

das folhas de *Palicourea rigida* e podem, pelo menos parcialmente, justificar o uso popular da planta. Os flavonoides identificados por Rosa et al., 2010, contribuem, significativamente, para o conhecimento do perfil químico das Rubiáceas já que esta classe de compostos é amplamente utilizada como marcadores quimiotaxonômicos em algumas espécies. O trabalho dos pesquisadores foi o primeiro relato de isolamento de flavonoides no gênero *Palicourea* e, assim sendo, a espécie *P. rigida* pode representar mais uma fonte promissora de fitoantioxidante para futura aplicação em fitoterápicos que possam combater os radicais livres e doenças associadas. Esses dados demonstram a importância de espécies desse gênero, amplamente distribuído na região do Cerrado e evidenciam a relevância de estudos fitoquímicos e farmacológicos de *P. rigida*, espécie pouco estudada, no que se refere às suas ações antimicrobianas.

Moraes (2013) avaliou o potencial químico-farmacológico de *P. rigida* com o objetivo de verificar a adequação aos padrões normativos do Sistema Único de Saúde (SUS). Utilizaram o extrato etanólico que sofreu fracionamento por partição, produzindo as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. Foram realizadas prospecção fitoquímica, quantificação de fenóis totais e flavonoides por espectrofotometria e análise por cromatografia líquida de alta eficiência. A toxidez aguda foi determinada e as atividades antinociceptiva (testes de contorções, formalina e placa quente) e anti-inflamatória (ensaios de edema de pata e pleurisia) foram realizadas. Flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e esteroides, alcaloides e antraquinonas foram detectadas em *P. rigida*. Os fenóis totais variaram entre 3,72 e 28,05 g/100 g, enquanto os flavonoides foram de 1,95 e 14,15 g/100g. Rutina e quercetina foram identificadas nas frações em acetato de etila e butanólica, respectivamente. Os resultados indicaram que *P. rigida* constitui promissora fonte de substâncias bioativas com atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória, justificando o uso popular e reunindo características importantes de interesse do SUS.

Albuquerque et al., (2015) analisaram o uso de fitoterápicos nos ambientes de promoção a saúde e sua aceitação pela população e profissionais da área, concluindo que a aceitação da fitoterapia na sociedade brasileira é amplamente esperada.

Lima Neto et al., (2015) fizeram análise quantitativa de metabólitos secundários de várias espécies medicinais, coletadas no Cerrado de Mato Grosso. Extratos etanólicos das folhas de *P. rigida* foram submetidos à análise fitoquímica preliminar para identificação das

principais classes de metabolitos secundários e à quantificação do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e cumarinas. O estudo descreve a atividade antimicrobiana, antioxidante e a toxicidade preliminar frente a larvas de *Artemia salina*.

Figura 1: Folhas de *Palicourea rígida* na reserva Biológica UNILAVRAS-BOQUEIRÃO

Foto: Do autor.



2.3. Plantas medicinais na Odontologia

Em estudo sobre a utilização de plantas medicinais em Odontologia no estado do Mato Grosso, Borba et al., (2008) relataram que as espécies mais citadas foram a camomila (*Matricaria chamomilla* L.) para diminuir o incomodo da erupção dentária, o açafraão (*Crocus sativus* L.) para tratar estomatites e a arnica-da-serra (*Brickelia brasiliensis* Spreng.) para diminuir a dor de dente. A folha foi a parte da planta mais utilizada, e o chá obtido por decocção, a forma de uso mais comum. Entre as 26 indicações terapêuticas para saúde bucal, destacou-se dor de dente, com 19 plantas (21,84% das espécies vegetais citadas), seguida de inflamação de dente, com 16 (18,39%), acalmar a dentição, com 12 (13,79%), anti-inflamatório, com 11 (12,64%), coceira na gengiva (para nascer dente de criança), com 10 (11,49%). Os autores concluíram que as plantas medicinais citadas são empregadas como

alternativa terapêutica para a saúde bucal, seguindo um padrão definido entre os residentes do bairro.

Francisco (2010) discutindo o tema sobre Fitoterapia e Odontologia concluiu que, apesar do seu uso milenar, ainda é discriminada por grande parte dos profissionais de saúde, inclusive na área odontológica, na qual a fitoterapia pode agregar benefícios ao controle de formação do biofilme dental e tratamento de afecções bucais, além de outras vantagens como seu baixo custo e grande efetividade. Com a implantação da PNPIC no SUS, surge a esperança de um maior investimento em pesquisas envolvendo a biodiversidade de plantas brasileiras, valorizando o conhecimento popular e motivando a industrialização de produtos naturais. Estes fatores ressaltam a importância do estudo da fitoterapia nos cursos de graduação na formação dos profissionais da saúde.

Em experimento utilizando o extrato etanólico da casca de *Pithecellobium cochiliocarpum* Jesus et al., (2010) observaram ação antimicrobiana significativa e atividade inibitória mínima de aderência *in vitro* sobre as linhagens de *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. salivares* e *Lactobacillus casei*, presentes no biofilme bacteriano supra gengival, apresentando-se como opção terapêutica para as infecções orais, sendo acessível à população, uma vez que tem seu uso difundido na medicina popular. *Pithecellobium cochiliocarpum* (Gomez) Macbr é uma árvore de grande porte, endêmica do Brasil pertencente à família Leguminosae, encontrada na Mata Atlântica. Sua decocção tem sido amplamente utilizada pela população devido a sua propriedade antisséptica, cicatrizante, anti-inflamatória, analgésica e antiulcerogênica. Estudos fitoquímicos relatam a presença de saponinas, flavonoides, catequinas e terpenos. Poucos estudos têm demonstrado suas atividades biológicas.

Cavalcante (2010) através de estudo etnobotânico em diversos municípios do nordeste brasileiro, identificou as plantas mais utilizadas pela população. A autora avaliou a atividade antimicrobiana e o potencial para interações medicamentosas com antibióticos de cinco plantas mais citadas no estudo etnobotânico. Os resultados obtidos indicaram que as plantas medicinais são utilizadas popularmente como recurso terapêutico na área da Odontologia e que a associação das plantas e dos antibióticos ensaiados apresentou potencial para promover interações medicamentosas sinérgicas ou antagônicas. A autora concluiu que o uso simultâneo com medicamentos merece maior atenção, visto que o uso indiscriminado de plantas

medicinais ou de sua associação com medicamentos sintéticos, em regime de automedicação pode trazer reações indesejáveis.

Almeida et al., (2013) realizaram uma prospecção tecnológica sobre as aplicações de bioprodutos na Odontologia por meio do mapeamento de patentes nas bases de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial, World Intellectual Property Organization, European Office Patent e United States Patent and Trademark Office. Como resultados verificou-se que ainda é discreto o desenvolvimento de tecnologias que envolvem produtos obtidos de plantas medicinais para serem utilizados na odontologia. Levando em consideração as bases que foram consultadas, foi possível observar que a pesquisa e aplicação tecnológica de bioprodutos na odontologia ainda é uma lacuna a ser preenchida. Os autores sugerem como uma das causas, o complexo processo de depósito de propriedade intelectual e a legislação que versa sobre propriedade intelectual existente em nosso país ou pelo longo período de sigilo (que dura até 18 meses).

Evangelista et al., (2013) realizaram um levantamento da comercialização de plantas medicinais e estudo etnobotânico para identificação das principais plantas medicinais indicadas e utilizadas nas patologias orais nos atendimentos odontológicos ambulatoriais na cidade de Manaus. Os resultados demonstraram a existência de comercialização de plantas medicinais para patologias orais, mas entre os Cirurgiões-Dentistas e entre os pacientes, apenas 8% e 7,61%, respectivamente, utilizaram plantas medicinais para alterações patológicas orais. Os autores concluíram que as plantas medicinais comercializadas na cidade de Manaus são utilizadas de maneira empírica e que, apesar da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), novas políticas públicas de saúde devem inserir plantas medicinais e fitoterápicos de uso oral na rede pública de saúde na cidade de Manaus.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato vegetal

3.1.1 Coleta do Material

A espécie botânica utilizada foi a *Palicourea rigida*, pertencente à família *Rubiaceae* proveniente da Reserva Biológica UNILAVRAS-BOQUEIRÃO localizada no Município de Ingaí, sul de Minas Gerais. A área total, de aproximadamente, 160 hectares, está situada a 21°20'47''Sul e 44°59'27''Oeste, entre 1100 e 1250 metros de altitude.

3.1.2 Preparação do Extrato

As amostras de folhas foram lavadas em água destilada e passadas por um processo de esterilização com Hipoclorito de Sódio 1% e álcool 70°GL, para evitar que microrganismos que estejam nas folhas interfiram na produção do extrato, e secas em estufa à temperatura de 40 °C, até atingir peso constante. As folhas secas e pulverizadas foram submetidas à maceração exaustiva com etanol 96 °GL, à temperatura ambiente. A solução obtida, após filtração foi concentrada com auxílio de um evaporador rotativo a uma temperatura de 40°C. Após evaporação do solvente, foi obtido o extrato etanólico bruto das folhas de *P. rigida*. Esse extrato bruto foi utilizado para se fazer as diluições necessárias.

3.1.3 Preparação da Solução Estoque e Diluições

A solução estoque da planta *P. rigida* foi preparada de modo a conter 25mg de extrato para cada mL de Dimetilsulfóxido DMSO®. A concentração inicial foi obtida a partir de 250mg do extrato da planta dissolvido em 10mL de DMSO®. Foram preparadas outras três soluções com concentração final de 12,5mg/ml, 8,33mg/ml e 5mg/ml pela diluição de 2ml, 1ml e 1ml do extrato em 2ml, 2ml e 4ml de água destilada respectivamente.

3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.2.1 Microrganismos testes

Os microrganismos envolvidos neste experimento foram provenientes da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP): as espécies microbianas utilizadas foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Todos os testes foram realizados em três repetições em ambiente asséptico na capela de fluxo laminar. Foi

utilizado o meio BHI (Brain Heart Infusion) para as bactérias e o meio Batata dextrose ágar (BDA) para a levedura.

A seleção destas cepas deveu-se ao fato de tratar-se de bactérias envolvidas no desenvolvimento da cárie dentária, considerada o principal problema de saúde bucal do país, e no caso de *S. aureus* e *C. albicans*, por tratar-se de patógenos oportunistas relevantes da cavidade bucal.

3.2.2 Testes de sensibilidade aos extratos

Para a realização da atividade antibacteriana, foi utilizado o método de difusão em disco, seguindo uma metodologia padronizada recomendada pelo NCCLS descrita originalmente por Bauer et al (1966) e replicada por Miranda et al. (2016). Cepas padrão dos microrganismos testes foram incubadas em meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) *overnight* a 37°C para ativação das mesmas. A padronização do inóculo foi assegurada através da comparação com a escala nefelométrica de 0,5 de McFarland segundo Da Silva et al. (2018), o que equivale a um inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC. Para este fim, foi adicionado 0,5mL de cloreto de bário a 1% em 99,5mL de ácido sulfúrico a 1 %. A densidade do inóculo foi determinada por comparação em espectrofotometria a um comprimento de onda de 530nm a uma transmitância de 88% (MORAIS, 2018).

Alíquotas de 100 µL aproximadamente destas suspensões foram transferidas com o auxílio de micropipetas para placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura, com uma espessura aproximada de 4 mm. Foram adicionados discos de papel filtro de 6mm de diâmetro contendo 20 µL de solução do extrato nas concentrações de 25mg/ml, 12,5mg/ml, 8,33mg/ml e 5mg/ml.

Como padrão positivo foram utilizados dois antibacterianos e um antifúngico, que também serviram para o estudo de interação medicamentosa planta-medicamento sintético. Como padrão negativo foi utilizada água destilada. Os antibióticos, adquiridos da Sigma® foram: Ampicilina (10µg/ml) e Amoxicilina (10µg/ml). O antifúngico foi o Cetoconazol (2mg/ml). As placas foram acondicionadas em estufa a 37° C por 24 horas. Os testes foram feitos com 3 repetições avaliando-se o diâmetro dos halos de inibição formados em volta dos discos utilizando-se uma régua (ALCANTRA et al. 2019).

3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos e dos extratos etanólicos de *P. rigida* foi realizada através do modelo experimental de difusão em fase líquida (microdiluição em caldo) conforme descrito por Tintino (2015) com modificações. Foram utilizadas microplacas TPP® estéreis de 96 poços em forma de U distribuídos em 9 linhas e 12 colunas. Cada poço recebeu 20 µL de inóculo, meio de cultura e soluções de antibióticos/antifúngico/extrato, determinando volume final de 100 µL. Nos poços foram distribuídas as soluções diluídas do extrato de modo a conter as concentrações finais de 3,57 a 25mg/ml, antibióticos nas concentrações finais de 0,714 a 10µl/ml, antifúngico nas concentrações de 0.25 a 2mg/ml, a solução estoque dos antibióticos e antifúngico foi utilizada como controle positivo e o BHI, água destilada e o inóculo, como controle negativo. Após o preenchimento dos poços as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após esse tempo, foi adicionado 30 µL de resazurina Sigma® preparada em solução aquosa (0,01%). As placas foram incubadas a 37°C por mais uma hora, quando então foi procedida a leitura visual. A indicação de cor rosa é indicativa de transformação da resazurina em resorfurina e foi interpretada como presença de células viáveis (ALVES, 2008; DIAS, 2018). A CMI é representada pela menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos pesquisados.

3.2.4 Avaliação do potencial para interação medicamentosa

Para esta avaliação foram realizados os procedimentos de microdiluição em caldo contendo concentrações dos antibióticos associados com os extratos em concentrações padronizadas, de forma a reproduzir o modelo de difusão em meio líquido segundo Tintino (2015). Para se verificar o potencial de associação positivo (efeito sinérgico) ou negativo (efeito antagônico) cada poço recebeu a solução antibiótica e do extrato em concentração sub-CIM. Após incubação, foi adicionada a resazurina e os procedimentos de leitura foram os mesmos descritos anteriormente.

4- RESULTADOS

Pelo método da difusão em disco, o extrato da planta *P. rígida* não apresentou atividade bactericida nem fungicida mesmo em sua maior concentração (25mg/ml), não sendo possível a visualização de nenhum halo de inibição. Porém, foi possível observar que nos locais onde há presença do extrato, os microrganismos tiveram mais dificuldade para se reproduzir.

Figura 2:

Placa de PGA com *C. albicans* em contato com extrato de *P. rigida* 25mg/ml.



Figura 3:

Placa de BHI com *S. mutans* em contato com extrato de *P. rigida* 25mg/ml.

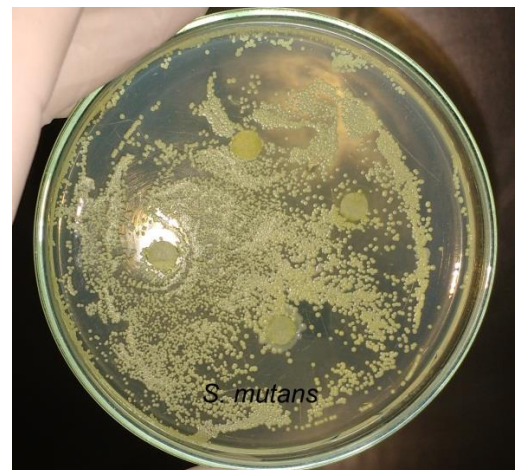


Figura 4:

Placa de BHI com *S. salivarius* em contato com extrato de *P. rigida* 25mg/ml.

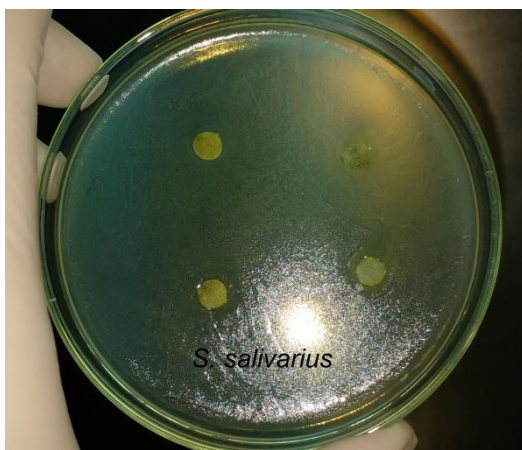


Figura 5:

Placa de BHI com *S. aureus* em contato com extrato de *P. rigida* 25mg/ml.



Para os antibióticos Ampicilina (10 μ g / mL) e Amoxicilina (10 μ g/ mL) e o antifúngico Cetoconazol (2mg/mL), o resultado foi positivo conforme mostra a tabela I.

Tabela I: Média e desvio padrão do raio dos halos de inibição (mm) dos antibióticos e antifúngico.

	Amoxicilina	Ampicilina	Cetoconazol
<i>S. mutans</i> :	22,12 (\pm 0,67)	20 (\pm 0)	-
<i>S. salivarius</i> :	21,5 (\pm 1,5)	19 (\pm 0)	-
<i>S. aureus</i> :	21,33 (\pm 1,3)	20(\pm 0)	-
<i>C. albicans</i> :	-	-	10(\pm 0)

Com relação ao método de difusão em caldo dos extratos, o resultado foi considerado positivo apenas para as cepas de *Candida albicans*, visto que foi a única que apresentou resultado positivo na primeira diluição (12,5 mg/ml), pois na concentração inicial (25 mg/ml) o solvente DMSO atua como bactericida e fungicida em todas as cepas testadas nesse projeto.

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foi considerada como 25 mg/ml para as cepas de *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. aureus* e de 12,5 mg/ml para as cepas de *C. albicans*. Para os antibióticos e o antifúngico, a CIM foi encontrada também pelo método de difusão em caldo e os resultados estão propostos na tabela II.

Tabela II: Concentração inibitória mínima em mg/ml da amoxicilina, ampicilina e cetoconazol.

	Amoxicilina	Ampicilina	Cetoconazol
<i>S. mutans</i> :	1:4096	1:256	-
<i>S. salivarius</i> :	1:8192	1:128	-
<i>S. aureus</i> :	1:8192	1:256	-
<i>C. albicans</i> :	-	-	1:4

Para realizar a interação medicamentosa foram utilizados os antibióticos, antifúngico e extrato na concentração sub-CIM, ou seja, uma diluição a baixo da CIM, de acordo com a tabela III.

Tabela III: Concentração sub inibitória em mg/ml da amoxicilina, ampicilina e cetoconazol.

	Amoxicilina	Ampicilina	Cetoconazol	Extrato
<i>S. mutans:</i>	1:8192	1:512	-	1:1
<i>S. salivarius:</i>	1:8192	1:256	-	1:1
<i>S. aureus:</i>	1:16384	1:512	-	1:1
<i>C. albicans:</i>	-	-	1:8	1:4

A associação entre fármacos e extrato vegetal não produziu efeito sinérgico, tendo esta conclusão sido comprovada após fazer a cultura das interações em placas de petri, utilizando o meio BHI para as bactérias e PGA para o fungo, deixando as culturas na estufa por 24 h, tornando possível a visualização de que ainda haviam colônias ativas.

5- DISCUSSÃO

Segundo Souza (2017), devido a imensa quantidade de plantas medicinais utilizadas para tratar doenças, é fundamental que sejam realizados estudos de cunho científico, tendo em vista que o Ministério da Saúde incentiva o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para o tratamento de doenças. Nesse sentido, deve ser feita a avaliação *in vitro* da posologia correta para sua utilização e posteriormente, verificação de possíveis efeitos colaterais e testar sua toxicidade *in vivo*.

Para *C. albicans*, Freitas (2015) e Pádua (2013) em estudos com extratos aquosos de folhas de *B. anisandra*, relataram alta sensibilidade na concentração inibitória mínima de 31,25 mg /mL. No presente estudo, foi observado que a *P. rigida*, na concentração inibitória mínima de 12,5 mg/ml, também atua na inibição da *C. albicans*, abrindo espaço para novas pesquisas para testar a interação entre os dois extratos.

Segundo Amparo (2018), o método de difusão em disco é amplamente utilizado devido a sua simplicidade e baixo custo para realização, porém, não apresenta sensibilidade semelhante ao método de diluição em caldo, seja ela macro ou micro, que é considerado o melhor método para avaliar a atividade antimicrobiana de plantas medicinais. Além da disso, esse método possui vantagens como reprodutibilidade, pequena quantidade de amostra requerida e possibilidade de teste simultâneo de um grande número de amostras.

No que diz respeito à metodologia de teste da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, Bona (2014) ressalta que o método de microdiluição em caldo é consideravelmente mais sensível que o método de difusão em disco. No presente estudo, podemos observar que o DMSO atua também como agente bactericida e fungicida no método de microdiluição em caldo, o que interfere nos resultados, mesmo não ocorre no método de difusão em disco, não apresentando nenhuma inibição aparente do crescimento dos micro-organismos.

De nosso conhecimento, poucos estudos avaliam a ação antimicrobiana de *P. rigida*. No entanto, outros extratos vegetais apresentam reconhecida atividade microbiana ou microbiostática. Resultados satisfatórios em relação à inibição do crescimento de *C. albicans* foram também observados por Barbosa *et al.* (2017), que descobriram que o óleo essencial da folha e da flor de erva-cidreira, nas concentrações de 15 µL/mL e 16 µL/mL, produziram halos de inibição de até 20 mm. Antagonicamente, Pereira *et al.* (2019) quando da utilização

da tintura de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), não obteve atividade inibitória, independente das concentrações utilizadas. Os resultados preliminares sobre a ação antifúngica da *P. rigida* obtidos neste trabalho associados àqueles que reportam ação antimicrobiana de outras plantas encorajam a realização de estudos mais aprofundados sobre o potencial da espécie vegetal utilizada no presente trabalho.

Cunha et al. (2016), utilizando o extrato etanólico de *P. rigida* no método de difusão em disco, assim como no presente estudo, também obtiveram resultados negativos na tentativa de inibir o crescimento de *C. albicans*. Porém, neste trabalho, foi realizado também o método de difusão em meio líquido, através de placas de 96 poços, comprovando que a *P. rigida* é eficaz contra esta levedura a partir da concentração de 12,5 mg/ml.

Portanto, o uso de plantas medicinais é uma alternativa eficaz e segura que pode contribuir para a diminuição do uso de medicamentos sintéticos, visto que o poder de cura das plantas é utilizado desde o surgimento da espécie humana e hoje, possui sua eficiência comprovada pela ciência. Por se tratarem de produtos naturais, são de grande aceitação para a população, não apenas pela facilidade para a obtenção do produto, mas também por ser mais barato em relação aos sintéticos (LICATA, 2013).

6- CONCLUSÕES

A levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) é susceptível ao extrato etanólico bruto da *Palicourea rigida* na concentração de 12,5mg/1ml.

O método de diluição em caldo é mais sensível e confiável do que o método de difusão em disco para a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

O extrato da *Palicourea rigida* não é viável para a interação medicamentosa com os antibióticos Amoxicilina e Ampicilina assim como para com o antifúngico Cetoconazol.

A propriedade antifúngica da *Palicourea rigida* pode ser utilizada como fitoterápico de baixo custo desde que sejam feitos estudos do seu modo de utilização e de sua biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. R. et al, Uso de Fitoterápicos nos ambientes de promoção da saúde. **Caderno de Cultura e Ciências**, v.14, n.2, p. 95-104, Dez. 2015.

ALCÂNTRA, A. L; CARDOSO, R. C; SOUZA, F. M; ESPINHEIRA, M. J. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo extraído da cápsula do *Eucalyptus urograndis*: uma contribuição significativa para o ramo farmacêutico. **Revista Multidisciplinar e de Psicologia**. V.13, N. 43, p. 455-468, 2019.

ALVES, P. M. et al. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.2, p. 222-224, mar-abr, 2009.

ALMEIDA, A. A. C; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, R. M. Bioprodutos aplicados à odontologia: Prospecção Tecnológica. **Revista Geintec**. São Cristóvão/SE. v. 3, n. 3, p. 155-160, 2013.

ANDRADE, F. S. **O uso de plantas medicinais e fitoterápicos em unidades do SUS no município de São Felipe – BA**. 2018. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). – Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira – BA, 2018.

AMPARO, T. R. *et al*. Métodos para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **INFARMA – Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2018.

BADKE, M. R. **Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais e o cuidado em enfermagem**. [Dissertação] Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria-UFSM; 2008.

BAUER, A. W; KIRBY, W. M; SHERRIS, J. C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. Apr;45(4):493-6, 1966.

BARBOSA, C. S; PEREIRA, R. F; FORTUNA, J. L. Atividade antifúngica do óleo essencial de erva-cidreira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) sobre *Candida albicans*. **Revista biociências**, Taubaté. v. 23, n. 1, p. 53-60, 2017.

BOLZANI, V. S; TREVISAN, L. M. V; YOUNG, M. C. M. Triterpenes of *Palicourea rigida* H. B. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 23, n. 1, p. 20-1. 1992.

BORBA, A. M; MACEDO, M; WALTER, L. R. F; Odontologia alternativa com plantas medicinais na Chapada dos Guimarães – Mato Grosso – Brasil- **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 5, n. 1, p. 43-49, 2008.

BONA, E. A. M; PINTO, F. G. S; FRUET, T. K; JORGE, T. C. M; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006- Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Nacional de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de maio de 2006.

BRAZ FILHO, R. Contribuição Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Química Nova**, v. 3, n. 1, p. 229-239, 2010.

Conselho Federal de Odontologia (CFO). Resolução nº82/12008 de 25 de setembro de 2008. Reconhece e regulamenta o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 de outubro de 2008.

CAVALCANTE, A. L. F. A. **Plantas Medicinais e Saúde Bucal: Estudo Etnobotânico, Atividade microbiana e Potencial para Interação Medicamentosa**. 2010. 203p. Dissertação (Mestrado em Odontologia –Diagnóstico Bucal) –UFPB). João Pessoa, 2010.

COELHO, C. P, BARBOSA, A. A. Biologia reprodutiva de *Palicourea Ruiz & Pavon* (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. **Revista Brasileira Botânica**, v. 26, n. 3, p. 403-413, jul-set, 2003.

CUNHA, L. F. **Plantas do cerrado brasileiro: triagem fitoquímica e de atividades biológicas de espécies nativas do município de Diamantina, região Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais**. 2016. 317 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

DA SILVA, L. L; DE OLIVEIRA, G. M. G; NETO, M. J. Atividade fungicida de plantas do cerrado contra micoses superficiais e cutâneas. **Revista saúde e meio ambiente**, v. 6, n.1, 1-16, janeiro/julho, 2018.

DIAS, J. L; LACERDA, G. E; CABRAL, J. B; MOREIRA, J. F; DIAS, T; NASCIMENTO, G. N. L. Propriedade antimicrobiana e potencial citotóxico in vitro do gel de *Aloe vera*: uma discussão sobre o uso em queimaduras. **Scientia Plena**. v. 14, n. 4, 2018.

EVANGELISTA, S. S. et al. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.15, n.4, p. 513-519, 2013.

FENALT, J. M. et al. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **VITALLE – Revista de ciências da saúde**, [S.l.], v. 28, p. 38-49, dez. 2016. INSS 2177-7853. Disponível em: <<https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/6188/4230>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

FRANCISCO K. S. F. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v.4, n.1, p. 18-24, 2010.

FREITAS, L. B. O; BOAVENTURA, M. A. D; SANTOS, W. L; STEHMAN, J. R; JUNIOR, D. D; LOPES, M. T. P; et al. Allelopathic, cytotoxic and antifungic activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters**. v. 12, p. 9-16, 2015.

GAVILANES, M. L; CASTRO, E. M; PIRES, M. F; PEREIRA, F. J; PEREIRA, M. P. Micromorfometria foliar de *Palicourea rigida* Kunth. (*Rubiaceae*) em ambiente de cerrado e campo rupestre. **Cerne**, v.22, n. 2, p. 163-170, 2016.

JESUS, R. P. F. S. et al. Ação antibacteriana e antiaderente de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. sobre microrganismos orais. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v.9, n.4, p. 331-335, out./dez., 2010.

LICATA, A, MACALUSO, F. S; CRAXÍ, A. Herbal hepatotoxicity: a hidden epidemic. **Internal and Emergency Medicine**. v. 8, p. 13-22, 2013.

LIMA NETO, G.A. et al. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

MACHADO, T. B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, n.3, p.279-84, 2003.

Ministério da Saúde. DAF/SCTIE/MS **Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS, RENISUS**, Brasília DF.2009.

LOPES S, VON POSER, G. L; KERBER, V. A; FARIAS, F. M; KONRATHE. L; *et al.* Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (*Rubiaceae*). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 32, p. 1187-1195, 2004.

MAZZARI, A. L. D. A; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1- 12, 2014.

MIRANDA, C. A. S. F. F; CARDOSO, M. D; BATISTA, L. R; RODRIGUES, L. M. A; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan-mar, 2016.

MORAES, M. A.; ARAÚJO, A. L. A.; SOUSA, O. V. **Análise da legislação sobre o uso de plantas medicinais no Brasil. Potencia químico-farmacológico de *Palicourea rigida Kunth***. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) –UFJF). Juiz de Fora, 2013.

MORAES, M. A; SANTOS, B. C. S; FABRI, R. L et al. Pharmacological potential of *Palicourea rigida kunth*: A possible participation of flavonoid. **Academics Journals**. v. 11, n. 10, p. 194-206, 2017.

MORAIS, J. F. A. **Avaliação de consórcios bacterianos para mitigar os efeitos do estresse hídrico em culturas de soja**. 2018. 39 p. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M.; Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Productis**. v. 75, p. 311-335, 2012.

PÁDUA, M. S; MENDES-COSTA, M. C; MAGALHÃES, J. C; FERREIRA, J. M. S; CASTRO, A. H. F. Assessment of antimicrobial activity *in vitro* of ethanolic extracts of *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 15, n. 3, p. 431-437, 2013.

PEREIRA, A. G.; PUCCI, F. V. C.; COSTA, S. DA S. Teste de inibição de crescimento á cândida para a sensibilização em diferentes concentrações da tintura do *stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n. 3, p. 120-124, 16 ago. 2019.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROSA, E. A. et al. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p. 484-488, Ago./Set. 2010.

SiBBR. **Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira**. Disponível em <http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>. Acesso em 29/08/2016.

SILVA, F. M. A; KATO, L. Estudo Fitoquímico e Atividade Antibacteriana de *Palicourea rígida* (Rubiaceae). Goiânia: PRPPG, UFG, 2005. Relatório de Pesquisa.

SOUZA, B. W. A. DE; BARBOSA, D. B. P.; ROSA, J. G. N.; EDUARDO, A. M. DE L. E N. A importância da atenção farmacêutica e farmácia clínica no uso racional de medicamentos fitoterápicos. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n. Esp. 1, p. 49, 10 de jun. 2019.

SOUZA, J. S. S; GOMES, E. C; ROCHA, T. C; BOGER, B. Uso de plantas medicinais por comunidades do município de Curitiba. **Revista eletrônica multidisciplinar**. v. 10, n. 2, p. 91-97, jul./dez. 2017.

TINTINO, S. R; NETO, A. A. C; MENEZES, I. R. A; OLIVEIRA, C. D. M; COUTINHO, H, D, M. **Acta biológica colombiana**, v 20, n 3, p. 193-200, 2015.

WERKMAN, C. et al. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.3, p.104-111, 2008.