

FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA DE MOSSORÓ/ FACENE/RN

BEATRIZ HELEN JALES DANTAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *VITEX
GARDNERIANA SCHAUER* FRENTE ÀS DOENÇAS GENITO URINÁRIAS:
TRIAGEM DE COMPOSTOS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE**

MOSSORÓ/RN

2018

BEATRIZ HELEN JALES DANTAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *VITEX
GARDNERIANA SCHAUER* FRENTE ÀS DOENÇAS GENITO URINÁRIAS:
TRIAGEM DE COMPOSTOS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE**

Monografia apresentada à Faculdade de Enfermagem
Nova Esperança de Mossoró como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dr^a. Sc. Andreza Rochelle do Vale Morais

MOSSORÓ/RN

2018

D192a

Dantas, Beatriz Helen Jales.

Avaliação do potencial biológico do óleo essencial da *Vitex gardneriana Schauer* frente às doenças genito urinárias: triagem de compostos, atividade antimicrobiana e antioxidante / Beatriz Helen Jales Dantas. – Mossoró, 2018.

77.:il.

Orientador: Prof. Dra. Andreza Rochele do Valle Morais

Monografia (Graduação em Biomedicina) – Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró.

1.Potencial biológico. 2. *Vitex gardneriana Schauer*. 3. Antioxidante. I. Título. II. Morais, Andreza Rochele do Valle.

CDU 615.32

BEATRIZ HELEN JALES DANTAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *VITEX
GARDNERIANA SCHAUER* FRENTE ÀS DOENÇAS GENITO URINÁRIAS:
TRIAGEM DE COMPOSTOS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE**

Monografia apresentada à Faculdade de Enfermagem
Nova Esperança de Mossoró como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Projeto de monografia apresentado pela aluna BEATRIZ HELEN JALES DANTAS do curso de Bacharelado em Biomedicina, tendo obtido o conceito de _____ conforme a apreciação da Banca Examinadora constituída pelos professores:

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Andreza Rochelle do Vale Morais

Orientadora

Prof. Me. Francisco Vicente de Andrade Neto

Membro

Profª. Drª. Karoline Rachel Teodósio de Melo

Membro

Dedico essa monografia a Deus, aos meus pais (Carlos e Neuma), ao meu namorado e a minha orientadora. Pessoas fundamentais para que esse trabalho fosse desenvolvido e concluído com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Desenvolver uma pesquisa experimental foi, desde os primeiros períodos, algo que me chamou a atenção. Esse tipo de pesquisa demanda, além de esforços pessoais do pesquisador, incentivos de pessoas externas, instituições e órgãos que acreditem na importância de pequenas descobertas para o avanço da ciência. Graças a Deus, essa pesquisa teve muitos colaboradores e aqui, agradeço a cada um pela contribuição:

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu Deus pelo dom da vida e por ter me concedido saúde, paciência e sabedoria para desenvolver esse trabalho; gostaria também de agradecer a minha mãe (Neuma Jales) por toda paciência, amor e incentivos dados a mim em todos os momentos, ao meu pai (Carlos Dantas- em memória) por ter sido o meu maior exemplo profissional e também o meu maior incentivador, ao meu namorado (Kawendeson Cardoso) por todo apoio, e aos meus familiares de maneira geral.

Além desses, gostaria de agradecer a minha orientadora Dra. Andreza Rochelle do Vale Morais por não medir esforços para que essa pesquisa fosse realizada, pela dedicação, por responder todos os meus e-mails e todas as mensagens por mais que elas fossem enviadas depois da meia noite, por conseguir outros colaboradores, por amar pesquisa, por me incentivar e também por me sobrecarregar de tarefas (que me trouxeram grandes aprendizados). Dra, obrigada por ter sido uma orientadora tão presente, por todas as ajudas e por todos os ensinamentos. A pesquisa precisa de mais Andrezas!!!

À minha banca composta pela professora e Dr^a. Karoline Rachel Teodósio de Melo e pelo Prof. Me. Francisco Vicente de Andrade Neto, por não só aceitarem o convite para compor a banca, como também por terem contribuído com essa pesquisa e com o meu crescimento profissional;

À professora Mayara Freire de Alencar por auxiliar em algumas análises;

À Faculdade de enfermagem Nova Esperança de Mossoró, no nome da vice diretora Sr^a Maria da Conceição por ter disponibilizado o laboratório de química da instituição, bem como os equipamentos e reagentes disponíveis para a realização dessa pesquisa;

Aos técnicos do laboratório de química da Facene/RN: Alex lima, Evelane e Hiago por toda a ajuda durante a pesquisa e também por toda preocupação e incentivos. Vocês são excelentes profissionais. Saibam que essa monografia também tem a contribuição de vocês;

À UFERSA, no nome da professora Êlika, pela disponibilidade do laboratório de Nutrição animal da instituição; Ao CNPQ pela bolsa disponibilizada durante parte dessa pesquisa; e Aos demais colaboradores dessa pesquisa, Obrigada.

“Nunca foi sobre nós, nem sobre o que podemos
fazer, é tudo sobre você, tudo para você, Jesus”
Ministério Zoe.

RESUMO

Nos últimos anos têm crescido os índices de doenças que acometem o trato geniturinário. Destarte, os pesquisadores têm desenvolvido pesquisas que visam investigar propriedades medicinais em plantas com a finalidade de aprimorar as terapias já existentes e desenvolverem novos princípios ativos que sejam eficazes contra as doenças geniturinárias. Entre as plantas utilizadas para fins medicinais surge a *Vitex gardneriana*, erva utilizada pelo senso comum pela possibilidade de possuir propriedades terapêuticas aplicáveis a diversas patologias. Assim sendo, esse trabalho teve como objetivo desenvolver estudos com o óleo essencial extraído da *Vitex gardneriana Schauer* buscando oferecer maiores subsídios ao seu conhecimento científico através da triagem de compostos e caracterizações biológicas. Para isso, foi desenvolvido um planejamento fatorial completo 2^3 em duplicata com a finalidade de encontrar características ótimas de extração do óleo essencial da *Vitex*, utilizando como variáveis independentes o tipo de solvente (éter etílico e acetato de etila), parte da planta (folha e caule), método de extração (soxhlet e extração por solvente) e como variável dependente o rendimento do processo de extração. Para a triagem de compostos, como flavonóides e terpenos e para as caracterizações microbiológicas (inibição da formação de biomassa pelas cepas *S. aureus* 700698, *P. aeruginosa* 9027 e *E. coli* 11303 e do número de células viáveis) e antioxidantes (capacidade de antioxidante total), a amostra do óleo essencial da *Vitex* foi obtida através da triplicata do método de extração que apresentou melhor rendimento. Mediante as análises desenvolvidas constatou-se que todas as variáveis utilizadas para o processo de extração bem como a interação entre elas apresentaram diferenças significativas quanto ao rendimento do óleo essencial, sobre isso, os resultados do ANOVA mostraram que o valor de F calculado foi maior do que o valor de F tabelado no nível de 5% (p/p), indicando que as combinações de tratamento admitidas são significativas. Além disso, através dos gráficos de superfície de resposta, foi observado que a metodologia mais eficaz para a maximização do rendimento do óleo essencial da *Vitex* utilizou o éter etílico, a folha e a extração por solvente como procedimento. Ademais, algumas concentrações do óleo essencial obtido apresentaram potencial inibitório da formação de biomassa das cepas avaliadas, sendo ainda eficaz para reduzir o número de células viáveis da cepa MRSA de *S. aureus*. No que diz respeito à atividade antioxidante, o referente óleo, quando comparado com o padrão positivo, ácido ascórbico, apresentou valores de 82,26 mg de equivalente de ácido ascórbico por grama de amostra para a capacidade de reduzir Mo^{+6} a Mo^{+5} , Apesar disso, sugere-se a repetição dos resultados da atividade antioxidante para confirmação dos valores em triplicata. Os resultados encontrados através dessas análises biológicas correlacionados com a presença de flavonóides e terpenos no óleo de *V. gardneriana* e com a literatura sugerem que esse composto apresenta-se com bom potencial biotecnológico contra agentes infecciosos, além da possibilidade de possuir capacidade terapêutica contra estresse oxidativo, o que faz desse óleo um objeto de estudo promissor para a ciência e, quem sabe, para a evolução terapêutica das doenças geniturinárias.

Palavras-chave: Vitex . Óleo. Extração. Antioxidante. Otimização.

ABSTRACT

In recent years the rates of diseases affecting the genitourinary tract have increased. Thus, researchers have developed research that seeks to investigate medicinal properties in plants in order to enhance existing therapies and develop new active principles that are effective against genitourinary diseases. Among the plants used for medicinal purposes is *Vitex gardneriana*, an herb used by common sense for the possibility of possessing therapeutic properties applicable to several pathologies. Thus, this work aimed to develop studies with the essential oil extracted from *Vitex gardneriana Schauer*, seeking to offer greater subsidies to its scientific knowledge through the screening of compounds and biological characterization. For this purpose, a complete 2^3 factorial design in duplicate was developed in order to find optimal *Vitex* essential oil extraction characteristics, using as solvent independent variables the type of solvent (ethyl ether and ethyl acetate), part of the plant (leaf and stem), method of extraction (soxhlet and extraction by solvent) and as a dependent variable the yield of the extraction process. For the screening of compounds such as flavonoids and terpenes and for microbiological characterizations (inhibition of biomass formation by strains *S. aureus* 700698, *P. aeruginosa* 9027 and *E. coli* 11303 and number of viable cells) and antioxidants (antioxidant capacity total), the *Vitex* essential oil sample was obtained through the triplicate of the extraction method that presented the best yield. The analysis showed that all the variables used for the extraction process as well as the interaction between them showed significant differences in the yield of the essential oil, on that, the ANOVA results showed that the calculated F value was higher than that the value of F tabulated at the level of 5% (w / w), indicating that the treatment combinations allowed are significant. In addition, through surface response graphs, it was observed that the most effective methodology for maximizing *Vitex's* essential oil yield utilized ethyl ether, sheet and solvent extraction as a procedure. In addition, some concentrations of the essential oil obtained showed an inhibitory potential of the biomass formation of the strains evaluated, being still effective to reduce the number of viable cells of the *S. aureus* MRSA strain. With regard to the antioxidant activity, the oil reference, when compared with the positive standard, ascorbic acid, presented values of 82.26 mg of ascorbic acid equivalent per gram of sample for the ability to reduce Mo + 6 to Mo + 5. In spite of this, it is suggested to repeat the results of the antioxidant activity to confirm the values in triplicate. The results obtained through these biological analyzes correlated with the presence of flavonoids and terpenes in the oil of *V. gardneriana* and with the literature suggest that this compound presents with good biotechnological potential against infectious agents, besides the possibility of possessing therapeutic capacity against oxidative stress, which makes this oil a promising study object for science and, perhaps, for the therapeutic evolution of genitourinary diseases.

Keywords: Vitex. Oil. Extraction. Antioxidant. Optimization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PARTES DA <i>VITEX GARDNERIANA</i> (A: PARTE AÉREA DA PLANTA; B: FLORESCÊNCIA E FOLHA; C: FRUTO).....	35
FIGURA 2 - IMAGEM TAXONÔMICA DA <i>VITEX GARDNERIANA</i>	36
FIGURA 3 - EQUIPAMENTO EXTRATOR SOXHLET.....	43
FIGURA 4 - ROTA EVAPORADOR.....	44
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA.....	47
FÍGURA 6 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES QUANTO A SUA SIGNIFICÂNCIA (GRÁFICO DE PARETO).....	50
FIGURA 7 - GRÁFICO AVALIATIVO RENDIMENTO/VARIÁVEIS.....	52
FIGURA 8 - GRÁFICOS DE AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO. A: TIPO DE SOLVENTE E PROCEDIMENTO; B: PARTE DA PLANTA E TIPO DE SOLVENTE; C: PARTE DA PLANTA E PROCEDIMENTO.....	54
FIGURA 9 - REAÇÃO DE CIANIDINA	56
FIGURA 10 - PESQUISA DE FLAVONOIDES NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>VITEX</i>	56
FIGURA 11 - PESQUISA DE TERPENOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>VITEX</i>	57
FIGURA 12 - QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA DOS BIOFILMES DE <i>P. AERUGINOSA</i> , <i>S. AUREUS</i> E <i>E. COLI</i> APÓS 24 HORAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DO ÓLEO DE <i>VITEX</i>	58
FIGURA 13 - NUMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BIOFILME DE <i>S. AUREUS</i> ATCC 700698, <i>P. AERUGINOSA</i> ATCC 9027 E <i>E. COLI</i> ATCC 11303 APÓS 24 HORAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>V. GARDNERIANA SCHAUER</i>	60
FIGURA 14 - GRÁFICO DA CURVA PADRÃO (ABSORBÂNCIA/CONCENTRAÇÃO)	61

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ESTUDOS QUE AVALIARAM A UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DE LESÕES RENAI.....	24
QUADRO 2 - PRINCIPAIS PLANTAS UTILIZADAS PARA LITÍASE RENAL.....	29
QUADRO 3 - DOENÇAS ASSOCIADAS A BIOFILMES / PRINCIPAIS MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS/ APARELHOS MÉDICOS COLONIZADOS POR BIOFILMES/ PRINCIPAIS MICROORGANISMOS ASSOCIADOS	33
QUADRO 4 - COMPOSTOS FLAVONOIDES E SUAS RESPECTIVAS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS	39
QUADRO 5 - DESCRIÇÃO DOS NÍVEIS INFERIOR E SUPERIOR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	41

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 - FÓRMULA PARA AVALIAR O RENDIMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	44
EQUAÇÃO 2 - EQUAÇÃO LINEAR PARA A AVALIAÇÃO DA VARIÁVEL RESPOSTA, RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO EM TERMOS DAS TRÊS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SENSIBILIDADE DE CEPAS DE MICRORGANISMOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>OCIMUM GRATISSIMUM L.</i> , <i>SALVIA OFFICINALIS L.</i> E <i>CYMBOPOGON CITRATUS (DC)</i>	22
TABELA 2 - MATRIZ EXPERIMENTAL.....	41
TABELA 3 - MATRIZ EXPERIMENTAL E RENDIMENTOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>VITEX GARDNERIANA</i>	49
TABELA 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA.....	51
TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DE MO^{+6} A MO^{+5} DO ÓLEO DE <i>VITEX GARDNERINA SCHAUER</i>	62
TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO RELACIONADO COM O ÁCIDO ASCRÓRBICO.....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral.....	19
1.2.2 Objetivos Específicos.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 DOENÇAS GENITURINÁRIAS: ÍNDICES EPIDEMIOLÓGICOS E ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO	20
2.1.1 Infecção do trato urinário.....	20
2.1.2 Doenças glomerulares.....	22
2.1.3 Insuficiência renal.....	26
2.1.4 Calculose renal.....	27
2.1.5 Câncer de próstata.....	30
2.1.6 Câncer de colo de útero.....	31
2.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES ASSOCIADOS A DOENÇAS DO TRATO GENITO URINÁRIO.....	32
2.3 IMPORTÂNCIA DO USO DE PLANTAS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS E PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS. ...	33
2.4 <i>VITEX GARDNERIANA</i> : CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS	34
2.4.1 Propriedades farmacêuticas conhecidas da <i>Vitex gardneriana</i>	36
2.4.2 Caracterização físico-química da <i>Vitex gardneriana</i>	37
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	38
3. METODOLOGIA.....	40
3.1 MATERIAIS	40

3.1.1 Cepas.....	40
3.2 MÉTODOS.....	40
3.2.1 Planejamento experimental.....	41
3.2.2 Triagem de compostos.....	44
3.2.3 Caracterização microbiológica.....	45
3.2.4 Avaliação antioxidante.....	48
3.2.5 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
4.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	49
4.2 PESQUISAS DE COMPOSTOS.....	56
4.2.1 Flavonóides.....	56
4.2.2 Terpenos.....	57
4.3.1 Efeito do óleo essencial na inibição de biofilmes.....	58
4.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm crescido no Brasil os índices de doenças que acometem o trato geniturinário tanto de homens, como de mulheres. Dessas patologias, as mais recorrentes estão relacionadas com infecções do trato urinário por bactérias, doenças renais e patologias nos órgãos genitais que vão desde o aparecimento de úlceras, até o desenvolvimento de neoplasias malignas, como o câncer (GAZZANEO et al., 2016).

Essas disfunções geniturinárias fazem parte de um conjunto ampliado de anomalias do sistema urinário e reprodutivo que têm relação direta com sua origem embriológica e genética, representando 35 a 45% dos fatores congênitos (CONNELL; OWEN; SEGARS, 2013; STEVENSON; HALL, 2006). Apesar disso, algumas doenças que abordam esse trato, como infecções bacterianas e fungicas, podem estar relacionadas não somente com fatores intrínsecos desde o nascimento, mas também com questões extrínsecas como higiene deficiente, gestação, ato sexual e uso de produtos espermicidas (BAUMGARTEN et al., 2011; ZUGAIB, 2013).

O diagnóstico e tratamento dessas patologias correspondem a um grande desafio epidemiológico e clínico, pois os pacientes acometidos necessitam de um acompanhamento multidisciplinar envolvendo processos cirúrgicos, hormonais, genéticos, sociais, psicológicos, éticos e laboratoriais (GAZZANEO et al., 2016). Algumas doenças que atingem essa área do corpo humano são muito complexas e, apesar do desenvolvimento da ciência, ainda há vários estudos que precisam ser feitos para o aprimoramento dos tratamentos já existentes ou para a criação de novas formas terapêuticas (MOLIN; CAVINATTO; COLET, 2015).

Devido a isso, os pesquisadores brasileiros têm investido no desenvolvimento de novas pesquisas utilizando plantas medicinais e demais terapias alternativas com a finalidade de fortalecê-las cientificamente e torna-las seguras para o tratamento, da mesma forma como são vistas em diversos países (MOLIN; CAVINATTO; COLET, 2015).

O uso de plantas medicinais já é uma prática bastante comum como recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 60-85% da população dos países em desenvolvimento já utilizavam dessas práticas como forma de acesso aos cuidados da saúde (KEMPES; ALVES; CAMARGO, 2014).

Esse consumo de ervas e plantas para fins medicinais, cosméticos e alimentícios, além de ser uma cultura que tem tradição milenar, faz parte de atividades humanas que tem se aprofundado a cada dia devido, tanto a onda de comportamento que se adequa à chamada

“consciência verde”, quanto pelo fato de se adotar cada vez mais costumes voltados para o prazer de reunir grupos a fim de aprofundar relações. A cultura do chá é antiga e apreciada por muitos pela diversidade em que pode ser servido. Além disso, algumas plantas usadas para fazer chás, além de terem sabor agradável, possuem propriedades terapêuticas (BRASIL, 2006; WHO, 2015).

Segundo Valeriano et al (2017), esse uso pode ser explicado por se tratar de um tratamento mais acessível e que, de maneira geral, proporciona menores efeitos adversos quando comparados com a quimioterapia e antibioticoterapia, tratamentos usuais em pacientes com câncer e infecção do trato urinário, respectivamente.

No que diz respeito a patologias geniturinárias como o câncer de próstata e câncer de colo de útero, Mendes et al (2010) e Goey et al (2014) relatam que quando os pacientes são diagnosticados com essas neoplasias, na maioria das vezes, procuram explorar várias terapias possíveis que variam desde radioterapia até o uso de fitoterápicos. Além dessas, outras patologias geniturinárias, como infecções do trato urinário e calculose renal também são tratadas pela população com plantas medicinais, como a *Phyllanthus niruri L* (quebra pedra) (TEIXEIRA, 2012).

Entre essas plantas que são consumidas, não somente como matéria-prima de chá, mas com valor fitoterápico surge a *Vitex gardneriana Schauer*, bastante encontrada na vegetação da região Nordeste do Brasil. Esta planta tem se propagado entre o senso comum pela possibilidade dela possuir propriedades terapêuticas aplicáveis em diversas patologias, entre elas está alguns infecções geniturinárias e até mesmo o câncer (ANDRADE et al., 2012).

Ainda existem poucos estudos sobre a *Vitex*. Algumas pesquisas mais antigas, como a de Barros (1970) demonstrou que o extrato oriundo da casca do caule dessa planta, principalmente o etanólico, possui uma ação estimulante na musculatura uterina de ratos e também na região abdominal de sapos. Além desse, estudos mais recentes já mostram os principais constituintes do óleo essencial dessa planta, como o descrito por Barreto et al (2005), também descrevem as propriedades anti-edematogênica, antinociceptiva (BARRETO et al., 2004) e antimicrobiana em alguns fungos e bactérias (RIBEIRO, 2016).

Óleos essenciais são compostos que podem ser extraídos de diversas partes das plantas medicinais, como raiz, caule, folhas e até de flores. Essa extração pode ser feita utilizando diversas metodologias e aparelhos (PIRES et al., 2012).

Os óleos obtidos de plantas possuem, na maioria das vezes, uma grande importância tanto para os setores alimentícios e cosméticos como para a indústria farmacêutica, de maneira que possuem substâncias com grande potencial terapêutico (GASPARIN et al.,

2014). O óleo da planta supracitada já possui alguns estudos que o caracterizam, porém, é importante o desenvolvimento de novos estudos para fortalecer a utilização desse óleo e para o conhecimento de novos princípios ativos e o de novas perspectivas sobre sua utilização (ANDRADE et al., 2012).

Diante dos poucos estudos realizados com a *Vitex* e mediante a possibilidade de uso dessa planta como medicinal, entende-se que pode haver uma diversidade de possibilidades a seu respeito. Destaca-se, portanto a relevância de compreendê-la em seus aspectos naturais, científicos, suas definições e indicações para o uso humano. Vale então questionar: quais são as propriedades e as características da *Vitex gardneriana* e as possibilidades de uso desta planta para fins medicinais principalmente em doenças do trato geniturinário?

Nesse sentido, entende-se a necessidade de investir em pesquisas que possam realizar novas determinações a fim de chegar a uma utilidade mais adequada, específica e esclarecida dos óleos extraídos da *Vitex gardneriana*.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

As patologias geniturinárias, de maneira geral, têm acometido muitas pessoas nos últimos anos. Há um grande desafio quanto ao diagnóstico e tratamento dessas doenças, com isso os pacientes acometidos têm buscado diversas formas terapêuticas, entre elas o uso de plantas medicinais que, de acordo com o senso comum, podem trazer melhorias para essas patologias e/ou auxiliar nos tratamentos convencionais.

Dessa forma, as plantas medicinais têm sido um objeto de estudo bastante recrutado para as pesquisas, visando uma comprovação científica acerca de suas propriedades terapêuticas.

Ademais, viu-se a necessidade de trabalhar sobre esse tema e verificar se o óleo essencial obtido da *Vitex gardneriana Schauer*, planta bastante utilizada como finalidade medicinal na região Oeste do Rio Grande do Norte, possui alguma propriedade farmacêutica associada com doenças geniturinárias, seja com atividade antimicrobiana para as infecções ou antioxidantes para as neoplasias. Para isso, faz-se necessário a identificação de metodologias que sejam apropriadas para a extração do óleo essencial, bem como para a sua caracterização físico-química, microbiológica e antioxidante.

A partir desse entendimento e tomando como fundamento os resultados de pesquisas já desenvolvidas nessa área, os resultados obtidos através desse estudo serão de extrema importância, pois além de contribuir para uma compreensão mais esclarecida acerca do óleo

essencial extraído da *Vitex gardneriana*, também contribuirá com o aprimoramento do acervo de pesquisas do nosso país.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biológico do óleo essencial extraído da *Vitex gardneriana Schauer* frente às doenças genito urinárias, através da triagem de compostos e da avaliação antimicrobiana e antioxidante.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um planejamento experimental a fim de encontrar as características ótimas de extração do óleo essencial da *Vitex gardneriana Schauer*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana/antibiofilme frente a algumas cepas de bactérias;
- Avaliar a capacidade antioxidante total em mg de ácido ascórbico/ grama de amostra
- Realizar a triagem de compostos: Flavonóides e Terpenos

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS GENITURINÁRIAS: ÍNDICES EPIDEMIOLÓGICOS E ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO

As doenças geniturinárias correspondem a um leque de patologias que estão relacionadas tanto com o sistema genital, seja masculino ou feminino, como com o sistema urinário (GAZZANEO et al., 2016).

No que diz respeito às enfermidades que afetam a via urinária, pode-se relatar que essas comprometem tanto o trato urinário superior, quanto o inferior, interferindo principalmente na produção, armazenamento e eliminação da urina. Dentre essas doenças, as mais prevalentes são as infecções do trato urinário por bactérias ou fungos, doenças glomerulares, insuficiência renal, cálculos nos rins e outras (ALBINI et al., 2012; SAÚDE; SAÚDE, 2007).

Além dessas, alterações na região genital também são classificadas como doenças geniturinárias. As mais recorrentes variam desde processos inflamatórios até neoplasias malignas, como o câncer de próstata e o de colo uterino (GOEY et al., 2014).

O diagnóstico e tratamento das doenças que acometem o sistema geniturinário, principalmente das neoplásicas, são muito complexos, pois demanda conhecimentos epidemiológicos, clínicos e também os laboratoriais. Apesar do desenvolvimento da ciência, ainda há algumas patologias geniturinárias que precisam ser estudadas com maior aprofundamento, de maneira que esses estudos forneçam subsídios para um melhor conhecimento acerca dessas doenças, trazendo melhorias no diagnóstico e também nos tratamentos (MOLIN; CAVINATTO; COLET, 2015).

2.1.1 Infecção do trato urinário

A Infecção do Trato Urinário (ITU) é uma patologia caracterizada pela invasão de microrganismos ao sistema urinário, seja inferior (cistite) ou superior (pielonefrite). Essa doença é uma das mais prevalentes dentre as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), bem como no âmbito comunitário, afetando desde crianças até idosos (ARAÚJO, 2012).

Existem alguns fatores que são considerados de risco e que contribuem para o desenvolvimento dessa enfermidade, como por exemplo, uso de cateter vesical, pacientes

grávidas, idosos, diabéticos, mulheres em idade menopáusicas, sexualmente ativos e outros (HSIAO et al., 2015).

Apesar disso, o acometimento e a gravidade de infecções urinárias iram depender de alguns fatores: anatômicos, agente etiológico responsável e sua virulência, se há ou não mecanismos de resistência bacteriana e o desenvolvimento de um tratamento adequado (MORELLO et al., 2015).

Aproximadamente 90% dessas infecções estão associadas a bactérias Gram negativas, principalmente as da família Enterobacteriaceae (CRUZ; ROMÃO, 2009). Um estudo realizado com 4.745 doentes, que receberam assistência em 18 centros europeus, concluiu que o agente etiológico mais isolado em ITUs é a *Escherichia coli*. Além desse, outros agentes Gram negativos podem ser isolados, como por exemplo, *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas Sp* e alguns Gram positivos como *Staphylococcus aureus* (ALBERICI et al., 2015).

O diagnóstico de infecções urinárias pode ser feito através do sumário de urina (EAS) e principalmente através do exame de urocultura, que permite um isolamento mais preciso dos agentes etiológicos responsáveis pela patologia e ainda possibilita o desenvolvimento do antibiograma. É considerada infecção urinária, as uroculturas que apresentarem crescimento bacteriano igual ou superior que 10⁵ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por ml de urina (100.000 ufc/ml) colhida em jato médio e de maneira asséptica (FIHN, 2003).

Após o isolamento do microrganismo é feito o antibiograma para verificar quais os antibióticos que a bactéria é sensível e as possibilidades de tratamento. Porém, nos últimos anos, os microrganismos têm desenvolvido resistência a alguns antimicrobianos, o que tem preocupado os setores de saúde (CARNEIRO et al., 2011; ROGRIGUES; BERTOLDI, 2010).

Resistência trata-se da capacidade que os microrganismos possuem em desenvolver mecanismos para não serem mais inibidos por determinadas concentrações de um fármaco (MOTA et al., 2005). A resistência bacteriana pode acarretar prejuízos econômicos e clínicos, de maneira que têm desencadeado um aumento da morbidade e mortalidade nos ambientes hospitalares, devido principalmente ao atraso em um tratamento pela busca inconstante de medicações que tenha eficácia sobre aquele microrganismo (WHO, 2005).

Com isso, os pacientes ficam internados por um período mais prolongado, havendo mais gastos com insumos e conseqüentemente aumentando os custos com os cuidados de saúde, o que é um fator preocupante tendo em vista a atual conjuntura econômica e financeira enfrentada pelo Brasil nos últimos anos (CARNEIRO et al., 2011).

Pensando nesse assunto, há o desenvolvimento de pesquisas com a finalidade de desenvolver novas alternativas de tratamentos que sejam eficazes contra infecções urinárias e consequentemente bactérias e fungos responsáveis por elas. Sobre isso, Teixeira (2012) relata que existem alguns estudos de extratos e óleos essenciais oriundos de plantas medicinais que comprovam a ação dessas ervas, já utilizadas popularmente, em infecções urinárias.

O artigo desenvolvido por Pereira et al. (2004), por exemplo, relata que os óleos essenciais obtidos das plantas *Ocimum gratissimum* L., *Salvia officinalis* L. e *Cymbopogon citratus* (DC) possuem atividade antimicrobiana contra uma série de microrganismos, como vemos na tabela 1:

TABELA 1. SENSIBILIDADE DE CEPAS DE MICRORGANISMOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE OCIMUM GRATISSIMUM L., SALVIA OFFICINALIS L. E CYMBOPOGON CITRATUS (DC).

Microrganismos	Cepas inibidas - N (%)		
	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf
<i>Escherichia coli</i> (N=79)	55 (69,6)	76 (96,2)	71 (89,9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (N=7)	7 (100)	7 (100)	6 (85,7)
<i>Proteus mirabilis</i> (N=6)	2 (33,3)	5 (83,3)	1 (16,6)
<i>Morganella morganii</i> (N=4)	2 (50,0)	3 (75,0)	2 (50,0)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (N=2)	1 (50,0)	2 (100,0)	1 (50,0)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (N=1)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (N=1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Fonte: (PEREIRA et al., 2004).

Além desse estudo, outros como o de Silva et al (2010), confirmou a ação de três espécies de plantas medicinais do gênero *Phyllanthus* sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras.

Como o Brasil possui uma série de plantas que fazem parte do seu acervo botânico, o desenvolvimento de pesquisas como essas são de extrema importância, pois visam constituir uma fundamentação teórica e científica a fim de validar o uso de plantas, principalmente as já utilizadas empiricamente, no tratamento de ITUs e também utilizá-las para o desenvolvimento de novos princípios ativos em medicamentos (SILVA et al., 2010).

2.1.2 Doenças glomerulares

Os rins são órgãos duplos de extrema importância para o corpo humano. Esse órgão tem como unidade funcional o néfron, que é composto por várias partes, entre elas o corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman), estruturas que auxiliam na filtração do sangue e formação da urina (BRENNER; RECTOR, 2004).

As alterações em alguma região da estrutura renal, de maneira que ocasionem alguma patologia, podem desencadear uma série de problemas, pois os rins atuam tanto na manutenção da homeostase hidrolétrica, quanto na depuração de drogas, equilíbrio acidobásico, participa do controle da pressão arterial e ainda do processo de eritropoiese. Por essa razão, as doenças renais podem apresentar diferentes manifestações clínicas, dependendo da região do néfron que é acometida e da intensidade da lesão (BRENNER; RECTOR, 2004).

Dentre as patologias mais frequentes que acometem os rins, estão as glomerulopatias. Segundo Badr (2005), as doenças glomerulares, como o próprio nome já explica, são patologias que afetam a região glomerular do néfron. Essa alteração no funcionamento normal do glomérulo é classificada quando quase nenhuma reação inflamatória é detectada durante a biópsia renal e diagnosticada através de alterações na análise do sedimento urinário, acompanhadas ou não pela perda da função renal.

As glomerulopatias podem apresentar algumas manifestações clínicas e laboratoriais. Dentre essas, pode-se citar hematúria e/ou proteinúria isoladas e o desenvolvimento de síndrome nefrótica. Nessa síndrome há uma perda acentuada de proteína na urina, o aparecimento de edema e dislipidemias (POLITO; MOURA; KIRSZTAJN, 2010). Segundo Kodner (2016), alterações na membrana basal do glomérulo e do epitélio parietal, como por exemplo, a glomerulonefrite membranosa, podem auxiliar no acometimento de síndrome nefrótica pelo paciente.

Existe uma série de exames que avaliam a função renal. Dentre estes, pode-se citar a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) como um dos parâmetros mais importantes, pois realiza a medida de substâncias que são filtradas pelos rins em um determinado período de tempo por meio da dosagem de creatinina sérica (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007).

Quando há alterações discrepantes tanto no parâmetro de TFG, quanto nos demais marcadores da função renal, sejam bioquímicos ou em uroanálises, os pacientes acometidos iniciam o tratamento visando recuperar o funcionamento normal dos rins e de suas unidades funcionais. Esse tratamento pode ser através de hemodiálise e em alguns casos, principalmente de síndromes nefróticas, é realizado com anticoagulação, o que pode acarretar risco de sangramentos (KAYALI et al., 2008).

Além desses tratamentos, algumas literaturas trazem a importância do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para pacientes com lesões renais. A literatura chinesa, por exemplo, descreve uma lista de ervas que podem ser utilizadas para enfermidades renais, porém não existe muito respaldo científico para tal uso. Dessa forma, há o desenvolvimento de algumas pesquisas que visam comprovar cientificamente a eficácia de

compostos oriundos de óleos essenciais, obtidos de determinadas plantas, na patologia recém-discutida, seus efeitos, doses apropriadas e mecanismos de ação (LI et al., 2010; LAM E SUN, 2013).

O quadro 1, adaptado de Kuba; Vattimo (2015), resume algumas pesquisas que avaliaram a utilização de plantas medicinais no tratamento de lesões renais, principalmente de nefropatias:

QUADRO 1 - ESTUDOS QUE AVALIARAM A UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DE LESÕES RENAIIS.

Autor e ano	Fitoterápico/droga	Lesão renal	Parâmetros Relevantes	Resultados
Erwei et al (2012)	Casca de <i>Eucommia ulmoides</i>	Nefrotoxicidade Cádmio 1,0 mg/kg	ATPase; Na ⁺ , K ⁺ , GSH, creatinina, uréia sérica, histopatologia renal.	Efeito protetor contra o dano oxidativo.
Wu et al (2012)	<i>Macrothelypteris oligophlebia</i> (EMO)	Nefrotoxicidade por Gentamicina 100 mg/kg	Ureia; Creatinina sérica; MDA; NO; SOD; CAT; (GSH – px) Histopatologia.	Significante efeito nefroprotetor.
Gao et al (2010)	Ruibarbo Sinvastatina	Nefropatia Diabética (Ratos C57BL/K e db/db)	Albumina urinária; ApoE; TGF-β; Fibronectina	Efeito nefroprotetor na nefropatia diabética. Meio de atuação distinto ao da sinvastatina.
Chih et al	<i>Hibiscus sabdariffa</i> &	Hiper-uricemia por ácido	Ácido úrico e creatinina sérica;	HSE conseguiu

(2012)	<i>Alopurinol</i>	oxônico 280mg/kg	Xantina oxidase Atividade de uricase	diminuir ácido úrico aumentando a atividade da enzima uricase.
Meng et al (2007)	<i>Astragalus membranaceus mongholicus e Angelica sinensis</i>	Obstrução unilateral do ureter (UUO)	Histopatologia renal, Angiotensina II, ET1;(NOS);(NO); (ROS).	O efeito antifibrótico pela maior produção de NO pela ativação de NOS diminuição de ROS
Ding et al (2013)	Sanqi Oral Liquid: & CAO: coated aldehyde oxygenstarch	Nefrectomia rim direito e ablação de 2/3 do rim esquerdo	Ureia e creatinina sérica; Contagem plaquetária, CD4+, CD8+, CD68+ e Histopatologia renal	Sanqi tem efeito significativo na regulação dos subprodutos dos linfócitos T reduzindo a infiltração de macrófagos nos tecidos renais e diminuindo a fibrose tubulointerstitic

				ial
Zuo et al (2013)	<i>Liriope spicarta</i> <i>var. polifera</i> (LSP) Cloridrato de Metformina	Nefropatia diabética: dieta modificada	Glicemia de jejum, hemoglobina glicosada; Creatinina e ureia sérica; (SOD);(MDA), (CAT)e (GSH -px). Proteína, creatinina urinária e clearance de creatinina. Histopatologia renal e Determinação de AGE;	LSP: melhora pela Hipolipidemia , antioxidação e supressão do sistema AGE/RAGE

Fonte: Adaptado (KUBA; VATTIMO, 2015).

2.1.3 Insuficiência renal

A insuficiência renal (IR) é caracterizada pela diminuição da função dos rins. Essa patologia pode se estender de aguda a crônica e caracteriza-se, de acordo com a destruição dos néfrons, em lenta, progressiva ou irreversível (NOGUEIRA et al., 2011).

A insuficiência renal aguda (IRA) é caracterizada pela perda da função renal em decorrência da diminuição do ritmo de filtração glomerular, o que gera alterações nas funções desempenhadas pelos rins, como, por exemplo, na homeostase de líquidos e eletrólitos. Essa patologia tem afetado cerca de 20 a 40% dos pacientes que já estão admitidos em hospitais, sendo mais evidente no setor de unidade de terapia intensiva (UTI) (SANTOS; MARINHO, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2015).

Já a insuficiência renal crônica (IRC) é uma patologia decorrente da incapacidade dos rins em desenvolverem suas funções ou retornarem ao normal após uma IRA ou alteração renal devido a alguma outra doença. Essa enfermidade tem afetado muitas pessoas em todas as regiões do Brasil, principalmente os pacientes que já possuem alguma patologia de base, como diabetes mellitus (30%) e a Hipertensão Arterial Sistêmica (35%) (ROSO et al., 2013).

O diagnóstico de insuficiência renal, assim como o de outras patologias que afetam os rins, pode ser através da avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG), por meio dos exames de clearance ou da dosagem de creatinina sérica (SODRÉ; OLIVEIRA, 2014).

Alguns autores, como Cleto (2011, p. 489), que segue os critérios diagnósticos recomendados pela *Acute Kidney Injury Network* (AKIN), relata que alterações agudas nos níveis séricos de creatinina e no débito urinário são importantes fatores relacionados a IR.

Acerca do tratamento dessa patologia, a Sociedade Brasileira de Nefrologia (2015) relata que irá depender muito do caso de cada paciente, pois será focado nos fatores que estão provocando a insuficiência renal. Esse tratamento pode ser tanto por modificações na dieta, para reduzir o acúmulo de toxinas que são eliminadas constantemente pelos rins, quanto através de medicamentos, que podem ser antibióticos, para tratar alguma infecção que esteja agravando a IR, ou diuréticos, para ajudar na eliminação de líquidos. Além desses, os pacientes acometidos com essa patologia também passam pelo tratamento através da diálise.

2.1.4 Calculose renal

A calculose renal, conhecida também como litíase renal e/ou urolitíase, é uma patologia considerada um grande problema de saúde pública enfrentado pelo Brasil. Essa enfermidade é resultante de alterações tanto nutricionais quanto fisiológicas, que geram o acúmulo de cálculos no interior dos órgãos ou dos canais que constituem o sistema urinário, isso pela sobrecarga de íons (CRUCES et al., 2013).

Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (2014), essa doença é a terceira mais frequente entre as patologias que acometem o trato urinário, afetando mais homens do que mulheres, principalmente a faixa etária entre 30 a 50 anos. Além disso, é um diagnóstico frequente em mulheres grávidas e em diabéticos (KORKES, 2014).

Pacientes com litíase renal podem sentir alguns sintomas bem característicos da doença, como intensa dor lombar na região onde se encontra o cálculo formado e, em decorrência disso, vômitos e náuseas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2002).

O estudo da formação desses cálculos é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento de medidas preventivas. As causas podem variar em cada paciente,

relacionadas com fatores genéticos, metabólicos, anatômicos, infecciosos e principalmente nutricionais, como a diminuição da ingestão de água. Esses fatores podem provocar a saturação da urina e a precipitação de cristais, como os de oxalatos de cálcio, cistina, uratos de amônia, ácido úrico e outros (GIORDANO et al., 2014).

O diagnóstico e tratamento de calculose nos rins tiveram um grande avanço nos últimos 30 anos, principalmente com o advento dos exames de imagem, como ultrassonografia e tomografia computadorizada (MAZZUCCHI, 2009). Além disso, o tratamento com base no princípio “*primum non nocere*” (primeiro não causar danos) tem desencadeado resultados positivos, de maneira que são minimamente invasivos e geram baixos índices de complicações graves (KORKES, 2014).

O diagnóstico de litíase foi feito, por muitos anos, através do exame de urografia excretora. Porém, estudos mais recentes mostram que a tomografia computadorizada (TC) e a ultrassonografia (US) possuem maior sensibilidade e especificidade nas identificações de cálculos renais (FREITAS, 2004).

Segundo Arrabalpolo et al (2013), além desses dois exames de imagem, a ressonância magnética entra como alternativa para diagnóstico de litíase em grávidas. Porém, essa técnica possui uma baixa sensibilidade na detecção dos cálculos, apesar de conseguir mostrar uretrite, edema periuretral e periuretrite. Ademais, análises laboratoriais, como dos níveis séricos de creatinina, que permite avaliar a função renal e, o hemograma, que permite verificar os níveis de infecções, também são parâmetros que podem auxiliar no diagnóstico da patologia em questão (KORKES, 2014).

O tratamento dessa enfermidade é constituído por mudança na dieta, com correta ingestão de água, proteínas e sódio; e também através do uso de medicamentos visando à eliminação dos cálculos, como nifedipina (TIZATTO; MACHADO, 2016). Além disso, alguns pacientes fazem o uso de terapias alternativas com plantas medicinais, julgando serem até mais eficazes no tratamento e na cura de calculose renal (LEITE; MARINHO, 2014).

Um estudo realizado com 312 usuários de fitoterápicos da cidade de Santa Cruz no Rio de Janeiro coletou 50 nomes de espécies de plantas que são comercializadas com finalidades medicinais. Entre essas ervas, os nomes mais citados estão os populares chapéu-de-couro e o quebra-pedra, usados em ITUs e para eliminação de cálculos renais (LOPES; PANTOJA, 2013). A saber, a planta *Phyllanthusniruriherbae*, popularmente conhecida como “quebra pedra”, é composta por aproximadamente 6,5% de taninos, além de ácido gálico, compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides, o que tornam essa erva com características anticicatrizantes, anti-inflamatória, bactericida e outras (NASCIMENTO, 2008).

Além dessa, outras plantas como *Persea americana Mill* (abacateiro), *Vernoniabeyrichiiless* (asa de peixe) e *Echinodorusgrandiflorus micheli* (chapéu-de-couro) também foram estudadas para avaliação em combate aos cálculos renais (SANTOS, 2015). O levantamento bibliográfico acerca das principais plantas usadas para combater a litíase renal, gerou o seguinte quadro 2:

QUADRO 2 - PRINCIPAIS PLANTAS UTILIZADAS PARA LITÍASE RENAL.

Planta Medicinal	Resultados (estudos in vitro/in vivo)	Referências
<i>Ammi visnaga L</i>	Alteração dos cristais de CaOx para forma dihidratada e redução desses cristais em ratos portadores de cálculos renais.	Abdel-Aal et al. (2009)
<i>Bergenia ligulata (rizoma)</i>	Antioxidante, diurético e inibição de cristais (Ratos Wistar)	Bashir e Gilani (2009)
<i>Boerhavia diffusa terrestris (raiz)</i>	Inibição da nucleação e do crescimento de cristais de fosfato de cálcio dihidratado (experimentação in vitro utilizando urina artificial e humana)	Joshi et al. (2005)
<i>Boerhavia diffusa e Bryophyllum pinnatum (raiz)</i>	Redução de cristais com promoção da forma de CaOx dihidratado em relação ao monohidratado (Experimentação in vitro: urina humana)	Yasir e Waqar (2011)
<i>Cynodon dactylon (rizoma)</i>	Redução de deposição de CaOx e cristalúria caracterizadas por cristal de menor tamanho.	Atmani et al. (2009)

<p><i>Orthosiphon grandiflorus</i>, <i>Hibiscus sabdariffa</i> e <i>Phyllanthus amarus</i> (planta toda)</p>	<p><i>Hibiscus sabdariffa</i> e <i>Phyllanthus amarus</i> diminuíram a deposição de cristais nos rins. A redução da retenção de oxalato no rim e maior excreção na urina foram relacionadas à <i>Hibiscus sabdariffa</i>. <i>Phyllanthus amarus</i> influenciou o aumento de citrato urinário, que diminui íons cálcio livre (ratos com hiperoxalúria induzida).</p>	<p>Woottisin et al. (2011)</p>
--	--	------------------------------------

Fonte: Adaptado de CRUCES et al., 2013.

2.1.5 Câncer de próstata

A próstata é uma glândula que constitui o sistema reprodutor masculino, cuja principal função é produzir parte do sêmen. Existem algumas patologias que acometem essa região anatômica, como os processos inflamatórios e neoplasias malignas. No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais prevalente entre homens e o sexto tipo mais comum em todo mundo, tem afetado, principalmente, indivíduos com mais de 50 anos, podendo ser assintomático na fase inicial e acometer com mais prevalência a zona periférica da próstata (CASTRO et al., 2011; INCA, 2014).

Pacientes com esse tipo de neoplasia possuem, na maioria das vezes, dificuldades para urinar, aumento do número de micções, jato urinário fraco e presença de sangue na urina (GONÇALVES, 2008). Segundo a Sociedade Brasileira de Urologia (2011), aproximadamente 80% dos tumores encontram-se na zona periférica da glândula, com isso, cerca de 18% dos pacientes são diagnosticados já no exame clínico conhecido como toque retal. Além desse exame, é realizada também a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA), que é uma glicoproteína produzida através do epitélio da próstata com função de liquefazer o sêmen após a ejaculação, não sendo assim um marcador câncer específico (MOTTET et al., 2015).

Quando esses exames apresentam alguma alteração, o médico pode solicitar análises como uma ultrassonografia pélvica ou prostática, ressonância magnética (RM) e uma biopsia para o estudo histopatológico do tecido. As técnicas inovadoras da RM, como a espectroscopia de prótons e o contraste dinâmico contribuem de maneira significativa para a identificação e localização do câncer de próstata, porém a ultrassonografia prostática e a

biópsia são consideradas padrão ouro para o diagnóstico dessa patologia (BOURDOUMIS et al., 2010).

Depois de diagnosticado é preciso que o paciente inicie o tratamento que irá variar de acordo com o estágio do tumor, tamanho da próstata, expectativa de vida, comorbidades e outros fatores. Em casos de pacientes com doença localizada é indicado processos cirúrgicos ou radioterapia, já naqueles que possuem a doença em seu estágio mais avançado, é indicado à combinação do bloqueio hormonal com a cirurgia e radioterapia (BRASIL, 2002).

Apesar de existir uma série de tratamentos eficientes, a população diagnosticada com algum tipo de câncer também procura terapias alternativas, como os produtos naturais. Para essa finalidade, esses produtos precisam possuir atividades antioxidantes (BATISTA; ARCANJO, 2017).

Os antioxidantes atuam sobre os radicais livres, diminuindo as consequências que o seu excesso pode causar e, por essa razão, é importante avaliar a capacidade antioxidante de determinados compostos para verificar se há ou não alguma propriedade contra neoplasias cancerígenas (HALLIWELL, 2000).

Existem alguns estudos, como o de Liu et al (2012), que comprovam a ação científica de determinados compostos naturais, sobre células cancerígenas. Dentre esses compostos é destacado o componente *Aloe-emodin*, encontrado na babosa, é capaz de inibir a atividade quinase das células, levando a supressão do desenvolvimento do câncer de próstata (LIU et al., 2012).

Estudos como esse, mostram que a fitoterapia já é uma prática bastante consolidada no Brasil. Isso porque alguns produtos naturais, além de serem aceitos pela população, possuem efeitos comprovados sobre a saúde e são de baixo custo, o que torna essa alternativa terapêutica acessível a todos e um importante campo de estudo para os pesquisadores (CAETANO, 2016).

2.1.6 Câncer de colo de útero

O câncer de colo uterino (CCU) é caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado de células nessa região. Essa neoplasia tem acometido mulheres em todo o mundo e segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2009) é responsável pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres por ano. Estima-se para o ano de 2018 aproximadamente 16.370 novos casos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

No Brasil, esse é o terceiro tipo de câncer mais comum nas mulheres. A incidência vai variar de acordo com as regiões do país, de maneira que a região Nordeste ocupa a segunda

posição, perdendo apenas para a região Norte (CORRÊA et al., 2017). O câncer de colo uterino possui um crescimento lento e isso permite uma detecção precoce, que pode ser realizada através do exame de rastreamento conhecido como Papanicolaou (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

Esse exame é muito importante para a população e também para a saúde pública de maneira geral, pois além de ser de baixo custo é bastante efetivo e seguro no rastreamento do câncer de colo de útero. De acordo com o ministério da saúde, o preventivo deve ser realizado em mulheres sexualmente ativas, com idade entre 25 e 64 anos a cada três anos, caso tenha dado dois resultados negativos com intervalo anual (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011).

O diagnóstico e tratamento aliados e feitos precocemente podem melhorar o prognóstico de casos desse tipo de câncer. O grande desafio é atingir o público alvo e seguir os protocolos padrões, pois, ainda existe uma resistência de muitas mulheres em fazer esse tipo de exame, e muitas só procuram fazer quando há o aparecimento de sintomas, que geralmente só acontece quando a patologia já está em um estágio avançado (RIBEIRO et al., 2016).

Acerca do tratamento do CCU, pode-se dizer que é feito basicamente através de cirurgia, quimioterapia ou radioterapia, sendo a cirurgia o método de primeira escolha. Os métodos terapêuticos vão variar de acordo com cada paciente, tamanho do tumor, idade e também com o desejo de ter filhos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

2.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES ASSOCIADOS A DOENÇAS DO TRATO GENITO URINÁRIO

Os Biofilmes são classificados por vários autores como sendo um consórcio de estruturas de microorganismos aderidos em uma matriz polimérica, ou a uma superfície. Esse tipo de associação pode ser desenvolvido tanto em superfícies bióticas, como abióticas, incluindo dispositivos médicos como o cateter urinário e até em aparelhos intrauterinos (HØIBY et al., 2010; VALE, 2015; DONLAN; COSTERTON, 2002).

Assim como os microorganismos em suas formas planctônicas podem desencadear doenças, a forma associada também pode contribuir para o desenvolvimento de patologias como infecções do trato urinário e prostatite bacteriana, através da formação de biofilmes em superfícies bióticas ou contaminação indireta através de superfícies abióticas (BATONI et al., 2011). As principais doenças geniturinárias associadas a biofilmes estão expressas no quadro 3.

QUADRO 3 - DOENÇAS ASSOCIADAS A BIOFILMES / PRINCIPAIS MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS/ APARELHOS MÉDICOS COLONIZADOS POR BIOFILMES/ PRINCIPAIS MICROORGANISMOS ASSOCIADOS

DOENÇAS	Microorganismos	Aparelhos médicos	Microorganismos
Infecção do trato urinário	<i>S. saprophyticus</i>	Cateter urinário	<i>Staphylococcus spp</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Doenças que afetam a região genital, por exemplo, Prostatite bacteriana.	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo	Aparelhos intra-uterinos	<i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>C. albicans</i>

Fonte: Adaptado de BATONI et al., 2011

Muitos desses microorganismos têm apresentado resistência frente aos antibióticos tanto de primeira linha, quanto aos de última geração, podendo desencadear sérios problemas na saúde mundial. Dessa forma, é importante a investigação de atividades antimicrobianas e antibiofilmes em novos compostos, como, por exemplo, nos óleos essenciais obtidos de plantas (SILVA et al., 2012).

2.3 IMPORTÂNCIA DO USO DE PLANTAS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS E PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS.

O homem tem explorado os recursos naturais desde tempos mais antigos, não somente como alimento, mas também por suas propriedades terapêuticas (SILVA et al., 2012).

As plantas medicinais, em muitos casos, é o recurso mais acessível e viável financeiramente para muitas comunidades e grupos étnicos. Assim, com o uso contínuo, foram-se descobrindo tanto as propriedades que essas ervas possuem e que são importantes para o tratamento de doenças quanto às propriedades nocivas capazes de desencadear a morte e/ou produzir alucinações (VALERIANO et al., 2017).

Aproximadamente 85% da população dos países em desenvolvimento utilizam produtos à base de plantas medicinais em cuidados de saúde seja pelo conhecimento tradicional ou através dos sistemas oficiais (ROSA et al., 2011). O Brasil possui uma flora com muita diversidade e apresenta cerca de 40 mil espécies de plantas, muitas delas com propriedades terapêuticas e também medicinais (OLIVEIRA et al., 2012). De acordo com o Ministério da saúde, o consumo dessas plantas como fitoterápicos tem aumentado muito no nosso país, registrando um crescimento de 161% entre os anos de 2013 a 2015 (BRASIL, 2016).

A criação da Política Nacional de Fitoterápicos, já presente em cerca de 3.250 unidades de farmácias de 930 municípios, contribuiu bastante para esse aumento, de maneira que prover um acesso mais seguro e um uso racional da fitoterapia. Esse programa elaborou uma lista com 71 plantas de interesse para o sistema único de saúde (RENISUS) e além de subsidiar o desenvolvimento de uma cadeia produtiva também terá a função de orientar estudos e pesquisas com plantas para finalidades medicinais (BRASIL, 2016).

Observando o interesse da população por fitoterápicos e o uso frequente dessas para o tratamento das mais variadas doenças, os pesquisadores passaram a desenvolver pesquisas visando analisar as propriedades farmacológicas e organolépticas dessas plantas bem como outros fatores a fim de expressar uma confirmação científica de sua eficácia no tratamento de patologias (OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010).

Sobre isso, algumas pesquisas destacam o uso dos metabólitos secundários das plantas para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, tendo em vista a possibilidade desses metabólitos atuarem de forma direta ou indireta no organismo, inibindo ou ativando alvos celulares (CALIXTO, 2005).

Com isso, as pesquisas precisam desenvolver metodologias mais adequadas tanto para a otimização do processo de extração, quanto para o desenvolvimento de estudos da atividade biológica de extratos vegetais, que visem um melhor rendimento, a detecção de efeitos específicos e controlem os efeitos sinérgicos que venham a ser causados pelos numerosos constituintes contidos nos extratos (ATARÉS et al., 2012).

2.4 *VITEX GARDNERIANA*: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS

O termo *Vitex*, em sua derivação fármaco-etimológica é uma palavra derivada do latim vitilium, ou do grego vieo, dos quais se designa o significado de trançado, entrelaçado, unido, ou que se faz alusão aos ramos duros, no entanto flexíveis. Estes ramos são utilizados na construção de cercas, vergas e ripas (BARRETO, 2004).

Quando se junta o nome *gardneriana*, faz-se alusão a uma homenagem feita pelo botânico alemão Johan Konrad Schauer, descritor original da espécie que foi descrita ao pesquisador inglês George Gardner, que em meados do século XVII, em uma excursão feita no Vale do Jaguaribe no Estado do Ceará conheceu a planta. Na região nordestina do Brasil, esta espécie é popularmente conhecida como ‘jaramataia’, sendo possível encontra-la em leitos de rios situados nos estados da Paraíba, Recife, Ceará e também no Rio Grande do Norte. Trata-se de arbusto que pode alcançar o crescimento de 6 a 7 metros de altura. As suas folhas são simples e inflorescentes de cor roxa claro. Seu fruto é tipo drupa carnosa, de formato ovóide e coloração verde oliva (RIBEIRO, 2016).

Segundo Barreto (2008) existem estudos que indicam outras espécies da *Vitex gardneriana*, porém, da qual se fala é a apresentada na figura 1:

FIGURA 1 - PARTES DA VITEX GARDNERIANA (A: PARTE AÉREA DA PLANTA; B: FLORESCÊNCIA E FOLHA; C: FRUTO)



Fonte: VALE (2015).

Observa-se que é uma árvore de pequeno porte, tem folhas simples, opostas, decussadas, obovado-lanceoladas com limbo coriáceo e face dorsal pubescente (BARRETO, 2004).

Suas inflorescências são axilar-terminais, densamente pubérrulas, cálice sinsépalo, subcampanulado, piloso, 5-lanciniado, sua corola apresenta coloração roxa clara com tubo torcido para cima e comprimido lateralmente na porção superior, com o lacinio superior mais desenvolvido. Possui drupa (BARRETO, 2004, p. 51).

Pode-se perceber que, de uma forma geral, a *Vitex gardneriana* é uma planta muito presente no contexto da vegetação do semiárido nordestino, sendo uma espécie também

encontrada no Rio Grande do Norte, conhecida popularmente pelo nome de Jaramataia (ARAÚJO, 2009).

Em se tratando da sua caracterização taxonômica mais sintética, pode-se acrescentar algumas características, segundo descrição de Araújo (2009), observando-se a Figura 2:

FIGURA 2 - IMAGEM TAXONÔMICA DA *VITEX GARDNERIANA*



Fonte: Araújo (2009).

A espécie *Vitex gardneriana* Schauer, além de Jaramataia, possui outros nomes populares, como azeitona do mato, tarumã do Brejo, entre outros (ARAÚJO, 2009).

Na descrição da planta têm-se os seguintes atributos informados por Araújo (2009): é uma árvore com 6-7 m de altura, suas inflorescências são axilares terminais, cálice sinsépalo, subcampanulado, piloso, sua corola apresenta coloração roxo clara com tubo torcido voltado para cima, sendo que comprido lateralmente na porção superior. O seu lacínio superior é bem mais desenvolvido. É ainda uma planta oleaginosa e que se destaca como ornamental. Sua florescência geralmente se dá no mês de novembro.

2.4.1 Propriedades farmacêuticas conhecidas da *Vitex gardneriana*

No que diz respeito às propriedades farmacêuticas, Barreto (2004) menciona em seu estudo que não havia ainda informações provenientes de estudos experimentais sobre propriedades farmacêuticas na *Vitex gardneriana*, mas, se sabe que algumas pessoas comentam o seu uso como uma planta medicinal.

Segundo Monteiro et al (2015), a Jaramataia é uma espécie de vegetal muito utilizada para fins de cura em diversos processos patológicos, entre os quais estão: verminose, gripe, rinites, gases, dor de barriga, sinusite, inflamação na próstata. Há ainda quem a utilize para

dor nos ossos, problemas nos rins, problema na coluna, calmante, dentre outros (ANDRADE et al., 2012).

Araújo (2009) situa o uso da *Vitex gardneriana* como sendo importante no tratamento de alguns problemas de saúde, definindo que a mesma, nesse sentido, é usada dentro do contexto da etnomedicina. Trata-se de um vegetal usado no tratamento de problemas renais, a partir do chá das folhas e cascas do caule. Diz-se que é também um bom calmante, anti-inflamatório, serve para cicatrizar ossos da coluna e alívio de dores estomacais. Além de tudo isso, pode ser usado como abortivo e que o seu “xarope feito com as folhas, raspas do caule e fruto, é usado para combater tosse, bronquite, gripe, inflamações, gastrite, mau hálito e verme” (ARAÚJO, 2009, p. 92).

2.4.2 Caracterização físico-química da *Vitex gardneriana*

Um dos pesquisadores que estudou a caracterização físico-química da *Vitex gardneriana* foi Barreto (2004). Este pesquisador identificou, a partir de sua análise química, que o material extraído da referida planta guarda diferentes compostos. Ainda segundo o autor a identificação foi feita de forma espectroscópica através da qual foi percebido:

20-hidroxi-ecdisonae o iridóide glicosilado, aucubina, respectivamente. Os espectros obtidos de VA evidenciam tratar-se de uma estrutura esteróide, pela presença de 27 átomos de carbono. Na análise do APT observa-se a presença de 7 carbonos quaternários, 5 grupos metilas, 8 metilenos e 7 metinos. O espectro 1HRMN permitiu verificar a presença de 38 prótons (BARRETO, 2005, 53).

Barreto (2005) descreve ainda que encontrou nos extratos da casca do caule da Jaramataia, a presença de monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides, iridóides, saponinas, açucars, flavonóides e fenilpropanoglicosídeos.

Para realizar esta caracterização, Barreto (2004), desenvolveu para seu estudo de mestrado os seguintes procedimentos: coletou a *Vitex gardneriana* na caatinga do Nordeste brasileiro, mais especificamente em às margens do Rio Espinharas no município de Espinharas na Paraíba. Para a caracterização foram usadas amostras de caule jovem e folhas maduras com o pecíolo. O material foi fixado FAA 50, segundo o método de Johansen (1940) até a confecção de lâminas semipermanentes. A epiderme foi examinada por dissociação em solução de hipoclorito de sódio. A concentração variável foi de 10 e 30% por período, de acordo com a amostra. Os fragmentos da epiderme foram isolados e lavados em água destilada, neutralizados com água acética 1%, corados com Safranina e Azul de Astra, montados em glicerina 50%.

Barreto (2004) descreve ainda que da estrutura interna do caule foi feita em secções transversais, por meio de corte à mão livre com lâmina comum. As secções transversais também foram usadas para examinar a região mediana da lâmina foliar, neutralizadas em água acética 1% e também coradas Safranina e Azul de Astra e montadas em glicerina 50%.

Com referência aos óleos encontrados na referida planta, o óleo essencial das folhas de *Vitex gardneriana* foi estudado por Nascimento et al (2016). Foram encontrados 12 compostos dentre os quais há predominância de sesquiterpenos, sendo identificados como constituintes majoritários Cis-Calameneno, Isoledeno, α -copaeno e E-Cariofileno (NASCIMENTO et al., 2016).

Para chegar a essa composição química, Nascimento et al. (2016) obteve o óleo essencial das folhas de *Vitex gardneriana*, por meio de hidrodestilação, feita em aparelho Clevenger, tendo permanecido no mesmo durante 2 horas e em seguida analisados por CG/MS.

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são compostos voláteis e metabólitos secundários produzidos pelas plantas, podendo ser encontrado desde a folha até a raiz; atuam principalmente como mecanismo de defesa desses organismos e, quando extraídos, podem possuir grande importância para os setores alimentícios, cosméticos e até industriais (GASPARIN et al., 2014).

Sobre isso, Bakkali et al (2008), relata que são conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais e 300 deles já são utilizados para fins farmacêuticos e cosméticos. A obtenção desses óleos pode ser feita através de várias metodologias, desde que essas garantam uma extração eficiente. A hidrodestilação, destilação a vapor e extração por fluido supercrítico estão entre os métodos mais utilizados, porém devem ser escolhidos de acordo com a composição do óleo que se deseja obter (PIRES et al., 2012; CASSEL et al., 2009; YUSOFF et al., 2011).

Segundo Fernandes Júnior et al (2014), esses compostos e os seus componentes predominantes podem possuir diversas propriedades como antifúngica, antimicrobiana, antiparasitária e até antioxidante. Existem algumas pesquisas feitas com óleos essenciais para avaliar essas propriedades e os principais componentes dos óleos. Acerca dos componentes, alguns estudos mostram que os mais encontrados são flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, glicosinatos e taninos (RODRIGUES et al., 2015; TAJKARIMI, IBRAHIM, e CLIVER, 2010).

Os flavonoides é um dos maiores grupos encontrados em óleos essenciais oriundos de plantas utilizadas para fins medicinais. Esse composto tem como principal função proteger a planta contra agentes oxidantes e, segundo algumas pesquisas, tem eficácia na prevenção de doenças cardiovasculares, cancerígenas, imunológicas e outras (YAN et al. 2014; YANG et al. 2013). Esse composto é utilizado com algumas aplicações terapêuticas, como se observa no quadro 4:

QUADRO 4 - COMPOSTOS FLAVONOIDES E SUAS RESPECTIVAS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

ATIVIDADE	FLAVONÓIDE	REFERÊNCIA
Antitumoral	Quercetina	Formica e Regelson, 1995
Antiespasmódica	Quercetina-3-glicosídeo; rutina; pinostrobin	Mata et al., 1997
Antimicrobiana	7',4'-diidróxi-5metóxi- flavona	Gutkind et al., 1984
Antioxidante	Quercetina; diidroquercetina; rutina	Larson, 1988

Fonte: Adaptado (SIMÕES et al., 2010).

Além desse, estudos mostram que os sequeiterpenos também podem apresentar alguns efeitos farmacológicos, entre esses estão os antiinflamatórios, antiparasitários e até efeitos no Sistema Nervoso Central (SILVA et al., 2012; SIMÕES, 2002).

Apesar das inúmeras vantagens dos óleos essenciais, há um grande desafio nas pesquisas e estudos com essa matéria prima, pois envolve uma série de etapas que vai desde as investigações do conhecimento e uso popular até a caracterização da amostra, investigação farmacológica do extrato e dos seus constituintes isolados, avaliação dos mecanismos de ação e formulação dos princípios ativos, tudo isso para que se descubra um novo composto biologicamente ativo com ação em patologias que afetam a saúde humana (MANSANOSARTO; ERSONZANUSSO JUNIOR, 2014).

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

Para o desenvolvimento desse estudo foram necessários os seguintes materiais: folhas e cascas do caule de *Vitex Gardeneriana Schauer*, estufa, moinho de facas (TE-650 Willye), peneira 20 Mesh, recipientes de plástico, bandeja, cápsula de porcelana, tubos de ensaio, Becker, balança analítica, soxhlet, funil de separação, balão de decantação, balão volumétrico, bico de Bunsen, rota- evaporador, papel filtro (Diâmetro 18; gramatura 80g/cm³), placas de Petri, placas de microdiluição, meio de cultura estéril, pipetas, ponteiras, estufa bacteriológica, espectrofotômetro, banho ultrassônico, eppendorfes e spectra max.

Dentre os solventes e reagentes, foram utilizados: água purificada, clorofórmio, etanol (70%), HCl concentrado, magnésio em pó, éter etílico, acetato de etila, Na₂SO₄ anidro, anidrido acético, fosfato de sódio, ácido sulfúrico, molibdato de amônia e ácido ascórbico.

3.1.1 Cepas

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas três cepas de bactérias, escolhidas por possuírem importância clínica significativa e por serem classificadas de formas distintas frente às provas bioquímicas e com diferentes comportamentos frente aos antimicrobianos: *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 11303.

3.2 MÉTODOS

O material vegetal a ser utilizado nessa pesquisa (folhas e cascas do caule de *Vitex gardneriana Schauer*) foi coletado no município de Apodi, Rio Grande do Norte/Brasil, propriamente as margens do rio Apodi. As amostras coletadas foram submetidas a dois processos de secagem: em um primeiro momento foram secas através da radiação solar por um período de 24 horas e posteriormente foram colocadas em estufa a 45°C durante 10 horas para uma segunda secagem, assim como o descrito por Barreto et al (2007).

Após esse procedimento, as amostras passaram por um processo de trituração utilizando um moinho de facas (TE-650 tipo Willye) e peneira de 20 Mesh, pertencentes ao laboratório de nutrição animal da Universidade Federal do Semi-Árido (UFERSA). Depois de trituradas, foram acondicionadas em recipientes de plástico previamente identificados com tipo da amostra (folha ou caule) e data de trituração.

O material triturado foi utilizado durante o processo de extração do óleo essencial e consequentemente nas outras etapas desse estudo.

3.2.1 Planejamento experimental

Diante dos diversos fatores que influenciam no processo de extração, foi desenvolvido um planejamento fatorial completo 2^3 com duas repetições. O processo de extração do óleo essencial da *Vitex gardneriana schauer* foi otimizado utilizando como variáveis independentes o tipo de solvente (T-S), parte da planta (PP) e procedimento de extração. As variáveis foram codificados em -1 e +1 para facilitar o entendimento da matriz experimental, como descritos no quadro 5 e na tabela 2:

QUADRO 5 - DESCRIÇÃO DOS NÍVEIS INFERIOR E SUPERIOR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

	-1	+1
TIPO DO SOLVENTE	ACETATO DE ETILA	ETER ETÍLICO
PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	SOXHLET	EXTRAÇÃO POR SOLVENTE
PARTE DA PLANTA	FOLHA	CAULE

Fonte: Do autor (2018)

TABELA 2 - MATRIZ EXPERIMENTAL

	T-S	PROCEDIMENTO	PP
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1

6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Fonte: Do autor (2018)

*Onde, tipo de solvente (T-S), parte da planta (PP) e procedimento de extração; -1 (T-S Acetato de etila, procedimento Soxhlet, PP folha) +1 (T-S Éter etílico, procedimento extração por solvente, PP caule).

A variável dependente utilizada para este estudo foi o rendimento do processo de extração, de maneira que a metodologia que apresentou melhor rendimento foi utilizada para a realização da triplicata e obtenção do óleo essencial a ser utilizado para a identificação de compostos e atividades antimicrobiana e antioxidante.

3.2.1.1 Extração

A extração foi desenvolvida em duplicata obedecendo ao planejamento experimental 2^3 e a ordem de randomização (8, 4, 1, 7, 3, 5, 2, 6). As partes da planta (folha e caule) foram assim escolhidas por possuírem características distintas, havendo, dessa forma, a possibilidade da identificação de tipos e concentrações de compostos diferentes em cada uma; os solventes foram selecionados com base em algumas literaturas e principalmente na polaridade dessas substâncias, o que pode possibilitar uma maior seletividade de compostos durante o processo de extração (SIMÕES et al., 2010).

As metodologias de extração desenvolvidas foram adaptadas de alguns autores como Vale (2015), no caso de extração por solvente; já o Soxhlet foi uma forma alternativa inovadora de metodologia a ser testada, quando comparado com outras pesquisas já feitas com a *Vitex*.

A extração do óleo essencial obtido das folhas ou do caule da *Vitex*, por arraste de solvente, foi realizada de acordo com uma adaptação do que foi descrito por Vale (2015). Inicialmente foram pesadas 5 gramas da amostra e colocadas em 1 litro e meio de água purificada, em seguida esse material passou por um processo de ebulição durante 2 horas no bico de Bunsen. Após esse procedimento, a mistura água/óleo foi filtrada utilizando funil de separação, Becker e papel filtro (Diâmetro 18; gramatura 80g/cm³) para que posteriormente fosse colocada no balão de decantação, onde foram acrescidos 200 ml de solvente para a partição durante 30 min.

Já a extração utilizando Soxhlet foi desenvolvida no sistema apropriado, ilustrado na figura 3:

FIGURA 3 - EQUIPAMENTO EXTRATOR SOXHLET

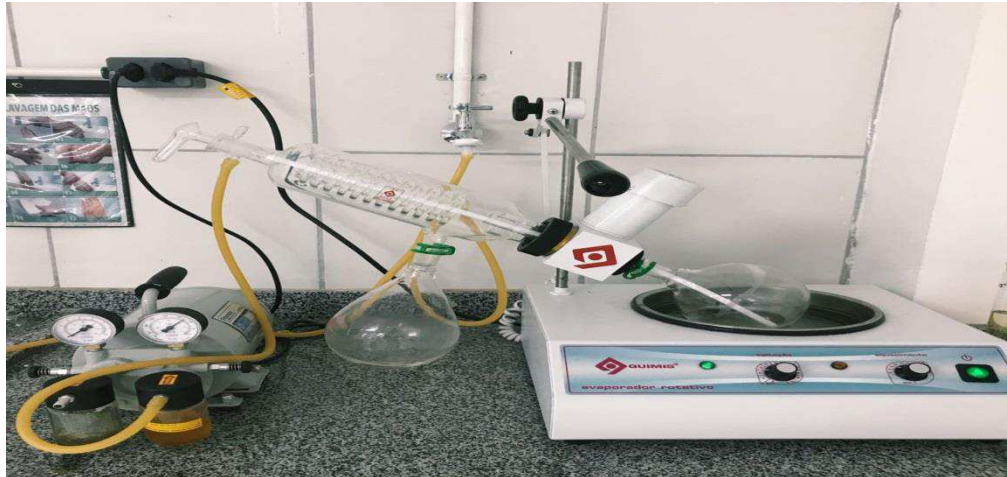


Fonte: Do autor (2018)

Esse sistema permite que determinada quantidade de solvente passe várias vezes pela amostra formando um ciclo. Dessa forma, pode possibilitar uma extração altamente eficiente utilizando pouco solvente quando comparado com outras metodologias de extração (SIMÕES et al., 2010). Para realizar essa metodologia, inicialmente o balão volumétrico previamente dessecado foi pesado em uma balança analítica, seguindo da pesagem de 5g da amostra, que posteriormente foi colocada no extrator. Após essas etapas, foi colocada água gelada para resfriar o sistema e também 200 ml de solvente orgânico específico de acordo com o planejamento experimental. Essa extração foi feita durante 8 horas (TOCCHETTO; MATTOS, 2004).

A fase orgânica oriunda das duas metodologias foi concentrada utilizando o rota-evaporador, onde a amostra foi submetida à temperatura correspondente ao ponto de ebulição dos solventes, com 2 rotações do balão por minuto e um vácuo de -100, como ilustrado na figura 4 e descrita por Oliveira (2010).

FIGURA 4 - ROTA EVAPORADOR



Fonte: Do autor (2018)

3.2.1.2 Rendimento do processo

A variável dependente utilizada foi o rendimento do processo de extração, cuja fórmula está descrita na equação 1:

EQUAÇÃO 1 - FÓRMULA PARA AVALIAR O RENDIMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

$$\text{Óleo extraído (g)} = \frac{\text{Óleo extraído} \times 100}{\text{Massa alimentada}} = \frac{\text{Óleo}}{100}$$

Fonte: BIMAKR, M. et al., 2009

Avaliar o rendimento do processo de extração é de extrema importância para verificar qual das metodologias utilizadas foi mais eficiente quando a maximização do rendimento do óleo essencial da *Vitex gardneriana* e, mediante isso, utilizar o óleo essencial obtido para realizar as identificações de compostos e as atividades antioxidantes e microbiológicas propostas (JANTAN et al., 2003).

3.2.2 Triagem de compostos

Através de metodologias simples e de caráter qualitativos, foi feita a pesquisa de flavonoides e terpenos verificando a presença ou ausência desses compostos no óleo essencial de *Vitex gardneriana Schauer*. Para esses testes, bem como para as caracterizações microbiológicas e antioxidantes, a amostra do óleo essencial da *Vitex* foi obtida através da triplicata das variáveis de extração que apresentaram melhor rendimento.

3.2.2.1 Flavonóides

A pesquisa de flavonoides foi realizada através do teste de Cianidina (Ácido clorídrico (HCl) concentrado e magnésio), como sugerido por Langassner; Vargas (2010).

Inicialmente foram transferidos 0,5 mL do extrato filtrado para uma cápsula de porcelana, que foi aquecida até secar em banho maria (50°C). Em seguida foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para que ocorresse a eliminação da clorofila, ainda no banho maria. Após esse procedimento, o resíduo foi desprezado e o que ficou foi redissolvido com 0,5 mL de etanol 70% e transferido para um tubo de ensaio, onde foram colocados cerca de 0,5 mL de HCl concentrado e pequena quantidade de magnésio em pó. A reação é considerada positiva quando apresenta uma coloração vermelha.

3.2.2.2 Terpenos

A identificação de terpenos foi feita através da adaptação do que foi descrito por Silva; Miranda; Conceição (2010). O teste para identificação de terpenos como os esteroides foi realizado de acordo com a reação de Lieberman Burchard. Inicialmente foram misturados 0,5 mL do extrato com 0,5 mL de clorofórmio, em seguida essa solução foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e transferida para um tubo de ensaio, onde foi adicionado 0,25 mL de anidrido acético e três gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, observando se há mudança de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde indica a presença de esteróides/triterpenóides respectivamente.

3.2.3 Caracterização microbiológica

As caracterizações microbiológicas também foram realizadas utilizando a triplicata de óleo essencial obtida através da metodologia de extração que gerou maior rendimento do óleo. As metodologias utilizadas seguiram protocolos desenvolvidos pela Universidade Federal do Ceará (UFC) e a metodologia descrita por Vale (2015).

3.2.3.1 Cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas fazem parte do estoque do laboratório da UFC. Por essa razão, esses microorganismos foram, inicialmente, ativados e colocados na estufa por um período de 24 horas. Posteriormente, as estirpes incubadas na estufa foram transferidas para tubos falcon de 50 ml e centrifugadas durante 5 minutos, sob 4°C na velocidade de 9000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 5 ml de meio de cultura estéril aos tubos para ressuspender o pellet bacteriano.

A concentração de células foi avaliada através da turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração para cada bactéria até que a concentração fosse ajustada para 2×10^6 células/ mL.

3.2.3.2 Montagem das placas

Foram utilizadas placas de 96 poços para a realização dos procedimentos. Onde, em todos os poços experimentais e no controle negativo foram colocados 100 uL de meio de cultura estéril.

Em seguida, 200 uL do óleo essencial da planta em estudo, previamente diluído a 10% em meio TSB (contendo 10% de tween), foi distribuído nos poços da linha A, para que, posteriormente, fosse feita uma diluição seriada com 100 uL da substância presente na linha A nas demais linhas, exceto na H, e descartando os últimos 100 uL excedentes da linha G. Enquanto que nos poços da Linha H (controle negativo) foram acrescentados mais 100 uL de meio de cultura estéril.

Após esses procedimentos e, por último, foram colocados 100 µL da diluição inicial dos inócuos bacterianos nos poços testes e no controle negativo. Seguido da incubação das placas à 37 °C durante 24 horas em agitação constante.

Depois desse período, após o crescimento dos biofilmes, os conteúdos dos poços foram retirados e o biofilme que ficou aderido a placa foi lavado três vezes usando 200 uL de água estéril por poço. Foi desenvolvida a quantificação da biomassa dos biofilmes e a enumeração do número de células viáveis.

3.2.3.3 Quantificação da biomassa

Para a determinação da biomassa através da coloração com cristal violeta, após a lavagem dos poços, a placa passou por uma secagem à temperatura ambiente, e, depois de seca, foram adicionados alguns reagentes em todos os poços testes para que, depois de 5 minutos esses fossem retirados, seguindo a ordem: 200 uL de álcool metílico P.A. e 200uL de cristal violeta 1% (totalizando 5 min de espera em cada).

Em seguida, todos os poços testes foram lavados 3 vezes com água destilada e, posteriormente, foram colocados 200 uL de ácido acético 33% para a realização da leitura da placa no SpectraMax, utilizando um comprimento de onda de 590 nanômetros e o shaker, durante 10 segundos, em intensidade média e modo orbital.

Todos os dados foram transferidos para o programa estatístico Graphpad com todas as informações pertinentes à interpretação dos resultados, como substâncias testadas, as respectivas concentrações e as estirpes bacterianas utilizadas.

3.2.3.4 Viabilidade celular e contagem das unidades formadoras de colônia

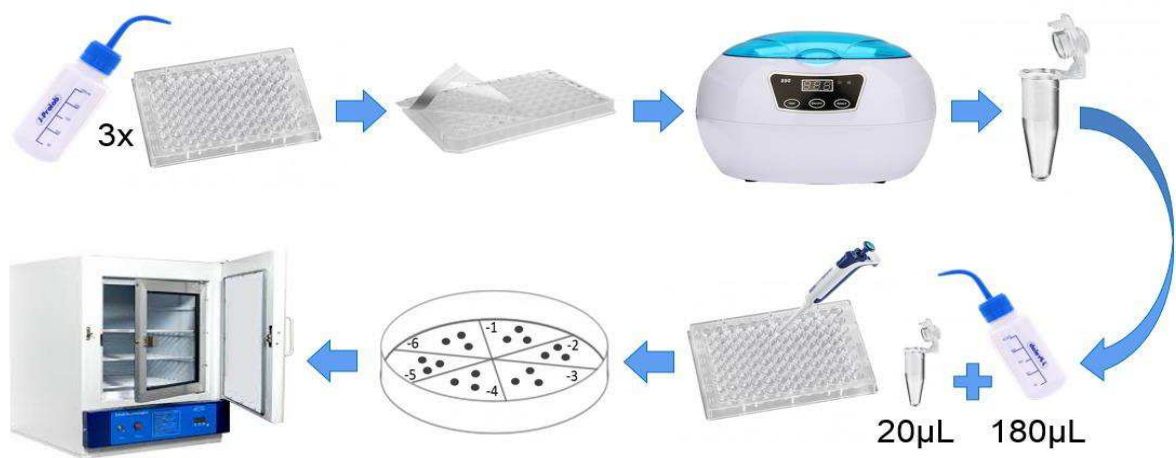
Para a realização da viabilidade celular e contagem das unidades formadoras de colônia, primeiramente 200 μL de água estéril foi adicionado a cada poço e, em seguida, a placa foi colocada em banho ultrassônico durante 480 segundos.

Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi retirado e foram realizadas diluições seriadas de cada suspensão. As diluições geradas foram plaqueadas utilizando placas de Petri com o meio ágar dividido em 6 fatias.

Cada uma dessas fatias foi identificada com o número correspondente a diluição decimal (-1 a -6); em seguida, em cada fatia foram colocadas 3 gotas de 10 μL do mesmo poço e correspondentes à diluição anotada naquela fatia; na tampa da placa foram colocadas as informações pertinentes a interpretação dos resultados, como substância testada, concentração da substância e estirpe bacteriana.

As placas foram incubadas na estufa durante 24 horas sob condições específicas para as estirpes bacteriana analisadas e, após esse tempo, foi feita a contagem do número de colônias formadas em cada uma das 3 gotas de cada diluição decimal (log UFC/mL), como observado na figura 5:

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA



Fonte: Do autor (2018)

3.2.4 Avaliação antioxidante

3.2.4.1 Capacidade de antioxidante total

A capacidade de antioxidante total foi realizada em triplicata com base no que foi descrito por Prieto; Pineda; Aguilar (1999). Sua realização é importante para avaliar a capacidade de ação antioxidante do óleo em situações de estresse oxidativo e consequentemente alterações teciduais, o que acontece em patologias como o câncer (DRÖGE, 2002).

Inicialmente, foram preparados os reagentes contendo fosfato de sódio monobásico, molibdato de amônia e solução padrão (ácido ascórbico): O fosfato de sódio foi preparado diluindo 33,3 mg do fosfato monobásico em 10 mL de água destilada, gerando uma concentração molar de 28mM; para a solução de molibdato foi dissolvido 1,232mg de molibdato em 12,5 mL de água (4mM), depois foram acrescidos 3,3 mL de ácido sulfúrico (0,6 mols) puro e água até completar o volume final de 10 mL.

Para preparar a solução de ácido ascórbico (padrão) foi desenvolvida uma curva utilizando diferentes concentrações (0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mg ácido ascórbico/mL). Em seguida foram pipetados 100 µL dessas concentrações em eppendorfes e neles ainda foram adicionados 100 µL da solução de molibdato, 100 µL da solução de fosfato de sódio e 1mL de água destilada.

Além disso, foi preparado o Branco contendo 100 µL da solução de molibdato, 100 µL da solução de fosfato de sódio e 100 µL de água destilada e acrescidos mais 1 mL de água.

As amostras testes, foram preparadas colocando 100 µL das diluições preparadas em 1mg/ml (10 mg de amostra em 10ml de água destilada) em eppendorfes e acrescidos 100 µL das soluções preparadas de molibdato, fosfato de sódio e 1 mL de água destilada.

Em seguida, as amostras, o branco e a curva padrão foram levados a estufa em 100°C durante 90 minutos e posteriormente foram resfriados. Em seguida foi feito a leitura do teste à 695 nm no espectrofotômetro (KASUKI) e o ácido ascórbico foi utilizado como padrão do resultado (mg de ácido ascórbico/ g de amostra).

3.2.5 Análise estatística

A análise dos rendimentos gerados foi realizada com o auxílio do software *Statística 2.0*; essa avaliação estatística foi combinada pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações. Para os ensaios antibacterianos e antioxidantes, os resultados foram

expressos como média dos valores \pm S.D para n experimentos e aplicados no programa de estatística Graphpad para a geração dos gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Para a realização da otimização do processo de extração do óleo essencial da *Vitex*, foi desenvolvido um planejamento experimental completo 2^3 em duplicata, utilizando uma matriz experimental com diferentes variáveis independentes, avaliando rendimento do óleo essencial de cada procedimento.

Tais extrações seguiram uma ordem randomizada (8,4,1, 7, 3, 5, 2, 6) gerando rendimentos que podem ser visto na tabela 3:

TABELA 3 - MATRIZ EXPERIMENTAL E RENDIMENTOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA *VITEX GARDNERIANA*.

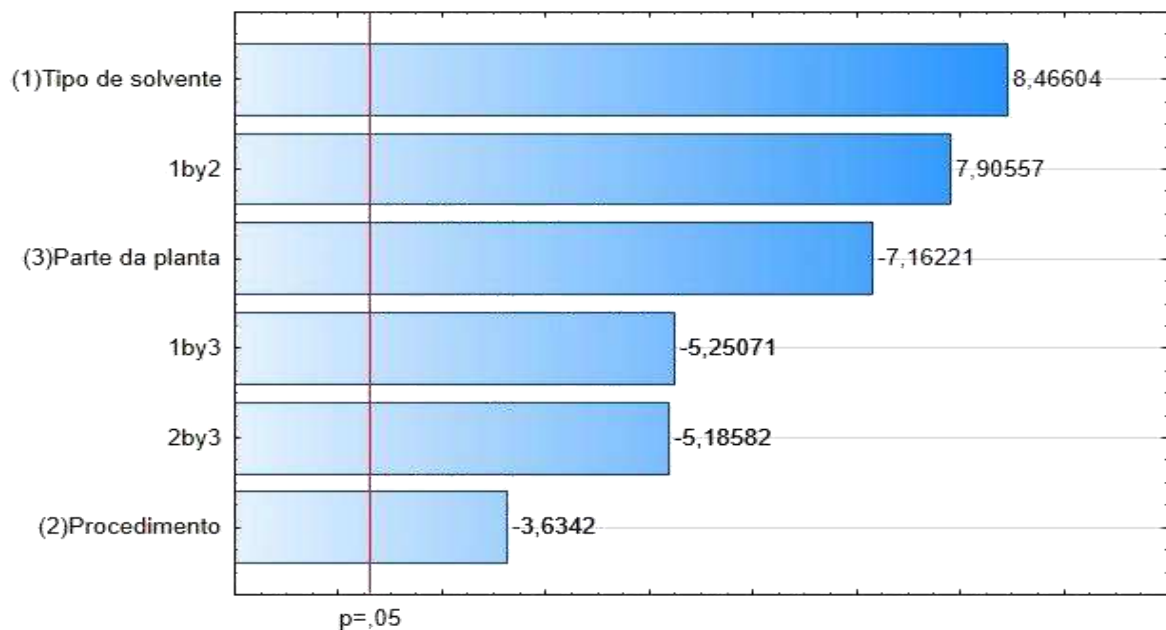
	T-S	PROCEDIMENTO	PP	Rendimentos (1)	Rendimentos (2)
1	-1	-1	-1	7%	6,0%
2	+1	-1	-1	7,1%	7,0%
3	-1	+1	-1	1,89%	1,90%
4	+1	+1	-1	11,84%	15,23%
5	-1	-1	+1	5,95%	6,01%
6	+1	-1	+1	6,50%	6,40%
7	-1	+1	+1	1,40%	1,30%
8	+1	+1	+1	3,40%	2,80%

Fonte: Do autor (2018)

*Onde, tipo de solvente (T-S), parte da planta (PP) e procedimento de extração; -1 (T-S Acetato de etila, procedimento Soxhlet, PP folha) +1 (T-S Éter etílico, procedimento extração por solvente, PP caule).

Os resultados dos rendimentos mostrados na tabela 3 foram aplicados em programas estatísticos com o intuito de verificar a metodologia mais eficaz para a maximização da extração do óleo essencial e a interferência das variáveis utilizadas na geração desses rendimentos. O programa Statistica gerou o gráfico de Pareto, visto em figura 6, para expressar a avaliação das variáveis independentes quanto a sua significância.

FIGURA 6 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES QUANTO SUA SIGNIFICÂNCIA (GRÁFICO DE PARETO)



Fonte: Do autor (2018)

De acordo com o gráfico de Pareto, todas as variáveis utilizadas (parte da planta, tipo de solvente e metodologias de extração), bem como a interação entre elas apresentaram diferenças significativas quanto ao rendimento do óleo essencial. Ainda de acordo com esse gráfico, o tipo de solvente foi a variável que mais influenciou no rendimento. Sobre isso, Simões et al. (2010) ressalta que, de maneira geral, os solventes podem influenciar na extração de óleos essenciais, devido as suas diferentes polaridades, o que pode possibilitar uma maior seletividade de compostos durante o processo de extração ou alguma interação entre compostos químicos que dificultem o procedimento. Ainda de acordo com esse mesmo autor, a estrutura das partes da planta, tempo de extrações e outros fatores extrínsecos também podem afetar as extrações de óleos essenciais.

Uma equação linear (equação 2) foi desenvolvida em função da variável resposta, rendimento da extração, em termos das três variáveis independentes, em que y representa a

variável dependente. Os valores codificados das variáveis são representados por x_1 (procedimento), x_2 (tipo de solvente) e x_3 (parte da planta), respectivamente.

EQUAÇÃO 2 - EQUAÇÃO LINEAR PARA A AVALIAÇÃO DA VARIÁVEL RESPOSTA, RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO EM TERMOS DAS TRÊS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.

$$y = 5,86 + 1,79X_1 - 0,77 X_2 - 1,52 X_3 + 1,68X_1X_2 - 1,11 X_1X_3 - 1,10 X_2X_3$$

Fonte: Anova (2018)

As variáveis independentes utilizadas foram avaliadas na análise de variância Anova, vista na tabela 4. Essa análise permite comparar três ou mais tratamentos para verificar a sua significância (SILVA, 2012).

TABELA 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA

	SS	N	MS	Fcal	Ftab	R ₂
Regressão	181,820	6	30,3034			
Resíduo	30,002	9	3,33353	9,0905	3,374	0,8536
Falta de ajuste	24,256	1	24,2556			
Erro puro	5,746	8	0,71826			
Total	211,822	15	14,1215			

Fonte: Do autor (2018)

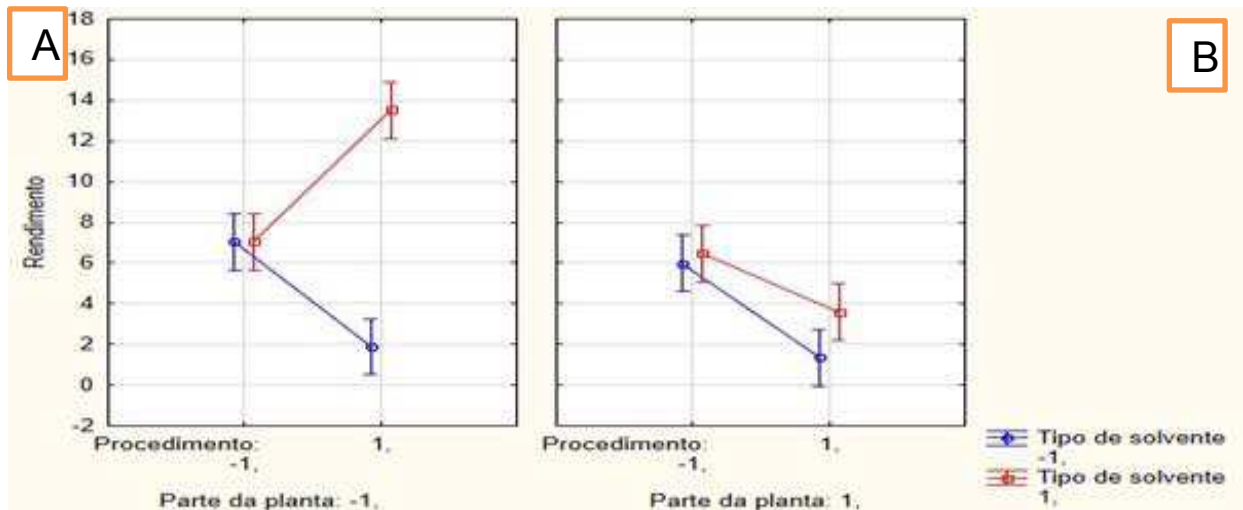
*SS: Soma quadrática; n: número de grau de liberdade; MS: Média quadrática; R₂: coeficiente de variação.

De acordo com os dados mostrados por essa análise, pode-se compreender que valor de F calculado foi maior do que o valor de F tabelado no nível de 5% (p / p), indicando que as combinações de tratamento admitidas pela equação foram significativas. Além disso, o valor de R₂ indica que 85,36% da variável resposta pode ser explicada pelo modelo apresentado na equação. Diante disso, Silva (2012) destaca a utilização do Anova como metodologia eficaz para verificar se há correlação entre os valores preditos pelo modelo com os valores observados no experimento.

Além dessas análises, a análise das médias marginais (figura 7) mostrou que, em “A”, quando foi utilizada a parte da planta -1 (folha), o procedimento -1 (soxhlet), o rendimento apresentou-se no mesmo nível na utilização dos dois tipos de solvente. Já quando foi utilizada a parte da planta -1, o procedimento 1 (extração por solvente), o rendimento do óleo

aumentou com a utilização do solvente 1 (éter etílico) e diminuiu com a utilização do solvente -1 (Acetato de etila).

FIGURA 7 - GRÁFICO AVALIATIVO RENDIMENTO/VARIÁVEIS.



Fonte: Do autor (2018)

*Onde, -1 (T-S Acetato de etila, procedimento Soxhlet, PP folha) +1 (T-S Éter etílico, procedimento extração por solvente, PP caule).

Já na figura “B” pode-se constatar que na utilização do procedimento -1, da parte da planta 1, os rendimentos apresentaram-se aproximados na utilização dos dois tipos de solvente, sendo que na utilização do solvente 1 houve rendimento um pouco maior. Enquanto que na utilização da parte da planta 1, do procedimento 1, o rendimento do óleo essencial apresentou declínio na utilização dos dois tipos de solventes quando comparado com os valores gerados na utilização do procedimento -1. Apesar disso, na utilização das duas metodologias de extração e do caule, o éter etílico foi mais eficiente quanto à maximização do rendimento.

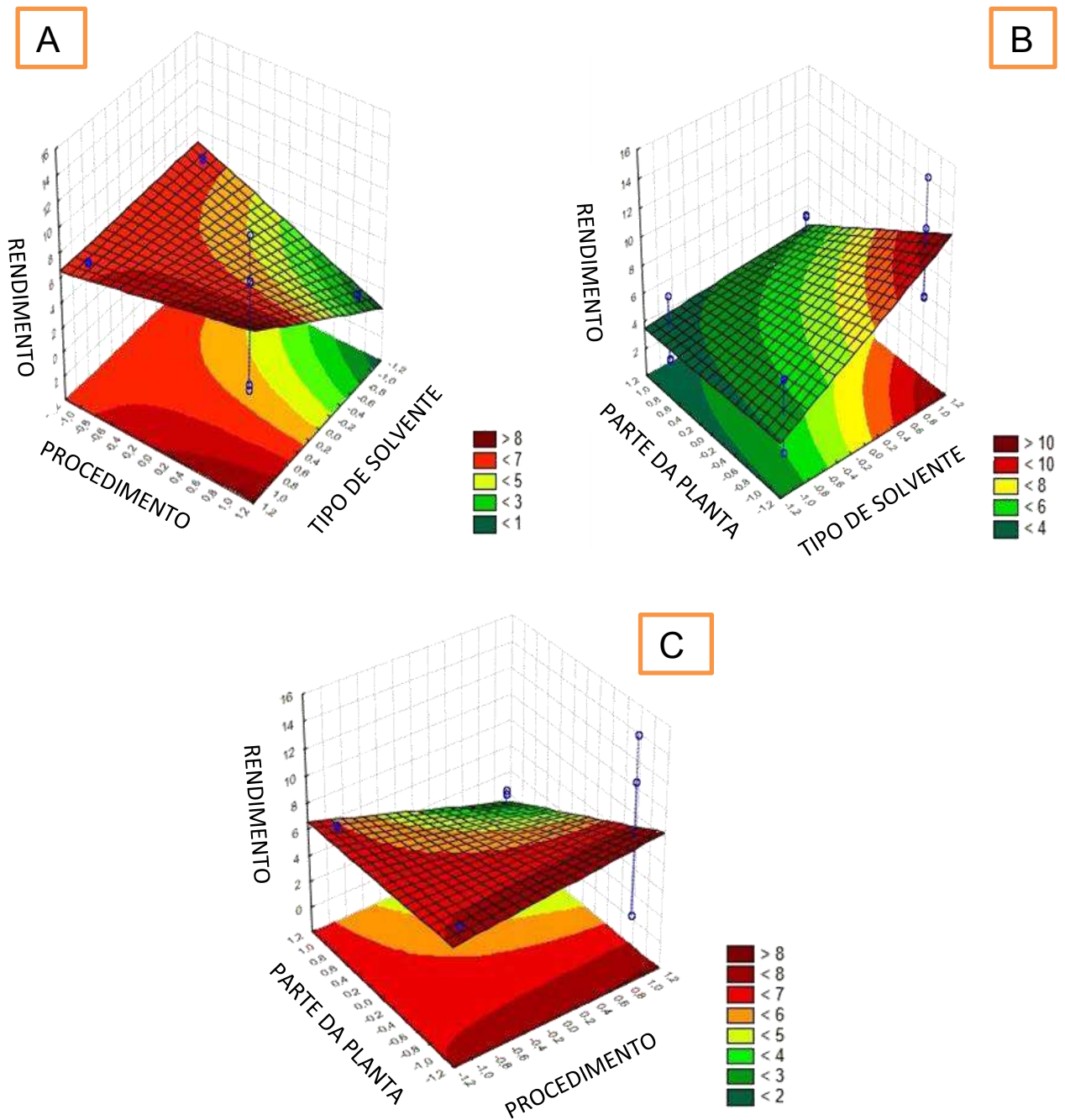
As metodologias de extrações utilizadas possuem algumas diferenças, como, por exemplo, o tempo de contato da amostra com o solvente. Na metodologia utilizando Soxhlet o tempo de contato entre a variável parte da planta com solvente é bem maior do que na metodologia “extração por solvente”. De acordo com alguns autores, como Prins; Lemos; Freitas (2006) esse tempo de contato pode interferir no rendimento de óleos essenciais, assim como influenciou na extração dos óleos essenciais do alecrim (*Rosmarinus officinalis L*). De maneira geral, o aumento do tempo de extração é diretamente proporcional ao rendimento do óleo essencial, porém, de acordo com Waterman (1993); Mann (1994) esse fator dependerá muito da parte da planta utilizada, da consistência, bem como das características dos solventes

utilizados, o que podem explicar a metodologia de menor tempo ter gerado uma quantidade de óleo maior.

Sobre isso, Simões et al. (2010) relata que a consistência da amostra também pode influenciar na extração devido às estruturas histológicas das diversas partes de uma planta ser bastante heterogênea; existem algumas partes mais compactas, como o caule, e outras que possuem uma textura mais delicada, como as folhas. Dessa forma, a consistência dos tecidos também pode influenciar no poder de penetração dos solventes e conseqüentemente na extração de óleos essenciais, o que explica a facilidade do éter em extrair o óleo essencial das folhas com mais facilidade independente do tempo de extração e a sua dificuldade em extrair do caule.

Para uma melhor visualização da interferência dessas variáveis no rendimento do óleo essencial, foram elaborados os gráficos de superfície de resposta, visto na figura 8:

FIGURA 8. GRÁFICOS DE AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO. A: TIPO DE SOLVENTE E PROCEDIMENTO; B: PARTE DA PLANTA E TIPO DE SOLVENTE; C: PARTE DA PLANTA E PROCEDIMENTO.



Fonte: o autor (2018)

*Onde, -1 (T-S Acetato de etila, procedimento Soxhlet, PP folha) +1 (T-S Éter etílico, procedimento extração por solvente, PP caule).

De maneira geral, as imagens expressas na figura 8 são complementares e contribuem para a avaliação estatística das metodologias de extração utilizadas quanto à maximização do rendimento do óleo essencial extraído, que pode ser observada através da diferença de cores, onde a cor vermelha mais escura expressa os maiores rendimentos nos gráficos. Na imagem

A, observando a variação de cores, está expresso que o tipo de solvente 1 (éter etílico) e o procedimento 1 (Extração por solvente) geraram um bom rendimento; em concordância a isso, a imagem B expressa que parte da planta -1 (folha) e o tipo de solvente 1 (éter etílico) também geraram o maior rendimento e a imagem C conclui que a parte da planta - 1 e o procedimento 1 também contribuíram para um aumento no rendimento.

Nesse sentido, pode-se observar que durante a realização desses experimentos houve influência de todas as variáveis e da interação entre elas sobre o rendimento do óleo essencial. O solvente orgânico éter etílico, por exemplo, possui algumas características mais apropriadas para a extração de óleos essenciais de acordo com Biasi e Deschamps (2009), como uma baixa temperatura de ebulição, uma boa seletividade, além de ser quimicamente inerte. Em contrapartida a isso, o acetato de etila possui um ponto de ebulição mais alto, podendo reagir com algumas substâncias e perder estabilidade perante fontes de calor (QUIMIDROL; COMÉRCIO INDÚSTRIA IMPORTAÇÃO LTDA, 2007).

Destarte, as características químicas do éter etílico, bem como a textura mais delicada da folha (SIMÕES et al.,2010) e o tempo do procedimento extração por solvente foram mais significativos e eficientes quanto à maximização do óleo essencial de *Vitex gardneriana Schauer*. Assim, conclui-se que a metodologia quatro da matriz experimental (Éter etílico, folha e extração por solvente) foi estatisticamente a mais eficaz para a maximização do rendimento do óleo essencial da *Vitex*. Essa metodologia gerou rendimentos numerais de 11,84% e 15,23%, valores superiores ao encontrado por Monteiro et al. (2015) em suas metodologias de extração utilizando extrato em etanol de folhas secas de *Vitex* (13,12%) e extrato em água (8,13%).

Ademais, a partir da avaliação estatística e com base no que a literatura revela sobre extrações de óleos essenciais e os seus interferentes, é importante destacar que o planejamento experimental utilizado mostrou-se uma ferramenta útil para avaliar as variáveis independentes sugeridas e a influência de cada uma sobre uma variável dependente. De acordo com Peralta et al. (2005), o desenvolvimento de planejamentos experimentais como esse permitem a avaliação de uma grande quantidade de variáveis através de uma quantidade pequena de ensaios, além de possibilitar a redução de custos e conferir uma maior confiabilidade aos resultados.

4.2 PESQUISAS DE COMPOSTOS

A pesquisa de compostos, bem como as avaliações das atividades antimicrobiana e antioxidante foram desenvolvidas utilizando o óleo essencial obtido através da triplicata da metodologia quatro da matriz experimental.

4.2.1 Flavonóides

A pesquisa de Flavonóides obedeceu à metodologia descrita por Langassner e Vargas (2010), pela qual a reação é positiva quando apresenta uma coloração vermelha, semelhante à figura 9:

FIGURA 9 - REAÇÃO DE CIANIDINA



Fonte: (LANGASSNER; VARGAS, 2010)

A pesquisa desse composto no óleo essencial de *Vitex gardneriana Schauer* apresentou resultado positivo, tendo em vista que o óleo apresenta coloração original incolor, como pode ser observado na figura 10:

FIGURA 10 - PESQUISA DE FLAVONOIDES NO ÓLEO ESSENCIAL DE VITEX.



Fonte: Do autor (2018)

De acordo com Zuanazzi; Montanha (2010), na *Vitex* sp. já foi identificado um tipo de flavonoide chamado vitexina. De maneira geral, a presença de flavonoides em compostos de vegetais, como nos óleos essenciais, pode estar relacionado com as atividades biológicas

desses componentes frente à microorganismos como fungos e bactérias, além da possibilidade de possuírem atividade antioxidante (SIMÕES et al.,2010).

4.2.2 Terpenos

A pesquisa de terpenos foi desenvolvida a partir de uma adaptação do que foi descrito por Silva; Miranda; Conceição (2010). De acordo com esses autores a presença de terpenos pode ser visualizada através da reação de Lieberman Burchard, onde haverá coloração azul evanescente seguida de verde indicando a presença de esteróides/triterpenóides respectivamente.

A pesquisa desse composto no óleo essencial de *Vitex gardneriana Schauer* apresentou resultado positivo, como pode ser observado na figura 11:

FIGURA 11 - PESQUISA DE TERPENOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE VITEX



Fonte: Do autor (2018)

Os terpenos são compostos frequentemente encontrados em produtos naturais (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). De acordo com CARNEIRO et al. (2011), no gênero *Vitex (Lamiaceae)* já foram identificados esses compostos e, além disso, Barreto (2005) descreveu em seu artigo que nos óleos da *Vitex gardneriana* também já foram identificados a presença de compostos como: monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, esteróides, iridóides, saponinas, açúcares, flavonóides e outros.

4.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *V. GARDNERIANA*

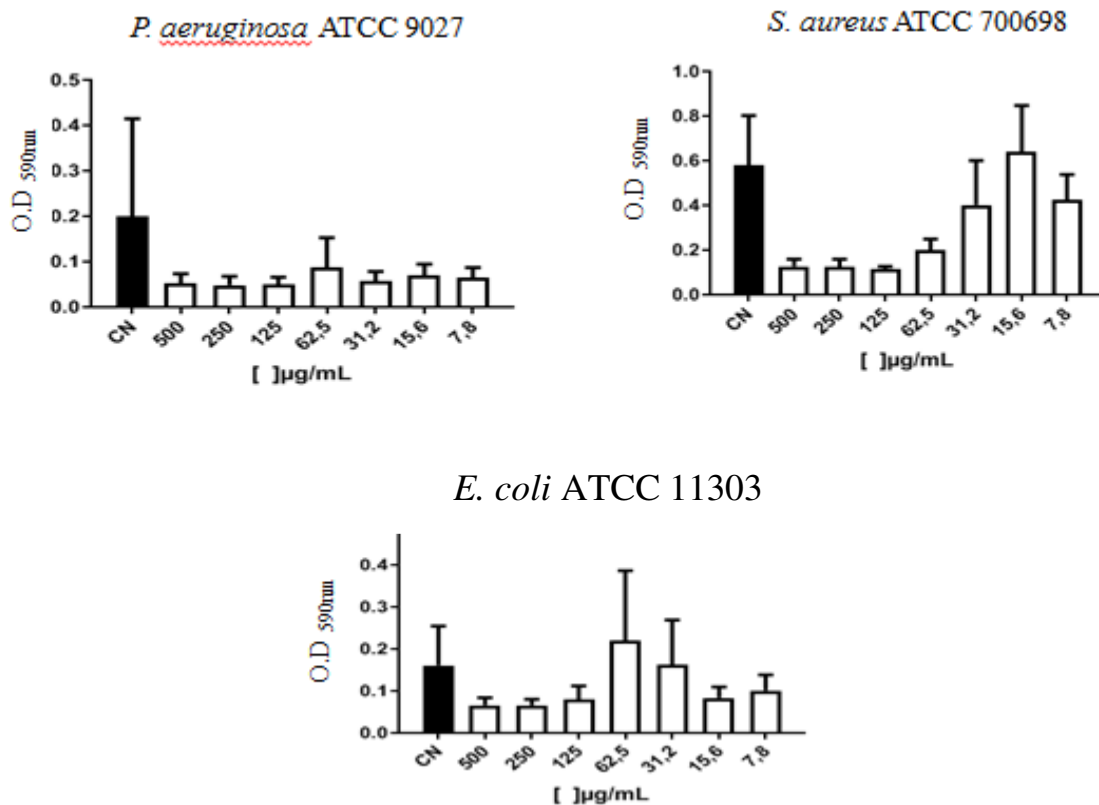
Os óleos essenciais obtidos de plantas têm sido avaliados pela possibilidade de possuírem atividades biológicas, principalmente relacionadas com ação frente aos microorganismos (VALE, 2015). Sobre isso, foram realizadas aplicações do óleo essencial de *V. gardneriana* frente às cepas descritas no tópico 3.1.1, com a finalidade de verificar a ação

desse composto na inibição da formação de biofilmes bacterianos e do número de células viáveis nos biofilmes.

4.3.1 Efeito do óleo essencial na inibição de biofilmes

A figura 12 expressa a quantificação da biomassa dos biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* após 24 horas de crescimento na presença do óleo essencial extraído de *Vitex gardneriana*.

FIGURA 12 - QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA DOS BIOFILMES DE *P. AERUGINOSA*, *S. AUREUS* E *E. COLI* APÓS 24 HORAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DO ÓLEO DE VITEX.



Fonte: Do autor (2018)

De maneira geral, a formação de biomassa pelas cepas avaliadas foi inibida pelo óleo essencial da *Vitex gardneriana Schauer*. Sobre isso Benbelaid et al. (2014), relata que os óleos essenciais, na maioria das vezes, podem possuir atividades sobre os biofilmes tanto de bactérias Gram-negativas, quanto de Gram-positivas. Ademais, a presença de compostos como Flavonóides e Terpenos, já identificados na planta utilizada, contribuem para o desenvolvimento de atividades frente aos microorganismos.

Essas atividades são de grande relevância, pois as associações de microorganismos podem desencadear doenças, como infecções urinárias e prostatite bacteriana no caso das

doenças genitourinárias, além de terem a capacidade de se desenvolverem em superfícies abióticas, incluindo dispositivos médicos como o cateter urinário e aparelhos intrauterinos (ONURDAĞ et al., 2010).

Diante disso, pode-se observar que, nesse estudo, todas as concentrações foram capazes de reduzir, expressivamente, a biomassa da *P. aeruginosa* quando comparado com o controle negativo, enquanto que nas demais bactérias isso ocorreu apenas em algumas concentrações (500, 250, 125, 62,5, 31,2 e 7,8 µg/mL para *S. aureus* e 500, 250, 125, 15,6 e 7,8 µg/mL para *E. coli*). Vale (2015) também quantificou a biomassa dos biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e os resultados avaliados por ele também constataram que o óleo essencial da *Vitex gardneriana Schauer* é capaz de reduzir a formação de biomassa por esses microorganismos.

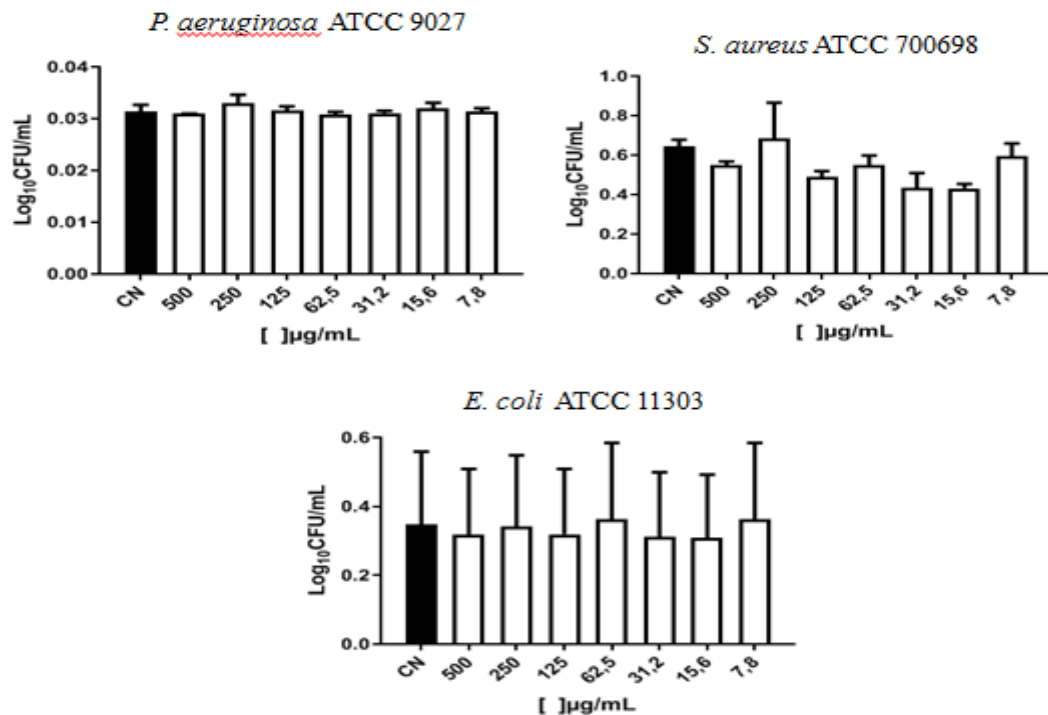
De acordo com Davies (2003), cerca de 80% das infecções bacterianas estão relacionadas com a formação de biofilmes. Por essa razão, capacidade do óleo essencial estudado em inibir a formação de biomassa torna-se uma aplicabilidade medicinal importante frente às infecções (SILVA et al., 2012).

De acordo com alguns autores, baixas concentrações de antimicrobianos podem aumentar a produção de biofilmes por algumas espécies bacterianas (HATHROUBI et al., 2015), relacionado a isso pode estar o fato das baixas concentrações do óleo essencial de *Vitex* não terem sido tão eficaz para a redução da biomassa das cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

Em relação ao ensaio de enumeração de unidades formadoras de colônias, o número de células viáveis de *P. aeruginosa* e *E. coli* não foi reduzido pelo óleo essencial da *V. gardneriana* em estudo. Em contrapartida a isso, o número de células viáveis da cepa MRSA de *S. aureus* foi reduzido em algumas concentrações do óleo essencial de *Vitex*. O que pode ser observado na figura 13.

A capacidade do óleo essencial da *Vitex* em reduzir, apesar de apenas em algumas concentrações, o número de células viáveis da *S. aureus* é de extrema importância para a investigação de novos princípios ativos frente a essas bactérias, tendo em vista que podem ser responsáveis por uma série de patologias, como infecções urinárias, prostatites bacterianas, além de formarem biofilmes em superfícies bióticas e abióticas (BATONI et al., 2011).

FIGURA 13 - NUMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BIOFILME DE *S. AUREUS* ATCC 700698, *P. AERUGINOSA* ATCC 9027 E *E. COLI* ATCC 11303 APÓS 24 HORAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *V. GARDNERIANA* SCHAUER.



Fonte: Do autor (2018)

Legitimando com esses dados, Kavanaugh; Ribbec (2012) desenvolveram um trabalho avaliando a aplicação de vários óleos essenciais em biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e, curiosamente, um dos óleos essenciais foi eficaz contra biofilme, mas não foi capaz de reduzir o número de células planctônicas. Além disso, Silva et al. (2009) avaliando a aplicabilidade de óleos essenciais em cepas de *S. aureus* e *E. coli*, constatou que a cepa de *S. aureus* apresentou maior susceptibilidade do que a *E. coli*.

Ainda não existem explicações fidedignas quanto ao mecanismo de ação dos óleos essenciais frente aos microorganismos. Porém, de acordo com Burt (2004) há especulações que esses compostos podem causar danos às membranas das bactérias através de compostos lipofílicos, o que pode ser fator explicativo das diferentes ações frente a bactérias Gram negativas e Gram positivas.

Ademais, mediante os resultados expostos, pode-se constatar que o óleo essencial da *Vitex gardneriana Schauer* apresentou resultados importantes na inibição da formação de biomassa pelas cepas de *S. aureus* ATCC 700698, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *E. coli* ATCC 11303, sendo mais eficaz para reduzir o número de células viáveis da cepa MRSA de *S. aureus* ATCC 700698. Ainda que o gênero *Vitex* represente uma fonte promissora contra biofilmes, a espécie em estudo ainda permanece pouco explorada, necessitando do

desenvolvimento de mais estudos que encontrem a maneira mais eficiente e apropriada para a aplicação do potencial biotecnológico dessa planta.

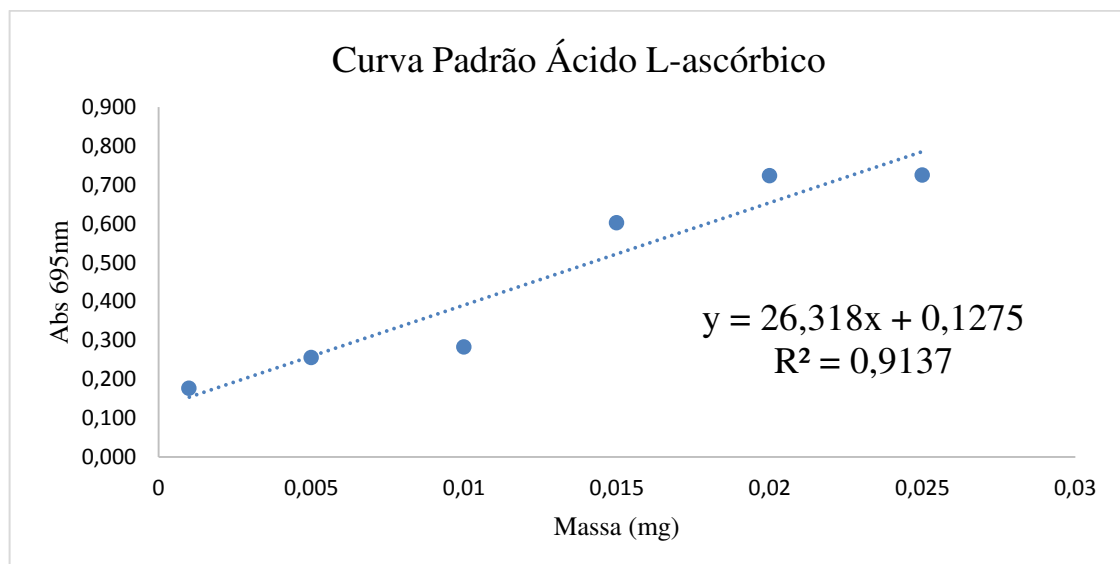
4.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) foi realizada de acordo com o que foi descrito por Prieto; Pineda; Aguilar (1999), com a finalidade de verificar a capacidade da amostra teste em doar elétrons e, dessa forma, neutralizar os radicais livres.

Como controle positivo foi utilizado uma curva padrão de ácido ascórbico, que gerou, como observado na figura 14, a equação linear “ $y = 26,318x + 0,1275$ ”, onde y pode ser substituído pelas absorvâncias da amostra teste e x corresponderá à quantidade da absorvância teste que possui atividade antioxidante correlacionada com o ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/g de amostra).

Além disso, pode-se observar que a equação apresenta o coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,91, o que indica que 91% da variável resposta pode ser explicada pelo modelo apresentado na equação. De acordo com Shimakura (2006), quando o valor de R^2 se expressa acima de 0,9 há a possibilidade de correlações fortes entre as variáveis.

FIGURA 14 - GRÁFICO DA CURVA PADRÃO (ABSORVÂNCIA/CONCENTRAÇÃO).



Fonte: Do autor (2018)

A figura 14 apresenta os valores de absorvância medidos em cada concentração da curva padrão. Os valores apresentados foram comparados com as absorvâncias da amostra teste para verificar se o óleo essencial da planta analisada possui capacidade antioxidante

total, sendo capaz de reduzir redução Mo^{+6} a Mo^{+5} . As absorvâncias das amostras testes, bem como a média e o desvio padrão podem ser vistos na tabela 5:

TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDA PELO MÉTODO REDUÇÃO DE MO^{+6} A MO^{+5} DO ÓLEO DE VITEX GARDNERIANA SCHAUER.

Amostras	Absorvância		Média	DP	CV
	1	2			
	0,359	0,329	0,344	0,015	4,36

Fonte: Do autor (2018)

Através da análise dos dados expostos na tabela 5 percebe-se que as absorvâncias das amostras testes ficaram dentro dos valores estabelecidos na curva de ácido ascórbico e a respeito dos valores de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), é possível considerar, de acordo com Pimentel Gomes (1985), que conferem baixa dispersão dos resultados.

Os valores de absorvância expressos na tabela 5 foram aplicados à equação da figura 14, com o intuito de verificar a concentração que a amostra teste possui atividade antioxidante correlacionada com ácido ascórbico. Os resultados gerados após a aplicação na fórmula foram organizados na tabela 6:

TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO RELACIONADO COM O ÁCIDO ASCÓRBICO.

Amostras	Concentrações		Media	DP	CV	Amostr a Branco	Valor de "x" na curva (mg)	Eq. Ácido ascórbico em mg/g de amostra
	1	2						
	0,088	0,077	0,082	0,006	6,93	0,344	0,0082	82,26

Fonte: Do autor (2018)

A partir da análise da tabela 6 é possível perceber que a média \pm DP das absorvâncias testes possui valor aproximado com a média de absorvância obtida entre a utilização das concentrações 0,05 e 0,1 da curva de ácido ascórbico, sendo, dessa forma, capaz de reduzir Mo^{+6} a Mo^{+5} . Para a verificação do equivalente de ácido ascórbico (mg) por grama de amostra, o valor expresso de "x" na curva (0,0082 mg) foi dividido pela massa de óleo

utilizada (0,00010g) encontrando o valor significante de 82,26 mg equivalente de ácido ascórbico por grama de amostra.

Não foram encontrados estudos que avaliassem a capacidade antioxidante total do óleo essencial do gênero *Vitex* correlacionada com ácido ascórbico. Porém, outros estudos, como o desenvolvido por Melo (2013), avaliou a capacidade antioxidante total (expresso como equivalentes de ácido ascórbico) de polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Dictyopteris justii*, encontrando valores também significativos.

Ademais, alguns estudos, como o de Monteiro et al (2015); Vale (2015), também relatam o potencial antioxidante da *Vitex gardneirana Schauer*, porém relacionados com outros radicais livres. De acordo com o que foi proposto por Vale (2015), o óleo essencial da *Vitex* apresentou elevada capacidade antioxidante para inibir a oxidação β -caroteno, em contrapartida durante a avaliação da capacidade quelante sobre o íon ferroso, o óleo essencial de *C. piauhiensis* mostrou-se mais eficaz como antioxidante em relação ao óleo de *V. gardneriana*. Ainda sobre a atividade antioxidante da planta em estudo, Monteiro et al. (2015) verificou que essa atividade, quando comparada com o padrão positivo (TROLOX) foi considerada boa para a inibição do radical livre DPPH em 50%.

De acordo com Amorati et al. (2013) a atividade antioxidante dos óleos essenciais está diretamente relacionada com a sua composição. Perante isso, Grassmann (2005) ressalta que os terpenóides, compostos já identificados no óleo essencial da planta em estudo, têm demonstrado potencial atividade antioxidante, apesar dessa atividade também está relacionada com os a interação entre os vários compostos presentes nesses óleos.

Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados. Esses radicais podem ser formados naturalmente no organismo ou através da exposição a fatores exógenos, porém, quando produzidos de forma exagerada, podem provocar estresse oxidativo e consequentemente danos à saúde humana, podendo desencadear doenças, como as neoplasias malignas (BARREIROS et al., 2006).

De acordo com Bianchi; Antunes (1999), com a finalidade de limitar a produção exagerada de radicais livres e impedir a indução de danos, são estudados mecanismos de defesa antioxidante em vários compostos, incluindo óleo oriundo de plantas.

Diante disso, a boa atividade antioxidante do óleo essencial da planta em estudo, destaca-se como importante alternativa a ser utilizada frente aos radicais livres e consequentemente as doenças relacionadas ao excesso desses radicais. Para isso, é necessário a realização de mais estudos, além da repetição dos valores em triplicata para conferir uma maior fidedignidade a essas análises.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante os resultados obtidos, pode-se verificar que a planta em estudo apresentou valores significativos quanto às metodologias testadas. Dessa forma, através desse trabalho, foi possível compreender que as variáveis (parte da planta, tipo de solvente e metodologia de extração) influenciam no rendimento do óleo essencial de *Vitex gardneriana Schauer*, sendo a folha, o éter etílico e a extração por solvente as variáveis que geraram o melhor rendimento.

Além disso, algumas concentrações do óleo essencial obtido através dessa metodologia apresentaram potencial inibitório da formação de biomassa das cepas de *S. aureus* ATCC 700698, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *E. coli* ATCC 11303, sendo ainda eficaz para reduzir o número de células viáveis da cepa MRSA de *S. aureus* ATCC 700698.

No que diz respeito à atividade antioxidante, o referente óleo apresentou atividade antioxidante capaz de reduzir Mo^{+6} a Mo^{+5} , com o valor de 82,26 mg de equivalente de ácido ascórbico por grama de amostra. Apesar disso, sugere-se a repetição dos resultados da atividade antioxidante para a confirmação dos resultados em triplicata.

Sobre a triagem de compostos, foi identificado que o óleo essencial em estudo possui flavonoides e terpenos do tipo triterpenóides.

Destarte, perante a avaliação dos resultados corroborados pelos valores já reportados na literatura, é possível afirmar que o óleo essencial da *Vitex gardneriana Schauer* apresenta-se como um composto de bom potencial biotecnológico contra agentes infecciosos, além da possibilidade de possuir capacidade terapêutica contra estresse oxidativo, o que faz desse óleo um objeto de estudo promissor para a ciência e, quem sabe, para a evolução terapêutica das doenças geniturinárias, já que essas englobam desde simples infecções ocasionadas por bactérias ou até biofilmes de bactérias até doenças associadas ao excesso de radicais livres.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AAL, E. A.; DAOSUKHO, S.; EL-SHALL, H. Effect of supersaturation ratio and Khella extract on nucleation and morphology of kidney stones. **Journal of Crystal Growth**, v.311, p.2673–2681. 2009.
- AKRAM et al. Identification of Spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the Immunomodulatory Effectsptr_3289 557. 562. **Phytotherapy Research**, n. 25, p. 557–562, 2011.
- ALBERICI, I., et al. "Pathogens causing urinary tract infections in infants: a european overview by the ESCAPE study group." **European journal of pediatrics**, v. 174, n. 6, p. 783-790, 2015.
- ALBINI, Carlos Augusto et al (Org.). **Infecções urinárias: uma abordagem multidisciplinar**. Curitiba/PR: Editora Crv, 2012. 803 p.
- ALENCAR, Éverton do Nascimento. **Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas emulsionados contendo óleos naturais para o tratamento de infecções cutâneas**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2013.
- AMORATI, R.; FOT, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant acitivity of essential oils: a critical review. **Journal of Agricultural end Chemistry**, n. 61, v. 46, p. 10835–10847, out. 2013.
- ANDRADE, S. E. O. et al. Estudo Etnobotânico De Plantas Medicinais na Comunidade Várzea Comprida dos Oliveiras, Pombal, Paraíba, Brasil. **Revista Verde**, Mossoró/RN, v. 7, n. 3, p. 46-52, jul-set, 2012.
- ARAÚJO, E. G.; FERNANDES, N. S. Determinação da umidade em farinhas de trigo utilizando o método clássico de análise e a termogravimetria. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO NORTE NORDESTE DE QUÍMICA, 1., 2007, Natal. **Anais [...]** Natal: ANNQ, 2007. Disponível em: http://annq.org/congresso2007/trabalhos_apresentados/T78.pdf. Acesso em 24 jan. 2018.
- ARAÚJO, M. M. **Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais no assentamento Santo Antonio, Cajazeiras, PB, Brasil**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB, 2009.
- ARRABAL-POLO, M. A.; ARRABAL-MARTIN, M.; GARRIDO-GOMEZ, J. Calcium renal lithiasis: metabolic diagnosis and medical treatment. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v. 131, n. 1, p.46-53, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802013000100046&lng=en&tlng=en. Acesso em: 03 maio 2018.
- ATARÉS, L. et al. Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. **Food Chem**, v. 134, n. 3, p. 1418-1424, 2012.
- ATMANI, F. et al. *Cynodon dactylon* extract as a preventive and curative agent in experimentally induced nephrolithiasis. **Urological Research**, v. 37, p. 75–82, 2009.

BADR, K.F. Filtration function in glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 68., p. 1905–1919. 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*, v. 46, n. 2, p. 446-475. 2008.

BARETO, Livia Cristina Lira de Sá et al. Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** Braz J. Pharmacogn, v.15, n. 1: jan/mar. 2005.

BARETO, Livia Cristina Lira de Sá. **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Vitex Gardneriana* Schauer (verbenaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, 113-123, 2006.

BARRETO, Livia Cristina Lira de Sá et al. Atividade Moluscicida de Extratos e de Aucubina de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) em Embriões da *Biomphalaria glabrata*. **Latin American Journal Of Pharmacy**. Santiago de Compostela/ Espanha, p. 339-343. 28 jan. 2007.

BARRETO, Livia Cristina Lira de Sá et al. Avaliação Preliminar da Atividade Biológica e Toxicidade Aguda de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae). *Lat. Am. J. Pharm*, v. 27, n. 6, p. 909- 13, 2008.

BARROS, G. S. G.; et al. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **J Pharm Pharmacol.**, v. 22, n. 2, 116-122, fev. 1970.

BASHIR, S.; GILANI, A.H. Antiurolithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: An explanation of the underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.106-116, 2009.

BATISTA, Alessandra Macedo; ARCANJO, Gabriel Davi Brandão. **Caracterização do uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos utilizados por pacientes com câncer atendidos pelo sistema único de saúde no município de Aracaju-SE**. 2017. 56 f. TCC (Graduação em Farmácia), Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE, 2017.

BATONI, G. et al. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 256-279, 2011.

BAUMGARTEN, M. C. S. et al. Infecção Urinária na Gestação: uma Revisão da Literatura. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, Porto Alegre, v. 13, p. 333-342, 2011.

BENBELAÏD, F. et al. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrugresistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 4, n. 6, p. 463–472, jun. 2014.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Ver. Nutr.**, Campinas, v. 12, p. 123-130, 1999.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas Aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p.

BIMAKR, M. et al. Supercritical carbon dioxide (Sc-Co₂) extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha Spicata* L.) leaves. **European Journal of Scientific Research**, v. 33, n. 4, p. 679-690, 2009.

CONSELHO FEDERAL DE BIOMEDICINA. **Código de ética da profissão de biomédico**. Brasília: CFBM, 1984. Disponível em: <http://www.cfbiomedicina.org.br/documentos/codigodeetica.pdf>. Acesso em: 24 maio 2018.

BOURDOUMIS., et al. The novel prostate cancer antigen 3 (PCA3) biomarker. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 36, n. 6, p. 665-668, nov./dez., 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata**: Documento de consenso. Rio de Janeiro: INCA, 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cancer_da_prostata.pdf. Acesso em: 07 maio 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>. Acesso em: 16 abr. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006 b. 92 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRENNER, B. M.; RECTOR, F. C. Brenner & Rector's the kidney. 7th. ed. [s.l: s.n.].2004.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-53, 2004.

CAETANO, Natália Lima de Barros. **Uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos por pacientes em tratamento antineoplásico**: possíveis interações. 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/SE, 2016.

CALIXTO, J. B. et al. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131 –134, 2005.

CARNEIRO, M. et al. O uso de antimicrobianos em um hospital de ensino: uma breve avaliação. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 421-424, 2011.

CASSEL, E. et al. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CASTERA-ROSSIGNOL, A.; BOSQUE, F.; Nouvelle approche des anti-oxydants. **OCL. Oléagineux, corps gras, lipides**, v. 1, n. 2, p. 131-143, 1994.

CASTRO, H. A. S. et al. Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2,6 e 10,0 ng/ml. **Rev. Bras. Radiol.**, v.44, n.4, p. 205–209, 2011.

CÉSAR, F. O. et al. **Avaliação de fatores de risco para litíase urinária em Goiânia.** Goiânia: SBPC, 2012. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pibic/trabalhos/FERNA000.PDF>. Acesso em: 03 maio 2018.

YUSOFF, Zakiah Mohd et al. **Characterization of down-flowing steam distillation system using step test analysis.** IEEE, 2011.

CHIH, Y.K. et al. Hibiscus sabdariffa L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. **Journal of Functional Foods**, v.4, p. 375–381, 2012.

CLETO, Sergio Aparecido (2011) - Dialise, cuidado cada vez mais frequente na UTI. In VIANA, Renata Andrea Pietro Pereira; WHITAKER, Iveth Yamaguchi - **Enfermagem em terapia intensiva: práticas e vivencia.** Porto Alegre: Artmed. p 480-490.

CONNELL, M. T.; OWEN C. M.; SEGARS, J. H. Genetic syndromes and genes involved in the development of the Female reproductive tract: a possible role For gene therapy. , **J. Genet. Syndr. Gene Ther.**, v. 4, n. 2, 2013.

CORRÊA, C. S. L. et al. Rastreamento do câncer do colo do útero em Minas Gerais: avaliação a partir de dados do sistema de informação do câncer do colo do útero (SISCOLO). **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 315-323, 2017.

COSTA, T. L. **Características físicas e físico-químicas do óleo de duas cultivares de mamona.** 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2006.

CRUCES et al. Plantas medicinais no controle de urolitíase. **Rev. Bras. Pl. Med**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 780-788, jun. 2013.

CRUZ, Jenner; ROMÃO, João E. Júnior. Infecções do Trato Urinário. Disponível em < <http://www.scielo.com.br> > acesso em Mar. 2009.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 2, p. 114 - 122, 2003.

DING, H.M et al. Effect of Sanqi Oral Liquid on the Expressions of CD4+, CD8+ and CD68+ Rats with Chronic Renal Failure Cells in 5/6 Nephrectomized. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 19, n. 8, p. 589-595, 2013.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167–193, mar, 2002.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

ERWEI, L. et al. Eucommia ulmoides Bark Protects Against Renal Injury in Cadmium-Challenged Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, p.307–314, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **farmacopéia brasileira**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Medicinal Plants from the Brazilian Savanna with Antibacterial Properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p.1-13. 2014.

FIHN, S. D. Clinical practice: Acute uncomplicated urinary tract infection in women. **N Engl J Med**, n. 349, p. 259-266.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n 12, p. 1061-1080, 1995.

FREITAS, R. M. C. et al. Avaliação dos métodos de imagem no diagnóstico da urolitíase: revisão da literatura. **Radiol Bras**, São Paulo , v. 37, n. 4, p. 291-294, Aug. 2004. Acesso em: 03 maio 2018.

GAO, Q. et.al. Rhein Improves Renal Lesion and Ameliorates Dyslipidemia in db/db Mice with Diabetic Nephropathy. **Planta Medica**, v. 76, p. 27–33, 2010.

GASPARIN, P.P. et al. Qualidade de folhas e rendimento de óleo essencial em hortelã pimenta (*Mentha X Piperita* L.) submetida ao processo de secagem em secador de leito fixo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p.337-344, 2014.

GAZZANEO, Ilanna Fragoso Peixoto et al. Profile of patients with genitourinary anomalies treated in a clinical genetics service in the Brazilian unified health system. **Revista Paulista de Pediatria (english Edition)**, v. 34, n. 1, p.91-98, mar. 2016.

GIORDIANO, E. A. et al. Evaluation of food intake and excretion of metabolites in nephrolithiasis. **J Bras Nefrol**. v. 36, n. 4, p. 437-445, 2014.

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

GOEY, A.K.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Herb-drug interactions in oncology. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 9, n. 4, p.354–355. 2014.

GONÇALVES, I. R.; PADOVANI, C.; POPIM, R. C. Caracterização epidemiológica e demográfica de homens com câncer de próstata. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 1337-1342, jul./ago. 2008.

GRASSMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitamins and Hormones**. V. 72, p. 505-535. 2005.

GUTKING, G. O. et al. Screening of South American Plants for Biological Activities. 1. Antibacterial and Antifungal Activity. **Fitoterapia**, V. 5, p. 213-218, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000.

HATHROUBI, S. et al. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 179, p. 277 - 286, 2015.

HAZELETT, S. E. et al. The association between indwelling urinary catheter use in the elderly and urinary tract infection in acute care. **BMC Geriatrics**, Ohio, v. 6, n. 15, out. 2006. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2318-6-15.pdf>. Acesso em: 04 de abril de 2018.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiol.**, v. 5, p. 1663-1674, Nov. 2010.

Hsiao C, et al. Risk Factors for Development of Septic Shock in Patients with Urinary Tract Infection. **BioMed Res Int**. 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/717094/>. Acesso 27 mar. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 104p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia**. 2. ed. rev. ampl. – Rio de Janeiro: INCA, 2016. 160 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Christine Dieguez, 2018. 130 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Próstata. Brasília: INCA, 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>. Acesso em: 07 maio 2018.

JANTAN, I.; et al. A comparative study of the constituents of the essential oils of three Cinnamomum species from Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 387-391, 2003.

JOSHI, V.S. et al. Inhibition of the growth of urinary calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals with aqueous extracts of Tribulus terrestris and Bergenia ligulata. **Urological Research**, v. 33, p. 80–86, 2005.

KAVANAUGH, N. L.; RIBBECK K. Selected antimicrobial essential oils eradicate Pseudomonas spp. and Staphylococcus aureus biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 11, p. 4057-4061, Jun., 2012.

KAYALI, F. et al. Venous thromboembolism in patients hospitalized with nephrotic syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 3, p. 226–230, 2008.

KEMPES, N. F. et al. Extração simplificada dos princípios ativos do capim limão. In: **2º ENCONTRO PIBID – FAI**, 2., 2014. Adamantina, SP. **Anais [...]**. Adamantina, SP: PIBID; CAPES; FAI, 2014. Disponível em: http://www.fai.com.br/portal/pibid/adm/atividades_anexo/816135c6e68b58db9a651a50038d0f0a.pdf. Acesso em: 15 jan. 2017.

KODNER, C. Diagnosis and Management of Nephrotic Syndrome in Adults. **American Family Physician**, v. 96, n. 6, p. 479-485, 2016.

KORKES, F. Litíase urinária: a busca do ponto de equilíbrio. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v.13, n. 2, abr./jun., 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082015ED3312>. Acesso em: 03 maio 2018.

KUBA, G.; VATTIMO, M. f. f. O uso de fitoterápicos orientais nas lesões renais: revisão integrativa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 43, p.1192-1198, 2015.

LAM, T. P.; SUN, K.S. Dilemma of integration with Western medicine: views of traditional chinese medicine practitioners in a predominant Western medical setting. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 21, p. 300- 305, 2013.

LANGASSNER, Silvana Maria Zucolotto; VARGAS, Mara Rúbia Winter de. **Farmacognosia: roteiros para aulas práticas**. Natal/RN: UFRN, 2010. 87 p.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LEITE, Marinho M. G. V. Levantamento Etnobotânico de plantas medicinais em comunidade indígena no município de Baía da Traição-PB. **Biodiversidade**, v. 13, n 1, p. 82-106, 2014.

LI, S. et al. Herb network construction and co-module analysis for uncovering the combination rule of traditional Chinese herbal formulae. **Bio Med Central Bioinformatics** v. 11, p. 1-12, 2010.

LIU, K et al. Aloe-emodin suppresses prostate cancer by targeting the mTOR complex 2. **Carcinogenesis**, v.33, n. 7, p. 1406-1411, 2012.

LOPES, G. F. G, PANTOJA, S. C. S. Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz-Rio de Janeiro. **Revista eletrônica Novo Enfoque**, v. 16, n. 16, p. 62-80, 2013.

MANN, T. **Chemical aspects of biosynthesis**. New York: Oxford University Press Inc. 1994, 92 p.

SARTO, Marcella Paula Mansano; ZANUSSO JUNIOR, Gerson. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista Uningá Review**, Paraná, v. 1, n. 20, p. 98-102, set. 2014.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MAZZUCCHI, E.; SROUGI, M. O que há de novo no diagnóstico e tratamento da litíase urinária?. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 723-728, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302009000600018>. Acesso em: 03 maio 2018.

MELO, Karoline Rachel Teodosio de. **Avaliação de polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Dictyopteris justii* como agentes antioxidantes e como agentes inibidores formação de cristais de oxalato de cálcio**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

MENDES, E.; HERDEIRO, M. T.; PIMENTEL, F. O uso de terapêuticas à base de plantas por doentes oncológicos: artigo de revisão. **Acta Médica Portuguesa**, v.23, n.5, p. 901-908. 2010.

MENG, L. et al. A combination of Chinese herbs, *Astragalus membranaceus* var *mongholicus* and *Angelica sinensis*, enhanced nitric oxide production in obstructed rat kidney **Vascular Pharmacology**, v.47, p.174–183, 2007.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2009. Visto em: 08 de maio de 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.

MOLIN, Gislaïne Tisott dal; CAVINATTO, Aline Williens; COLET, Christiane de Fátima. Utilização de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos à quimioterapia de um centro de oncologia de Ijuí/RS. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 2, n. 39, p.287-298, 2015.

MONTEIRO, L. C. C. F. et al. Atividade antioxidante, teor de fenóis e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* de *Vitex gardneriana Schauer*. In: **ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA**, 4., 2015, Mossoró. Proceedings. Mossoró: Blucher Chemistry Proceedings, 2015. v. 3, p. 1 - 8.

MORELLO, W., et al. (2015). "Acute pyelonephritis in children." *Pediatric Nephrology*: 1-13.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz. J. Resanim*, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465- 470, 2005.

Mottet N, Bellmunt J, Briers E, et al. Guideline of Prostate Cancer, European Association of Urology 2015.

NASCIMENTO JE. Estudo comparativo de três espécies de *Phyllanthus* (Phyllanthaceae) conhecidas como quebra-pedra (*Phyllanthusnini* L, *Phyllanthusamarus* Schum e Thonn e *Phyllanthustenellus*Roxb). [Tese]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde; 2008.

NASCIMENTO, M. F. et al. Composição Química do Óleo Essencial das Folhas de *Vitex gardneriana*. 39 a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Criar e Empreender. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, Goiânia, 2016. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/39ra/cdrom/resumos/T0055-1.pdf>. Acesso em 20 de abril de 2018.

NOGUEIRA PCK, et al. Estimated prevalence of childhood end-stage renal disease in the state of São Paulo. **Rev Assoc Med Bras**. 2011. 57(4):443- 449. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0104423011703682> Portuguese>. Visto em: 20 de abril de 2018.

OLIVEIRA, Gisele Lopes de; OLIVEIRA, Antonio Fernando Morais de; ANDRADE, Laise de Holanda Cavalcanti. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Bot. Bras**, Pernambuco, v. 2, n. 24, p.571-577, 07 abr. 2010.

OLIVEIRA, Lizandra Carla Pereira de et al. ESTUDO DA EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE ÓLEO DE BARU. **Citino**, Mato Grosso do Sul, v. 1, n. 1, p.28-32, out. 2011.

OLIVEIRA, Taciane Almeida de. **BIOATIVIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Vitex cymosa* e *Eschweilera pedicellata* SOBRE ADULTOS DE *Sitophilus zeamais***

- MOTSCHULSKY, 1855 (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE)**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, área de Concentração em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010. Cap. 1. Disponível em: <http://btd.inpa.gov.br/bitstream/tede/1221/1/Dissertacao_Taciane_Almeida.pdf>. Acesso em: 21 maio 2018.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, Toronto, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.
- ONURDAĞ F. K., OZKAN, S., OZGEN, S., OLMUŞ, H., ABBASOĞLU, U. Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa adhesion on soft contact lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010.
- PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? *Engenharia Sanitária e Ambiental*. v.10, n.2, p.106-110, 2005.
- PEREIRA, Rogério Santos et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev Saúde Pública**, Taubaté/sp, v. 2, n. 38, p.326-328, 13 ago. 2004.
- PINHO-DA-SILVA L, Mendes-Maia PV, Teófilo TMNG, Barbosa R, Ceccatto VM (2012) TransCaryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Causes Tracheal Smooth Muscle Relaxation through Blockade of Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels. *Molecules*. 17; 11965-11977.
- PIRES, T.C. et al. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero Citrus sobre o crescimento de micro-organismos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.71, n.2, p. 378-385, 2012.
- POLITO MG, de Moura LA, Kirsztajn GM. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9.617 native kidney biopsies. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:490-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfp355>.
- PRIETO, Pilar; PINEDA, Manuel; AGUILAR, Miguel. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 269, n. 2, p.337-341, maio 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- PRINS; LEMOS; FREITAS. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 8, p.92-95, 2006.
- QUIMIDROL: COMÉRCIO INDÚSTRIA IMPORTAÇÃO LTDA (Santa Catarina). **FISPQ – FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO**. 2007. Cláudia S. Portantiolo. Disponível em: <<http://www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/fispq/Acetato%20de%20Etila.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2018.
- RIBEIRO, L.; BASTOS, R. R.; VIEIRA, M. T. V.; RIBEIRO, L. C.; TEIXEIRA, M. T. B.; LEITE, I. C. G.. Rastreamento oportunístico versus perdas de oportunidade: não realização do exame de Papanicolaou entre mulheres que frequentaram o pré-natal. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 1-13, jun, 2016.

RIBEIRO, Louise Helena de Freitas. **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Vitex gardneriana* NA PREVENÇÃO E CONTROLE DE BIOFILMES DE ESPÉCIES DE *Candida* DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA.** 2016. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia de Recursos Naturais, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

RODRIGUES, Fernanda d'Athayde; BERTOLDI, Andréa Dâmaso. **Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado.** *Ciênc. saúde coletiva* [online]. 2010, vol.15, suppl.1, pp.1239-1247. ISSN 1413-8123. World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO; 2005. (WHO Policy Perspectives on Medicines; 10).

RODRIGUES, Laís da Silva et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicol. Argent.**, PiauÍ, v. 1, n. 23, p.36-43, 04 abr. 2015.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311 - 318, 2011.

ROSO, Camila Castro et al. **PROGRESSÃO DA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA:: PERCEPÇÕES DE PESSOAS EM PRÉ- DIÁLISE.** **Revista de Enfermagem da Ufsm**, Santa Maria, p.581-588, 2013.

SANTOS ES; Marinho CMS. Principais causas de insuficiência renal aguda em unidades de terapia intensiva: intervenção de enfermagem. *Rev. Enf. Ref.* [Internet] 2013; 3(9) [acesso em 02 maio 2018]. Disponível:<http://dx.doi.org/10.12707/RIII1272>.

SANTOS, Marcela Rosana da Silva. **Efeito de composto fitoterápico sobre o cálculo renal induzido em Ratos.** 2015. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, 2015. Cap. 1.

SANTOS, Nara Yamane dos et al. 2009. Estudo prospectivo observacional sobre a incidência da Injúria Renal Aguda em Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. Vol. 31, n.3, p. 206-211. Consult. 02 maio. 2018. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/jbn/v31n3/v31n3a06.pdf>.

SAÚDE, Organização Panamericana da; SAÚDE, Organização Mundial de. **Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde.** 10. ed. São Paulo: Editora Usp, 2007. 691 p. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?id=PQhs3Rx4b8C&pg=PA653&lpg=PA653&dq=Doenç as+do+aparelho+geniturinário+\(N00++N99\)&source=bl&ots=nm2zvLmMwk&sig=u3Rg318a3_MsO1pyqfuASQdyW4&hl=ptBR&sa=X&ved=0ahUKEwj2urGqjvvaAhUDG5AKHf3FD_wQ6AEIdjAJ#v=onepage&q=Doenças do aparelho geniturinário \(N00 - N99\)&f=false](https://books.google.com.br/books?id=PQhs3Rx4b8C&pg=PA653&lpg=PA653&dq=Doenç+as+do+aparelho+geniturinário+(N00++N99)&source=bl&ots=nm2zvLmMwk&sig=u3Rg318a3_MsO1pyqfuASQdyW4&hl=ptBR&sa=X&ved=0ahUKEwj2urGqjvvaAhUDG5AKHf3FD_wQ6AEIdjAJ#v=onepage&q=Doenças+do+aparelho+geniturinário+(N00+-N99)&f=false). Acesso em: 10 maio 2018.

Shimakura, S. E. (2006) Correlação. In CE003 - Estatística II. Paraná: Dep. de Estatística – UFPR: 71-78.

SILVA, M.t.n. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.257-262, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722009000300005>.

SILVA, N. L. A. da; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. da. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, Caxias, v. 6, n. 2, p.1-17, 20 jan. 2010.

SILVA, Shirley de Oliveira et al. REGENERAÇÃO NATURAL EM UM REMANESCENTE DE CAATINGA COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE USO NO AGRESTE PERNAMBUCANO. **Revista Árvore**, Viçosa-mg, v. 36, n. 3, p.441-450, 2012.

SIMÕES, C. M. O. 2002. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ufrgs, 2010. 1104 p. (CDU 615.322). Reimpresso -Porto alegre: editorada UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC,2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). Hernandes F. Minidicionário do Paciente Renal. [Internet] São Paulo; 2015. Disponível em: < http://www.sbn.org.br/leigos/pdf/Mini_dicio_terapia_substitutiva.pdf > Acesso em 02 de maio, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo de Diálise SBN 2013. Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2013-14-05.pdf. Disponível: http://www.sbn.org.br/leigos/pdf/Mini_dicio_terapia_substitutiva.pdf. Acesso em: 02 de maio, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo de diálise. 2014. Disponível em: < <http://www.censo-sbn.org.br/censosAnteriores>>. Acesso em: 4 de maio de 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Diretrizes de câncer de próstata. Rio de Janeiro, 2011, 92p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Diretrizes de litíase urinária da Sociedade Brasileira de Nefrologia. *J Bras Nefrol.* 2002;24(4):203-7.

SODRÉ FL; COSTA JCB; LIMA JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(5):329-37.

SODRÉ, Aline; OLIVEIRA, Mauren. Estimativa da taxa de filtração glomerular através de formulas. 122. ed. Paraná: Newslab, 2014.

STEVENSON RE, Hall JG. Human malFormations and related anomalies. 2ª ed. New York: Oxford University Press; 2006. *Syndr Gene Ther.* 2013;4:127.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control.*, v.21, n.9, p.1199-1218. 2010.

TEIXEIRA, A.C.J. **Fitoterapia aplicada à prevenção e tratamento de infecções urinárias**. 2012. Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa Faculdade de ciências da saúde, Porto, Portugal. 2012.46p.

TIZATTO, Luiz Augusto Pandolfo; MACHADO, Roberto Augusto Fernandes. EXAMES DIAGNÓSTICOS E TRATAMENTO DE UROLITÍASE:: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Revista Thêma Et Scientia**, Londrina, v. 6, n. 1, p.212-229, 01 jun. 2016.

TOCCHETTO, Luiz Fernando; MATTOS, Patrícia Póvoa de. **Metodologia para definição de procedimento operacional padrão**. 2004. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/35513/1/doc97.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2018.

TONGNUANCHAN, Phakawat; BENJAKUL, Soottawat. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, 2014.

VALE, Jean Parcelli Costa . Potencial Biotecnológico de Plantas da Caatinga: Atividade Antimicrobiana e Antioxidante de metabólitos Secundários e Óleos Essenciais de *Vitex gardneriana* e *Croton piauhiensis*. 2015. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

VALERIANO, A.C.F.R.; SILVA JÚNIOR, E.X.; BEDOR, C.N.G.; COSTA, M.M. O Uso Da Fitoterapia na Medicina por Usuários do SUS, Uma Revisão Sistemática. *Revista Multidisciplinar e de Psicologia*, Janeiro de 2017, vol.10, n.33, p. 219-236.

WATERMAN, P. G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*. Essex: Longman Group, 1993, p.41-61.

WHO – World Health Organization Traditional Medicine: Definitions. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789241506090_eng.pdf;jsessionid=67FF6A763AC92A53142AD69C8D502425?sequence=1>. Acesso em: 12 de abril de 2018.

WU, G. et al. Nephroprotective activity of *Macrothelypteris oligophlebia* rhizomes ethanol extract. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.6, p.773-777, 2012.

YAN X.T., Li W., Sun Y.N., Yang S.Y., Lee S.H., Chen J.B., Jang H.D., Kim Y.H. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(5):1397-402. doi: 10.1016/j. bmcl.2014.01.028.

YANG G.M., Yan R., Wang Z.X., Zhang F.F., Pan Y., Cai B.C. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Chin J Nat Med*. 2013;11(5):519-24. doi: 10.1016/ S1875- 5364(13)60094-1.

YASIR, F.; WAQAR, M.A. Effect of indigenous plant extracts on calcium oxalate crystallization having a role in urolithiasis. *Urological Research*, v.39, n.5, p.345-350, 2011.

YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N.

ZUANAZZI, José Angelo Silveira; MONTANHA, Jarbas Alves. Flavonóides. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da Ufsc, 2010. Cap. 23. p. 578-613.

ZUGAIB. B. Noções práticas de obstetrícia. 13ª Ed. Belo Horizonte: Artes Médicas, 2013.

ZUO-QI, X. et. al. Preventive effects of polysaccharides from *Liriope spicata* var. *prolifera* on diabetic nephropathy in rats **International Journal of Biological Macromolecules**. n.63 p.114 - 120, 2013.