



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIENCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA**



JAMES ROMERO SOARES BISPO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES TOXICOLÓGICAS E
MICROBIOLÓGICAS DE CHÁS INDUSTRIALIZADOS.**

Maceió – AL

2006

JAMES ROMERO SOARES BISPO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES TOXICOLÓGICAS E
MICROBIOLÓGICAS DE CHÁS INDUSTRIALIZADOS.**

Dissertação apresentada à coordenação do curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Zenaldo Porfírio

Maceió – AL

2006

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

B622n Bispo, James Romero Soares.
Avaliação das atividades toxicológicas e microbiológicas de chás industrializados / James Romero Soares Bispo. – 2006.
70 f. : il., tabs.

Orientador: Zenaldo Porfírio.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2006.

Bibliografia. f. 58-68.
Apêndices f. 69-70.

1. Fitoterápicos. 2. Toxicidade. 3. Perfil microbiológico. 4. Chás industrializados. I. Título.

CDU: 543.95:663.95



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA




BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

CERTIFICADO

Eu, Adriana Santos Ribeiro, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (portaria N° 301, 25/03/2003), certifico que **James Romero Soares Bispo**, em sessão pública, no dia 30 de maio de 2006, realizou sua Defesa de Dissertação de Mestrado, intitulada: “**Avaliação da Atividade Toxicológica e Microbiológica de Chás Industrializados**”, cuja Banca Julgadora, composta pelos Professores Doutores: Zenaldo Porfírio (Orientador – PPGQB/ICBS/UFAL), Ana Paula Fernandes Barbosa (UNICISAL) e Brancilene Santos de Araújo (UFS), considerou o candidato **APROVADO** para receber o título de **MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA E SUB-ÁREA BIOQUÍMICA**.

Maceió, 09 de fevereiro de 2012.


Prof.^a Dr.^a Adriana Santos Ribeiro
Coordenadora do PPGQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Adriana S. Ribeiro
Coordenadora do PPGQB
IQB/UFAL

Dedico a minha dissertação a meus pais, e em especial a minha esposa Larissa e nosso bebê que está a caminho e a minha filha Bruna.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais pelo apoio em todas as horas e pela compreensão.

À minha esposa Larissa Bispo pelo amor e apoio, tanto nos momentos de alegria quanto nos de dificuldade.

A minha filha Bruna Letícia por ser a minha inspiração, meu amor, minha vida.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado Walfrido, Ana Lucila, Brancilene, Maria Emília, Daniel, Carol, Carlos Eduardo e Adriana, não só pelo companheirismo no decorrer do curso, mas também pela amizade dedicada.

Aos meus amigos Manoel, Cláudio, Roberto, Cristiane, Valter, Geanne e todos os outros não menos importantes que de certa forma torceram e me apoiaram no meu caminho.

Ao professor e amigo Dr. Zenaldo Porfírio pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas pela oportunidade de realização de minha pós-graduação.

À fundação de amparo à pesquisa de alagoas (FAPEAL) pelo apoio no desenvolvimento de meus trabalhos.

RESUMO

O uso de fitoterápicos na medicina popular sempre foi uma constante em todas as civilizações do mundo. Entretanto, suas atividades farmacológicas ainda são pouco estudadas. Este trabalho tem como objetivo estudar a atividade toxicológica e microbiológica de chás industrializados de Chá Preto (*Camelia sinensis*), Camomila (*Matricaria recutita*), Erva Doce (*Foeniculum vulgare*, L.) e Hortelã (*Mentha piperita*), em camundongos Swiss albinos. Foram feitas extrações aquosas e etanólicas dos chás em questão. Aqueles que apresentaram acentuada atividade toxicológica e antimicrobiana tiveram seus extratos etanólicos fracionados por um método de partição líquido-líquido segundo um gradiente crescente de polaridade. Foram utilizados nos testes toxicológicos camundongos Swiss Albinos fêmeas. Para avaliação da atividade antimicrobiana destes extratos foi utilizado um método de difusão em Agar baseado no Método de Kirby e Bauer modificado. De acordo com as análises preliminares do perfil microbiológico destes chás pôde-se observar a presença de um número elevado de Unidades Formadoras de Colônias por grama de chá, porém todos os chás se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos por lei. Os testes toxicológicos realizados com os extratos dos chás apresentaram resultados expressivos para os extratos de *C. sinensis* (Chá Preto) e de *M. recutita* (Camomila). Com os testes das frações dos extratos etanólicos de *C. sinensis* e *M. recutita* pode-se observar uma atividade hepatotóxica nas frações clorofórmica e de acetato de etila de *C. sinensis* determinando-se a DL₅₀ de 1,67 g.kg⁻¹ e 0,84 g.kg⁻¹ respectivamente. Observou-se ainda o alto poder hepato-esplenotóxico do extrato de *M. recutita* na dose de 3,34 g.kg⁻¹ de massa inoculada. O extrato etanólico de *C. sinensis*, principalmente em sua fração clorofórmica, apresentou uma boa atividade antimicrobiana frente a linhagens bacterianas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e cepas de *C. albicans*, demonstrando uma atividade antifúngica pronunciada.

Palavras-Chave: Toxicidade, Perfil Microbiológico, Fitoterápicos, Chá.

ABSTRACT

The use of medicinal plants has always been a constant in the folk medicine of different civilizations around the world. However, their pharmacological activities are still poorly studied. This work aims to study the toxicological and microbiological activity of industrialized teas of Black Tea (*Camellia sinensis*), chamomile (*Matricaria recutita*), Fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and spearmint (*Mentha piperita*) in Swiss albino mice. There were made aqueous and alcoholic extracts of the teas in study. Those who had strong antimicrobial and toxicological activity had their ethanolic extracts fractionated by a method of liquid- liquid partition in a gradient of increasing polarity. Female mice of Swiss albino species were used in toxicity testing. To evaluate the antimicrobial activity of these extracts it was used an Agar diffusion method based on Kirby and Bauer modified method. According to the preliminary analysis of the microbiological profile of these teas could observe the presence of a large number of units According to the preliminary analysis of the microbiological profile of these teas it could be observed the presence of a large number of colony forming units per gram of tea, despite all the teas were maintained within the standards established by law. The toxicological tests carried out with extracts of the teas showed significant results for the extracts of *C. sinensis* (Black Tea) and *M. recutita* (Chamomile). With testing of the fractions from ethanolic extracts of *C. sinensis* and *M. recutita* it could be observed a hepatotoxic activity in fractions of chloroform and ethyl acetate of *C. sinensis* of which were determined the LD50 of 1.67 g.kg⁻¹ and 0.84 g.kg⁻¹ respectively. The extract of *M. recutita*, at a dose of 3.34 g.kg⁻¹ mass inoculation, also demonstrated a high power-toxic on the liver and spleen. The ethanol extract of *C. sinensis*, especially in its chloroform fraction, showed good antimicrobial activity against bacterial strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *C. albicans* strains, showing a pronounced antifungal activity.

Keywords: Toxicity, microbiological profile, Herbal Medicines, Tea.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>Camelia sinensis</i>	16
1.2	<i>Matricaria recutita</i>	19
1.3	<i>Foeniculum vulgare</i>	21
1.4	<i>Mentha piperita</i>	23
2	OBJETIVOS	26
	Objetivos Gerais.....	26
	Objetivos Específicos.....	26
3	JUSTIFICATIVA	27
4	PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1	Materiais e Métodos	28
4.1.1	Obtenção das Amostras.....	28
	Amostras dos extratos testados.....	28
4.1.2	Amostras Biológicos.....	28
	Bactérias e Leveduras.....	28
4.1.3	Animais Utilizados.....	29
4.2	Extração Aquosa de <i>Camelia sinensis</i>, <i>Matricaria recutita</i>, <i>Foeniculum vulgare</i> e <i>Mentha piperita</i>	29
4.3	Extração etanólica dos chás de <i>Camelia sinensis</i>, <i>Matricaria recutita</i>, <i>Foeniculum vulgare</i> e <i>Mentha piperita</i>	30
4.4	Partição dos extratos etanólicos de <i>Camelia sinensis</i> e <i>Matricaria recutita</i>	30
4.5	Prospecção Química	32
4.5.1	Testes para fenóis e taninos.....	32
4.5.2	Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides.....	32
4.5.3	Testes para Leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	33
4.6	Preparação dos Meios de Cultura	34
4.6.1	Meio Líquido.....	34
4.6.2	Meios Sólidos.....	34

4.7	Preparo dos Extratos para os Testes Biológicos.....	35
4.7.1	Testes de Toxicidade Aguda.....	35
4.7.2	Testes Antimicrobianos.....	35
4.7.3	Teste do Perfil Microbiológico.....	35
4.8	Bioensaios.....	36
4.8.1	Atividade Hepatotóxica e Esplenotóxica dos Extratos.....	36
	Inoculação.....	36
4.8.2	Atividade Antimicrobiana.....	36
4.8.3	Perfil Microbiológico.....	38
4.9	Análise Estatística.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	Prospecção Química.....	40
5.2	Toxicologia dos Extratos Aquosos.....	41
5.2.1	Biopsia de Fígado.....	45
5.2.2	Biopsia de Baço.....	47
5.3	Atividade Antimicrobiana.....	50
5.4	Resultado do Perfil Microbiológico.....	54
6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICES.....	68

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Parte aérea da <i>C. sinensis</i> (www. phytochemicals .info/ plants/tea.php)	17
Figura 2- Estrutura química de uma Teaflavina presente no extrato de <i>C. sinensis</i> (Lewis <i>et al.</i> ,1998).	118
Figura 3- <i>Matricaria recutita</i> . Foto da parte aérea da planta (http://www.plantasvasculares.uns.edu.ar/herbario/galeria/mg/matricaria_recutita_d10_8.jpg).	19
Figura 4- Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>M. recutita</i> : (a) α -Bisabolol; (b) Bisabolol-óxido B; (c) Bisabolol-óxido A; (d) Farneseno e (e) Chamazuleno (http://chemfinder.cambridgesoft.com/).	20
Figura 5- <i>F. vulgare</i> . Exposição da parte aérea da planta (http://www.pharmakobotanik.de/schfld/Foenvul.jpg).	21
Figura 6- Estruturas químicas dos compostos predominantes no óleo essencial de <i>F. vulgare</i> : (a) fenchone (www.launc.tased.edu.au) e (b) trans e cis-anethole (www.chemikalienlexikon.de/aroinfo/gif/1568.gif)	22
Figura 7- Ilustração das folhas da <i>M. piperita</i> (http://www.pharmakobotanik.de/schfld/Menthpip.jpg)	23
Figura 8- Estruturas químicas de componentes do extrato de <i>Mentha piperita</i> : (a) Limoneno; (b) Mentofurano; (c) Mentol; (d) Mentona e (e) Pulegona (http://chemfinder.cambridgesoft.com/)	24
Figura 9- Camundongos utilizados nos testes de hepatotoxicidade e esplenotoxicidade: (a) Gaiolas com ração e água à vontade; (b) Biotério aclimatado.	29
Figura 10- Método utilizado para fracionamento dos extratos etanólicos de <i>C. sinensis</i> e <i>M. recutita</i> .	31

- Figura 11-** Método modificado de difusão em Agar baseado no método de Kirby Bauer 37
- Figura 12-** Preparação dos poços para inoculação; (a) Verte-se o meio na placa; (b) ponteiros fixadas para formação dos poços 38
- Figura 13-** Inoculo dos extratos nos poços 38
- Figura 14-** Perfil microbiológico dos chás testados: (a) Inoculação dos extratos; (b) Plaqueamento das amostras. 39
- Figura 15-** Comparação do valor percentual do peso do fígado em relação ao corpóreo para os grupos teste. 43
- Figura 16-** Comparação do valor percentual do peso do baço em relação ao corpóreo para os grupos teste. 44
- Figura 17-** Microfotografia do fígado de um camundongo apresentando degeneração hidrópica (seta 1) quando comparado ao grupo controle (seta 2). 46
- Figura 18-** Microfotografia do fígado de camundongos inoculados com as frações extrato de *C. sinensis*, apresentando infiltrado inflamatório moderado (a) quando comparado com os espaços portais do grupo controle (b). Diferenciação dos níveis de hepatite produzidos pelas frações testadas. 47
- Figura 19-** Microfotografia do baço de um camundongo apresentando congestão moderada da polpa vermelha (a) em relação ao grupo controle(b). 49
- Figura 20-** Microfotografia do baço de um camundongo apresentando um aumento do número de blastos por campo de grande aumento (a) em relação ao grupo controle (b). As setas indicam os blastos presentes por campo 49
- Figura 21-** Microfotografia do baço de um camundongo apresentando atrofia moderada dos folículos linfóides (a) quando comparada com o grupo controle (b). 50
- Figura 22-** Halos de inibição apresentados pelos extratos de *C. sinensis* frente às cepas microbianas testadas. 51

- Figura 23-** Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Camelia sinensis*. 54
- Figura 24-** Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Matricaria recutita*. 55
- Figura 25-** Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Foeniculum vulgare L.* 55
- Figura 26-** Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Mentha piperita* 56

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1-	Valores dos rendimentos das frações dos extratos etanólicos de <i>C. sinensis</i> e <i>Matricaria recutita</i> .	31
Tabela 2-	Constituintes químicos identificados através da mudança de coloração apresentada pelo material analisado, de acordo com MATOS (1997).	33
Tabela 3-	Constituintes químicos identificados através da mudança de coloração apresentada pelo material analisado, de acordo com MATOS (1997).	33
Tabela 4-	Prospecção química dos extratos etanólicos de <i>Camelia sinensis</i> e <i>Matricaria recutita</i>	40
Tabela 5-	Relação das massas corpóreas e do fígado dos animais utilizados nos experimentos dos extratps aquosos.	42
Tabela 6-	Relação das massas corpóreas e do baço dos animais utilizados nos experimentos dos extratps aquosos.	43
Tabela 7-	Avaliação dos cortes histológicos do fígado dos animais inoculados com as frações dos extratos de <i>Camelia sinensis</i> , <i>Matricaria recutita</i> e grupo controle.	45
Tabela 8-	Avaliação dos cortes histológicos do baço dos animais inoculados com as frações dos extratos de <i>C. sinensis</i> , <i>Matricaria recutita</i> e grupo controle.	48
Tabela 9-	Leitura dos halos de inibição das frações aquosas dos extratos frente às linhagens microbianas.	51
Tabela 10-	Leitura dos halos de inibição das frações EtOH/H ₂ O dos extratos frente às linhagens microbianas	52
Tabela 11-	Leitura dos halos de inibição das frações EtOH/H ₂ O dos extratos frente às linhagens microbianas	53

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia, ou uso terapêutico de plantas medicinais, é um hábito identificado em praticamente todas as civilizações ou grupos culturais conhecidos desde os primórdios da humanidade. No passado, as plantas representavam a principal arma terapêutica conhecida, e sua intensa utilização resultou em conhecimentos empíricos que foram transmitidos de geração para geração. O acúmulo dessas informações pelo homem primitivo propiciou o surgimento da cultura popular da arte de curar e também da farmacoterapêutica, que se tornou uma das bases importantes para o nascimento da indústria farmacêutica (Jornal da Unicamp, 2001).

As plantas medicinais contêm substâncias que são farmacologicamente ativas (Schulz *et al.*, 1998). Os artigos recentes em jornais médicos reconheceram a posição original da fitoterapia no campo crescente da medicina complementar e alternativa (CAM) e forneceram um contexto para a utilização pelos clínicos de fitoterápicos no tratamento dos pacientes (Miller, 1998; Winslow e Kroll, 1998; Barrett *et al.*, 1999; Ness *et al.*, 1999).

As plantas medicinais são usadas em vários países como tratamento alternativo aos problemas de saúde. Muitos extratos de plantas e seus óleos essenciais demonstraram atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, o que justificou a pesquisa na medicina tradicional focalizada na caracterização da atividade antimicrobiana destas plantas (Martínez *et al.*, 1996).

Brasil, Cuba, Índia, Jordânia e México são países com uma rica tradição no uso de plantas medicinais, cujos extratos vem sendo utilizados com sucesso em aplicações anti-bacterianas e antifúngicas (Martínez *et al.*, 1996;; Mahasneh *et al.*, 1999; Ahmad and Beg, 2001). Em 1996, Navarro *et al.* publicaram um trabalho que demonstrou que extratos de *Eucalyptus globulus* Labill, *Punica granatum* L., *Artemisia mexicana* Wild., e *Bocconia arborea* Watt. provenientes do México, possuem uma forte atividade antimicrobiana *in vitro* frente a uma ampla gama de microrganismos.

Fenômenos similares são relatados também por todo o mundo (Grosvenor *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1996). Nimri *et al.* desenvolveram um trabalho onde foram testados extratos etanólicos de espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional na

Jordânia e outros países do Oriente Médio quanto a sua atividade antimicrobiana. Extratos de *P. granatum L.*, *Quercus infectoria Olive.* e *Rhus coriaria L.* exibiram um amplo espectro de atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginos*, *Bacillus cereus* e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 12351).

Partindo-se do ponto que as plantas produzem uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas, espera-se que os programas de seleção para alguns alvos sub-representados, tais como a atividade antifúngica, possam render compostos candidatos a desenvolver novas drogas antimicrobianas (Ahmad e Beg, 2001). Adicionalmente, espera-se que os compostos da planta demonstrem diferentes mecanismos de ação comparados com os antibióticos atualmente utilizados tornando-se ativos contra os patógenos microbianos multirresistentes.

O potencial de toxicidade de plantas medicinais não é novo. Em diversas regiões, como Ásia e África, onde as plantas medicinais são usadas, sabe-se bem que algumas plantas devem ser usadas com cuidado porque podem ser tóxicas para o fígado (alcalóides da pirrolizidina, apiol, safrol, lignanas). A planta medicinal utilizada em medicamentos ou até mesmo *in natura* é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até prova em contrário (Simões, 2002).

Assim, deve-se considerar que uma planta medicinal ou um fitoterápico não tem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com a sua ingestão, mas lembrar, principalmente, dos efeitos que se instalam a longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, a exemplo do Confrei (*Symphytum officinale L.*) (Hirono *et al.*, 1978; Abbott, 1988; Yeong *et al.*, 1991, 1993; Brasil, 1992).

Segundo a RESOLUÇÃO-RDC Nº. 48, DE 16 DE MARÇO DE 2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em

publicações ou ensaios clínicos. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

Dentre as plantas mais utilizadas para terapêutica temos a *Matricaria chamomilla* (Camomila), que é usada para tratar várias doenças, incluindo inflamações e o câncer, embora nenhum estudo tenha sido feito para comprovar estas atividades, e a *Mentha piperita* (Hortelã), que já foi citada como bom fitoterápico para combater gripe comum, perda de apetite, bronquite e sinusite entre outras doenças (Gené *et al.*, 1996; Hernández-Ceruelos *et al.*, 2002; Akdogan *et al.*, 2003).

Segundo a portaria n^o 519, de 26 de junho de 1998, da Secretária de Vigilância Sanitária (Ministério da Saúde), os chás são produtos constituídos de partes de vegetais inteiras, fragmentadas ou moídas, obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas por infusão (método de preparação no qual a água potável, em temperatura acima de 90°C, é vertida sobre o chá que deve permanecer em repouso por tempo determinado, conforme a espécie vegetal) ou decocção (método de preparação no qual o chá é mergulhado em água potável mantida em temperatura acima de 90°C, por tempo determinado), não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas.

O estudo da toxicologia destes chás não se restringe à análise dos princípios ativos nele presentes, mas também a análise microbiológica da qualidade do chá disponível no mercado, tendo em vista que as reações adversas provocadas no organismo do indivíduo podem ter sido causadas por microrganismos patogênicos presentes no produto. Portanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes seguros. Neste sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de nenhum outro xenobiótico sintético e sua preconização, ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso, deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (Brasil, 1995).

A segurança dos fitoterápicos é de importância particular uma vez que a maioria destes produtos são auto prescritos pelo próprio paciente. Cerca de 70% dos pacientes

que fazem uso de fitoterápicos não revelam o uso aos seus médicos e farmacêuticos. Além disso, muitos fitoterápicos são adicionados a complexos vitamínicos e utilizados como suplementos dietéticos, embora os relatos científicos sobre seu uso seguro e eficaz sejam limitados. Poucos estudos relacionados ao potencial toxicológico dos fitoterápicos estão disponíveis e não há sustentação de estudos clínicos rigorosos (Fossati *et al.*, 1985; Capasso *et al.*, 2000), de modo que mais pesquisas nesta área são necessárias.

Existem vários relatos de reações toxicológicas em pessoas que se utilizaram destes chás como terapia para diversos tipos de doenças. Pesquisas realizadas na Escola de Farmácia da Universidade de Otago (Dunedin/Nova Zelândia) sugeriram que os chás de *M. recutita* e *M. piperita* podem causar modulação sobre a atividade metabólica das enzimas hepáticas de ratos (Maliakal *et al.*, 2001)

Uma comunicação do Spanish Pharmacovigilance System (2003) relatou que os Conselhos Consultivos Francês e Espanhol suspenderam a comercialização do chá de *Camelia sinensis*, produto da marca Exolise, preparado a partir do extrato etanólico de *C. sinensis*, devido às severas desordens hepáticas apresentadas pelas pessoas que consumiram o produto em questão.

Malini *et al.* (1985) confirmou a ação hormonal, emenagoga (provoca a menstruação) e abortiva do extrato acetanólico (acetato de etila) de *Foeniculum vulgare* pela administração oral do extrato acetanólico de sementes de *F. vulgare* por 15 dias em ratos. Após este período notou-se que concentração total de proteínas diminuiu significativamente nos testículos e nos vasos deferentes e foi aumentada nas vesículas seminais e na glândula prostática dos ratos, enquanto nas ratas, doses moderadas do extrato causaram o aumento no peso das glândulas mamárias e doses mais elevadas aumentaram o peso do ovário, do endométrio, da cérvix e da vagina.

1.1 *Camelia sinensis* (Chá Preto)

O Chá Preto é uma das bebidas mais populares no mundo devido à disponibilidade de muitas variedades e qualidades, seu gosto, o efeito estimulante, mas também pelos seus benefícios à saúde. Tanto o Chá Verde quanto o Chá Preto são

produzidos a partir das folhas de *C. sinensis*, diferindo apenas no processo de produção. Na produção do chá preto as folhas de *C. sinensis* passam por um processo de oxidação, o que não acontece com as de chá verde. A *C. sinensis* é um arbusto sempre verde da família Theaceae (Figura 1).

Figura 1 – Parte aérea da *Camellia sinensis*.

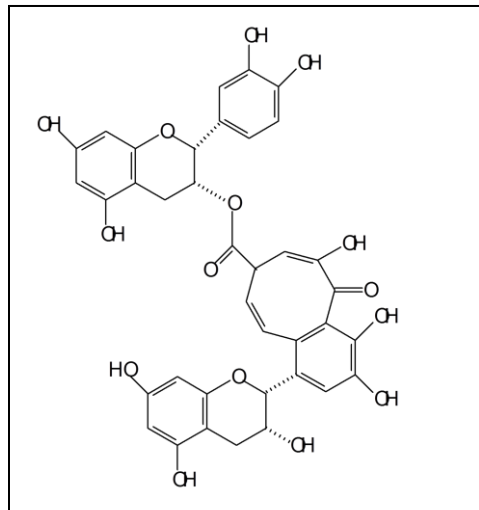


Fonte: MAZZA, G. Disponível em <http://www.photomazza.com/?Camellia-sinensis>. Acesso em 18/05/2005.

A infusão obtida através das folhas da planta *C. sinensis* origina o chá verde ou chá preto ricos em compostos fenólicos. Estes compostos representam até 30% do total do peso seco das folhas de chá *in natura* e incluem os flavandióis, flavonóides, ácidos fenólicos e flavonóis (mais conhecidos como catequinas). O interesse científico na busca das propriedades medicinais do chá de *C. sinensis* levou a descoberta de que o extrato desta planta contém uma quantidade elevada de óxidos de catequina, denominados geralmente como tearubiginas e teaflavinas, e uma quantidade mais baixa de catequinas livres que foram identificadas recentemente (Das *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 1995; Smaity *et al.*, 1995; Smaity *et al.*, 1998). Diferentes estudos epidemiológicos sugerem um efeito protetor do chá preto contra vários cânceres humanos, incluídos os que comprometem o cólon (Blot *et al.*, 1997). No estômago humano, catequinas do chá tem ação comprovada contra a *Helicobacter pylori*, que causa a gastrite (Mkatoh *et al.*, 1994).

As Teaflavinas são um grupo de pigmentos polifenólicos encontrados no chá preto que são formados durante o processo de fermentação da *C. sinensis* (Figura 2) (Sanderson, 1972). Sabe-se que as teaflavinas contribuem para as propriedades do Chá preto como a cor (Roberts, 1959), sabor (Millin *et al.*, 1969) e outros fatores que o tornam objeto de vários estudos.

Figura 2 – Estrutura química de uma Teaflavina presente no extrato de *C. sinensis*.



Fonte: Lewis *et al.*, 1998.

Mundialmente, o Chá Preto provém principalmente de plantações na África, Índia, Sri Lanka e Indonésia, enquanto o Chá Verde é proveniente de países asiáticos como a China e Japão. Apesar do tipo de produção influenciar os elementos presentes em cada um dos chás, o conteúdo e efeitos gerais de antioxidantes são similares. A investigação sugere que os antioxidantes presentes nestas bebidas podem ter um efeito protetor contra algumas doenças como ataques cardíacos e alguns câncros (Brown, 1991).

O chá de *C. sinensis* tem uma escala notável de atividades farmacológicas (Hamilton-Miller *et al.*, 1995). Os efeitos benéficos do chá (Modder *et al.*, 2002; Higdon *et al.*, 2003) são baseados em suas propriedades antioxidantes (Yokozawa *et al.*, 1998), anticancerígenas (Ahmad *et al.*, 1997 e 2000), antialergênicas (Fujimura *et al.*, 2002) e antiinflamatórias (Kundu *et al.*, 2002). Entretanto a informações sobre a ação

antimicrobiana do chá são dispersas através da literatura, alguns dados são contraditórios e nenhum estudo sistemático foi realizado.

1.2 *Matricaria recutita* L. (Camomila)

Uma das ervas mais populares para o tratamento de indigestões, inflamações e outros tipos de doenças menores é a *M. recutita* (camomila). Uma planta indígena, natural do Mediterrâneo oriental, que apresenta flores brancas de aproximadamente 20-50 cm de altura (Figura 3) (Schilcher, 1987; Hañsel e Sticher, 2004).

Figura 3 – *Matricaria recutita*. Foto da parte aérea da planta.



Fonte: Brace, S. Disponível em: <http://www.ruadireita.com/alimentacao/info/cha-de-camomila-contr-o-diabetes/>. Acesso em: 18/12/2005.

As flores secas da camomila foram usadas extensamente na medicina tradicional por séculos por causa de suas propriedades antiinflamatórias, espasmolítica, como antipéptica, sedativa, antibacteriana e antifúngica (Fidler et al., 1996; Avallone et al., 2000; Zanolli et al., 2000).

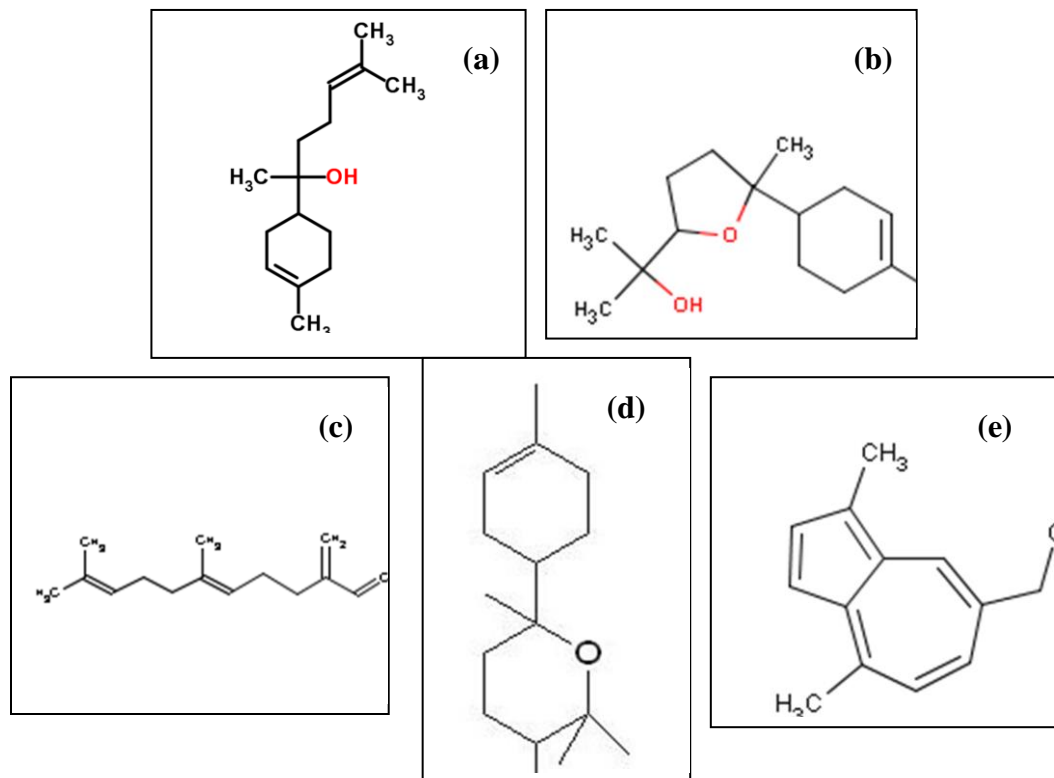
A *M. recutita*, uma planta de grande importância e uso freqüente, é usada como um componente de misturas de chás, bem como em muitas preparações galênicas (medicamentos de composição mal definida). As preparações (ungüentos, inalações, tinturas, chás) das flores da *M. recutita* são facilmente encontradas disponíveis por todo o mundo sem a recomendação médica. Em muitos países como Argentina, Egito,

Hungria, Eslováquia e Alemanha, são numerosas as plantações de *M. recutita*. (Franke, 1997; Hannig, 1997).

A maior parte do valor farmacológico da planta encontra-se em seu característico óleo volátil de cor azul (que corresponde a 1,5 % dos componentes da *M. recutita*). Outros compostos ativos relacionados são flavonóides (propriedades espasmolíticas) e polissacarídeos (Avallone *et al.*, 2000; Robbers e Tyler, 2000).

O óleo compreende uma mistura complexa de sesquiterpenos (α -bisabolol, os óxidos do α e β bisabolol e o farneseno), sesquiterpenolactonas (chamazuleno, com intensa cor azul) e derivados acetilênicos (espiroéteres) (Figura 4). Estes compostos são responsáveis pelas ações antiinflamatórias, antibacterianas e antifúngicas da *M. recutita* (Ammon *et al.*, 1996; Rekká *et al.*, 1996; Amirghofran *et al.*, 2000; Lee e Shibamoto, 2002).

Figura 4 – Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial de *M. recutita*: (a) α -Bisabolol; (b) Bisabolol-óxido B; (c) Bisabolol-óxido A; (d) Farneseno e (e) Chamazuleno.



Fonte: Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em 05/05/2006.

O chá de *M. recutita* contém 10-15% do óleo essencial presente na planta, enquanto extratos brutos e preparações certamente comportam uma quantidade maior (Foster e Tyler, 1999). Efeitos adversos e interações medicamentosas são reportados quanto ao uso de extratos ou de chá de *M. recutita*, como reações anafiláticas (Subiza et al., 1989), inibição da dependência de morfina (Gomaa et al., 2003) e potencialização dos efeitos da warfarina (medicamento utilizado como anticoagulante e como raticida) (Heck et al., 2000). As razões para estas reações adversas e interações ainda são desconhecidas.

1.3 *Foeniculum vulgare* (Erva-Doce)

A erva-doce é uma planta pertencente a família Umbelliferae (Apiaceae), conhecida e utilizada pelo homem desde a antiguidade. A *F. vulgare* é um arbusto que alcança 80 – 150 cm de altura e tem um aroma forte (Figura 5) (Brender et al., 1997). Esta espécie vegetal sempre foi cultivada em todos os países que circundam o Mar Mediterrâneo devido ao seu aroma (Muckensturm et al., 1997). Os efeitos terapêuticos e a utilização culinária da *F. vulgare* foram tão amplos que esta foi exportada de país para país por séculos (Puelo, 1980). Atualmente, é largamente comercializada em alguns países como Rússia, Índia, China, Japão, Inglaterra, Alemanha, Vietnã e América do Sul (Vola'k e Stodola, 1998).

Figura 5 – *F. vulgare*. Exposição da parte aérea da planta.

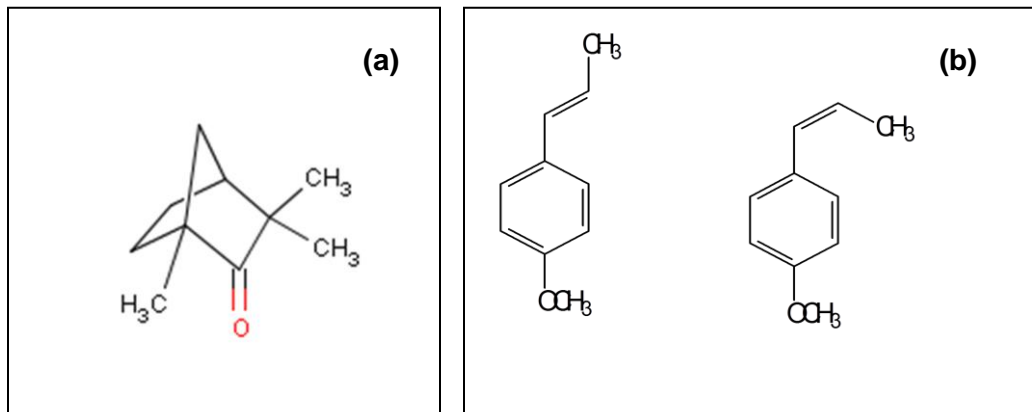


Fonte: SHONFELDER, P. Disponível em:
<http://www.pharmakobotanik.de/schfld/Foenvul.jpg>. Acesso em 18/12/2005

O interesse renovado em produtos naturais no lugar de agentes sintéticos tem focado novamente sua atenção nas plantas como fonte de compostos flavorizantes (Yaylayan, 1991). A *F. vulgare* é uma planta aromática comestível cuja semente é usada para formulações de sabores, temperos, licores, confeitaria, etc (Guilled e Manzanons, 1996). Devido ao sabor e ao aroma originais, o bulbo grosso e carnudo da *F. vulgare* é consumido em saladas ou cozinhado como vegetal de cozinha (Baytop, 1999; Atta-Aly, 2001).

Muitos trabalhos têm estudado recentemente o rendimento e a composição da folhas de *F. vulgare* (Verghese, 1988; Katsiotis, 1988; Arslan, Bayrak, e Akgul, 1989; Lawrence, 1989, 1992; Betts, 1992; Cavaleiro *et al.*, 1993; Piccaglia e Marotti, 1993;). Os compostos predominantes no óleo essencial da *F. vulgare* são anetol e fenchona (Figura 6), também utilizados para propósitos medicinais e como essência na industria de perfumes e cosméticos (Stuart, 1982; Marotti *et al.*, 1993).

Figura 6 – Estruturas químicas dos compostos predominantes no óleo essencial de *F. vulgare*: (a) fenchone e (b) trans e cis-anethole.



Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em 05/05/2006.

A *F. vulgare* e suas preparações medicamentosas são usadas para tratar distúrbios estomacais brandos, inchaços e flatulência (Bilia *et al.*, 2000). Os extratos de *F. vulgare* apresentam também propriedades funcionais, como antiinflamatório, antiespasmódico, carminativo (antiflatulento), diurético, expectorante, laxativo, analgésico, estimulantes da mobilidade do trato gastrintestinal e no tratamento de distúrbios nervosos (Jahromi *et al.*, 2003). São também utilizados no tratamento de

doenças do trato respiratório superior. As folhas desta planta são conhecidas por promover a menstruação, por aliviar sintomas do climatério feminino e aumentar a libido (Albert-Puleo, 1980). Os óleos essenciais de *F. vulgare* são também usados nas cólicas pediátricas e em algumas desordens do trato respiratório devido aos seus efeitos antiespasmódicos (Reynolds, 1982).

1.4 *Mentha piperita* (Hortelã)

O uso histórico da *M. piperita* (hortelã), reconhecido desde o fim do século XVIII, não é diferente do seu uso na medicina moderna (Foster, 1996). A hortelã é um membro da família das Labiataes e originada possivelmente na Ásia oriental. A *M. piperita* é um arbusto de cerca de 30 – 90 cm e possui um odor característico (Figura 7). Suas folhas e tronco são geralmente avermelhados e ela é uma planta herbácea de longa vida. As bordas das folhas são ásperas e sua superfície é verde escura. As flores são púrpuras e coletadas nas bordas dos galhos (Baser, 1993).

Figura 7 – Ilustração das folhas da *M. piperita*.

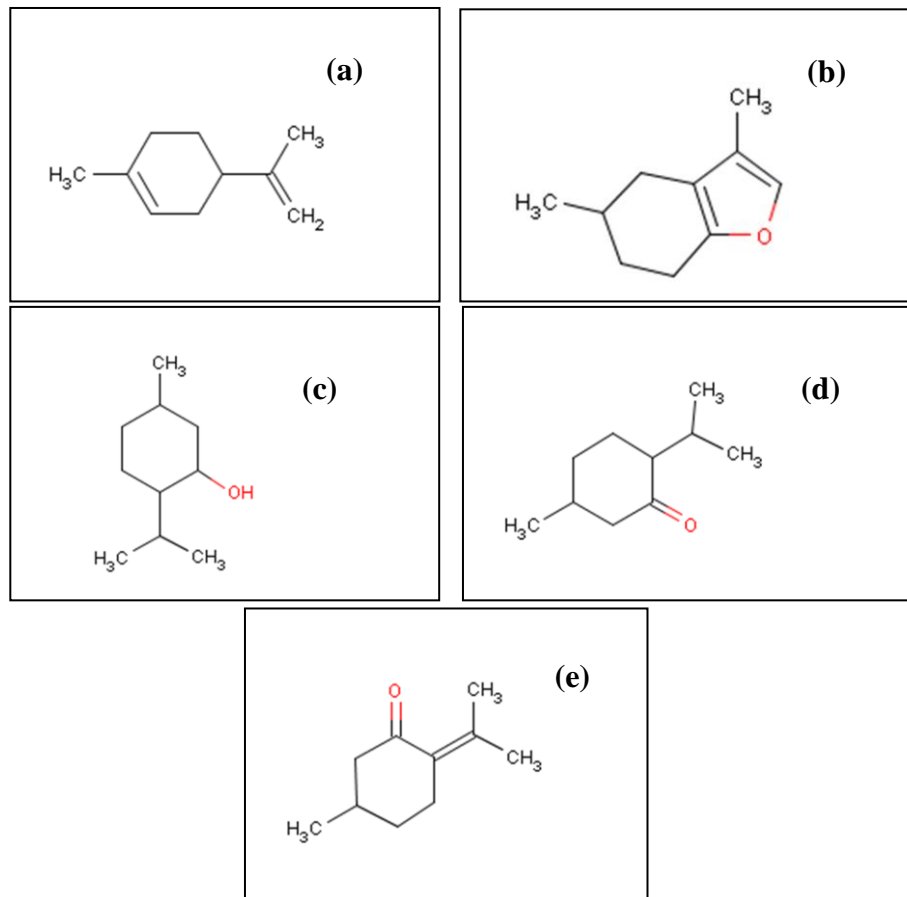


Fonte: SHONFELDER, P. Disponível em:
<http://www.pharmakobotanik.de/schfld/Foenvul.jpg>. Acesso em 18/12/2005

Seu agradável aroma faz dela um ótimo agente flavorizante para a indústria dos alimentos. De fato, os extratos obtidos de espécies de *Mentha* são nos dias de hoje extensivamente usados na manufatura de uma larga escala de produtos como doces, bebidas alcoólicas ou não e gomas de mascar (Ruiz del Castillo *et al.*, 2003).

Plantas do gênero *Mentha* são importantes fontes naturais de monoterpenóides usados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (Hendriks, 1998). A *M. piperita*, juntamente com a *M. arvensis* var. *piperascens* e a *M. spicata*, é responsável por uma das maiores safras de óleos essenciais economicamente importantes, com uma produção mundial excedendo 2000 toneladas por ano (Deans e Waterman, 1993). A *M. piperita* contém aproximadamente cerca de 0,32 – 4% de óleos voláteis, 25 – 62% de mentol, 13 – 40% de mentona, 1 – 4% de mentofurano, e 0 – 25% de limoneno (Figura 8) (Baser, 1993).

Figura 8 – Estruturas químicas de componentes do extrato de *Mentha piperita*: (a) Limoneno; (b) Mentofurano; (c) Mentol; (d) Mentona e (e) Pulegona



Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em 05/05/2006.

Vários efeitos farmacológicos e biológicos foram associados aos componentes destes óleos. Em particular o mentol é um conhecido agente antifúngico e antibacteriano (Morris *et al.*, 1979) e repelente de larvas (Kelsey *et al.*, 1984). Ele parece interagir na célula com o Ca^{2+} citossólico, provavelmente pela liberação do Ca^{2+} armazenado intracelularmente (Takeuchi *et al.*, 1994) e pelo bloqueio dos canais de cálcio (Taylor *et al.*, 1985; Hills e Aarson, 1992). A mentona possui uma boa atividade antihormonal em insetos (Slama, 1978), enquanto a pulegona é metabolizada por uma via de mono-oxigenação hepatomicrosomal a uma série de toxinas que podem levar ao câncer de fígado (Nelson, 1995), e está envolvida em muitos casos de intoxicação animal e humana (Bakerink *et al.*, 1996).

A hortelã está na lista das ervas vitais no grupo das ervas medicinais, porque pode ajudar a combater a perda do apetite, a gripe comum, bronquite, sinusite, febre, náusea e vômito, além de auxiliar na digestão (Starburck, 2001). Sobre a *M. piperita* foram relatadas atividades antiinflamatórias (Juergens *et al.*, 1998), antibacterianas (Tassou *et al.*, 1995) e a atividade antifúngica (Sarbhoy *et al.*, 1978).

Recentemente, também foi relatado que o óleo de *M. piperita* é eficaz contra reações alérgicas de hipersensibilidade imediata (Arakawa *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001). Três ou quatro copos de chá de hortelã entre as refeições podem aliviar problemas gastrointestinais (Gobel *et al.*, 1995). Quando aplicada topicamente, ela age contra irritações e como analgésico, com a habilidade de reduzir a dor e aumentar o fluxo de sangue na área afetada (Wichtl, 1994).

Alguns estudos cegos têm mostrado que o óleo pode servir como um revestimento entérico podendo ser benéfico para pessoas com síndrome intestinal (Rees *et al.*, 1979; Dew *et al.*, 1984; May *et al.*, 1996; Westphal *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Pittler e Ernst, 1998). O chá de *M. piperita* é tradicionalmente utilizado na terapia da cólica infantil, e um estudo duplo-cego (método que consiste em ministrar o medicamento a um indivíduo, fazendo-o alternar com um placebo, sem que ele, nem o médico, o saibam) confirmou sua eficácia (Leicester e Hunt, 1982).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a atividade toxicológica e microbiológica de extratos de plantas medicinais usadas comercialmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade hepatotóxica e esplenotóxica dos chás em camundongos Swiss albinos;

Realizar partição dos extratos dos chás que apresentaram atividade hepato-esplenotóxica;

Determinar atividade toxicológica das frações e dos extratos;

Determinar a concentração letal (DL₅₀) dos extratos analisados;

Realizar análise microbiológica dos chás usados comercialmente;

Determinar atividade antimicrobiana dos extratos *in vitro*.

3 JUSTIFICATIVA

A planta medicinal utilizada em medicamentos ou até mesmo *in natura* é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos (SIMÕES, 2002).

Como exemplo da necessidade de mais pesquisas a cerca das substâncias presentes nos extratos de plantas medicinais comercializados como fitoterápicos, temos o trabalho de Maliakai e cols. (2001), que sugeriram efeitos sobre a atividade das enzimas hepáticas causados pela administração de extratos de *M. chamomila* e *M. piperita*.

O uso indiscriminado de antibióticos é freqüente, mesmo quando consideramos os de última geração (Aubry-Damon and Couvalin, 1999; Seifert, *et al.* 1999; Arakawa *et al.* 2000; Vatopoulos *et al.* 2000). As bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Enterococcus faecalis*, vem desenvolvendo um alto grau de resistência a esses antibióticos e as infecções que muitos pacientes tem adquirido através da contaminação com linhagens bacterianas multirresistentes tem causado milhões de mortes em todo mundo.

Portanto torna-se importante o investimento em estudos mais específicos sobre as plantas medicinais comercializadas como fitoterápicos, devido à escassez de informações sobre os seus constituintes químicos e seu potencial toxicológico. Pode-se também ressaltar a importância da pesquisa de novas substâncias com atividades antimicrobianas que apresentem atividade contra cepas de bactérias multirresistentes e fungos patogênicos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Obtenção das Amostras

Amostras dos extratos testados

As amostras dos chás de *Camelia sinensis*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita* e *Matricaria recutita* (marcas, lotes e datas de validade – APÊNDICE 1) foram obtidas em estabelecimentos comerciais na Cidade de Maceió-AL.

4.1.2 Amostras Biológicas

Bactérias e Leveduras

As espécies de microrganismos utilizados foram as bactérias Gram positivas - *Staphylococcus aureus* (BACs 25 e 97), *Enterococcus faecalis* (BAC – 03 / ATCC 19433), *Klebsiella pneumoniae* (BAC – 34 / ATCC 13883) e Gram negativas - *Pseudomonas aeruginosa* (BACs 08, 52, 57 e 135) , *Escherichia coli* (BACs 10, 36 e 148) e *Serratia marcescens* (BAC –63 / ATCC 13880), e os fungos - *Candida albicans* (FUNS 13 e 49), *C. krusei* (FUNs 02 e 17), *C. tropicalis* (FUNs 12 e 24) e *C. guilliermondii* (FUN 16 e 26). Todos os espécimes foram cedidos pelo Laboratório de Patologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia de Maceió-AL. A classificação das bactérias foi confirmada pelo referido laboratório que possui vínculo com o Programa Nacional de Controle de Qualidade Ltda, da Sociedade de Análises Clínica – SBAC, conforme número contrato do participante 00684. Todas as espécies foram mantidas na micoteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada – L@MA, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.1.3 Animais Utilizados

Camundongos machos e fêmeas (*Swiss albinos*) foram utilizados oriundos do biotério setorial do Centro de Ciências Biológicas – CCBi – UFAL. Os animais foram previamente avaliados, quanto ao estado de saúde, e medicados contra parasitas. A sala onde eles permaneceram foi aclimatada com temperatura 21 ± 1 °C, com sistema de exaustão e fotoperíodo de 12 horas (Figura 9).

Figura 9 – Camundongos utilizados nos testes de hepatotoxicidade e esplenotoxicidade: (a) Gaiolas com ração e água à vontade; (b) Biotério aclimatado.



Fonte: Autor, 2006.

4.2 Extração Aquosa de *Camelia sinensis*, *Matricaria recutita*, *Foeniculum vulgare* e *Mentha piperita*.

Amostras de 10 g de cada planta foram ressuspensas em 100 mL água destilada. As amostras foram acondicionadas em erlemeyer de 250 mL e em seguida foram aquecidos em banho-maria (THERMOMIX BM), a 90°C por 30 minutos. Após este processo os extratos foram filtrados em papel de filtro e acondicionados em frascos estéreis hermeticamente fechados e mantidos em câmara refrigerada, até o momento dos testes.

4.3 Extração etanólica dos chás de *Camelia sinensis*, *Matricaria recutita*, *Foeniculum vulgare* e *Mentha piperita*.

As amostras de 200g dos chás foram individualmente extraídas a frio com agitação mecânica e utilizando-se como solvente o etanol. Os extratos etanólicos obtidos foram filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotativo sob vácuo (BÜCHI, MODELO RE-114B), à pressão reduzida fornecendo os extratos brutos etanólicos. Estes extratos foram utilizados em testes preliminares de atividade toxicológica e antimicrobiana.

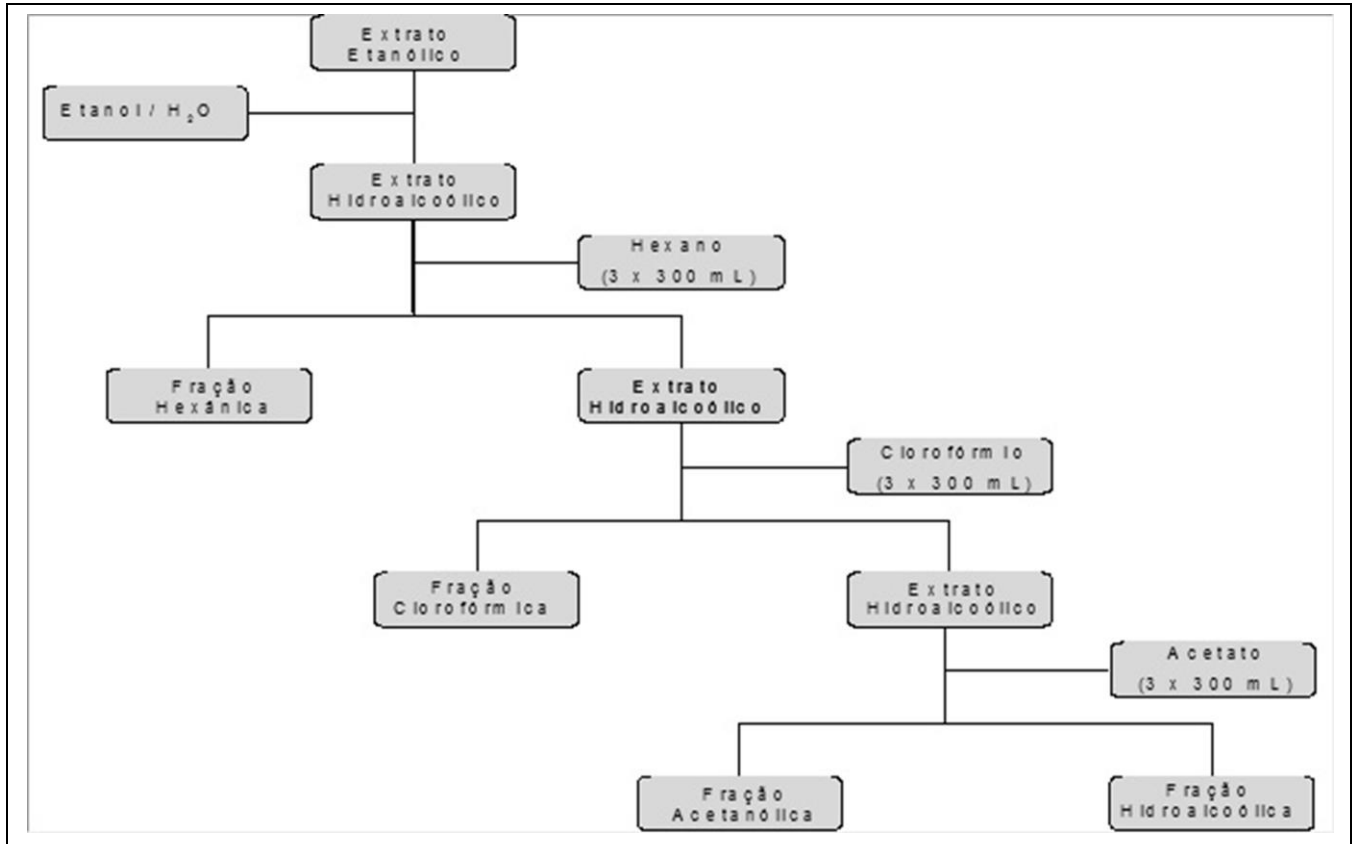
4.4 Partição dos extratos etanólicos de *Camelia sinensis* e *Matricaria recutita*.

Após os testes, os extratos etanólicos secos de *C. sinensis* e *M. recutita* foram individualmente ressuspendidos em uma mistura hidroalcoólica na proporção de 3:2 de etanol e água, e o material foi transferido para um funil de separação. O extrato foi submetido à extração por partição líquido-líquido, segundo um gradiente crescente de polaridade. Para tal foram utilizados os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila (destilados em evaporador rotativo - BÜCHI, modelos RE-111B e RE-114V, no laboratório de Produtos naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas).

O processo de partição baseou-se na adição sucessiva de 300 mL de solvente ao material contido no funil de separação, iniciando-se o processo pelo solvente mais apolar, o hexano. Após a adição de cada volume do solvente, o funil de separação foi agitado para separação das fases e a fração hexânica foi removida do funil. O processo foi repetido mais 2 vezes obtendo-se um volume total de aproximadamente 900 mL. O mesmo procedimento foi aplicado aos outros solventes para a obtenção desse mesmo volume final.

Após a evaporação à baixa pressão em aparelho rotatório, foram obtidas a partir do extrato hidroalcoólico as seguintes frações: fração hexânica, fração clorofórmica, fração de acetato de etila e fração hidroalcoólica (Figura 10).

Figura 10 – Método utilizado para fracionamento dos extratos etanólicos de *C. sinensis* e *M. recutita*.



Fonte: Autor, 2006.

Os rendimentos das frações hexânicas, clorofórmicas e de acetato de etila dos extratos etanólicos em questão estão dispostas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores dos rendimentos das frações do extratos etanólicos de *C. sinensis* e *Matricaria recutita*.

EXTRATOS FRACIONADOS	Fração Hexânica	Fração Clorofórmica	Fração Acetanólica	Fração Hidroalcoólica
Camelia sinensis	3,9g	3,87g	6,91g	--
Matricaria recutita	5g	5g	0,4g	--

Após este processo realizou-se a prospecção química dos extratos etanólicos de *C. sinensis* e *M. recutita*.

4.5 Prospecção Química

A metodologia utilizada para analisar a variabilidade de constituintes químicos presentes nas amostras de própolis foi de acordo com MATOS (1997).

A amostra (50 mg) de cada extrato foi colocada em frascos de vidro (10 mL), individualmente, e foi solubilizada em etanol (3 mL), sendo então distribuída em seis frascos de vidro (10 mL). Após isso, álcool etílico foi adicionado a cada frasco (2 mL).

4.5.1 Testes para fenóis e taninos.

Em um frasco de vidro (10 mL) contendo 2 mL das amostras dos extratos etanólicos individualizadas, colocou-se três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3). Agitou-se bem e observou a variação de coloração ou a formação de precipitado escuro, comparando-o com o teste em branco, isto é, usando apenas água e o cloreto férrico. Para a identificação dos constituintes químicos presentes foi seguido o esquema abaixo:

- Coloração variável entre azul e o vermelho foi indicativo da presença de fenóis, quando o teste em “branco” foi negativo.
- Formação de precipitado escuro de tonalidade azul indicou a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolizáveis) e verde, a presença de taninos flababênicos (taninos condensados ou catéquicos).

4.5.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides.

Em três frascos de vidros (10 mL) contendo 3 mL das amostras dos extratos etanólicos individualizadas, sendo um deles acidificado a pH 3,0 utilizando ácido clorídrico (HCl) 1 M e os outros dois alcalinizados a pH 8,5 e 11, respectivamente, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M. De acordo com a mudança da coloração do

material analisado, foram identificados os constituintes químicos presentes de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 – Constituintes químicos identificados através da mudança de coloração apresentada pelo material analisado, de acordo com MATOS (1997).

Constituintes	Cor em Meio		
	ácido	alcalino pH 8,5	alcalino pH 11
Antocianinas, Antocianidinas	vermelha	lilás	azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	amarela
Chalconas e Auronas	vermelha	-	vermelha púrpura
Flavononóis	-	-	vermelha. laranja

4.5.3 Testes para Leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.

Em dois frascos de vidro (10 ml) contendo 2 mL das amostras individualizadas, foi adicionado de HCl 1 M, no primeiro, até pH 1-3 e o segundo foi alcalinizado com NaOH 1 M até pH 11. Foram aquecidos em banho-maria durante 3 minutos. O resultado da reação (mudança da coloração) foi comparado com o teste anterior (item 4.1.5.2), e os constituintes químicos presentes foram identificados de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 – Constituintes químicos identificados através da mudança de coloração apresentada pelo material analisado, de acordo com MATOS (1997).

Constituintes	Cor em Meio	
	ácido	alcalino (pH 11)
Leucoantocianidinas	vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	vermelho laranja

4.6 Preparação dos Meios de Cultura

4.6.1 Meio Líquido

O meio de cultura líquido Brain Heart Infusion – BHI (Difco) foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante: 37,0 g do meio liofilizado (pó) foram suspensos em 1 L de água destilada (purificada). A suspensão foi aquecida a 80 °C em banho-maria, até completa solubilização. Em seguida, 2 mL do meio líquido foram transferidos para tubos de ensaios previamente esterilizados que foram então autoclavados a 121 °C por 15 minutos (Autoclave – FABBE LTDA, MOD 103). Após esterilização, os tubos de ensaio contendo o meio foram colocados em estufa Bacteriológica (FANEM, modelo 002CB) por 24 horas, para averiguar se houve algum tipo de contaminação, sendo a turbidez o principal indicador de contaminação da mesma. Não sendo constatada nenhuma modificação ou turbidez no meio, os mesmos foram acondicionados em refrigerador a uma temperatura de 4°C, até o momento dos testes.

4.6.2 Meios Sólidos

Os meios de cultura sólidos meio Agar Infuso de Cérebro e Coração - BHA – (Vetec), Eosina Azul de Metileno – EMB (Difco) - e Agar Saborand (Difco) foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante, onde as massas do meio liofilizado (pó) foram suspensas em 1000 mL de água destilada (purificada). O meio foi previamente solubilizado em banho-maria a 80 °C e foi autoclavado a 121 °C, por 15 minutos. Posteriormente, 20 mL do meio BHA foram transferidos para tubos de ensaio rosqueados estéreis, e estes foram autoclavados a 121°C por 15 minutos, sendo acondicionados em refrigerador a uma temperatura de 4 °C, até o momento dos testes. Os meios EMB e Agar Saborand foram, após a esterilização em autoclave, transferidos para placas de Petri estéreis (12 mL). As placas foram mantidas na capela de fluxo laminar à temperatura ambiente, até solidificação.

Posteriormente, todas as placas foram colocadas em estufa bacteriológica aquecida a 37°C, durante 24 horas, para verificar se houve algum tipo de contaminação, sendo o crescimento de colônias um indicativo da mesma. Não sendo constatada nenhuma modificação ou a presença de colônias de microrganismos na superfície do meio, as placas foram acondicionadas em refrigerador, a 4 °C, até momento dos testes.

4.7 Preparo dos Extratos para os Testes Biológicos

4.7.1 Testes de Toxicidade Aguda

Amostras (1g) das frações obtidas foram retiradas por pesagem em balança semi-analítica (modelo ACCULAB V-1mg) e foram colocadas em frascos pequenos (40 mL) e solubilizadas com 10 mL de água destilada estéril, sendo mantidas em ambiente refrigerado a 4°C.

4.7.2 Testes Antimicrobianos

Para realização dos testes de atividade antimicrobiana, 200 mg dos extratos foram solubilizados em um volume de 1mL de uma solução metanol/água (33%). Após este processo, a suspensão foi mantida em recipiente hermeticamente fechado.

4.7.3 Teste do Perfil Microbiológico

Um grama de cada amostra de chá foi suspenso em 10 mL de solução salina estéril (10%) com agitação em vortex. As amostras solubilizadas foram mantidas em recipientes estéreis para testes de avaliação do perfil microbiológico.

4.8 Bioensaios

4.8.1 Atividade Hepatotóxica e Esplenotóxica dos Extratos

Inoculação

Grupos contendo 10 camundongos Swiss Albinos fêmeas com a mesma faixa de peso foram inoculados intraperitonealmente com os extratos aquosos de *C. Sinensis*, *M. recutita*, *F. vulgare* e *M. piperita*, nas concentrações de 2,34 g.Kg⁻¹ e 3,34 g.Kg⁻¹ de peso dos animais. Posteriormente determinou-se uma dose para inoculação de 1,67 g.Kg⁻¹ para o extrato de *C. sinensis*.

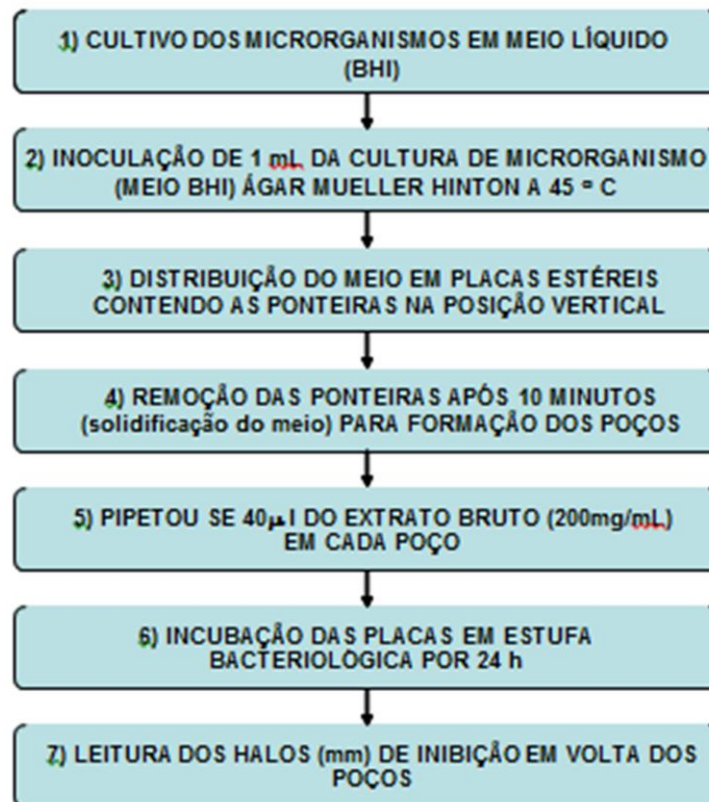
Foi realizada a determinação da DL 50 das frações dos extratos etanólicos de *C. sinensis* e *M. recutita*.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os animais foram mantidos em biotério aclimatado a uma temperatura de 21±1°C, fotoperíodo de 12 horas e ração e água a vontade. Os animais foram vistoriados diariamente, num período de três dias. Ao término do experimento, os animais foram pesados e biopsiados após período anestésico e foi determinado o peso do fígado e baço de todos animais.

4.8.2 Atividade Antimicrobiana

Na determinação da atividade antimicrobiana, foi utilizado um método de difusão em Agar baseado no método de Kirby e Bauer modificado (DREW *et al*, 1972) representado na Figura 11. São considerados extratos com atividade antimicrobiana extratos que apresentam halo de inibição acima de 10 mm.

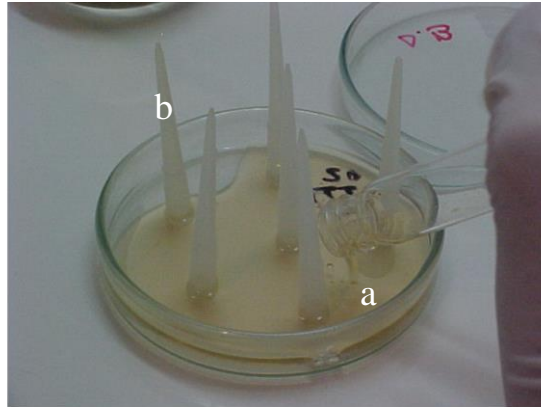
Figura 11 – Método modificado de difusão em Agar baseado no método de Kirbv Bauer



Fonte: Autor, 2006.

Os microrganismos foram repicados para tubos contendo 2 mL do meio líquido BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Foram utilizadas as bactérias Gram positivas -*Staphylococcus aureus* (BACs 25 e 97), *Enterococcus faecalis* (BAC – 03 / ATCC 19433), *Klebsiella pneumoniae* (BAC – 34 / ATCC 13883) e Gram negativas - *Pseudomonas aeruginosa* (BACs 08, 52, 57 e 135) , *Escherichia coli* (BACs 10, 36 e 148) e *Serratia marcescens* (BAC –63 / ATCC 13880), e os fungos *Candida albicans* (FUNS 13 e 49), *C. krusei* (FUNs 02 e 17), *C. tropicalis* (FUNs 12 e 24) e *C. guilliermondii* (FUN 16 e 26). Posteriormente, 1 mL do BHI foi adicionado em tubos contendo uma base de Agar Mueller Hinton a temperatura de aproximadamente 45°C e vertido em placas de Petri contendo uma base de agar bacteriológico com ponteiras estéreis colocadas na posição vertical, para formação dos poços (Figura 12).

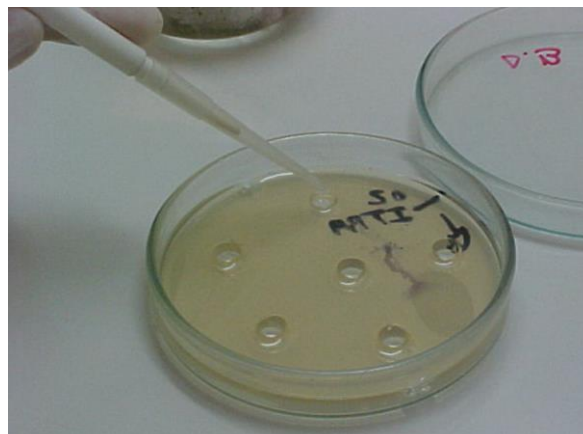
Figura 12 – Preparação dos poços para inoculação; (a) Verte-se o meio na placa; (b) ponteiros fixadas para formação dos poços



Fonte: Autor, 2006.

As placas formadas foram inoculadas 40 μ L da amostra dos extratos em cada poço (Figura 13). Após este processo as placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica por um período de 48 horas a 37°C.

Figura 13 – Inoculo dos extratos nos



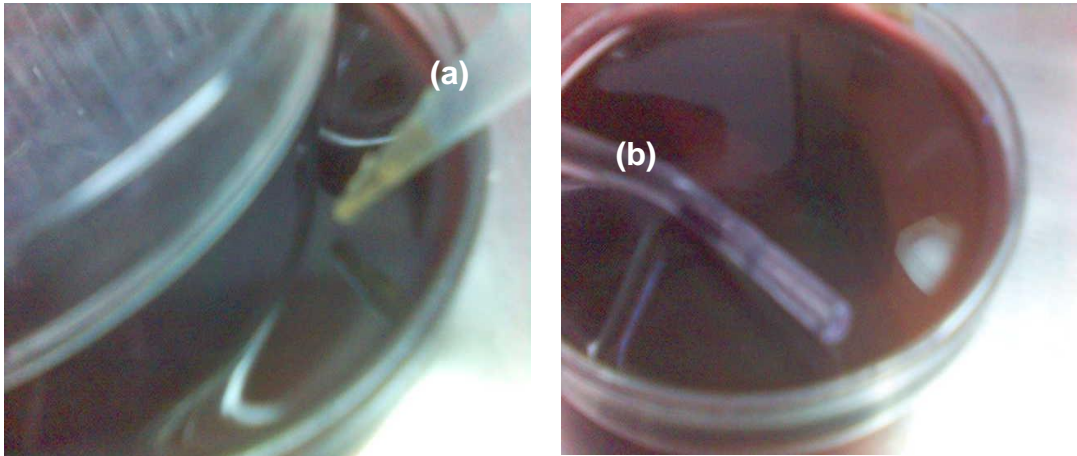
Fonte: Autor, 2006.

4.8.3 Perfil Microbiológico

Alíquotas de 1,0 mL e de 0,5 mL das amostras foram vertidas em placas de Petri contendo os meios Agar Sangue, EMB e Agar Saboraud, e em seguida foram plaqueadas com o auxílio de uma alça de vidro em “L” previamente esterilizada,

fazendo-se com a alça movimentos em forma de oito, para obtenção de uma distribuição uniforme (Figura 14). Após a absorção de toda a amostra pelo meio de cultura, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas.

Figura 14 – Perfil microbiológico dos chás testados: (a) Inoculação dos extratos; (b) Plaqueamento das amostras.



Fonte: Autor, 2006.

As leituras foram realizadas através da contagem do número de unidade formadora de colônias (ufc) por grama de extrato, com auxílio de uma lupa manual.

4.9 Análise Estatística

O tratamento estatístico foi realizado utilizando-se softwares (Microsoft Office Excel 2003) para analisar as médias dos grupos de animais testados determinando os desvios padrões relativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção Química

Segundo os resultados obtidos na prospecção química dos extratos etanólicos de *C. sinensis* e *M. recutita*, foram encontrados resultados positivos para a presença de flavanonas e flavanonóis, compostos da família dos flavonóides (Tabela 4). Não foi realizada a prospecção química dos extratos de *F. vulgare* e *M. piperita* devido à escassez de resultados expressivos para estes extratos nos testes preliminares.

TABELA 04 – Prospecção química dos extratos etanólicos de *Camelia sinensis* e *Matricaria recutita*

Constituintes Químicos	<i>Camelia sinensis</i>	<i>Matricaria recutita</i>
Antocianidinas	-	-
Antocianinas	-	-
Auronas	-	-
Catequinas	-	-
Chalconas	-	-
Fenóis	-	-
Flavanonas	+	+
Flavanonóis	+	+
Flavonas	-	-
Flavonóis	-	-
Leucoantocianidinas	-	-
Taninos	-	-
Xantonas	-	-

(+) Presença do constituinte químico;

(-) Ausência do constituinte químico

Atribuem-se diversas atividades farmacológicas à *M. recutita*, como antiinflamatório, antiespasmódico, ansiolítico e carminativo, associadas aos diferentes grupos de constituintes químicos presentes, como óleo essencial, flavonóides, cumarinas e mucilagem (Evans, 1996; Fetrow & Avila, 2000; Kuhn & Winston, 2000; Lorenzi & Matos, 2002; Newall *et al.*, 2002; Rotblatt & Ziment, 2002). A presença destes flavonóides fica comprovada diante da positividade da prospecção para flavononas e flavononóis no extratos obtidos no presente trabalho.

A ausência de outros constituintes, representada pelos resultados da prospecção química, não descarta a presença destes nos extratos analisados, pois alguns fatores influenciam o resultado destes testes, como o mascaramento destes por outras substâncias, a sazonalidade, a forma de coleta da planta, entre outros fatores relevantes. Como exemplo disto a presença de catequinas no extrato etanólico do chá de *C. sinensis* descrito por Sanderson (1972), não foi constatada na prospecção química do extrato citado o que não descarta a sua presença.

5.2 Toxicologia dos Extratos Aquosos

No grupo de camundongos inoculado com as concentrações de 2,34 g.Kg⁻¹ e 3,34 g.Kg⁻¹ de peso dos animais houve a morte de todos os animais inoculados com o extrato etanólico de *C. sinensis*, determinando-se uma dose para inoculação de 1,67 g.Kg⁻¹ para o extrato em questão.

De acordo com as análises realizadas foi constatado que os extratos aquosos de *M. recutita* e *C. sinensis* apresentaram atividade toxicológica para o fígado e baço nos modelos experimentais inoculados com uma dose de 3,34g.Kg⁻¹ e de 1,67 g.Kg⁻¹ de peso do animal, respectivamente (TABELA 5).

Tabela 5 – Relação das massas corpórea e do fígado dos animais utilizados nos experimentos dos extratos aquosos.

Grupo	Extratos Testados	Média de Peso Corpóreo e EPM***(g)	Média de Peso Fígado e EPM (g)	% Peso do fígado
G1*	<i>M. recutita</i> .	30,957 ± 1,83	1,962 ± 0,09	6,34
G2	<i>C. sinensis</i> .	35,99 ± 0,43	2,195 ± 0,11	6,10
G3	<i>F. vulgare</i>	32,082 ± 1,67	1,815 ± 0,06	5,65
G4	<i>M. piperita</i>	33,482 ± 0,79	1,836 ± 0,09	5,48
C**	Controle	30,5 ± 0,31	1,727 ± 0,07	5,66

*G= grupos tratados com os extratos aquosos dos chás

**C= Controle tratados com solução salina estéril.

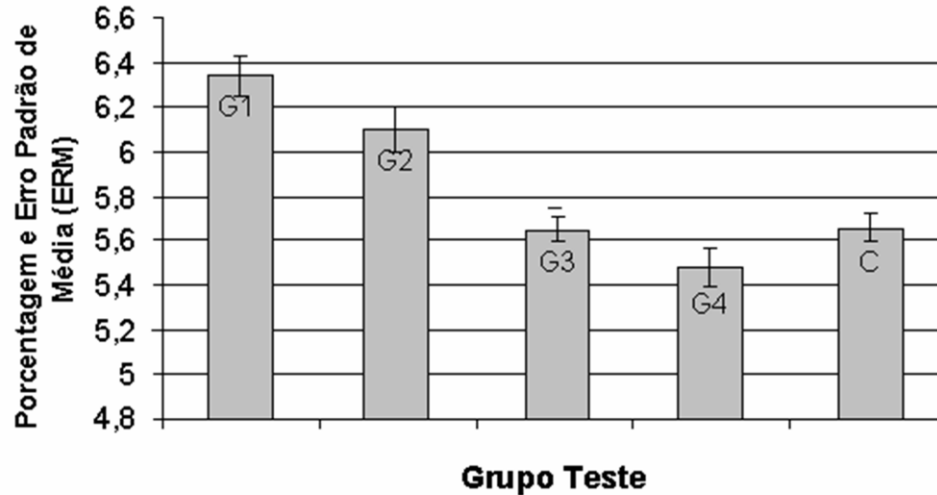
***EPM = Erro Padrão da Média

Para as frações de *M. recutita* doses acima de 3,34 g.Kg⁻¹ não apresentaram modificação da atividade. Para as frações clorofórmica e de acetato de etila de *C. sinensis* foi determinada a dose de 1,67 g.Kg⁻¹ como a DL50. Doses acima de 3,34 g.Kg⁻¹, da fração hexânica de *C. sinensis* não apresentaram modificação relevante da atividade.

O extrato aquoso da *M. recutita* apresentou indícios de atividade hepática, sendo o peso médio do fígado destes animais igual a 6,34% do peso corpóreo, em comparação com o percentual de 5,66% do controle, representando um aumento de 12% do valor do controle (Tabela 5). Nos animais inoculados com a dose de 1,67 g.Kg⁻¹ de extrato aquoso de *C. sinensis* foi obtido um percentual de 6,10% de massa do fígado em relação ao peso total dos animais deste grupo, representando um aumento de 7,8% do valor encontrado em relação ao controle, e neste grupo 50% foram a óbito em menos de 24 horas.

De acordo com os dados obtidos observamos que os extratos de *F. vulgare* e *M. piperita* não apresentaram atividade hepatotóxica quando o grupo de animais foi inoculado com uma massa de 3,34 g.Kg⁻¹, em comparação com o grupo controle (Figura 15).

Figura 15 – Comparação do valor percentual do peso do fígado em relação ao corpóreo para os grupos teste (G = grupo tratados com os extratos aquosos dos chás; C = grupo controle tratados com solução salina estéril)



Fonte: Autor, 2006.

O extrato aquoso de *M. recutita*, na dose de $3,34\text{g.Kg}^{-1}$ apresentou uma acentuada atividade esplenotóxica uma vez que ocorreu um aumento de 66% do peso do baço dos animais tratados em relação ao do grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6 – Relação das massas corpórea e do baço dos animais utilizados nos experimentos dos extratos aquosos.

Grupo Extratos Testados	Média de Peso Corpóreo e EPM*** (g)	Média de Peso do baço e EPM (g)	%Peso do Baço
G1* <i>M. recutita</i> .	$30,957 \pm 1,83$	$0,288 \pm 0,017$	0,93
G2 <i>C. sinensis</i> .	$35,99 \pm 0,43$	$0,275 \pm 0,011$	0,76
G3 <i>F. vulgare</i>	$32,082 \pm 1,67$	$0,186 \pm 0,007$	0,57
G4 <i>M. piperita</i>	$33,482 \pm 0,79$	$0,1872 \pm 0,013$	0,55
C** Controle	$30,5 \pm 0,31$	$0,173 \pm 0,021$	0,56

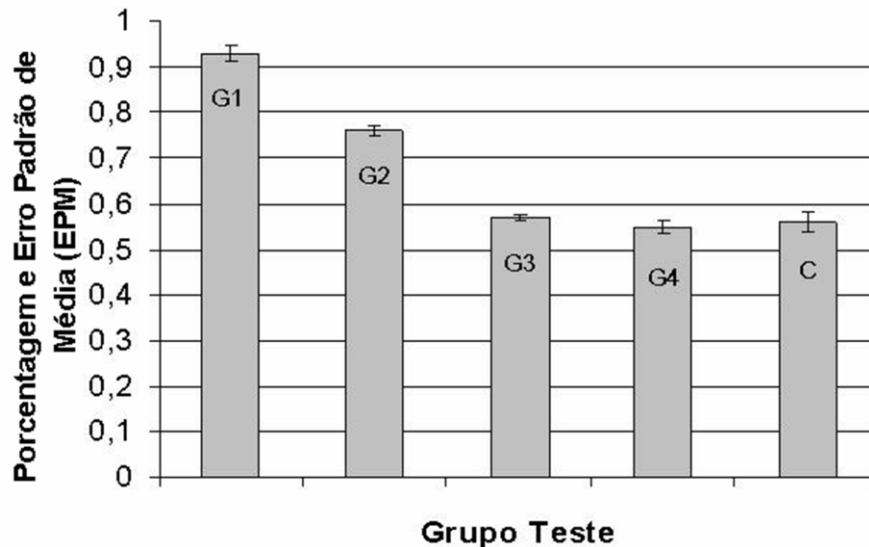
**C= Controle tratados com solução salina estéril.

*G= grupos tratados com os extratos aquosos dos chás

***EPM = Erro Padrão da Média

Os animais inoculados com a dose de $1,67 \text{ g.Kg}^{-1}$ de extrato aquoso de *C. sinensis* apresentaram um aumento do baço em relação aos do grupo controle de 35%. Os extratos aquosos de *F. vulgare* e *M. piperita* não levaram a um aumento perceptivo do baço em comparação ao grupo controle (Figura 16).

Figura 16 – Comparação do valor percentual do peso do baço em relação ao corpóreo para os grupos teste.



Fonte: Autor, 2006.

Os extratos aquosos de *F. vulgare* e *M. piperita* não levaram a um aumento perceptivo do baço em comparação ao grupo controle (Figura 16).

As frações dos extratos de *C. sinensis* e *M. recutita* foram analisadas com o intuito de se determinar a DL_{50} de cada fração, fazendo-se a inoculação dos grupos de camundongos com massa de $0,84 \text{ g.Kg}^{-1}$, $1,67 \text{ g.Kg}^{-1}$ e $3,34 \text{ g.Kg}^{-1}$. De acordo com estes testes foi possível determinar a DL_{50} das frações clorofórmica e de acetato de etila da *C. sinensis*, que foram respectivamente $1,67 \text{ g.kg}^{-1}$ e $0,84 \text{ g.kg}^{-1}$.

5.2.1 Biopsia de Fígado

Os dados expressos na tabela 7 demonstram resultados relevantes de acordo com o grau de comprometimento do fígado dos animais tratados com frações dos extratos de *C. sinensis* e *M. recutita* e do grupo controle conforme as análises histológicas das amostras de fígado dos animais (Tabela 7 e figuras 17 e 18).

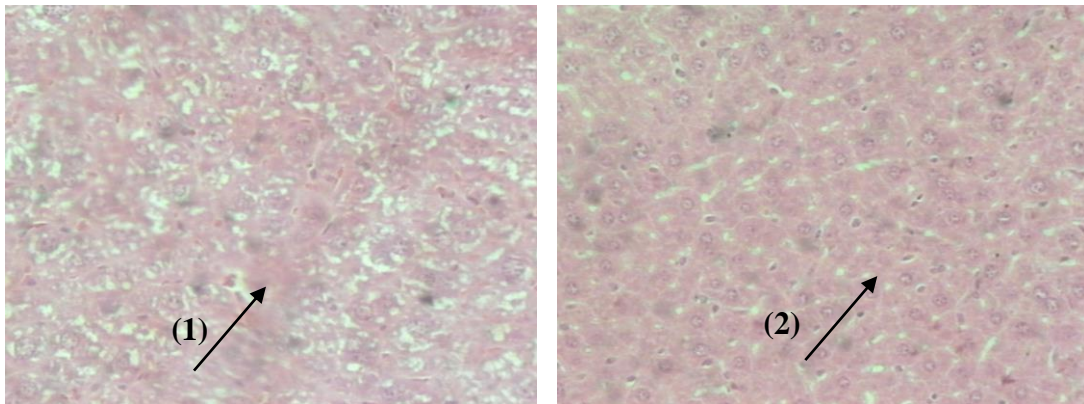
Tabela 7 – Avaliação dos cortes histológicos do baço dos animais inoculados com as frações dos extratos de *Camelia sinensis*, *Matricaria recutita* e grupo controle.

EXTRATOS TESTE		HEPATÓCITOS	SINUSÓIDES	ESPAÇOS PORTAIS	FIBROSE
C. sinensis	Fr. Hexânica	Leve Degeneração Hidrópica	Raros linfócitos, plasmócitos e neutrófilos	Leve ampliação com infiltrado inflamatório	--
	Fr. Clorofórmica	Leve Degeneração Hidrópica	Raros linfócitos, plasmócitos e neutrófilos	Leve ampliação com infiltrado inflamatório	--
	Fr. Acetanólica	Leve Degeneração Hidrópica	Normal	Normal	--
M. recutita	Fr. Hexânica	Normal	Normal	Normal	--
	Fr. Clorofórmica	Leve Degeneração Hidrópica	Raros linfócitos e plasmócitos	Leve infiltrado inflamatório sem ampliação	--
	Fr. Acetanólica	Normal	Raros linfócitos, plasmócitos e neutrófilos	Leve ampliação	--
Controle		Normal	Normal	Normal	--

Os cortes histológicos dos fígados dos animais inoculados com as frações de *C. sinensis* apresentaram um leve grau de degeneração hidrópica, o que não foi visualizado nos cortes histológicos dos animais do grupo controle (Figura 17). A degeneração hidrópica é uma lesão celular caracterizada na maioria dos casos por uma inibição da enzima ATP sintase por uma substância que o fígado tenha metabolizado,

que acarretará numa diminuição da síntese de ATP na mitocôndria, ocorrendo uma redução da atividade da bomba Sódio/Potássio. Esta redução leva a uma diminuição da permeabilidade da membrana celular fazendo com que haja um o acúmulo de água e eletrólitos no interior da célula, tornando-a tumefeita, aumentada de volume. É uma lesão não-letal mais comum frente aos mais variados tipos de agressão, independente da natureza (física, química ou biológica) do agente agressivo. Porém este tipo de degeneração é um processo reversível; suprimindo-se a causa, as células voltam ao normal (Brasileiro Filho, 1998). Neste caso podem-se considerar os extratos testados como os agentes químicos que provocaram esta degeneração.

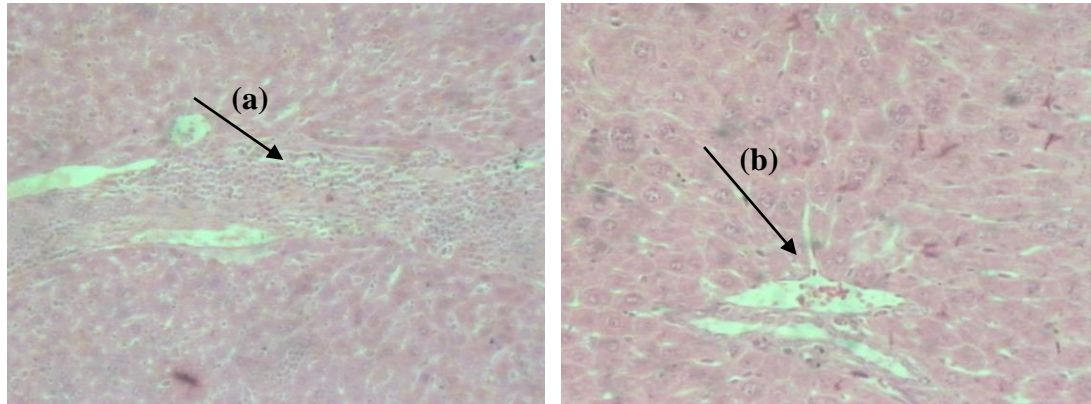
Figura 17 – Microfotografia do fígado de um camundongo apresentando degeneração hidrópica (seta 1) quando comparado ao grupo controle (seta 2).



Fonte: Autor, 2006.

Notou-se também a ampliação dos espaços portais às custas de infiltrados inflamatórios constituídos por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, com uma rara presença de eosinófilos. Esta ampliação apresentou graus variados de intensidade, sendo constatadas ampliações moderadas e leves dos espaços portais (Figura 18). Não foi observada fibrose e a lamina limitante permaneceu íntegra em todos os animais.

Figura 18 – Microfotografia do fígado de camundongos inoculados com as frações extrato de *C. sinensis*, apresentando infiltrado inflamatório moderado (a) quando comparado com os espaços portais do grupo controle (b). Diferenciação dos níveis de hepatite produzidos pelas frações testadas.



Fonte: Autor, 2006.

Os animais inoculados com as frações do extrato de *M. recutita* não apresentaram ampliação significativa dos espaços portais, de acordo com as análises das biópsias, embora tenham apresentado infiltrados inflamatórios constituídos por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, porém sem ampliação dos espaços portais. Também não foi observada fibrose e a lamina limitante se manteve íntegra.

Os efeitos toxicológicos apresentados pelos animais teste podem ocasionar a modificação das funções hepáticas podendo levar a necrose tissular e a uma cirrose. Porém, fazem-se necessários estudos de toxicologia crônica para analisar o uso destes extratos em longo prazo.

5.2.2 Biópsia de Baço

De acordo com a análise dos cortes histológicos do baço de animais testados com as frações de *C. sinensis*, não foi observada a presença de atrofia da polpa branca (folículos linfóides). Porém a microscopia dos cortes histológicos das amostras do baço dos animais inoculados com os extratos hexânico e acetanólico de *M. recutita* demonstrou a presença de atrofia da polpa branca em graus de intensidade leve e moderado, respectivamente. Notou-se a presença de congestão da polpa vermelha (sinusóides) em variados graus, indo de moderada até a ausência de congestão nos

animais testados com as frações hexânica, clorofórmica e acetanólica de ambos os extratos. Porém o aumento do número de blastos foi relevante apenas para os animais testados com a fração acetanólica de *C. sinensis* (Tabela 8 e figuras 19 a 20).

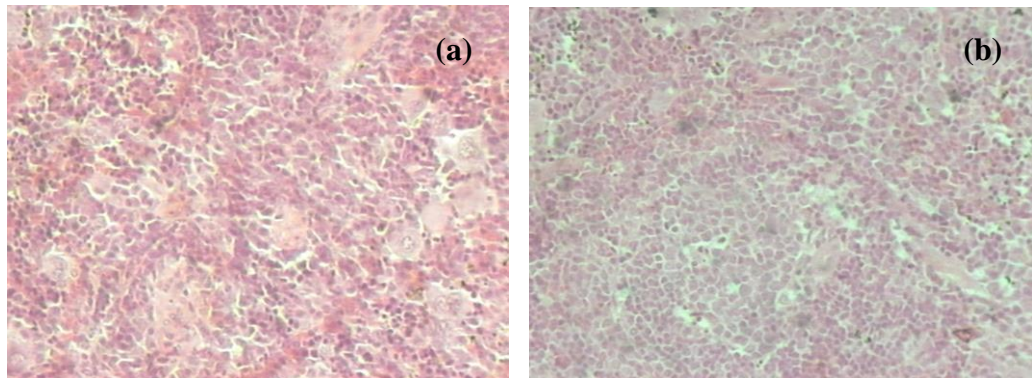
Tabela 8 – Avaliação dos cortes histológicos do baço dos animais inoculados com as frações dos extratos de *C. sinensis*, *Matricaria recutita* e grupo controle.

EXTRATOS TESTE		POLPA BRANCA	SINUSÓIDES	HEMATOPOESE
<i>C. sinensis</i>	Fr. Hexânica	Sem Atrofia	Congestão Leve	4-5 blastos
	Fr. Clorofórmica	Sem Atrofia	Congestão Leve	6-7 blastos
	Fr. Acetanólica	Sem Atrofia	Congestão Moderada	8-9 blastos
<i>M. recutita</i>	Fr. Hexânica	Leve atrofia dos folículos linfóides	Congestão Moderada	4-5 blastos
	Fr. Clorofórmica	Sem Atrofia	Congestão Leve	5-6 blastos
	Fr. Acetanólica	Moderada atrofia dos folículos linfóides	Congestão Moderada	4-5 blastos
Controle		Sem atrofia	Congestão Leve	4-5 blastos

Só foram consideradas frações com indícios de atividade esplenotóxica as frações que apresentaram congestão moderada dos sinusóides, devido as frações que apresentaram leve congestão mostrarem-se iguais ao controle.

Os indícios de esplenomegalia encontrados nos animais testados com as frações dos extratos em questão podem ser ocasionados por uma insuficiência hepática, que pode causar uma congestão da veia porta hepática ocasionando uma hipertensão portal. Este aumento da pressão pode causar um refluxo de sangue através da veia esplênica para o baço, promovendo seu aumento (Charmichael, 1994). A Figura 19 ilustra o corte histológico do baço de um camundongo que apresentou uma congestão moderada da polpa vermelha quando comparado ao grupo controle.

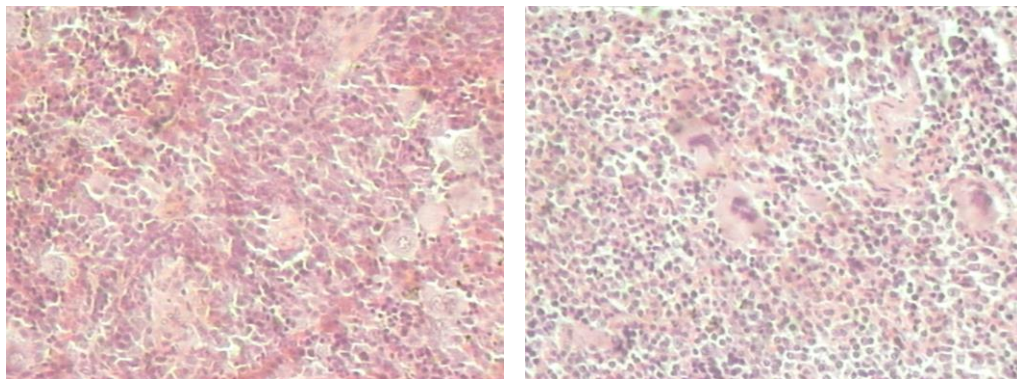
Figura 19 – Microfotografia do baço de um camundongo apresentando congestão moderada da polpa vermelha (a) em relação ao grupo controle(b).



Fonte: Autor, 2006.

Animais inoculados com a fração acetanólica de *C. sinensis* apresentaram um aumento do número de blastos variando de 8-9 blastos por campo de grande aumento, quando comparado com o grupo controle que apresentou um número de 4-5 blastos por campo (Figura 20), o que foi representativo de hematopoese do tecido.

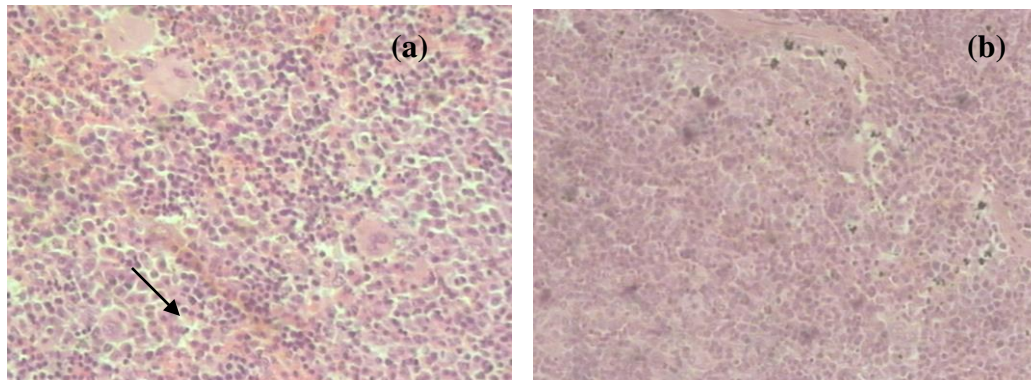
Figura 20 – Microfotografia do baço de um camundongo apresentando um aumento do número de blastos por campo de grande aumento (a) em relação ao grupo controle (b). As setas indicam os blastos presentes por campo



Fonte: Autor, 2006.

A microscopia dos cortes histológicos das amostras do baço dos animais inoculados com os extratos de *M. recutita* mostrou a presença de atrofia da polpa branca (fóliculos linfóides) em graus de intensidade moderado e leve (Figura 21).

Figura 21 – Microfotografia do baço de um camundongo apresentando atrofia moderada dos folículos linfóides (a) quando comparada com o grupo controle (b).



Fonte: Autor, 2006.

Notou-se a presença de congestão da polpa vermelha variando de moderada a leve. Com relação ao número de blastos não houve um aumento comparando-se com o grupo controle.

5.3 Atividade Antimicrobiana

Nos testes de atividade antimicrobiana foram utilizados os extratos etanólico e aquoso de *C. sinensis*, *M. recutita*, *F. vulgare L.* e *M.piperita*.

A fração aquosa de *C. sinensis* apresentou halos de inibição frente às linhagens de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*, com diâmetros de 20 mm, 10 mm, 10 mm e 14 mm respectivamente (Tabela 9).

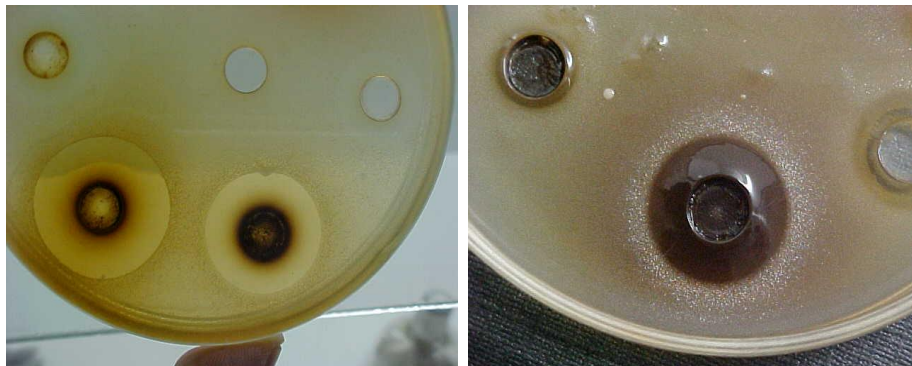
Tabela 9 – Leitura dos halos de inibição das frações aquosas dos extratos frente às linhagens microbianas.

AMOSTRAS	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa,</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans.</i>
<i>C. sinensis</i>	20(*)	10	10	14
<i>M. piperita</i>	--	--	--	--
<i>M. recutita</i>	--	--	--	--
<i>Foeniculum vulgare, L.</i>	--	--	--	--

(*) Medida do Halo de Inibição em mm.

De acordo com a leitura dos halos de inibição, as frações EtOH/H₂O de *C. sinensis* apresentaram halos de inibição de 15 mm, 12 mm, 14 mm e 30 mm, para cepas de *S. aureus* (BAC 97), *P. aeruginosa* (BAC 135), *E. coli* (Bac 148) e *C. albicans* (FUN 03) respectivamente. Os halos de inibição apresentados pelos extratos de *C. sinensis* são representados na figura 22.

Figura 22 – Halos de inibição apresentados pelos extratos de *C. sinensis* frente às cepas microbianas testadas.



Fonte: Autor, 2006.

A fração EtOH/H₂O de *M. piperita* obteve halos de inibição da ordem de 16 mm e 18 mm para as cepas de *S. aureus* (BAC 97 e BAC 25), respectivamente. Para a *M. recutita* foram observados halos de 15 mm e 18 mm para as mesmas cepas de *S. aureus*, assim como a fração EtOH/H₂O de *F. vulgare L.* (Tabela 10).

Tabela 10. Leitura dos halos de inibição das frações EtOH/H₂O dos extratos frente às linhagens microbianas

CEPAS UTILIZADAS	<i>C. sinensis</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. recutita</i>	<i>F. vulgare, L.</i>
<i>S. aureus</i>	--	18	18	14
<i>S. aureus</i>	15 (*)	16	15	16
<i>P. aeruginosa</i>	--	--	--	--
<i>P. aeruginosa</i>	12	--	--	--
<i>E. coli</i>	14	--	--	--
<i>E. coli</i>	--	--	--	--
<i>C. albicans</i>	30	--	--	--
<i>C. albicans</i>	--	--	--	--
<i>C. krusei</i>	--	--	--	--
<i>C. tropicalis</i>	--	--	--	--
<i>C. guilliermondii</i>	--	--	--	--

(*) Medida do Halo de Inibição em mm.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 10, observou-se atividade do chá de *C. sinensis* frente a linhagens de bactérias e fungos. A literatura cita a atividade bacteriana, mas de forma muito dispersa e não há indicação de atividade antifúngica na literatura (Yam *et al*, 1997). Considerando-se os resultados da atividade antifúngica, foram testadas as frações dos extratos etanólicos de *C. sinensis* e de *M. recutita* frente a linhagens bacterianas e fúngicas para se determinar a fração com possível atividade. Os resultados obtidos foram dispostos na tabela 11.

Tabela 11 – Leitura dos halos de inibição das frações EtOH/H₂O dos extratos frente às linhagens microbianas

CEPAS UTILIZADAS	<i>C. sinensis</i>			<i>M. recutita</i>		
	Fração hexânica	Fração clorofórmica	Fração acetato de etila	Fração hexânica	Fração clorofórmica	Fração acetato de etila
<i>E. faecalis</i>	—	—	—	—	—	X(**)
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	X
<i>Salmonella sp.</i>	—	18(*)	—	—	—	X
<i>L. pneumoniae</i>	—	15	—	—	—	X
<i>S. aureus</i>	—	14	—	—	—	X
<i>K. pneumoniae</i>	—	12	—	—	—	X
<i>E. coli</i>	—	12	—	—	—	X
<i>P. mirabilis</i>	—	14	—	—	—	X
<i>S. aureus</i>	—	16	—	—	—	X
<i>P. aeruginosa</i>	—	12	—	—	—	X
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	X
<i>S. marcescens</i>	—	—	—	—	—	X
<i>C. albicans</i>	—	08	—	—	—	X
<i>C. krusei</i>	12	16	—	—	—	X
<i>C. tropicalis</i>	—	18	—	—	—	X
<i>C. guilliermondii</i>	—	—	—	—	—	X
<i>C. albicans</i>	—	25	—	—	—	X

(*) Medida do Halo de Inibição em mm.

(**) Extratos não testados

Segundo Nicoletti (2002), a utilização frequente de antifúngicos na terapêutica médica vem tornando ineficiente o tratamento das micoses, proporcionando maior resistência dos fungos e dificultando sua eliminação. Portanto, pode-se ressaltar nos resultados a boa atividade antifúngica associada à fração clorofórmica de *C. sinensis* frente a cepas de *C. albicans* (FUNs –13 e 49), *C. krusei* (FUN 17) e *C. tropicalis* (FUN 24).

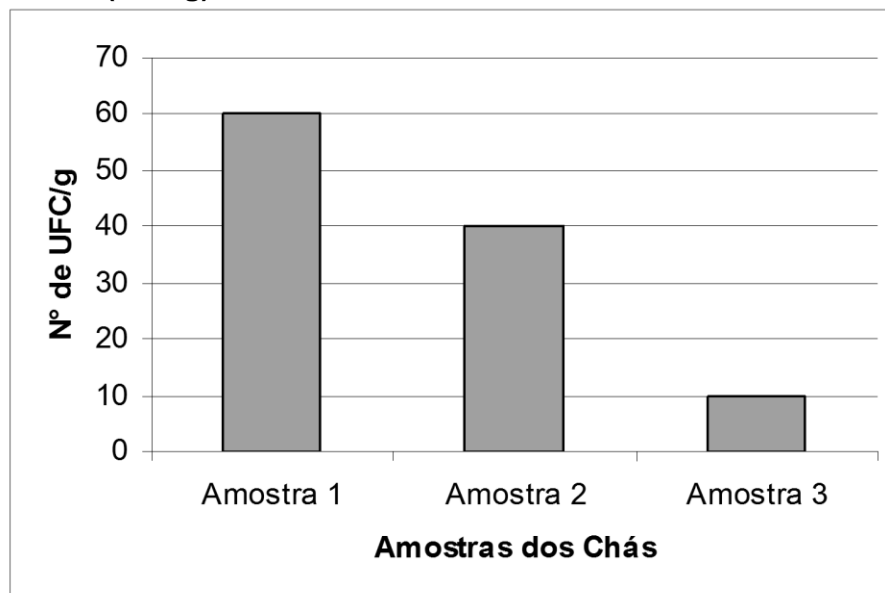
5.4 Resultado do Perfil Microbiológico

A legislação vigente (Resolução – RDC Nº 12 - BRASIL, 2001) estabelece um valor de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) para chá e produtos similares, obtidos por processamento térmico (torração e processos similares), consumidos após tratamento térmico (Infusão e decocção), com ou sem adição de açúcar e outros ingredientes de 10^3 a 45°C UFC/g.

Siqueira (1995), afirma que os coliformes diferenciam-se em coliformes totais e coliformes fecais, onde o índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpeza e sanificação deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento e estocagem.

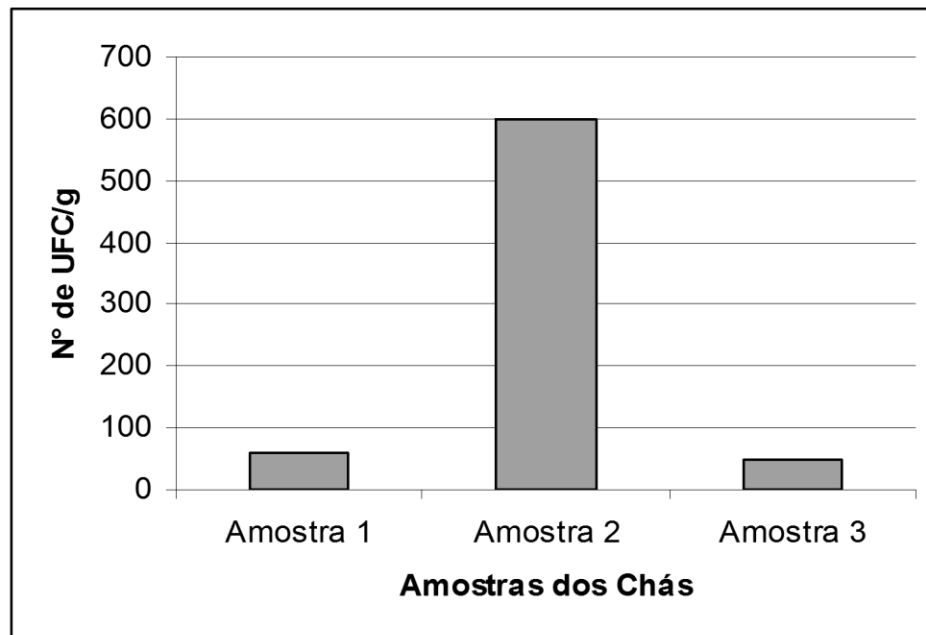
De acordo com as análises microbiológicas realizadas ficou comprovada a presença de coliformes totais nas amostras estudadas, porém dentro dos limites estabelecidos pela Resolução – RDC Nº 12 - BRASIL, 2001, onde achamos valores que variaram entre 60 ufc/g a 600 ufc/g nos extratos fitoterápicos (Figuras 23-26).

Figura 23 – Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Camelia sinensis*.



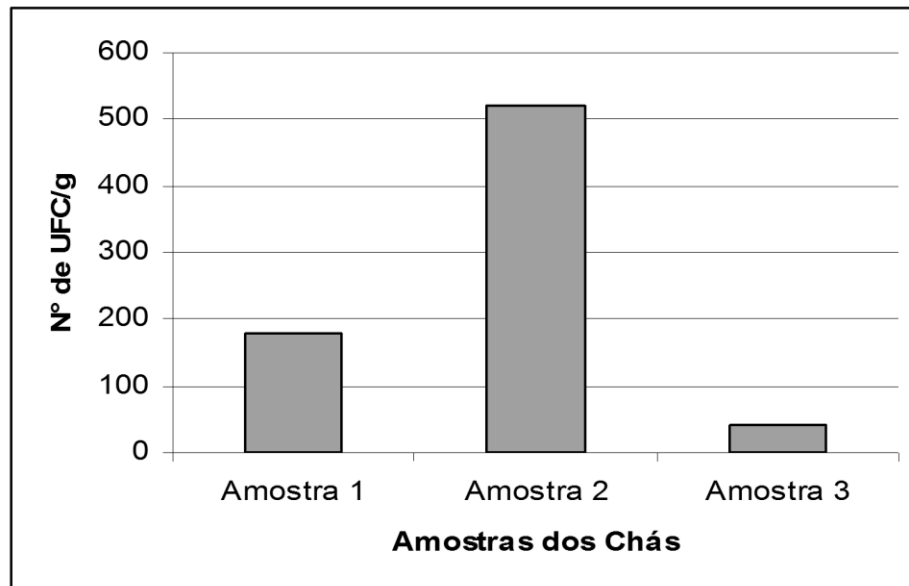
Fonte: Autor, 2006.

Figura 24 – Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Matricaria recutita*.



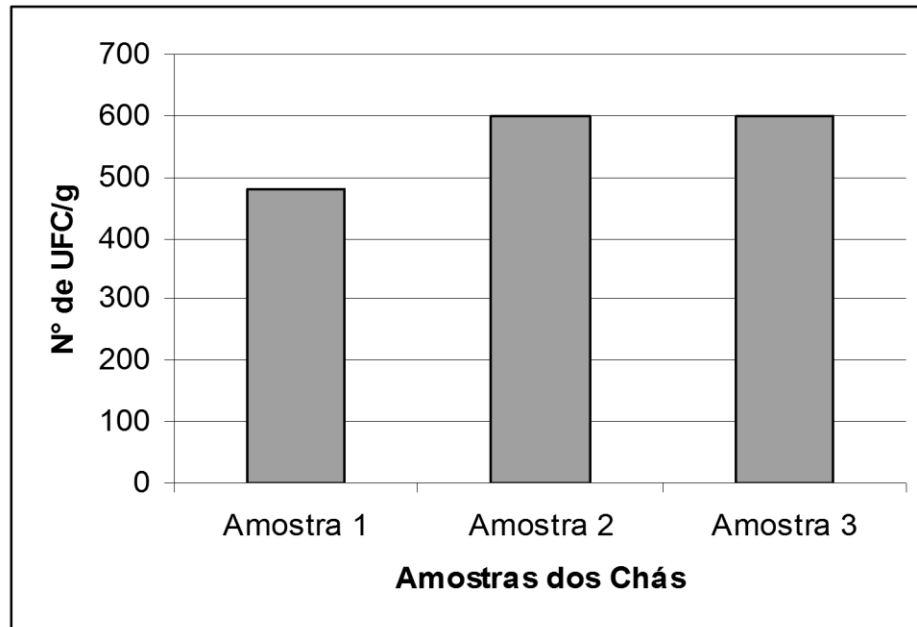
Fonte: Autor, 2006.

Figura 25 – Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Foeniculum vulgare L.*



Fonte: Autor, 2006.

Figura 26 – Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) das amostras dos chás de *Mentha piperita*



Fonte: Autor, 2006.

Os extratos de *C. sinensis* e *M. recutita* apresentaram um menor grau de contaminação, com 60 ufc/g, em cada amostra, excetuando-se a Amostra 2 de *M. recutita* que apresentou aproximadamente 600 Unidades Formadoras de Colônias. O extrato de *F. vulgare L.* apresentou amostras contendo perfis microbiológicos variados, apresentando valores de 60 a 520 UFC/g dependendo da amostra. Os maiores índices de Unidades Formadoras de Colônias por grama foram encontrados nos extratos de *Mentha piperita* apresentando todos cerca de 600 UFC/g, porém não ultrapassando o nível máximo estabelecido de acordo com a Resolução – RDC Nº 12 - BRASIL, 2001.

A prática da fitoterapia segura encontra uma série de dificuldades, que vão, desde a identificação correta do material botânico utilizado, à inexistência de estudos de segurança, eficácia e qualidade de grande parte das plantas. A qualidade implica controle e nele estão envolvidos experimentos nos quais se insere o controle microbiológico, cujo principal objetivo é analisar a contaminação por microrganismos (Brandão *et al.*, 1998; Bugno *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 1995).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos para os testes de atividade antibacteriana os extratos etanólicos de Camomila (*Matricaria recutita*), Erva Doce (*Foeniculum vulgare*, L.), Hortelã (*Mentha piperita*) apresentam um bom perfil de atividade diante de algumas cepas de bactérias Gram positivas, enquanto que tanto os extratos etanólico como aquoso de Chá Preto (*Camelia sinensis*) apresentam boa atividade frente a cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, além de a fração clorofórmica de *C. sinensis* apresentar boa atividade contra algumas espécies do gênero *Candida* spp.

De acordo com o perfil microbiológico foi observada contaminação apresentando uma grande quantidade de Unidades Formadoras de colônias por grama apresentada pelas amostras de *F. vulgare* e *M. piperita*., porém esta se encontra dentro dos padrões estabelecidos.

Quanto à toxicidade aguda apresentada pelos extratos testados pode-se observar que o uso contínuo dos chás de *C. sinensis* e de *M. recutita* pode provocar problemas de fígado e baço, pois os extratos destes chás apresentaram uma relevante atividade esplenotóxica e hepatotóxica, o que vem confirmar a necessidade de mais estudos a cerca dos extratos fitoterápicos comercializados e utilizados freqüentemente pela população sem indicação médica.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, P. J.; Comfrey: assessing the low-cost health risk.; **Medicine Journal Aust.**, v. 149, p.678-682, 1988.
- AHMAD, N.; FEYES, D.K.; NIEMINEN, A.-L.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H.; **Journal of the National Cancer Institute.** v. 89, p. 1881–1886, 1997.
- AHMAD, N.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H.; **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 376 (2), p. 338–346, 2000.
- AHMAD, I.; BEG, A.Z.; Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 74(2):1, p. 13-23, 2001.
- AKGÜL, A.; BAYRAK, A.; Comparative volatile oil of various parts from Turkish bitter fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). **Food Chemistry.** v. 30, p. 319–323, 1988.
- AMIRGHOFRAN, Z.; AZADBAKHT, M.; KARIMI, M.H.; Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 72, p. 167– 172, 2000.
- AMMON, H.P.T.; SABIERAJ, J.; KAUL, R.; Kamille — Mechanismus der antiphlogistischen Wirkung von Kamillenextrakten und Inhaltsstoffen. **Deutsche Apotheker-Zeitung.** v. 136, p. 1821– 1834, 1996.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Resolução – CNNPA, Nº12,** Gerência Geral de Alimentos, 1978.
- ARAKAWA, T.; ISHIKAWAhyg, Y.;USHIDA, K.; Volatile sulfur production by pig cecal bacteria in batch culture and screening inhibitors of sulfate reducing bacteria. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology.** v. 46, p. 193–198, 2000.
- ATTA-ALY, M. A.; Fennel swollen base yield and quality as affected by variety and source nitrogen fertilizer. **Scientific Horticulture,** v. 88, p. 191–202, 2001.
- AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUIA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M.; Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemical Pharmacology.** v. 59, p. 1387–1394, 2000.
- BAKERINK, J.A.; GOSPE JR, S.M.; DIMAND, R.J.; ELDRIDGE, M.W.; Multiple organ failure after ingestion of pennyroyal oil from herbal tea in two infants. **Pediatrics.** v. 98, p. 944-947, 1996.
- BARRETT, B.; KIEFER, D.; RABAGO, D.; Assessing the risks and benefits of herbal medicine: An overview of scientific evidence. **Alternative Therapies In Health And Medicine.** v. 5, p. 40-49, 1999.

BASER, K.H.C.; Essential oils of *Anatolian labiatae*: a profile. **Acta Horticulturae**. v. 333, p. 217–238, 1993.

BAYTOP, T.; Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present) (1st ed.). **Publication of Istanbul University**, p. 320, Istanbul, Turkey, 1999.

BETTS, T.J.; Possible value for the gas chromatographic analysis of essential oils of some unusual phase commercial capillaries. **Journal of Chromatography**. v. 626, p. 294–300, 1992.

BILIA, A.R.; FUMAROLA, M.; GALLORI, S.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F.; Identification by HPLC-DAD and HPLC-MS analyses and quantification of constituents of Fennel teas and decoctions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p. 4734–4738, 2000.

BLOT, W.J.; McLAUGHLIN, J.K.; CHOW W.H.; Cancer rates among drinkers of black tea. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 37, p. 739-760, 1997.

BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N.; SOARES, C.D.V.; Vigilância de fitoterápicos de Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Caderno Saúde Pública**. v. 14, p. 613-616, 1998.

BRASIL, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária** Portaria nº 19/92 de 30.1.92 Diário Oficial da União, v. 197, seção I, 3.2.1992.

BRASIL, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária** Portaria nº 6/95 de 31.1.95 Diário Oficial da União, v. 200, seção I, p 1523-1524, 6.2.1995.

BRASILEIRO FILHO, G.; **Patologia Geral – Bogliolo**. Editora Guanabara Koogan S.A., 2ª Edição, Belo Horizonte, 1998.

BRENDER, T.; GRUENWALD, J.; JAENICKE, C.; Herbal Remedies. **Phytopharm Consulting Institute for Phytopharmaceuticals**, second ed., Schaper & Brümmer GmbH & Co., Salzgitter, Berlin, Germany, 1997.

BROWN, S.; Guia Prático: Cozinha Vegetariana. **Ed. Civilização**, 1991.

BUGNO, A.; MATOS, D.; PINTO, T.J.A.; Contaminação fúngica em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, supl.1, p. 87, 2002.

CAPASSO R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCOB, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N.; Phytotherapy and quality of herbalmedicines. **Fitoterapia**. v. 71, p. S58-S65, 2000.

CAPOBIANCO, D.J.; BRAZIS, P.W.; FOX, T.P.; Proximal-muscle weakness induced by herbs. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1430, 1993.

CARMICHAEL, W.W.;The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**. v. 270, p. 78-86, 1994.

CAVALEIRO, C.M.F.; ROQUE, O.L.; PROENCA, D.A.; CUNHA, A.; Contribution for the characterization of Portuguese fennel chemotypes. **Journal of Essential Oil Research**. v. 5, p. 223–225, 1993.

Communication from the Spanish Pharmacovigilance System, **Spanish Medicines Agency Press Release**, 7 Apr 2003.

DAS, M.; VEDASIROMOM, J.R.; CHAUHAN S.P.S.; GANGULY, D.K.; Effect of the hot-water extract of black tea (*Camellia sinensis*) on the rat diaphragm. **Planta Médica**. v. 60, p. 470-471, 1994.

DEANS, S.G.; WATERMAN, P.G.; Biological activity of volatile oils. In: **Hay, R.K.M., Waterman, P.G. (Eds.)**, Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. Logman, Harlow, p. 97 –111, 1993.

DEW, M.J.; EVANS, B.K.; RHODES, J.; Peppermint oil for the irritable bowel syndrome: a multicenter trial. **British Journal of General Practice**. v. 38, p. 394–398, 1984.

DREW, W.L.; BARRY, A.L.; O'TOOLE, R.; SHERRIS, J.C.; Reability of the Kirby-Bauer Disc Difusion for Detecting Methicillin-Resitante Strains of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v. 24, N°2, p. 240-247, 1972.

EVANS, W. C.; **Trease and Evans' pharmacognosy**. 14.ed. London: Saunders, 1996.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R.; **Manual de medicina alternativa para o profissional**. RJ: Guanabara Koogan, p. 158-60, 2000.

FIDLER, P.; LOPRINZI, C.L.; O'FALLON, J.R.; LEITCH, J.M.; LEE, J.K.; HAYES, D.L.; NOVOTNY, P.; CLEMENS-SCHUTJER, D.; BARTEL, J.; MICHALAK, J.C.; Prospective evaluation of a chamomile mouthwash for prevention of 5-FU-induced oralmucositis. **Cancer**. v. 77, p. 522–525, 1996.

FOSSATI, C.; FANZIO, G.; Undesirable and toxic side effects of medicinal plants. **La Clinica Terapeutica**. v. 112, p. 249, 1985.

FOSTER, S.; TYLER, V.E.; Tyler's Honest Herbal. **Haworth Press**, New York, 1999.

GOMAA, A.; HASHEM, T.; MOHAMED, M.; ASHRY, E.; Matricaria chamomilla extract both inhibits development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 92, p. 50–55, 2003.

GOMES, A.; VEDASIROMONI, J.R.; DAS, M.; SHARMA, R.M.; GANGULY, D.K.; Anti-hyperglycemic effect of black tea (*Camellia sinensis*) in rat. **Journal Ethnopharmacol**. v. 45, p. 223-226, 1995.

GÖBEL, H.; SCHMIDT, G.; DWOSHAK, M.; Essential plant oils and headache mechanisms. **Phytomedicine**. v. 2, p. 93–102, 1995.

GROSVENOR, P.W.; GOTHARD, P.K.; MCWILLIAM, N.C.; SUPRIONO, A.; GRAY, D.O.; Medicinal plants from Riau province, Sumatra, Indonesia. Part 1: Uses. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 45(2), p. 75-95, 1995.

GUILLED, M. D.; MANZANONS, M.J.; A study of several parts the plant *Foeniculum vulgare* as a source of compounds with industrial interests. **Food Research International**. v. 29, p. 85–88, 1996.

HAMILTON-MILLER, J.M.T.; Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, p. 2375-2377, 1995.

HANNIG, H.-J.; Qualitätsforderungen an Kamille aus deutschem Anbau. **Drogenreport**. v. 10, p. 48–51, 1997.

HAÑSEL, R.; STICHER, O.; Pharmakognosie, **Phytopharmazie**. Springer Verlag, Heidelberg, 2004.

HECK, A.M.; DEWITT, B.A.; LUKES A.L.; Potential interactions between alternative therapies and warfarin. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 57, p. 1221– 1227, 2000.

HENDRIKS, H.; Pharmaceutical aspects of some *Mentha* herbs and their essential oils. **Perfume Flavor**. v. 23, p. 15-23, 1998.

HIGDON, J.V.; FREI, B.; Tea catechias and polyphenols : health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 43 (1), p. 89– 143, 2003.

HILLS, J.M.; AAROSON, P.I.; The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. **Gastroenterology**. v. 101, p. 55-65, 1992.

HIRONO, I.; MORI, H.; HAGA, M.; Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*.; **Journal of the National Cancer Institute**. v. 61, p. 865-869, 1978.

INOUE, T.; SUGIMOTO, Y.; MASUDA, H.; Effect of peppermint (*Mentha piperita* L.) extracts on experimental allergic rhinitis in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 24, p. 92–95, 2001.

JAHROMI, B.N.; TARTIFIZADEH, A.; KHABNADIDEH,S.; Comparison of fennel and mefenamic acid for the treatment of primary dysmenorrheal. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**. v. 80, p. 153, 2003.

JORNAL DA UNICAMP; **Plantas que fazem mal**; Campinas, ANOXV N. 163; Junho de 2001.

JUERGENS, U.R.; STOBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; Antiinflammatory effects of eucalyptol (1.8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in

human blood monocytes ex vivo. **European Journal of Medical Research.** v. 3, p. 407–412, 1998.

KAPLOWITZ, N.; Hepatotoxicity of herbal remedies: insights into the intricacies of plant-animal warfare and cell death. **Gastroenterology.** v. 113(4), p. 1408-12, 1997.

KATSIOTIS, S.T.; Study of different parameters influencing the composition of hydrodistilled sweet fennel oil. **Flavour and Fragrance Journal.** v. 4, p. 221–224, 1988.

KELSEY, R.G.; REYNOLDS, G. W.; RODRIGUES, E.; The biologically active constituents secreted and stored in plant glandular hairs. In: Rodrigues, E.R., Healey, P.L., Mehta, I. (Eds), **Biology and Chemistry of Plant Trichomes.** Plenum Press, New York, pp. 187-244, 1984.

KUHN, M. A.; WINSTON, D.; Herbal therapy & supplements – a scientific and traditional approach. **Philadelphia: Lippincott,** p. 89-92, 2000.

KUNDU, J.K.; NA, H.K.; CHUN, K.S.; KIM, Y.K.; LEE, S.J.; LEE, S.S.; LEE, O.S.; SIM, Y.C.; SURH, Y.J.; Inhibition of Phorbol Ester–Induced COX-2 Expression by Epigallocatechin Gallate in Mouse Skin and Cultured Human Mammary Epithelial Cells^{1,2}. **Journal of Nutrition.** v. 133 (11, Suppl. 1), p. 3805S–3810S, 2003.

LARREY, D.J.; **Hepatology.** v. 26, p. 47, 1997.

LAWRENCE, B. M.; Progress in essential oils. **Perfume and Flavor.** v. 14, p. 47–49, 1989.

LEE, K.G.; SHIBAMOTO, T.; Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 50, p. 4947– 4952, 2002.

LEICESTER, R.J.; HUNT, R.H.; Peppermint oil to reduce colonic spasm during endoscopy. **Lancet.** v. 2, p. 989–990, 1982.

LIU, J-H.; CHEN, G-H.; YEH, H-Z.; Enteric-coated peppermint- oil capsules in the treatment of irritable bowel syndrome: a prospective, randomized trial. **J. Gastroenterology.** v. 32, p. 765–768, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. **Nova Odessa: Plantarump.** p. 148-9, 2002.

MAHASNEH, A.M.; EL-OQLAH, A.A.; Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 64(3), p. 271-6, 1999.

MAITY, S.; VEDASIROMONI, J.R.; GANGULY, D.K.; Anti-ulcer effect of the hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Ethnopharmacol.** v. 46, p. 167-174, 1995.

MAITY, S.; VEDASIROMONI, J.R.; GANGULY, D.K.; Role of glutathione in the antiulcer effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 78, p. 285-292, 1998.

MALIAKAL, P.P.; WANWIMOLRUK S.; Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 53(10), p. 1323-9, 2001.

MALINI, T.; VANITHAKUMARI, G.; MEGALA, N.; ANUSYA, S.; DEVI, K.; ELANGO, V.; Effect of *Foeniculum vulgare* Mill. seed extract on the genital organs of male and female rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 29(1), p. 21-6, 1985.

MAROTTI, M.; DELLACECCA, V.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E.; PALEVITCH, D.; SIMON, J.E.; Agronomic and chemical of tree varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. **Acta Horticulture**. v. 331, p. 63–69, 1993.

MARTINEZ, M.J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZALEZ, N.; JAUREGUI, A.; Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52(3), p. 171-4, 1996.

MATOS, F.J.A.; **Introdução à Fitoquímica Experimental**: UFC, 1994.

MAY, B.; KUNTZ, H.D.; KIESER, M.; KOHLER, S.; Efficacy of a fixed peppermint/caraway oil combination in non-ulcer dyspepsia. **Arzneimittel-Forschung Drug Res**. v. 46, p. 1149–1153, 1996.

MILLER, L.G.; Herbal medicinals: Selected clinical considerations focusing on known or potential drug– herb interactions. **Archives of Internal Medicine**. v. 158, p. 2200-2211, 1998.

MILLIN, D. J.; CRISPIN, D. J.; AND SWAINE, D.J.: Amadori Compounds as Nonvolatile Flavor Precursors in Processed Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 17, p. 717, 1969.

MKATOH; SAITO, D.; NODA, T.; HFUKUDA; KWAKABAYSHI; TSUGIMURA; TERADA, M.; Intl Symp H. *pyZori* and its diseases (abstract). **Apri**. v. 1, p. S- 19, Tokyo, Japan, 1994.

MODDER, W.W.D.; AMARAKOON, A.M.T.; Tea and Health. **Tea Research Institute of Sri Lanka**, 2002.

MORRIS, J. A.; KHETTRY, A.; SEITZ, E.W.; Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 56, p. 595-599, 1979.

MUCKENSTURM, B.; FOECHTERLEN, D.; REDURON, J. P.; DANTON, P.; HILDENBRAND, M.; Pythochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*. **Biochemical Systematic and Ecology**. v. 25, p. 353–358, 1997.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M.L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X.; Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53(3), p. 143-7, 1996.

NESS, J.; SHERMAN, F.T.; PAN, C.X.; Alternative medicine: What the data say about common herpal therapies. **Geriatrics**. v. 54, p. 33-43, 1999.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D.; Plantas medicinais – guia para profissional de saúde. São Paulo: **Premier**, p. 59-63, 2002.

NICOLETTI, M.A.; Fitoterapia: *Circuma zedoaria* (CHRISTM) roscoe, uma possibilidade terapêutica como antifúngico de uso tópico. **Informa**, v.14, nº 9 e 10, 2002.

NIMRI, L.F.; MEQDAM, M.M.; ALKOFABI, A.; Antibacterial Activity of Jordanian Medicinal Plants. **Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)**. v. 37, Number 3, p. 196-201(6), 1999.

NELSON, S.D.; Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. **Drug Metabolism Reviews**. v. 27, p. 147-177, 1995.

PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M.; Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. **Flavor and Fragrance Journal**. v. 8, p. 115–122, 1993.

PITTLER, M.H.; ERNST, E.; Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. **American Journal of Gastroenterology**. v. 93, p. 1131–1135, 1998.

PUELO, M.A.; Fennel and anise as estrogenic agent. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 2, p. 337–344, 1980.

REES, W.; EVANS, B.; RHODES, J.; Treating irritable bowel syndrome with peppermint oil. **British Medical Journal**. v. 2, p. 835–836, 1979.

REKKA, E.A.; KOUROUNAKIS, A.P.; KOUROUNAKIS, P.N.; Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical processes. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**. v. 92, p. 361–364, 1996.

Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001

ROBBERS, J.E.; TYLER, V.E.; Tyler's Herbs of Choice. **Haworth Press**, New York, 2000.

ROBERTS, E.A.H.; The Phenolic Substances of Manufactured Tea IV. Enzymic Oxidation of Individual Substrates. **Journal of The Science of Food and Agriculture**. v. 9, p. 381, 1959.

ROTBLETT, M.; ZIMENT, I.; Evidence-based herbal medicine. Philadelphia: **Hanley & Belfus**, p. 119-23, 2002.

RUIZ DEL CASTILLO, M.L., FLORES, G., HERRAIZ, M., BLANCH, G.P.; Solid-Phase Microextraction for Studies on the Enantiomeric Composition of Filbertone in Hazelnut Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 2496-2500, 2003.

SANDERSON, G.W.; Recent Advances in phytochemistry, Vol5, eds. **V. C. Runeckles and T. C. Tso, Academic Press**, New York, p. 247-316, 1972.

SANTOS, P.R.V.; OLIVEIRA, A.C.X.; TOMASSINI, T.C.B.; Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Revista de Farmácia e Bioquímica**. Univ.São Paulo, v. 31, p. 35-38, 1995.

SARBHOY, A.K.; VARSHNEY, J.L.; MAHESHWARI, M.L.; SAXENA, D.B.; Efficacy of some essential oils and their constituents on few ubiquitous molds. **Zentralbl Bacteriol Naturwiss**. v. 133, p. 723–725, 1978.

SCHILCHER, H.; DIE KAMILLE, W.V.G.; STUTTGART; FRANKE, R.; Qualitätssicherung bei Arznei- und Gewürzpflanzen durch deutschen Anbau. **Drogenreport**. v. 10, p. 55–61, 1997.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E.; Rational Phytotherapy: A Physicians' Guide to Herbal Medicine. Berlin, Germany, **Springer Verlag**, 1998.

SHAW, D.; LEON, C.; KOLEV, S.; MURRAY, V.; Traditional remedies and food supplements. A 5-year toxicological study (1991-1995). **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**. v. 17(5), p. 342 -56, 1997.

SILVA, O.; DUARTE, A.; CABRITA, J.; PIMENTEL, M.; DINIZ, A.; GOMES, E.; Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 50(1), p. 55-9, 1996.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Editora Universidade - UFRGS / Editora da UFSC, 4ª Edição; Porto Alegre, 2002.

SIQUEIRA, R. S.; Manual de Microbiologia dos Alimentos. EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos**. Rio de Janeiro, p. 73-130. 1995.

STARBURCK, J.; Herbs for sleep and relaxation. **Men's Health**. v. 16, p. 24–26, 2001.

STUART, M.; **Herbs and herbalism** (pp. 62–64). New York: Van Nostrand Reinhold, 1982.

SUBIZA, J.; SUBIZA, J.L.; HINOJOSA, M.; GARCIA, R.; JEREZ, M.; VALDIVIESO, R.; SUBIZA, E.; Anaphylactic reaction after ingestion of chamomile tea: a study of cross-reactivity with other composite pollens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 84, p. 353–358, 1989.

TAKEUCHI, S.; TAMAOKI, L.; KONDO, M.; KONNO, K.; Effect of menthol on cytosolic Ca^{2+} levels in canine airway epithelium in culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 202, p. 1333-1338, 1994.

TASSOU, C.C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.; Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella* enteritis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 78, p. 593–600, 1995.

TAYLOR, B.A.; DUTHIE, H.L.; LUSCOMBE, D.K.; Calcium antagonist activity of menthol on gastrointestinal smooth muscle. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 20, p. 293-294, 1985.

VERGHESE, J.; Fennel. **Indian Cocoa Arecanut Species Journal**. v. 12, p. 39–43, 1988.

VOLA'K, J.; STODOLA, J.; **The illustrated book of herbs**. London: Caxton Editions, 1998.

YAM, T.S.; SAROJ SHAH, J.M.T.; HAMILTON-MILLER; Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. **Department of Medical Microbiology**, Royal Free Hospital School of Medicine, London NW3 2QG, UK Received 4 January 1997; accepted 23 April 1997.

YAYLAYAN, V. A.; Flavour technology: Recent trends and future perspectives. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. v. 24, p. 2–5, 1991.

YEONG M.L.; CLARK S.P.; WARING J.M.; WILSON R.D.; WAKEFIELD S.J.; The effects of comfrey derived pyrrolizidine alkaloids on rat liver. **Pathology**. v. 23, p. 35-38, 1991.

YEONG M.L.; WAKEFIELD S.J.; FORD H.C.; Hepatocyte membrane injury and bled formation following low dose comfrey toxicity in rats.; **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 74, p. 211-217, 1993.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; NAKAGAWA, T.; KASHIWAGI, H.; NAKAGAWA, H.; TAKEUCHI, S.; CHUNG, H.Y.; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46 (6), p. 2143–2150, 1998.

WEIZMAN, Z.; ALKRINAWI, S.; GOLDFARB, D.; BITRAN, C.; Efficacy of herbal tea preparation in infantile colic. **Journal of Pediatrics**. v. 122, p. 650–652, 1993.

WESTPHAL, J.; HORNING, M.; LEONHARDT, K.; Phytotherapy in functional abdominal complaints: results of a clinical study with a preparation of several plants. **Phytomedicine**. v. 2, p. 285–291, 1996.

WICHTL, M.; **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals**. Boca Raton, FL, CRC Press, p 336–338, 1994.

WINSLOW, L.C.; KROLL, D.; Herbs as medicines. **Archives of Internal Medicine**. v. 158, p. 2192-2199, 1998.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M.; Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**. v. 71, p. S117–S123, 2000.

Sites acessados:

MAZZA, G. *Camellia sinensis*. Disponível em <http://www.photomazza.com/?Camellia-sinensis>. Acesso em 18/05/2005.

Brace, S. Chá de camomila contra o diabetes. Disponível em: <http://www.ruadireita.com/alimentacao/info/cha-de-camomila-contra-o-diabetes/>. Acesso em: 18/12/2005.

The Free Chemical Database. Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em 05/05/2006.

SHONFELDER, P. Botanik für Pharmazeuten. Disponível em: <http://www.pharmakobotanik.de/schfld/Foenvul.jpg>. Acesso em 18/12/2005.

SHONFELDER, P. Botanik für Pharmazeuten. Disponível em: <http://www.pharmakobotanik.de/schfld/Foenvul.jpg>. Acesso em 18/12/2005.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Marcas, lotes e datas de validade dos chás de *C. sinensis*, *F. vulgare*, *M. piperita* e *M. recutita* utilizados nos testes.

1. *Camelia sinensis*

- **Marca:** Leão
- **Lote:** D323
- **Validade:** 19/11/06

- **Marca:** Maratá
- **Lote:** 271JZ
- **Validade:** 28/09/2007

- **Marca:** Real
- **Lote:** 09/05-26
- **Validade:** 26/09/2007

2. *Matricaria recutita*

- **Marca:** Leão
- **Lote:** A146
- **Validade:** 25/11/2005

- **Marca:** Vemat
- **Lote:** 543
- **Validade:** 07/11/2007

- **Marca:** Castelari