LETICIA AUDA SCISLOWSKI

AUSÊNCIA DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE *Thevetia peruviana* SOBRE MICRORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL

GUARAPUAVA
2019

LETICIA AUDA SCISLOWSKI

AUSÊNCIA DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE *Thevetia peruviana* SOBRE MICRORGANISMOS DAMICROBIOTA INTESTINAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Avaliadora, como critério para obtenção do grau de bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Profª.Ms.Rubia Dos Santos Bonapaz.

GUARAPUAVA
2019

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURA **PÁG.**

1 Placas de antibiograma da bactéria *Staphylococcus aureus* contendo respectivamente controle positivo, controle negativo e discos das extrações B, C e D..... 11

2 Placas de antibiograma da bactéria *Escherichia coli* contendo respectivamente controle positivo, controle negativo e discos das extrações B, C e D..... 11

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ºC	Graus Celsius
µL	Microlitro
µg	Microgramas
C. albicans	*Candida albicans*
CH Cl	Diclorometano
E. coli	*Escherichia coli*
H	Hora
K. pneumoniee	*Klebsiella pneumoniae*
L. bifidum	*Lactobacillus bifidum*
L. casei	*Lactobacillus casei*
mL	Mililitros
mm	Milímetros
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. pyogenes	*Streptococcus pyogenes*
S. typhi	*Salmonella typhi*
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
T. peruviana	*Thevetia peruviana*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 6
2.MATERIAL E MÉTODOS 7
2.1 MATERIAL VEGETAL 7
2.2 EXTRAÇÃO 7
2.3 MICRORGANISMOS 8
2.4 CULTURA EM ÁGAR M.R.S 9
2.6 ANTIBIOGRAMA 9
3. RESULTADOS 10
4. DISCUSSÃO 11
CONCLUSÃO 13
REFERÊNCIAS 14

AUSÊNCIA DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE *Thevetia peruviana* SOBRE MICRORGANISMOS DA MICROBIOTA INTESTINAL

SCISLOWSKI, LETICIA AUDA[1] (Campo Real)
BONAPAZ, RUBIA DOS SANTOS[2] (Campo Real)

RESUMO

A *Thevetia peruviana* é uma planta muito utilizada para o emagrecimento, porém, esta é altamente tóxica por conta de seus glicosídeos que podem ocasionar diversas manifestações cardiovasculares, neurológicas e gastrointestinais, devido à ação gastrointestinal das sementes desta planta é popularmente utilizada para a perda de peso. No intuito de avaliar os efeitos intestinais que podem ser ocasionados pela ação antibacteriana desta planta sobre a microbiota intestinal humana, foram utilizadas sementes de *Thevetia* para o teste de inibição de crescimento de bactérias patogênicas e probióticas presentes na microbiota humana. Estas sementes foram submetidas a quatro metodologias de extração semelhantes, após isto foi utilizado o método de antibiograma para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos, sendo que estes não apresentaram ação sobre as bactérias testadas. Conclui-se que a metodologia utilizada para a extração não se apresentou satisfatória para esse tipo de semente, pois outras bibliografias apresentaram resultados de inibição a partir de outra metodologia.

Palavras-chave: Antibiótico. Microbiota. Toxicidade.

ABSTRACT

Thevetia peruviana is a plant widely used for weight loss, but it is highly toxic because of its glycosides that can cause various cardiovascular, neurological and gastrointestinal manifestations, due to the gastrointestinal action of the seeds of this plant is popularly used for weight loss. The intestinal effects may be caused by the antibacterial action of this plant on the human intestinal microbiota causing its imbalance and consequently diarrheal disease, since the microbiota plays the role of protection and regulation of the intestine. *Thevetia* seeds obtained from Goiás were used for the growth inhibition test of pathogenic and probiotic bacteria present in the human microbiota. These seeds were submitted to four similar extraction methodologies entitled A, B, C and D, after which the method was used. of antibiogram to verify the antimicrobial activity of the extracts, which showed no action on the bacteria tested. It was concluded that the methodology used for extraction was not satisfactory for this type of seed, as other bibliographies showed inhibition results from another methodology.

Keywords: Antibiotic. Microbiota. Toxicity.

[1]Acadêmica do curso de Biomedicina, Centro Universitário Campo Real.
[2]Bióloga, Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Campo Real, Mestre em Ciência Animal.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas vem sendo registrado desde 140 DC, estas eram utilizadas para o tratamento de enfermidades (MORELLI, 2010), por tribos indígenas, onde as mulheres se encarregavam de extrair os princípios ativos destas plantas (SIMON; MATOS, 2001). Na sociedade cerca de 80% da população usa algum tipo de planta ou erva seja para alimentação ou para tratamento de enfermidades (MORELLI, 2010). A utilização das plantas se desenvolveu ao passar dos anos, desde a forma básica aplicada por populares, até a forma tecnológica obtida por meio de pesquisas na área farmacológica (LORENZI, 2008).

A ideologia de que tudo que é natural não traz malefícios a saúde gerou um problema relacionado a ação das plantas, pois esta ideologia exclui o fato de que concentrações e componentes de plantas podem ser tóxicos aos seres vivos (RATES, 2002). Em determinada concentração toda planta possui toxicidade, porém, o termo planta tóxica só é utilizado para plantas que em contato direto, inalação ou digestão acarretará danos à saúde do homem ou do animal, podendo ocasionar o óbito (STASI, 2007). A toxicidade da planta pode prover da qualidade do cultivo, colheita e transporte inadequado, ou pode ser devido aos seus componentes químicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006), estes são intitulados de princípio ativo, como as saponinas, toxialbuminas e os glicosídeos (BARG, 2004).

Exemplo de planta com caráter toxico que é utilizada popularmente como planta medicinal é a *Thevetia peruviana*. Está é mais conhecida como chapéu de Napoleão. A *T. peruviana* pertence à família Apocynaceae*,* é uma planta perene em forma de arbusto encontrada como decoração em algumas cidades, devido a beleza de suas flores (PEARN, 1989). Apesar de todas as partes da planta serem tóxicas (FIOCRUZ, 2012), muitos casos de intoxicação ocorrem através da ingestão de sementes (EDDLESTON; ARIARATNAM; 2000), por crianças ao serem confundidas com nozes (VASCONCELOS; VIEIRA; VIEIRA, 2009).

Com o consumo elevado de sementes desta planta podem ocorrer distúrbios cardiovasculares devido aos glicosídeos esteroidais presentes nestas (EDDLESTON; ARIARATNAM, 2000). Dentre os sintomas podem ocorrer manifestações neurológicas como: cefaleia, tonturas e distúrbios cardiovasculares, e ainda, a ingestão destas leva a alterações gastrointestinais que se resumem em: cólicas abdominais, vômitos, diarréia, sialorreia, náuseas, dor e queimação (BRASIL, 2017). Enfermidades gastrointestinais como a diarréia podem ser oriundas do desequilíbrio da microbiota intestinal (BRANDT, et al., 2006).

Uma vez que a microbiota intestinal é um ecossistema formado por microrganismos, dentre estes, é composto principalmente por bactérias anaeróbicas (SUAU, et AL., 1999), e

podem ser classificadas em probióticos e patogênicas. Os probióticos são microrganismos que auxiliam na saúde do hospedeiro quando em quantidades adequadas, entre estes, estão as Bifidobactérias e os Lactobacilos. Já as bactérias possivelmente patogênicas se apresentam nas espécies aeróbicas, sendo, gram negativas a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., e gram positivas como *Enterococcus, Streptococcus* e *Staphylococcus* (NOVERR; HUFFNAGLE, 2004), também são encontradas pequenas quantidades de proteobactérias como *Bacteroides* spp.*, Clostridium* spp. e *Fusobacterium* spp. (FORSYTHE, 2010).

A formação da microbiota intestinal é de extrema importância para a saúde do hospedeiro, já que esta age como uma barreira que pode reduzir a proliferação e disseminação de bactérias patogênicas e como imunomoduladores (GIBSON; ROBERTFROID, 1995). O desequilíbrio da microbiota intestinal pode levar a redução do efeito de proteção exercido por esta. Substâncias com ação antibiótica, ou seja, substâncias que combatem o crescimento de bactérias podem gerar enfermidades diarreicas por sua ação sobre a microbiota intestinal normal (PAIXÃO; DOS SANTOS CASTRO, 2016). Isso ocorre, pois, esta gera a proteção anti-infecciosa do meio fornecendo resistência a colonização de bactérias patogênicas (PENNA; NICOLI, 2001).

Portanto, o presente trabalho teve o intuito de avaliar a ação antimicrobiana dos extratos de sementes de *T. peruviana* sobre as bactérias probióticas e as bactérias patogênicas, e a possível ação das substâncias na desregulação da microbiota humana, o que poderia influenciar em uma possível infecção patogênica responsável pela enfermidade diarreica.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes foram obtidas de Goiatuba no estado de Goiás, através de compra online com um produtor rural responsável por estas. As frações foram submetidas ao serviço de entrega pela empresa prestadora de serviço Correios.

2.2 EXTRAÇÃO

As metodologias foram baseadas nos experimentos de SILVA., et al. (2013).

- Extração A. O material após limpo, triturado com o auxilio de um pistilo e pesado foi adicionado a um béquer contendo 100 mL de álcool etílico como solvente extrator, este permaneceu no solvente por sete dias para a maceração. Após esta etapa o produto foi adicionado à estufa de ar forçado por um período de 4h em 60ºC para

a evaporação total do solvente, o conteúdo foi suspenso em Éter de Petróleo 25 mL e filtrado. As extrações tiveram as concentrações em quantidade de sementes, sendo que cada semente pesa aproximadamente 0,4 g, por mililitro de álcool utilizado, obtendo assim 1/100 mL, 2/100 mL, 4/100 mL, 6/100 mL, 8/100 mL, 10/100 mL.

Na repetição dos testes ocorreram algumas modificações no método de extração primário, intituladas A, B, C e D, com concentrações 10/50 mL e 11/50 mL.

- Extração B. O material após limpo, triturado e pesado foi adicionado a um béquer contendo 50 mL de álcool etílico como solvente extrator, este permaneceu no solvente por dez dias para a maceração. Após esta etapa o produto foi adicionado à estufa de ar forçado por um período de 4h em 60ºC para a evaporação total do solvente, o conteúdo foi suspenso por método de filtração em 25 mL de Éter de Petróleo formando uma nova solução.
- Extração C. O conteúdo obtido pelo método de extração anterior foi triturado novamente em 5 mL de éter de petróleo e suspenso por método de filtração em 25 mL de Éter de Petróleo.
- Extração D. O material após limpo, triturado e pesado foi adicionado a um béquer contendo 50 mL de Éter de Petróleo como solvente extrator, este permaneceu no solvente por dez dias para a maceração. Após esta etapa partes líquidas e sólidas foram separados pelo método de decantação, onde o conteúdo líquido correspondente ao solvente e o produto da extração, foi reservado.

2.3 MICRORGANISMOS

Foram selecionados microrganismos patogênicos de isolados clínicos que estão presentes na microbiota intestinal humana em condições normais e variantes que podem ocasionar a enfermidade diarreica, sendo estas, *S. aureus, S. pyogenes*.

Os probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus bifidum* foram obtidas em cápsulas de forma individual, cada cápsula continha um bilhão de bactérias por unidade, sendo estas adquiridas de uma farmácia de manipulação na cidade de Guarapuava/PR.

2.4 CULTURA EM ÁGAR M.R.S

O ágar M.R.S é um meio seletivo para cultura de *Lactobacillus,* este foi diluído para a preparação de cinco placas. Foi utilizado o cálculo de concentração inicial e concentração final para obter o valor para a diluição, sendo de 14,5 g de ágar em pó para 100 mL de água destilada, com adição de 0,1 mL do detergente Tween 80, após a diluição este foi levado ao forno microondas com intervalos de 15s para a total diluição do soluto que em seguida foi esterilizado em autoclave por 15m e distribuídos em placas 90x15mm previamente esterilizadas em câmara de luz UV, com volume de 20 mL cada placa.

Foi preparado um inóculo em salina estéril com parte do conteúdo da cápsula manipulada, em turvação semelhante a 0,5 da escala de Mac Farland. Com o auxílio de uma alça calibrada o inoculado foi espalhado em forma de esgotamento para isolar colônias em ágar M.R.S. A placa foi incubada a uma temperatura de 35º por 2 dias. As colônias de *Lactobacillus* se apresentam em forma de grandes colônias de coloração branca (ÁGAR M.R.S, 2015).

2.5 CULTURA EM ÁGAR SANGUE

O ágar sangue de carneiro é um meio enriquecido, não seletivo e diferencial pela presença de hemólise. Este ágar pode ser utilizado para o cultivo de bactérias gram-positivas e gram-negativas por ser um meio de base rica e suplementada (AGAR SANGUE DE CARNEIRO, 2017). Este meio foi utilizado para o crescimento das bactérias *S. aureus* e *S. pyogenes,* este também foi utilizado para o crescimento do *L. bifidum*, pois apresentou maior taxa de crescimento em menor período de tempo.

O inóculo foi preparado a partir de colônias jovens de 24 horas de vida, suspensas e inoculada em salina estéril 0,85%. Foram utilizados equipamentos de espectrofotometria seguindo um padrão de 0,5 na escala de McFarland, de acordo com a metodologia descrita pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards.*

2.6 ANTIBIOGRAMA

O meio foi preparado a partir de uma base de ágar Mueller-Hinton, utilizado no teste de sensibilidade a antibióticos. A cultura foi realizada com colônias jovens em um prazo de 48h, inoculada em salina estéril 0,85% e em turvação semelhante a 0,5 da escala de Mac Farland.

Com o auxílio da pipeta volumétrica 100 µL da suspensão foi adicionado e espalhado por um espalhador em todos os sentidos do ágar, este ficou em repouso na estufa microbiológica previamente esterilizada no tempo de 5-10 minutos, o ágar estava seco para

a adição dos discos, cada disco contém 10 µL de cada produto das extrações. Estes foram identificados por marcações na parte externa da placa, sendo que, o tempo da adição não ultrapassou 15 minutos da semeadura, com a adição dos discos a placa ficou encubada em 36° de 18-24h. Após esse tempo os halos de inibição foram medidos com uma régua apropriada (ÁGAR MUELLER HINTON, 2014). As placas foram examinadas após 24 e 48 horas de incubação e analisadas se a placa estava satisfatoriamente estriada e se as zonas de inibição resultantes estavam uniformemente circulares com um tapete confluente de crescimento. O diâmetro da zona de inibição foi medido respeitando o milímetro inteiro mais próximo do ponto em que ocorreu uma redução proeminente de crescimento.

Os testes foram realizados em triplicatas para uma maior confiabilidade dos resultados. Foi utilizado o medicamento sulfametoxazol + trimetoprim (Sulfazotrim) 25 µg em disco da marca CECON, como controle positivo em placa única para cada bactéria. As placas foram levadas invertidas para a estufa em uma temperatura de 35ºC (NCCLS, 2003).

3. RESULTADOS

Após o período de incubação do antibiograma as placas contendo bactérias probióticas e bactérias patogênicas foram analisadas. Os controles positivos de *L. casei*, *L. bifidum,* S*. aureus* e *E.coli* apresentam respectivamente os halos de inibição em 44 mm, 35 mm, 22 mm e 28 mm, sendo que os discos contendo o controle negativo e os discos contendo o produto das extrações não apresentaram halos de inibição de crescimento, indicando assim que os extratos primários e secundários não apresentaram ação inibitória sobre estes. Nas figuras 1 e 2 pode-se observar as placas de antibiograma das bactérias *S. aureus* e *E.coli* com seus controles positivo, negativo e discos contendo as extrações realizadas, respectivamente, nestas observa-se os halos correspondentes ao controle positivo, e a ausência de abertura de halos no controle negativo e nos discos da extração D 11/50 mL e 10/50 mL, extração B 10/50 mL e extração C 10/50 mL e 11/50 mL, em sentido anti horário na placa.

Figura 1- Placas de antibiograma da bactéria *Staphylococcus aureus* contendo respectivamente controle positivo, controle negativo e discos das extrações B, C e D.

*P 11-indica a extração D 11/50 mL; P 10- indica a extração D 10/50 mL; E 10- inidica a extração B 10/50mL; ET 10- indica a extração C 10/50mL ; ET 11 indica a extração C 11/50mL.

Fonte: Dados de pesquisa.

Figura 2- Placas de antibiograma da bactéria *Escherichia coli* contendo respectivamente controle positivo, controle negativo e discos das extrações B, C e D.

*P 11-indica a extração D 11/50 mL; P 10- indica a extração D 10/50 mL; E 10- inidica a extração B 10/50mL; ET 10- indica a extração C 10/50mL ; ET 11 indica a extração C 11/50mL.

Fonte: Dados de pesquisa.

4. DISCUSSÃO

Diferentemente desta pesquisa que utilizou as sementes, Reddy (2009), obteve extratos de folhas de *T. peruviana* com álcool 95%, tendo como diferencial da metodologia o uso aparelho Soxhlet. Ele preparou os extratos nas concentrações 2 mg, 4 mg, 6 mg e 8 mg e testou sobre bactérias e fungos patogênicos resistentes a antibióticos de grande importância médica, como a Nistatina e Estreptomicina. Os microrganismos testados por ele apresentaram halos de inibição na presença dos extratos, sendo que as bactérias *Klebsiella pneumoniae, E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram uma alta inibição do crescimento em todas as concentrações do extrato, enquanto *S. aureus, Candida albicans, Aspergillus niger, Mucor, Rhizopus* e *Penicillium* apresentaram pouca inibição na

concentração 2 mg, e inibição moderada nos extratos mais concentrados (4 mg, 6 mg e 8 mg), já a espécie *Proteus vulgaris* apresentou inibição apenas na concentração de 8 mg.

Alahashimi, et al. (2013) utilizaram uma metodologia semelhante a do autor anterior e também obtiveram resultados diferentes ao desta pesquisa. Este obteve extratos em álcool 95% das folhas de *T. peruviana* em aparelho Soxhlet, e testaram sobre os microrganismos *K. pneumoniee, P. aeruginosa, Salmonella typhi, E. coli, Bacillus cereus, S. aureus* e *C. albicans* nas concentrações 200 mg/mL, 175 mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL, 75mg/mL, 50mg/mL. O fungo *C. albicans* apresentou halos inibição de 9 mm na concentração 200 mg/mL, e 8 mm na concentração 175 mg/mL, a bactéria *B. cereus* apresentou halos de inibição de 7 mm nas concentrações 200 mg/mL, 175 mg/mL e 150mg/mL, *S. aureus* apresentou as maiores inibições com halos de 10 mm em 200 mg/mL, 175 mg/mL e 125 mg/mL, 12 mm em 150mg/mL, *K. pneumoniee* teve halos de 12 mm em 150 mg/mL e 10 mm em 125 mg/mL, *S. typhi* teve halos de 10 mm em 125 mg/mL e 9 mm em 100 mg/mL, *P. aeruginosa* teve halos de 13mm em 200 mg/mL e 9 mm em 175 mg/mL, enquanto a cepa de *E. coli* não apresentou inibição nas concentrações testadas.

Gonçalves e Nogueira (2003), assim como os autores anteriores utilizaram o aparelho Soxhlet, porém com outros solventes. Estes demonstram que as extrações que utilizam *n-hexano* e diclorometano como solvente extrator de *T. peruviana*, em frações brutas inibem o crescimento de fungos da espécie *Cladosporium cucumerinum* somente em contato com a luz, ou seja, este tipo de extrato é fotoativo. O extrato em *n-hexano* apresentou inibição do crescimento em 0,5 cm de diâmetro em contato com a luz, e não apresentou traços de inibição em ambiente sombrio, enquanto o extrato em CH-Cl apresentou maior número de frações ativas e inibição entre 0,5 cm e 1,5 cm em contato com a luz, não apresentou inibição em ambiente sombrio. Os mesmos autores por meio de análise capilar identificaram 70,5% dos compostos que a fração mais fotoativa do extrato em diclorometano apresenta em sua mistura complexa. Os compostos responsáveis por a atividade antifúngica do extrato de *T. peruviana* tiveram atividade média em ambientes escuros com inibição de 0,5 cm e 0,5 cm a 1,5 cm de diâmetro, e em exposição à luz com inibição de 0,5 a 1,5 cm de diâmetro, maior que 1,5 cm de diâmetro e sem inibição, sendo Isopulegol, Pulegone, Citronelol, Carvacrol, Ácido benzóico, Ácido caprílico, Ácido palmítico, Ácido linoléico e Ácido oléico os compostos isolados.

Comparando entre os autores que testaram a ação antimicrobiana da planta, o aparelho Soxhlet demonstrou ser mais efetivo para a extração dos princípios ativos de *T. peruviana* independente do solvente que foi utilizado por estes, os autores seguintes demonstram que os ativos desta atuam além da atividade microbiana, como em células cardíacas e em receptores de células neoplásicas, sendo que todos estes fatores podem ser

relacionados ao problema discutido nesta pesquisa tanto na idéia de ação sobre a microbiota como na idéia de ação sobre as células do sistema digestivo.

De Jesus Teixeira, et al. (2013), relataram quais os principais efeitos colaterais da ingestão de nozes de *T. peruviana* por adultos, sendo o efeito mais comum diarreia, cólica, enjôo, cefaleia, redução do apetite, aumento na frequência cardíaca, diurese aumentada e sudorese fria. Segundo Eddsleton (2000), sua atividade tóxica é devido aos glicosídeos cardíacos sendo que algumas pessoas observadas após ingestão de sementes apresentaram defeitos na condução sinusal, nó átrio ventricular e arritmias, sendo que quatro dos 64 pacientes avaliados morreram antes de ser feitos exames, e uma menina morreu 5 horas após a ingestão de oito sementes, por bloqueio cardíaco de terceiro grau.

Miyagawa et al., (2009), testaram as frações *neriifolin, thevefolin,* e *peruvosídeo,* presentes na casca de *T. peruviana* sobre o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) que é responsável pela sinalização da apoptose em células tumorais, para avaliar a superação a resistência das células neoplásicas sobre o TRAIL na terapia contra o câncer. Os glicosídeos *neriifolin* e *thevefolin* apresentaram em concentrações submicromolares significativa superação ao fator de resistência ao TRAIL, sendo esta superação de 36% e 46% respectivamente aos glicosídeos, ainda demonstrou alta viabilidade celular na ausência deste fator, sendo de 79% e 65%, visando que estes compostos possuem efeito sinérgico ao TRAIL contra as células que possuem os antígenos (AGS). Sendo que dos compostos de *T. peruviana* os glicosídeos *neriifolin* e *thevefolin* exibiram significativa superação contra a resistência do fator.

CONCLUSÃO

A metodologia utilizada não se mostrou satisfatória para a semente utilizada, pois esta não demonstrou resultados inibitórios contra as bactérias testadas em ambos os testes. Este experimento tem como importância o teste da metodologia e demonstração de que esta não seria a mais apropriada para a avaliação da ação antimicrobiana de *Thevetia peruviana,* pois outros autores apresentaram metodologias diferentes de extração e estas apresentaram resultados satisfatórios para a atividade antimicrobiana da planta. Sugere-se desta forma novos estudos *in vitro* para detectar a ação desta sobre as células do aparelho digestivo podendo assim explicar as possíveis alterações e reações.

REFERÊNCIAS

ÁGAR M.R.S. Caba produtos para laboratório, 2015. Bula de Kit para Análise Laboratorial.

ÁGAR MUELLER HINTON. Responsável Técnico: Fabrício Galvão de Brito. Vila Paris. Mbiologic diagnósticos, 2014. Bula de Kit para Análise Laboratorial.

ÁGAR SANGUE DE CARNEIRO. Responsável Técnico: Elisa Hizuru Uemura. Pinhais. Laborclin produtos para laboratório, 2017. Bula de Kit para Análise Laboratorial.

ALHASHIMI, S. et al. The antimicrobial activity of leaves and callus extracts of Thevetia peruviana In vitro. **Journal of Biotechnology Research Center**, Baghdad, v. 7, n. 3, p.74-80, 2013.

BARG, D. **Plantas tóxicas.** 2004. Trabalho apresentado para créditos em Metodologia Cientifica no curso de Fitoterapia, Faculdade de ciências da saúde, São Paulo, 2004.

BRANDT, K et al. Importance of the intestinal microflora. **Pediatria.** São Paulo, p. 117-127. set. 2006.

CHOPRA, D.; SIMON, D. **O guia Deepak Chopra de ervas:** 40 receitas naturais para uma saúde perfeita. Campus, 2001.

EDDLESTON, M; ARIARATNAM, C. A. Acute yellow oleander (Thevetia peruviana) poisoning: cardiac arrhythmias, electrolyte disturbances, and serum cardiac glycoside concentrations on presentation to hospital. **Heart**, v. 83, n. 3, p. 301-306, 2000.

FIOCRUZ. Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico em 2010. **Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas.** Fundação Osvaldo Cruz, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 125, n. 6, p. 1401-1412, jun. 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/125/6/1401/4730723>. Acesso em: 12 dez. 2018.

GONÇALVES, L; NOGUEIRA, J.M.F. et al. Photoactive extracts from Thevetia peruviana with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, n. 1, p. 51-54, 2003.

LORENZI, H; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil:** nativas e exóticas. São Paulo. 2002.

MIYAGAWA, T. et al. Cardenolide glycosides of Thevetia peruviana and triterpenoid saponins of *Sapinduse marginatus* as TRAIL resistance-overcoming compounds. **Journalof natural products**, v. 72, n. 8, p. 1507-1511, 2009.

MORELLI, M. S. **Guia de produção para plantas medicinais, aromáticas e flores comestiveis**. Porto Alegre: Cidadela, 2010. 252 p.

NCCLS. **M2-A8**: Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. 8 ed. Pennsylvania: Nccls, 2003. 58 p. v. 23.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 12, p. 562-568, 2004.

PAIXÃO, L. A.; DOS SANTOS CASTRO, F. F. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85-96, 2016.

PARANÁ. Secretaria da Saúde (Org.). **Intoxicações por Plantas Tóxicas.** 2017. Disponível em:<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/plantas/Intoxicacoes_por_Pla ntas_Toxicas.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.

PEARN, J. **Oleander poisoning.** Plantas tóxicas e animais: um guia da Australia. 2nd, William Brooks, Brisbane. 1989.

PENNA, F. J.; NICOLI, J. R. Influencia da colonização de bactérias normais no trato gastrointestinal de neonatais. **Jornal de pediatria**, v. 77, n. 4, p. 251-252, 2001.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REDDY, B. Antimicrobial Activity Of Thevetia Peruviana (Pers.) *K. Schum*. And *Nerium Indicum Linn.* **The Internet Journal Of Pharmacology**, Gulbarga University, v. 8, n. 2, p.1-4, 2009.

SILVA, A. C. et al. CONSIDERAÇÕES FARMACOLÓGICAS SOBRE A Thevetia peruviana. **JEPEX**, Recife, p. 1-3, dez. 2013. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R1203-1.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2018.

STACI, L. C.D. **Plantas Medicinais: verdades e mentiras.** São Paulo: Unesp, 2007. 136 p.

SUAU, A. et al. Análise direta dos genes que codificam o 16S rRNA de comunidades complexas revela novas espécies moleculares no intestino humano. **Microbiologia aplicada e ambiental.** v. 65, n. 11, p. 4799-4807, 1999.

DE JESUS TEIXEIRA, A. R.; MAZUTTI. et al. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE THEVETIA PERUVIANA E PERFIL DOS USUÁRIOS EM GURUPI-TO. **Revista Científica do ITPAC,** Gurupiri, 2013.

TUROLLA, M. S; NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VASCONCELOS, J; VIEIRA, J. G. P.; VIEIRA, E. P. P. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2009