

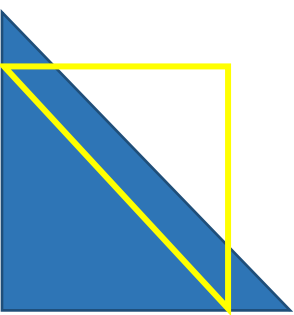


MAICON DOUGLAS JACOMELI

**ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DO EXTRATO METANÓLICO
DE *Euphorbia tirucalli* LINN.**

CHEMICAL-BIOLOGICAL STUDY OF THE METHANOLIC EXTRACT OF *Euphorbia tirucalli* LINN.

**Ji – Paraná
2019**



MAICON DOUGLAS JACOMELI

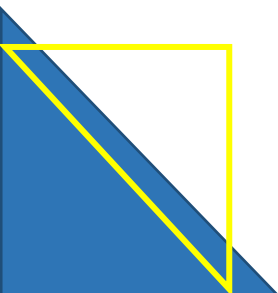
**ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DO EXTRATO METANÓLICO
DE *Euphorbia tirucalli* LINN.**

CHEMICAL-BIOLOGICAL STUDY OF THE METHANOLIC EXTRACT OF *Euphorbia tirucalli* LINN.

Artigo apresentado no Curso de graduação, em Farmaci
generalista do Centro Universitário São Lucas 2019, como
requisito parcial para obtenção do título.

Orientador: Prof. Drº Francisco Carlos da Silva

**Ji – Paraná
2019**



J16e

Jacomeli, Maicon Douglas

Estudo químico-biológico do extrato metanólico de *Euphorbia tirucalli* LINN / Maicon Douglas Jacomeli. Ji-Paraná: Centro Universitário São Lucas, 2019
19 p. il.

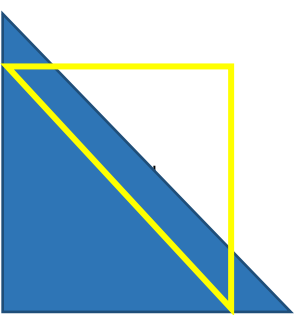
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Centro Universitário São Lucas, Curso de Farmácia, Ji-Paraná, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos da Silva

1. Euphorbiaceae. 2. Plantas medicinais. 3. Fitoquímica. 4. Toxicidade aguda. 5. Antibacteriano. I. Silva, Francisco Carlos da. II. Estudo químico-biológico do extrato metanólico de *Euphorbia tirucalli* LINN.

CDU 633.88

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário José Fernando S Magalhães
CRB 11/1091



MAICON DOUGLAS JACOMELI

ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Euphorbia*
tirucalli LINN

Artigo apresentado à Banca Examinadora do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná, como requisito de aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^o Dr. Francisco Carlos da Silva.

Ji-Paraná, 17 de junho de 2019.

Resultado: Aprovado (9,97).

BANCA EXAMINADORA



Dr. Francisco Carlos da Silva

Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná



Esp. Antônio de Souza Ferreira

Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná



Esp. Magda Fardim Dalcin

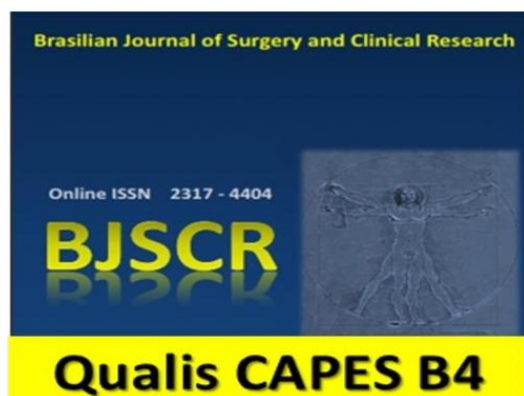
Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná

MAICON DOUGLAS JACOMELI

ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Euphorbia tirucalli* LINN.

CHEMICAL-BIOLOGICAL STUDY OF THE METHANOLIC EXTRACT OF *Euphorbia tirucalli* LINN.

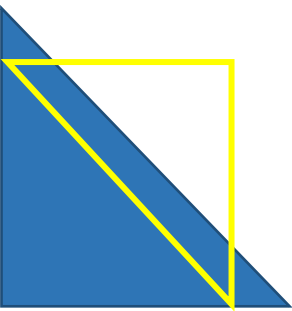
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi desenvolvido na forma de artigo científico nas normas da revista **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research** com ISSN 2317-4404, Qualis B-4. As normas para preparação dos manuscritos encontram-se em anexo.



**Ji – Paraná
2019**

SUMÁRIO

RESUMO / ABSTRACT		01
1 INTRODUÇÃO		02
2 MATERIAIS E METODOS		03
Material vegetal		03
Preparo da amostra e extração metanólica		03
Prospecção fitoquímica		03
Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>		03
Avaliação da atividade antimicrobiana		04
3 RESULTADOS		04
Prospecção fitoquímica		04
Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>		04
Avaliação da atividade antimicrobiana		05
4 DISCUSSÃO		05
5 CONCLUSÃO		06
6 REFERÊNCIAS		06
ANEXO		10
Modelo da Revista BJSCR		11
Resultado do Anti-plágio		14



ESTUDO QUÍMICO-BIOLÓGICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Euphorbia tirucalli* LINN.

CHEMICAL-BIOLOGICAL STUDY OF THE METHANOLIC EXTRACT OF *Euphorbia tirucalli* LINN.

MAICON DOUGLAS JACOMELI¹, JEFERSON DE OLIVEIRA SALVI², RAFAEL BINOW SCHMITD³, FRANCISCO CARLOS DA SILVA^{4*}

1. Acadêmico do curso de graduação em Farmácia do Centro Universitário São Lucas Ji-paraná; 2. Mestre em Biologia Celular e Molecular; Coordenador do curso de Farmácia da Faculdade Panamericana de Ji-paraná; 3. Pós-Graduando em Biologia Molecular pela Escola Paulista de Medicina/Unifesp; 4. Professor Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicado a Saúde; Docente dos cursos de Ciências Biológicas e Farmácia do Centro Universitário São Lucas Ji-paraná.

Rua: Dezenove. Nº: 35. Bairro: Jardim Aurélio Bernardes cidade: Ji-Paraná Rondônia. Brasil. CEP: 76907-424. maicon_jacomelli@outlook.com

Recebido em xx/xx/201x. Aceito para publicação em xx/xx/201x

RESUMO

Euphorbia tirucalli Linn, habitualmente conhecida como Avelóz, espécime da família Euphorbiaceae, utilizada na medicina popular como antibiótico, antifúngico, cicatrizante, anti-inflamatório se estendendo até antineoplásico. Com base nestas informações, este estudo teve como finalidade a avaliação fitoquímica, teste de toxicidade aguda frente ao micro crustáceo de *Artemia salina* e o potencial antibacteriano das partes aéreas de *E. tirucalli* L. O extrato metanólico, foi preparado com refluxo de solvente em um processo intermitente, após período de extração, foi novamente submetido a extração rotativa a quente, para concentração do extrato. A prospecção fitoquímica ocorreu por testes colorimétricos, precipitados e formação de espuma evidenciando a presença de Alcaloides, Fenóis, Flavonoides, Saponinas, Taninos, Triterpenos. No teste de toxicidade aguda, foi utilizado o micro crustáceo de *Artemia salina*, indicando presença de toxicidade, a Avaliação da atividade Antimicrobiana foi realizada por infusão em disco, utilizando concentrações distintas de 1mg/mL, 2mg/mL e 3mg/mL, apresentando atividade antimicrobiana sobre, cepas de *E. coli* e *S. aureus*. Os testes físicos químicos revelaram um grande potencial farmacológico. Estudos investigativos sobre plantas medicinais são de suma importância, considerando que devido a natureza de seus compostos, além de possuírem atividades farmacológicas, possam apresentar interações medicamentosas ou interferir em exames laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE: Euphorbiaceae; Plantas medicinais; Fitoquímica; Toxicidade aguda; Antibacteriano.

ABSTRACT

Euphorbia tirucalli Linn, commonly known as “Avelóz”, is a specimen of the family Euphorbiaceae. It is used in popular medicine for its antibiotic, antifungal, healing and anti-inflammatory properties, extending to antineoplastic. Based on this information, this study aimed at the phytochemical evaluation, acute toxicity test against the microcrustacean of *Artemia salina* and the antibacterial potential of the aerial parts of *E. tirucalli* L. The methanolic extract was prepared with the reflux of the solvent in an intermittent procedure. After the extraction period, it was again subjected to hot rotary extraction to concentrate the extract. Phytochemical prospecting was performed by colorimetric, precipitated and foaming tests evidencing the presence of Alkaloids, Phenols, Flavonoids, Saponins, Tannins, Triterpenes. In the acute toxicity test, the microcrustacean of *Artemia salina* was used and thus indicated the presence of toxicity. The evaluation of the antimicrobial activity was performed by infusion, using different concentrations of 1mg / mL, 2mg / mL and 3mg / mL, showing antimicrobial activity on *E. coli* and *S. aureus* strains. Chemical-physical tests revealed a great pharmacological potential. Investigative studies on medicinal plants are important because they consider the nature of their compounds and possible pharmacological activities that may present drug interactions or interfere with laboratory tests.

KEYWORDS: Euphorbiaceae; Medicinal plants; Phytochemistry; Acute toxicity; Anti-bacterial.

1. INTRODUÇÃO

Planta medicinal pode ser definida como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”¹.

A humanidade faz o uso de preparados de plantas medicinais para a cura dos males que acometem o corpo e a alma desde a antiguidade². Nesse contexto, se destaca o trabalho do imperador da China (Shen Nung 2838-2698 a.c.), foi o pioneiro na história em catalogar vários exemplares de plantas com efeitos tóxicos e medicinais, posteriormente viu-se a importância de registrar e estudar plantas com efeitos terapêuticos³. O uso de plantas medicinais no Brasil tem origem indígena, somada com conhecimentos trazidos das culturas portuguesa e africana⁴.

O clima favorável do Brasil possibilitou o desenvolvimento e adaptação de uma vasta biodiversidade de plantas. Devido a diversidade de biomas, cada região possui algumas espécies de plantas específicas, tornando inquestionável o seu valor científico. Desta forma, é possível encontrar de 45 a 55 mil espécies de plantas cerca de 22% do total mundial, fato que tem grande valor econômico, visto o interesse de extração e obtenção de matéria prima por indústrias de inseticidas, tecidos, papel, madeiras e principalmente farmacêuticas que têm interesse nos metabólitos secundários⁵.

O metabolismo vegetal pode ser dividido em dois, o primeiro é essencial para as rotas metabólicas básicas das plantas, como exemplo os glicídios, lipídeos e protídeos que possuem funções vitais nas plantas, e o segundo, conhecido como metabolismo secundário, está relacionado com a forma de defesa da planta, como exemplo os taninos, cumarinas e saponinas que estão presentes em alguns frutos verdes e dão sabor amargo e desagradável, permanecendo até o desenvolvimento das sementes, o que funciona como desestimulante para os herbívoros⁶. Da mesma maneira, existem substâncias como os óleos voláteis, os flavonoides, betalaínas e antocianinas que atuam atraindo os predadores responsáveis pela polinização de algumas plantas, garantindo a sobrevivência da espécie. Desta forma, o estudo dos metabólitos

secundários presentes em plantas medicinais é de grande importância, pois podem causar reações adversas como toxicidade ou interações^{6, 7}.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 85% dos habitantes de países em processo de desenvolvimento utilizam plantas medicinais em seus cuidados básicos à saúde⁸. Neste sentido, o uso de plantas medicinais para fins terapêuticos foi incluído na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (NPICP) do Sistema Único de Saúde (SUS) através da Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006⁹. Para garantir que a população tenha acesso às plantas medicinais e fitoterápicos de forma segura e eficaz, foi criado o Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que estabelece diretrizes de políticas públicas de saúde para o uso e indicações terapêuticas, bem como, incentiva o desenvolvimento de medicamentos oriundos da biodiversidade nacional de forma sustentável¹⁰.

Dentre as famílias de plantas consideradas medicinais se destaca a Euforbiácea, devido suas atividades farmacológicas, como; antifúngico, antimicrobiano, antineoplásico, anti-inflamatório^{11, 12, 13}. Alguns dos metabólitos secundários sempre presentes nesta família são as cumarinas, terpenos, esteroides, alcaloides, taninos (inclusive taninos pirogálicos, taninos pirocatéquico, taninos gálicos), flavonoides e saponinas^{14, 15}.

A Euphorbia tirucalli Linn. pertencente à família Euforbiácea, originária do continente africano, é um arbusto, podendo alcançar entre 4-12 m de altura, com galhos retos, ramificações lisas, cilíndricas e polidas, folhas pequenas presentes apenas nas proximidades das pontas de galhos juvenis e raramente apresenta flores^{16, 17}. É conhecida popularmente por Avelóz, Arvore do lápis, dedo do diabo^{17, 18}. É utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas e não infecciosas, foi trazida para o Brasil e se aclimatou muito bem em regiões de climas tropicais, um exemplo disso é o que pode ser observado na região Norte do Brasil^{19, 20, 21, 22}.

Uma das primeiras matérias científicas sobre o uso da *E. tirucalli* L. no Brasil fora realizado pelo médico nordestino Lauro Neiva (1968)²³, onde faz a descrição da posologia, utilizando apenas a seiva caustica em diluição aquosa, com sua empregabilidade, no câncer, doença de chagas, doenças degenerativas, antimicrobiano, controle de parasitas, tumores, sífilis entre outras finalidades^{24, 25}.

Com base neste panorama, o objetivo do presente estudo é realizar testes químicos biológicos, como; prospecção fitoquímica, análise antibacteriana e toxicidade aguda, com o extrato metanólico preparado em diferentes concentrações, a partir da *E. tirucalli* L. e averiguar algumas de suas atividades farmacológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As partes aéreas em idade produtiva e partes do tronco da *E. tirucalli* L. foram coletadas em fevereiro de 2019, no município de Ji-Paraná, Estado Rondônia situado na região amazônica, Brasil, com localização geográfica do ponto de coleta: 10°51'40.3"S, 61°57'43.9"O. A sua exsiccata está depositada no herbário Prof.^a Dr.^a Marlene Freitas da Silva (MFS), localizada na Universidade do estado Pará, onde a planta foi identificada por Oliveira, P. M. C., tombada sob o número de registro: 006161²⁶.

Preparo da amostra e extração metanólica

A amostra foi lavada com água destilada para remoção de macro agentes interferentes e contaminantes, posteriormente trituradas em moinho de facas elétrico, aumentando a superfície de contato com o líquido extrator.

Na preparação do extrato foram utilizados 100g de partes aéreas fresca e adicionado 250mL de solvente, utilizando o aparelho Soxhlet onde a um refluxo de solvente em um processo intermitente com metanol (faixa de ebulição 63-68 °C). Em velocidade/quantidade estabelecida de 6 a 8 sifonagens por hora e temperatura constante e com fluxo de gotejamento entre 150 e 200 gotas por segundo por um período de 2hs^{27, 28}.

Após o período de extração, a solução extrativa foi submetida a evaporação rotativa a vácuo, sobre pressão 500 PSI, com temperatura de 45 °C, com a finalidade de concentrar o extrato, com a posterior redução do solvente o concentrado atingiu cerca de 1/5 do volume original e foi submetido a secagem em estufa a 35°C por 24h.²⁹.

Prospecção fitoquímica

A marcha da prospecção fotoquímica, ocorreu com uma adaptação de metodologias

baseadas na colorimetria, precipitação e formação de espuma. Os grupos fitoquímicos são:

Tabela 01 – Lista de avaliação dos Metabolitos secundários, reagentes e resultados.

Metabolitos Secundários	Testes e Reagentes	Resultado
<i>Alcaloides</i>	Dragendorff, Wagner em ácidos orgânicos e inorgânicos	leve turbidez ou precipitado
<i>Cumarinas</i>	Observação através de luz ultravioleta	fluorescência amarela, azul ou verde claro
<i>Fenóis</i>	Cloreto férrico	Coloração verde ou tons de azul
<i>Flavonoides</i>	Cianidina ou Shinoda; Ácido clorídrico e magnésio	Vermelho ou laranja
<i>Saponinas</i>	Reação hemolítica	Formação e permanência de espuma
<i>Taninos</i>	Cloreto férrico a 10%	Coloração azul ou verde
<i>Triterpenos</i>	Reações de Liebermann-Burchard e Salkowski; clorofórmio e ácido sulfúrico	Coloração estável vermelho ou amarela

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os metabolitos citados na **tabela 1** obtiveram sua confirmação através dos testes e reagentes presentes em metodologia^{7,30}, todos realizados em triplicata utilizando a diluição de 1g/mL de água.

Bioensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Em um Becker de 1000mL, com base plana e firme, verteu se a solução salina, contendo 17,5 g de sal marinho para 500mL de água destilada, com PH ajustado entre 8 – 9 com o auxílio de solução base NaOH, após adicionados os cistos do micro crustáceo, que permaneceram sobre iluminação, aeração constante em temperatura ambiente controlada a 25°C (±2), por 48h até a eclosão dos náuplios³¹.

A amostra metanólica foi preparada na concentração de 3mg/ml, posteriormente foi

Openly accessible at

realizada uma diluição seriada (1:1, 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20), então, aproximadamente 10 náuplios de *A. salina* foram adicionados a cada tubo de ensaio contendo as diluições preparadas. Como controle negativo, utilizou-se solução salina (35 g / L) e como controle positivo foi utilizado o dicromato de potássio a 0,1%.

Após 24h, com a contagem de indivíduos vivos por tubo foi calculado a percentagem de mortalidade e Dose Letal Mediana, (DL₅₀). Os testes foram realizados em triplicatas^{32, 33}.

Tabela 2 – Diluições e concentrações do Bioensaio.

	Diluição/ Concentração	Extrato Metanólico	Diluyente qsp. H ₂ O 5mL
1	3mg/mL	5,0mL	---
1:2	1,5mg/mL	2,5mL	2,5mL
1:5	0.60mg/mL	1,0mL	4,0mL
1:10	0.30mg/mL	0,5mL	4,5mL
1:20	0.15mg/mL	0,25mL	4,75mL

Legendas: (1:?) Diluições, (mg) Miligramas, (mL) Mililitros, (Qsp.) Quantidade Suficiente para. (H₂O) Água.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a obtenção da DL₅₀ utilizou-se uma equação de regressão linear relacionando o %M. Ao valor de y (ordenadas), atribui-se a metade das mortes máximas possíveis (n/2); ao resultado de x obtido (abscissas), aplicou-se o antilogaritmo, resultando no valor final que é convertido para µg/mL ou PPM^{34, 35}.

De acordo com a metodologia proposta, utilizando o micro crustáceo de *A. salina*, se classifica como produto altamente tóxico aquele que apresentar DL₅₀ ≤ 80µg/mL; produto moderadamente tóxico o que apresentar DL₅₀ entre 80 e 250µg/mL; e produto levemente tóxico ou atóxico o que apresentar DL₅₀ ≥ 250µg/mL³⁶.

Avaliação da atividade antimicrobiana

O extrato metanólico de *E. tirucalli* L. testados foram preparados a partir de 3mg/ml, em concentrações diluídas de 3,2,1mg/ml, respectivamente A, B, C. Para técnica realizada na difusão em disco, se baseou na metodologia padronizada por Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2011)³⁷.

Como meio de cultura, foi selecionado o ágar Mueller-Hinton³⁸, para a inoculação das cepas propostas, *S. aureus* (ATCC 25923). e *E. coli* (ATCC 25922). Obtidas na bacterioteca do Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná – RO.

Utilizando a metodologia de diluição na escala Mac Farland³⁹, o controle negativo foi realizado com água destilada e metanol, e o positivo foi efetuado com Vancomicina 30µg para *S. aureus* e Ciprofloxacino 5µg para *E. coli*. As placas foram encubadas em temperatura 36°C (±2) por 24h, os halos de inibição foram averiguados, sendo considerado satisfatória a inibição os halos maiores que 6mm de diâmetro, os testes foram realizados em triplicata^{37,40}.

3. RESULTADOS

Prospecção fitoquímica

O rendimento do extrato metanólico foi de 9,36% (9,36g) de *E. tirucalli* L.

Os metabólitos secundários obtidos com o espécime vegetal estudado estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado do screening fotoquímico.

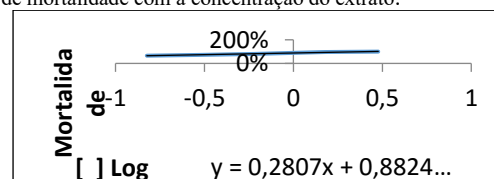
Metabolito secundário	Resultado
Alcaloides	Positivo
Cumarinas	Negativo
Fenóis	Positivo
Flavonoides	Positivo
Saponinas	Positivo
Taninos	Positivo
Triterpenos	Positivo

Fonte: Elaborado pelo autor.

Bioensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Para a obtenção da DL₅₀, utilizou-se uma equação de regressão linear relacionando o %M. Para a equação da linha reta obtida (y = ax + b), ao valor de y (ordenadas), atribui-se a metade das mortes máximas possíveis (n/2); ao resultado de x obtido (abscissas). No bioensaio de toxicidade aguda, frente a de *A. salina*, o extrato metanólico apontou que a DL₅₀ se iniciou a partir de 9,549 µg/mL, de acordo com a metodologia descrita por Mayer et al., (1982)³¹.

Tabela 4 = Gráfico de dispersão, que correlaciona a taxa de mortalidade com a concentração do extrato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Avaliação da atividade antimicrobiana

As concentrações utilizadas tangentes a DL₅₀, obtida no bioensaio com *A. salina*, foram utilizadas como parâmetro, para realizar a análise da atividade antibacteriana. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5. Demonstrando que ha atividade antibacteriana em diferentes concentrações. No controle positivo, como esperado apresentou excelente halo de inibição de acordo com os parametros de CLSI (2011)³⁷, e no controle negativo, quaisquer presença de halo, foram descartadas.

Tabela 5. Concentração inibitória do extrato metanólico, *E. tirucalli*, pelo método de disco de difusão em Ágar.

Concentração em mg/mL			
Mg/mL	3	2	1
<i>E.coli</i>	8mm	7mm	7mm
<i>S. aureus</i>	9mm	8mm	7mm
Controle Positivo		Controle Negativo	
Van	Cip	CH ₃ OH	H ₂ O
----	28mm	----	----
20mm	----	----	----

Fonte: Elaborado pelo autor.

4. DISCUSSÃO

Os dados obtidos com o estudo conferem quase que em sua totalidade com dados encontrados na literatura^{15,16}, com exceção de Cumarinas. Ao realizar a prospecção fitoquímica houve o resultado positivo para Alcaloides que basicamente são compostos nitrogenados, que dentre outros conferem a planta, proteção contra herbivoria e ações mecânicas⁴¹, Fenóis utilizados pelas plantas desde polinização até halelopatia⁴², Flavonoides conferindo coloração diversificada as plantas, farmacologicamente utilizado como anti-inflamatório, antiviral, antioxidante⁴³, quando isolada é fortemente empregada por sua atividade antitumoral⁴⁴, Saponinas que apresentam propriedade físico-química de saponificar substancias lipossolúveis (detergente), utilizados como tensoativos⁴⁵, e antimicrobiano⁴¹, Taninos que conferem características antissépticos, adstringentes e antioxidantes⁴⁶, e os Triterpenos que em sua divisão, vão desde atribuir aroma agradável a flores e frutos até o combate de alguns tipos de

carcinoma humano⁴⁷.

Existe uma enorme gama de fatores tanto abióticos como edáficos, que podem influenciar na produção e proporção de metabolitos de uma determinada planta, como; constituintes do solo, nutrientes, pH, ciclo circadiano, temperatura, altitude, genética, dentre outros^{48,49}. Tomando como observação que as partes aéreas da planta foram coletadas em fevereiro, que é considerado um período chuvoso para a região⁵⁰, a planta se instalou em meio a vegetação baixa.

Baseado na metodologia de Mayer *et al.*, (1982)³¹, e classificado por Dolabela (1997)³⁶, a atividade biológica do extrato metanólico se enquadra como altamente tóxica para *A. salina*. De acordo com os critérios estabelecidos para classificação do valor da DL₅₀, se define como produto altamente tóxico, com DL₅₀ ≤ 80µg/mL³⁶. Em seu estudo realizado sobre toxicidade de várias famílias de plantas medicinais Brasileiro *et al.*, (2006)⁵¹ obtiveram os mesmos dados sobre *E. tirucalli* L. a toxicidade pode estar relacionada a um componente altamente tóxico, o Forbol frequentemente encontrado nos Diterpenos⁵², que em ensaios biológicos mostraram capacidade de induzir respostas inflamatórias^{53,54}.

Os resultados referente a sensibilidade bacteriana a *E. tirucalli*. mostraram que tanto o diluente Água (H₂O) quanto o líquido extrativo Metanol (CH₃OH), não apresentaram atividade antimicrobiana, devido a ausencia de halo de inibição, os antibioticos utilizados como controle positivo, mostraram sua atividade esperada, o que leva a descartar cepas resistentes a medicação.

O extrato metanólico frente a cepa de *E. coli*, apresentou halos de inibição em torno de 8mm em sua maior concentração 3mg/mL, diferindo apenas em 1mm das concentrações de 2 e 1mg/mL, assim sendo não é possível considera-lo dose dependente, necessitando de mais estudos.

Isso se difere, quanto ao mesmo teste submetido a cepa de *S. aureus*, onde apresentou halos de inibição em escala, onde 9mm para sua maior concentração 3mg/mL, 8mm para 2mg/mL e 7mm para 1mg/mL. Resultados análogos obtidos em estudos semelhantes com bacterias gram-positvas, incluindo *S. aureus*⁵⁵, e com ambas as classes cepas, Gram-Positivas e Gram-Negativas⁵⁶.

Esta atividade antibacteriana esta intrinsecamente relacionada com seus metabolitos, como as Saponinas e Triterpenos,

que induzem a um desequilíbrio osmótico, levando a apoptose⁵⁷, fenóis e flavonóides, que podem causar fragmentação nuclear e condensação da cromatina, devido ao bloqueio da enzima tirosina quinase, desencadeando o processo de apoptose celular^{58,59}, e os taninos que por mecanismo, bloqueiam a síntese de proteínas diminuindo a disponibilidade de íons, essenciais para o metabolismo bacteriano⁶⁰.

A sensibilidade das bactérias gram-positivas, se torna mais corriqueiro de verificar, uma vez que os metabólitos secundários das plantas são mais ativos contra esse tipo de bactéria^{61,62}, o que confirma os resultados obtidos. Os halos foram considerados satisfatórios, de acordo com metodologias propostas, onde 6mm de diâmetro são consideradas ativas^{37,40}.

5. CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos, observou-se que o extrato metanólico de *E. tirucalli* L. Possui um excelente potencial fitoquímico para futuras pesquisas, comprovado no ensaio de prospecção, onde apresenta uma série de metabolitos de interesse médico.

Nos estudos bacteriológicos, mostrou possuir certa atividade frente cepas de *E. coli*, apresentando atividade moderadamente mais acentuada sobre *S. aureus*, o que corrobora com a opinião de vários outros pesquisadores, sobre sua atividade antibacteriana.

Entretanto mesmo com a presença de halos de inibição em ambas as capas testadas, o resultado obtido com teste de toxicidade aguda e diluições seriadas, aponta uma DL₅₀, que a enquadra como altamente tóxica, que sugere estudos mais aprofundados sobre *E. tirucalli* L.

Os estudos investigativos sobre plantas medicinais, seus princípios ativos bem como estrutura e compostos, se tornam de suma importância, uma vez que vários compostos podem ser identificados e isolados, produzindo assim uma nova geração de medicamentos mais seguros, onde cepas de bactérias resistentes, não tiveram contato com o futuro fármaco, e ter sua seguridade comprovada para o uso in natura, para que haja uma utilização adequada e garantida, evitando assim problemas à saúde e interações medicamentosas.

6. REFERÊNCIAS

[1] Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? São Paulo, Quím. Nova, vol.28 no.3; 2005.

[2] Bruning MCR, Mosegui GBG, Vianna CMM. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. Ciênc. Saúde coletiva. 2012, vol.17, n.10, pp.2675-2685.

[3] Prinsloo G, Nogemane N, Street R. The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and medicine. Food and Chemical Toxicology. 2018; 116: 27–39.

[4] Alves RA, Silva MJP. Uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. Rev Esc Enferm USP. 2003; 37(4):85-91.

[5] COSTA LM. SocioBiodiversidade e os Biomas brasileiros: SocioBiodiversidade Brasileira. In: SECRETARIA DE EDUCAÇÃO À DISTÂNCIA/MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. Educação na Biodiversidade. Edição: TV Escola/ Salto para Futuro, 2010: p. 19-30.

[6] Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCP, Petrovick PR (Orgs). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora Artmed, e-PUB; 2017.

[7] Souza GHB, Mello JCP, Lopes NP. Farmacognosia: Coletânea Científica. 1.ed. Ouro Preto, MG. UFOP; 2011.

[8] Souza CMP, Brandão DO, Silva MSP, et al. Utilização de Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. Rev. Bras. Plan. Med., Campinas, 2013: v.15, n.2, p.188-193.

[9] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: PNPIC-SUS. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

[10] Brasil. Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência

Farmacêutica. Diário Oficial da União 22 jun; 2006.

[11] Fenner R, Betti AH, Mentz LA, et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Porto Alegre, RS. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2006: vol. 42, n. 3.

[12] Martins N, Lillian B, Henriques M, et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. Industrial Crops and Products 74. 2015: Pag. 648–670.

[13] Marangoni C. Plantas medicinais tradicionalmente utilizadas no nordeste do Brasil: potencial antimicrobiano para tratar distúrbios das vias gênito-urinárias. Pernambuco. Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco; 2015.

[14] Vale VV, Orlanda JFF. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). Scientiaplana. 2011: v.11 n.4. Pag. 341/133.

[15] Vale VV, Orlanda JFF. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). Rev. Bras. Plan. Med., Campinas, 2015: v.17, n.4, supl. I, p.730-736.

[16] Araújo KM, Lima A, Silva JN, et al. Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia Tirucalli* L. Rio de Janeiro. Antioxidants 2014: v.3, pag. 159-175.

[17] Oliveira LFSO, Fuentesfria AM, Klein FS, et al., Research Paper Antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* strains and genotoxicity assessment in human leukocyte cells of *Euphorbia tirucalli* L. Brazilian Journal of Microbiology, 2014: v.45, ed.4, pag. 1349-1355.

[18] Silva VAO, Rosa MN, Tansini A, et al. In vitro screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines. Experimental and therapeutic medicine. 2018: v. 16, pag. 557-566.

[19] Furstenberger, G. Hecker, E. On the active principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from

Euphorbia tirucalli originating from Madagascar. Journal of Natural Products; Germany, may-jun; 1986.

[20] Schvartsman S. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. São Paulo: Editora Sarvier, 1992: ed.2.

[21] Oliveira AP, Nepomuceno JC. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of the avelós (*Euphorbia tirucalli*) IN *Drosophila melanogaster*. Bioscience Journal 2004: v.20(2), pag. 179-186.

[22] Trindade MJS, Lameira AO. Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Amazônia Oriental. Belém-PA, Brasil; 2012.

[23] Neiva L. A cura do Câncer pelo Avelóz. Rio de Janeiro. Editora Arte Nova S.A. 1968.

[24] BATISTA, L. Avelós. In: A vida que vem da terra. 1. ed. Campina Grande: Editora e gráfica Santa Fé, 1987. p. 17.

[25] CATALUÑA, P.; RATES, S.M.K. The traditional use of the latex from *Euphorbia tirucalli* linnaeus (euphorbiaceae) in the treatment of cancer in south Brazil. Acta Hort. (ISHS) 1999: 501:289-296.

[26] Herbário Prof^a. Dr^a. Marlene Freitas da Silva (MFS). Disponível no INCT - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. [cesso 25 de março de 2019 às 20:20] Disponível em: <http://inct.splink.org.br>

[27] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 1979: 6th ed., Pergamon Press: Oxford.

[28] Simões CMO, Schankel EP, Gosmann G, et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Santa Catarina, Editora UFRGS, ed.6; 2007.

[29] Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins.v Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, 2014: v.15, n.4, supl.I, p.692-707.

- [30] Barbosa WLR, Quignard E, Tavares ICC, et al. Manual para Análise fitoquímica e Cromatografia de Extratos Vegetais. Belém: UFPA, 2001: v.4.
- [31] Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of medicinal Plant Research*, 1982: v.45, pag. 31-34.
- [32] Rajeh MAB, Kwan YP, Zakaria Z, Latha LY, Jothy SL, and Sasidharan S. A cytotoxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Research*, 2012: 4(3), 170-177.
- [34] Lucas CP, Oliveira RS, Neto JAN, et al. Evaluation of Cytotoxic and Mutagenic Activities of *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore. *Journal Of Pharmacy*. 2019: vol. 9, pag. 62-69
- [35] Barcelos IB, Bulian AL, Calazans RSP, et al. Análise fitoquímica e das atividades citotóxica, antioxidante, e antibacteriana das flores de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson, *Revista Fitos*, 2017: 11(1), 1-118.
- [36] Dolabela MF. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Minas Gerais, 1997: 130.
- [37] CLSI. Publication M100-S21. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Non fastidious Organisms by Clinical Laboratories. *Hardy Diagnostics*, 2011: 1-3.
- [38] Anvisa. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Módulo 4. 2004.
- [39] Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, and Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.
- [40] Bona E, Silva PFG, Fruet TK, Jorge TCM, and Moura A. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq do Inst Biol*, 2014: 81(3), 218-25.
- [41] ALVES, D.L.; SILVA, C.R. *Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal*. São Paulo: Editora Atheneu, 2002: 105p.
- [42] Peres LEP, *Metabolismo secundário*, USP, Escola superior de agricultura, Curso de extensão, 2001, pag. 26. [acesso 22 de mar. 2018]. Disponível em: https://cursosextensao.usp.br/pluginfile.php/18438/mod_resource/content/1/Apostila%2001b%20-%20Metabolismo%20secund%C3%A1rio.pdf
- [43] Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, and Oliveira TT. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, 2008: 27(1/2), 33-39.
- [44] Rodrigues SL, Martins LV, Bantim FC, et al. Flavonoids: Chemical composition, medical actions and toxicity, *Acta Toxicol. Argent*. 2015: 23 (1): 36-43.
- [45] Kaise S, Pavei C, Ortega GG, Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada, *Rev. bras. farmacogn*. 2010: vol.20 no.3.
- [46] Monteiro JM, Albuquerque UP, Araujo EL. Taninos: uma abordagem da química à ecologia, *Quim. Nova*, 2005: Vol. 28, No. 5, 892-896.
- [47] Dewik, P.M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons, 2002.
- [48] Neto LG, and Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, 2007: 30(2), 374-381.
- [49] Martins FMM, Estudo da Influência de Fatores Ambientais na Composição Química e Atividades Biológicas de *Xylopia sericea* St. Hil. São Mateus, Mestre em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Espírito Santo – ES, 2012.
- [50] Fisch G, Marengo JA, Nobre CA. Uma revisão sobre o clima da Amazônia., *Acta amazônica*, 1998: 28(2); 101-126.
- [51] BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências*

Farmacêuticas, São Paulo, 2006: v. 42, n. 2, p. 195- 202.

[52] Lin MW, Lin AS, Wu DC, et al. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50: 4333-4339.

[53] Machado MM., Oliveira LFS, Zuravski, L, et al. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 2016: 88(1), 17–28.

[54] Resgalla JC, Laitano KS, Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no brasil, *Notas téc. Facimar*, 2002: 6: 153-163.

[55] Upadhyay, B, Singh KP, Kumar A. Etho-medicinal, phytochemical and antimicrobial studies of *Euphorbia tirucalli* L. *J. Phytol.* 2010: 2, 65–77.

[56] De Araújo K, De Lima A, Silva, J., et al. Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia Tirucalli* L. *Antioxidants*, 2014: 3(1), 159–175.

[57] Carminate B, Carvalho AC, Pacheco TF, Natalli VD, and Silva MB. Investigação antibacteriana in vitro de extratos etanólicos das folhas e cascas de *Cedrela fissilis* Vell, *Ciência e Natura*, 2014: 36(1), 335–340.

[58] Carvalho OV, Oliveira FS, Saraiva GL, Botelho CV, Ferreira HCC, Santos MR, Silva Júnior A, and Almeida MR. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. *Bras. Med. Vet. Zootec*, 2013: 65(2), 353-358.

[59] Santos DS, and Rodrigues MMF. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *UNIFAP*, 2017: 7(3), 29-35.

[60] Pereira AV, Azevêdo TKB, Santos HSS, Santana GM, Trevisan LFA, Azevedo SS, Pereira MV, and Paula AFR. Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. *Agropecuária Técnica*. 2015; 36(1):121-7.

[61] Alterthum F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2015: p. 888.

[62] Eller CB, Burgess SSO, and Oliveira RS. Environmental controls in the water use patterns of a tropical cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae), *Tree Physiol* 2015: 35(1), 387–399.

ANEXO

INSIRA O TÍTULO EM PORTUGUÊS DO ESTUDO ORIGINAL

INSERT TITLE IN ENGLISH

NOME E SOBRENOME DO AUTOR¹, NOME E SOBRENOME DO AUTOR¹, NOME E SOBRENOME DO AUTOR¹, NOME E SOBRENOME DO AUTOR¹, NOME E SOBRENOME DO AUTOR^{2*}

1. Acadêmico do curso de graduação do curso X da Universidade Y; 2. Professor Doutor, Disciplina X do curso X da Universidade Y.

* Insira o endereço do autor de correspondência com Rua/ Av. número, bairro, cidade, Estado, Brasil. CEP: 00000-000. email@mail.com.br

Preferencialmente, o orientador do estudo deverá ser designado para os diálogos com o Corpo Editorial do periódico **BJSCR**, fornecendo preferencialmente seus contatos profissionais

Recebido em xx/xx/201x. Aceito para publicação em xx/xx/201x

RESUMO

O resumo do manuscrito, em negrito, deve ter no máximo 200 palavras. O resumo deve ressaltar o fator motivador para a redação do trabalho, sendo composto por frases simplificadas (concisas), afirmativas, sem apresentação de itens enumerados com tópicos. Deverá ser redigido em parágrafo único. Símbolos que não sejam comumente utilizados, fórmulas, equações, diagramas, entre outros, devem ser evitados.

PALAVRAS-CHAVE: registre de 3 a 5 palavras-chave, separadas por ponto e vírgula (;).

ABSTRACT

O abstract, sem negrito, deve ser a tradução do resumo; assim, para evitar o retrabalho, faça o abstract apenas após ter finalizado o resumo.

KEYWORDS: as keywords, separadas por ponto e vírgula (;) devem ser as palavras-chave traduzidas para o inglês.

1. INTRODUÇÃO

Neste item, deve ser abordado o referencial teórico pesquisado para a elaboração do artigo.

Se necessário, o texto poderá ser subdividido por subtítulo(s) sugestivo(s), grafados com alinhamento à esquerda e em negrito e fonte Arial. A introdução deverá ser finalizada com a hipótese e o(s) objetivo(s) do estudo realizado,

sem a necessidade de evidenciá-los em subtítulos.

Abaixo segue um modelo de parágrafo para que fique representado o modo de citação no padrão Vancouver, utilizado pelo periódico BJSCR.

Dotter & Judkins (1964)¹, descreveram pela primeira vez um procedimento de angioplastia com o uso de cateter de dilatação na circulação periférica, antevendo sua aplicabilidade na circulação coronária.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010)², as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, além de contribuir significativamente com altas taxas de morbidade e elevados custos governamentais com saúde, nos dias de hoje³.

Apesar de suas limitações, é preciso considerar que os *stents* coronarianos promoveram o maior avanço da cardiologia intervencionista desde a criação da angioplastia coronariana por Andreas Grüntzig em 1979⁴, uma vez que propiciaram uma diminuição significativa de reestenose quando comparados com qualquer outra técnica de intervenção coronariana percutânea^{4,5}.

Akira et al. (1995)⁶ compararam a reestenose após o implante de *stents* em lesões >20 mm, encontrando índices de 24 a 39%, independentes do tipo de *stent*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os autores devem detalhar os recursos

materiais e metodológicos utilizados para realização do trabalho.

Abreviaturas: para unidades de medida, utilize somente as unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI). Utilize apenas abreviaturas e símbolos já padronizados, evitando incluí-las no título do manuscrito e no resumo. O termo completo deve preceder a abreviatura quando ela for empregada pela primeira vez, salvo no caso de unidades comuns de medida.

3. RESULTADOS

Neste item os autores devem registrar seus dados numéricos. Figuras e Tabelas (se houver) deverão ser inseridas pelos autores no corpo do texto em local onde sua visualização facilite a compreensão do estudo apresentado.

- Se houver Figuras, recomenda-se que sejam coloridas, com numeração arábica progressiva. O título da figura deverá aparecer abaixo desta, seguido pela sua respectiva legenda, em fonte de tamanho 8. As figuras devem possuir resolução suficiente para visualização se a página for ampliada pelo leitor e estar no formato .JPG.

Não serão aceitas imagens fora de foco;

- Se apresentar Tabelas, o título desta deverá ser inserido sobre (acima) da Tabela, com numeração arábica progressiva, indicando, logo abaixo, a fonte da pesquisa (se houver), ou algum item de observação relevante para interpretação de seu conteúdo.

Os resultados apresentados em Tabelas não devem ser repetidos em gráficos, e vice-versa; No texto, a referência às Tabelas ou Figuras deverão ser feitas por algarismos arábicos. Note que não deverá ser feita inserção dos elementos denominando-os como: esquema, diagrama, gráfico etc. Os elementos gráficos do artigo necessariamente deverão ser chamados de **Figura ou de Tabela**.

4. DISCUSSÃO

Após a apresentação dos resultados, os autores deverão comentar sobre seus achados experimentais, contextualizando-os com os registros prévios na literatura científica especializada. Note que o item discussão não deve conter reapresentação de resultados, mas tão somente os comentários ou correlações entre os dados apresentados, e/ou entre os dados do estudo com a literatura especializada.

5. CONCLUSÃO

O(s) autor(es) deverá(ão) responder de modo afirmativo ou negativo sobre a hipótese que motivou a realização do estudo, por meio do

BJSCR (ISSN online: 2317-4404)

<http://www.mastereditora.com.br/bjscr>

alcance dos objetivos propostos. No último parágrafo, o(s) autor(es) poderá(ão) expressar sua contribuição reflexiva (de cunho pessoal), e/ou versar sobre as perspectivas acerca do estudo realizado. Este item não deve conter referências, pois deve expressar a opinião dos autores, com a devida fundamentação científica.

6. AGRADECIMENTOS ou FINANCIAMENTO

O(s) autor(es) deve(m) indicar a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa (agências de fomento, empresas, etc.), agradecer à instituições ou pessoas que viabilizaram o estudo, sem necessariamente apresentarem-se como autores.

7. REFERÊNCIAS

Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus)*, disponível em <http://www.nlm.nih.gov>. Utilize fonte Times New Roman de tamanho 9. Listar todos os autores quando até três; quando forem quatro ou mais, listar os três primeiros, seguidos de *et al.* (em itálico). As referências são de responsabilidade dos autores e devem estar de acordo com os originais.

Exemplos de referências:

LIVROS:

- [1] Vellini-Ferreira F. Ortodontia: diagnóstico e planejamento clínico. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999.
- [2] Kane AB, Kumar V. Patologia ambiental e nutricional. In: Cotran RS. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

PERIÓDICOS CIENTÍFICOS:

- [1] Ong JL, Hoppe CA, Cardenas HL, *et al.* Osteoblast precursor cell activity on HA surfaces of different treatments. J Biomed Mater Res 1998; 39(2):176-83.

WEBSITES:

- [1] World Health Organization. Oral health survey: basic methods. 4th ed. Geneve: ORH EPID: 1997. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Imunoterapia. [acesso 11 mar. 2012] Disponível em: <http://inca.gov.br/tratamento/imunoterapia.htm>

MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESES:

- [2] Mutarelli OS. Estudo in vitro da deformação e fadiga de grampos circunferenciais de prótese parcial removível, fundidos em liga de cobalto-cromo e em titânio comercialmente puro. [tese]

Openly accessible at

São Paulo: Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo; 2000.

ANAIS DE EVENTOS OU ENCONTROS CIENTÍFICOS:

- [3] Ribeiro A, Thylstrup A, Souza IP, Vianna R. Biofilme e atividade de cárie: sua correlação em crianças HIV+. In: 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1999; set 8; Águas de São Pedro. São Paulo: SBPqO; 1999.

