

## USO DA *Calendula officinalis* L. NA REMODELAÇÃO PULMONAR EM RATOS WISTAR INDUZIDOS À PNEUMONIA GRANULOMATOSA

### *Use of calendula officinalis L. in pulmonary remodeling in wistar rats induced to granulomatous pneumonia*

Girlene de Freitas Moraes<sup>1</sup>, Tainá Nolêto de Araújo<sup>1, 2</sup>, Tales de Jesus Almeida, Thiago César Reis Pereira<sup>3</sup>, Evair dos Santos Rocha<sup>4</sup>

#### RESUMO

Estudos apontam a ação cicatrizante, reepitelizadora, anti-inflamatória e antisséptica da *Calendula officinalis* L. em diversos tecidos lesionados, entretanto ainda não há eficácia comprovada desses efeitos nas estruturas pulmonares. Pressupõe-se que a utilização do óleo seja capaz de estimular fibroblastos e a consequente produção do colágeno. Propõe-se averiguar através de análise histopatológica a ação terapêutica da *Calendula officinalis* L. no tratamento de ratos Wistar induzidos à pneumonia granulomatosa. Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo Infectado - 5 animais; Grupo Tratado-Infectado - 5 animais; Grupo Tratado-Não-Infectado - 5 animais; e Grupo Não-Infectado - 3 animais. Os grupos G-I e G-T/I foram infectados por via intra-peritoneal (I.P.) com volume de 50 µl contendo 1.107 bacilos de KPC diluídos em solução PBS 1x. Por nove dias os animais dos grupos G-T/I e G-T realizaram o tratamento com óleo essencial (20 gotas) em solução fisiológica (20 ml) com o auxílio de um nebulizador durante 60 minutos. Aos 10 (dez) dias pós-infecção (DPI), os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico, e, ao analisar o tecido pulmonar pôde-se notar que o óleo essencial utilizado apresentou resposta imune inata contra a pneumonia causada por *KPC*, onde obteve os mesmos resultados de um pulmão sadio sem infecção.

Palavras-chave: *Calendula officinalis*. Remodelação. Pneumonia. Ratos Wistar. Óleo essencial.

#### ABSTRACT

Scientific researches point to the healing action, re-epithelizing, anti-bacterial and antiseptic action of *Calendula officinalis* in injured tissues, although the impact of the forms on the pulmonary structures has not yet been proven. It is assumed that the use of the fuel will be able to stimulate the fibroblasts and consequent production of the collagen. To verify, through histopathological analysis, *Calendula officinalis* L.'s therapeutic action on Wistar rats that have been induced to granulomatous pneumonia. The animals have been divided in four groups: Infected Group – 5 animals; Treated-Infected Group – 5 animals; Treated-Non Infected Group – 5 animals; and Non Infected Group – 3 animals. Both I-G and T/I-G groups were infected through intraperitoneal injection (I.P.) with the volume of 50 µl containing 1.107 of diluted KPC bacilli in PBS solution 1x. For nine days the animals from the T-G and G-T/I groups received treatment with essential oil (20 drops) in physiological solution (20 ml) with the aid of a nebulizer for 60 minutes. At 10 (ten) days post infection (DPI), the animals were submitted to euthanasia by anesthetic deepening, and when analyzing the lung tissue it was noted that the essential oil used had an innate immune response against KPC pneumonia, where it obtained the same results as a healthy lung without infection.

Keywords: *Calendula officinalis*. Remodeling. Pneumonia. Wistar Rats. Essential oil.

#### 1 INTRODUÇÃO

A *C. officinalis* está inclusa como planta medicinal no projeto de fitoterapia que está sendo implantado no Sistema Único de saúde de todo o Brasil. A planta faz parte da família Asteraceae (compositae), popularmente conhecida como calêndula, encontrada com facilidade em todo o país por ser muito comum, assim como sua utilização na medicina popular. Dentre muitas propriedades

<sup>1</sup> Graduandos do curso de Fisioterapia da Faculdade Cathedral, Boa Vista-RR.

<sup>2</sup> Rua Francisco Inácio de Souza, Tancredo Neves, Boa Vista-RR. E-mail: ttainanolet@gmail.com

<sup>3</sup> Doutor em Patologia pela Universidade Paulista, Docente no Curso Superior de Fisioterapia da Faculdade Cathedral Boa Vista-RR.

<sup>4</sup> Especialista em Terapia Intensiva pela Sociedade Brasileira de Terapia Intensiva (SOBRATI)

medicinais da calêndula estão as ações: cicatrizantes, reepitelizadoras, anti-inflamatório, antitumorígenas, citotóxicas e antissépticas<sup>1</sup>.

Considerando as taxas de mortalidade geradas pelas doenças respiratórias, a pneumonia apresentava percentual de 38% em 1996, crescendo para 48% no ano de 2012. Em indivíduos adolescentes, jovens e adultos, as pneumonias ocorrem de forma mais branda quando comparadas às que ocorrem em pacientes idosos ou crianças. Entretanto, quando os mesmos apresentam doenças crônicas ou possuem imunidade reduzida, as pneumonias podem ser consideradas relevantes no adoecimento e óbito.<sup>2</sup>

Questiona-se, no presente artigo, se a Calêndula – (*Calendula officinalis* L.) produziria efeitos satisfatórios na Prevenção e tratamento da Pneumonia granulomatosa em ratos. Tendo como objetivos induzir modelo experimental da Pneumonia Granulomatosa em ratos, estabelecer sistema eficiente de nebulização para o óleo essencial, analisar o efeito antiinflamatório e de remodelamento da calêndula (*Calendula officinalis* L.) por meio de análise macroscópica e microscópica do pulmão e desenvolver tratamento eficaz para patologias em que há necessidade de remodelamento pulmonar.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A pneumonia é uma enfermidade infecciosa, geralmente desenvolvida quando ocorre falha nas estruturas de defesa do organismo, no qual as vias aéreas de pequeno calibre e alvéolos são preenchidas por exsudato inflamatório que dificulta a hematose, comprometendo o desempenho pulmonar. Normalmente causada por bactérias, parasitas, fungos, vírus, e outros microrganismos, sendo a maioria causada por agentes bacterianos, as pneumonias se destacam entre as doenças mais comuns do sistema respiratório, possuindo taxas de internações que permanecem elevadas, mas que continuam reduzindo com o passar dos anos.<sup>3</sup>

A pneumonia granulomatosa é evidenciada na necropsia ou em radiografias de tórax e tende a não apresentar quadro sintomatológico.<sup>4</sup>

A *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) é uma bactéria encapsulada gram-negativa pertencente à família das enterobacteriaceae<sup>5</sup>, possui uma enzima capaz de inativar carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Devido a sua produção da enzima beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) apresenta capacidade de inativar inúmeros agentes antimicrobianos, resultando em resistência de até 95% dos medicamentos.<sup>6</sup>

Na maioria das vezes as infecções causadas pela KPC ocorrem em pacientes imunodeprimidos, devido o contato com secreção ou excreção de pacientes infectados ou colonizados, em ambiente hospitalar. O processo descrito tende a provocar patologias como: infecções do trato urinário e de feridas, pneumonia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e em casos mais graves a SEPSE.<sup>5</sup>

A bactéria produtora de KPC pode causar pneumonia que, conseqüentemente, envolve a destruição necrótica dos espaços alveolares associada à ventilação mecânica. Os sinais e sintomas característicos de uma pneumonia causada pela KPC são: agravamento do quadro respiratório e nos casos mais sérios, edemas e até falência de múltiplos órgãos.<sup>5</sup>

Apesar dos avanços no estudo da fisiopatologia da doença e melhora nos tratamentos de doenças pulmonares, se encontra expressivos os índices de complicações hospitalares e significativamente os pulmonares. Considerando à ação de estimulação de fibroblastos e conseqüente produção de colágeno, antiinflamatórias, antisepticas, dentre outras, que a espécie *Calendula officinalis* apresenta, torna-se válido considerar os efeitos preventivos desse produto natural sobre o modelo experimental de pneumonia em ratos.

A utilização de óleos essenciais se iniciou com um conhecimento empírico e hoje é notada com crescente número de estudos sobre os efeitos que podem causar. Estudos comprovam que distúrbios comuns que acometem nosso cotidiano como colesterol alto, cólicas menstruais e febre podem ser diminuídas utilizando óleos provenientes de plantas<sup>7</sup>. Testes vem sendo realizados com

utilização de ultradiluições associadas a ações de fibroblastos e torna-se claro o efeito positivo do método para a aceleração da cicatrização de feridas.<sup>8</sup>

Conhecida popularmente como calêndula, maravilla, vireina ou marquesita, entre outros; trata-se de uma planta anual que apesar de ser encontrada em parques e jardins urbanos e ser resistente a todos os tipos de solo, possui preferência por terrenos argilosos. Na composição química pode-se encontrar: óleo essencial, pigmentos carotenóides, mucilagens, flavonóides, saponinas, resinas, ácidos orgânicos e mineiras. Comprovadamente tem a capacidade de aumentar a produção de fibroblastos e fibrinas, acelerando o processo de reepitelização. Estudos evidenciam que além de cicatricial, a planta possui eficácia contra infecções em ferimentos.<sup>1</sup>

Experimentos realizados com calêndula mostram que pequenas doses da ultradiluição aplicadas por 24 horas já produzem respostas significativas na cultura de fibroblastos<sup>8</sup> e não apresenta qualquer risco de intoxicação ao paciente na forma de óleo bruto.<sup>1</sup>

O efeito anti-inflamatório da calêndula prepara o ambiente para que seja feita a remodelação, no entanto, essa fase não deve ser muito intensa pois o excesso de resposta inflamatória pode retardar a cicatrização.<sup>1</sup>

### 3 MÉTODO

O presente estudo caracterizou-se como pesquisa experimental *in vivo*, realizada no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade Cathedral de Boa Vista-RR, a partir da utilização de Ratos winstar e bacilos gram negativos de *KPC*, obtidos a partir de um banco de dados bacteriológico da faculdade Cathedral.

O óleo essencial de *Calendula officinalis* (100ml) 100% puro foi proveniente da loja Mega Center, situada na cidade de Recife – PE.

Foram manipulados ratos winstar, do gênero masculino specific pathogen-free (SPF), com quatro semanas de idade, foram infectados pela via intra-peritoneal (I.P.) com volume de 50 µl contendo  $1.10^7$  bacilos de *KPC* diluídos em solução PBS 1x. Foram utilizadas seringas e agulha de insulina estéreis e descartáveis. Os experimentos foram conduzidos no biotério da Faculdade Cathedral de Boa Vista-RR, que possui estrutura bem como certificação para manutenção de animais SPF. Todos os animais foram alimentados com ração e água estéreis. A maravalha estéril foi trocada duas vezes por semana.

Os bacilos de *KPC* utilizados para a infecção foram obtidos na uti do hospital geral de Roraima. As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> no Laboratório de Cultura Celular da Faculdade Cathedral. A cada 07 (sete) dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm para obtenção dos esporos contidos no sedimento, que foram ressuspensos em PBS com 0,1% de Tween 20 e centrifugado com Percoll a 50%. Os bacilos coletados do sobrenadante foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato-salina (PBS) armazenados a 4°C. Para contagem dos bacilos foi utilizada a câmara de Neubauer.<sup>9</sup>

Os animais divididos em 4 grupos: Grupo *Infectado* – ratos inoculados com *bacilos de KPC com 5 animais*; Grupo *tratado-Infectado* – ratos tratados com óleo essencial de Calêndula e inoculados com *bacilos de KPC*, com 5 animais; Grupo *tratado-Não-Infectado* – ratos tratados com óleo essencial de Calêndula e não-inoculados com 5 animais; e Grupo *Não-Infectado* – ratos não inoculados e não tratados com óleo essencial de Calêndula com 3 animais, foram mantidos sob as mesmas condições.<sup>10</sup>

Por nove dias os animais dos grupos G-T/I e G-T foram levados para a gaiola de nebulização, onde realizaram o tratamento com óleo essencial (20 gotas) em solução fisiológica (20 ml) com o auxílio de um nebulizador durante 60 minutos.

Aos 10 (dez) dias pós-infecção (DPI), os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico para tal foi administrado por via intraperitoneal utilizando-se mistura de quetamina (40 mg/Kg), xilazina (8 mg/Kg) e fentanil (4 mg/Kg). Em seguida, foi realizado pinçamento até a verificação da ausência de sensibilidade. Posteriormente, a necropsia foi iniciada

com a punção cardíaca através da abertura do tórax com tesoura, coletando-se até 1 (um) mL de sangue, que foi posteriormente dividido em 2 (duas) alíquotas para determinação da carga parasitária (dados não demonstrados) e obtenção do soro após centrifugação. Em seguida, foram injetados 50mL de solução PBS 1x estéril pela via intracardíaca. Os pulmões e o coração foram colhidos e processados para análise histológica.

Os fragmentos foram coletados do pulmão para fixação em solução de formol tamponado a 10% por até 48 horas, que foram clivados e processados rotineiramente, e finalmente embebidos em parafina para análise histopatológica. Posteriormente, fragmentos teciduais foram rotineiramente cortados em fragmentos de 03 (três) µm de espessura. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro, corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e coloração de Gram-Cromotrope e examinados pela microscopia de luz - Nikon Eclipse E200, Tokio, Japão.<sup>11</sup>

Este estudo foi desenvolvido considerando-se os aspectos éticos pertinentes a pesquisas envolvendo animais conforme a lei 6.638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática da vivisseção de animais, bem como os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) de 1991, entidade filiada ao *International Council of Laboratory Animal Science* (ICLAS).<sup>12</sup> Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UNIP (CEUA 043-18).

#### 4 DISCUSSÃO

Atualmente, a disseminação de enterobactérias produtoras de KPC constitui um grave problema epidemiológico em várias unidades de saúde do Brasil e no mundo.<sup>13</sup> Dessa forma, é extremamente relevante conhecer os padrões epidemiológicos locais e o perfil de sensibilidade, por meio de metodologias aplicáveis a qualquer laboratório de microbiologia clínica, para detecção de cepas produtoras de carbapenemases e, assim, contribuir para redução dos índices de morbidade e mortalidade. O termo “KPC” está associado à espécie bacteriana em que a enzima foi encontrada pela primeira vez, em 1996, na Carolina do Norte, em uma *K. pneumoniae*.<sup>14</sup> Essa enzima já foi identificada em praticamente todos os membros de importância clínica da família Enterobacteriaceae, porém ocorre mais frequentemente em *K. pneumoniae*.<sup>15</sup>

Uma medida mais previsível para controlar a resistência é frear o uso abusivo de antibióticos. Assim, em 5 de maio de 2011, o governo brasileiro deu um importante passo para restringir o uso descontrolado desses medicamentos, ao editar a resolução nº20, da ANVISA, que dispõe sobre prescrição, comercialização e embalagem de antibióticos. A nova resolução mantém, também, as exigências previstas na Resolução RDC nº. 44/2010, quanto à apresentação, retenção e escrituração das receitas contendo medicamentos antimicrobianos. O objetivo é minimizar a elevação da resistência bacteriana no país.<sup>16</sup>

A fiscalização pelas vigilâncias sanitárias locais quanto aos procedimentos de exigência e retenção da receita nos estabelecimentos farmacêuticos deve continuar a ser realizada. Assim, no momento, sugere-se a vigilância para o mecanismo de resistência KPC emergente no Brasil. Quanto a identificação laboratorial destas bactérias, em suma, a triagem fenotípica se dá preferencialmente por meio de antibiograma com discos de cefalosporinas de terceira geração (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona) e carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), além do teste de Hodge modificado.<sup>17</sup>

Para o desenvolvimento tecnológico de formulações fitoterápicas que atendam as exigências e especificações da legislação vigente no país, é indispensável o estabelecimento de protocolos que garantam o controle de qualidade das matérias-primas, derivados vegetais e excipientes empregados na sua produção, assim como a validação de técnicas qualitativas e quantitativas apropriadas aos marcadores químicos escolhidos para o desenvolvimento do fitoterápico. Só assim é possível obter um produto tecnologicamente acabado com qualidade assegurada.<sup>18 19 20 21</sup> Diante desta premissa, a primeira etapa deste trabalho se deteve em identificar quais os efeitos da planta na nebulização.

Dentro da cadeia produtiva de fitoterápicos, um dos pontos mais críticos é o estabelecimento

de técnicas analíticas qualitativas e quantitativas apropriadas, que permitam comprovar a presença dos marcadores químicos responsáveis pela ação biológica. Desta forma, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de análise moderna, que ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas.<sup>22</sup>

Contudo, ainda é notável um grande problema relacionado à adequação da produção dos medicamentos fitoterápicos as normas e exigências estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores, para que se possa garantir a qualidade, eficácia e segurança do produto final. Nesse contexto, é imprescindível que se faça a validação das metodologias empregadas nas etapas do desenvolvimento dos fitoterápicos, com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, a fim de se obter a confiabilidade dos resultados de nossa pesquisa, uma vez que a planta se mostrou totalmente efetiva no combate à pneumonia causada por KPC.<sup>20 21 23</sup>

A variabilidade do material vegetal deve-se às diferenças do crescimento, colheita, secagem, e condições de armazenagem. A polaridade do solvente, o modo de extração, e a instabilidade dos constituintes também podem influenciar na composição e na qualidade dos extratos. Portanto, para se obter um produto fitoterápico com qualidade, segurança e eficácia, é desejável que o cultivo de plantas medicinais seja feito em condições padronizadas.<sup>24 25</sup> Desta forma, torna-se imprescindível a discussão acerca do controle de qualidade das matérias-primas, empregadas no desenvolvimento de fitoterápicos, assim como ver sua aplicabilidade em outros patógenos que tem tropismo por tecido pulmonar.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

#### 5.1.1 Grupo Infectado:

Figuras 1 - Rato. Grupo *Infectado*, onde existem lesões bases de pulmão direito e 1/3 médio de pulmão esquerdo.



FONTE: autores

#### 5.1.2 Grupo Tratado Infectado:

Figura 2 - Rato. Grupo *Tratado-Infestado*, onde não revelou lesões em nenhuma área pulmonar.



FONTE: autores.

Nos pulmões do grupo *Tratado-Infestado*, não foi observado processo inflamatório agudo ao qual não sugere Pneumonia granulomatosa, associada aos bacilos de KPC.

### 5.1.3 Grupo Tratado Não-Infestado:

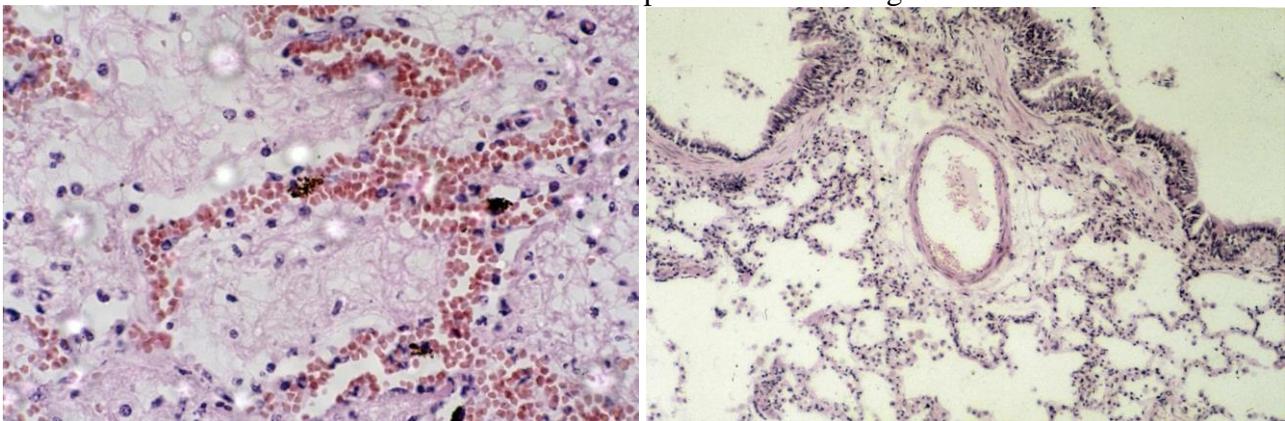
Nos pulmões do grupo *Tratado-não Infestado*, não foi observado processo inflamatório agudo resultado semelhante ao do grupo *Tratado-Infestado*.

### 5.1.4 Grupo não Tratado e Não-Infestado:

Nos pulmões do grupo *não Tratado-não Infestado*, não foi observado processo inflamatório agudo como já esperado por ser um grupo controle.

## 5.2 Análise Histopatológica

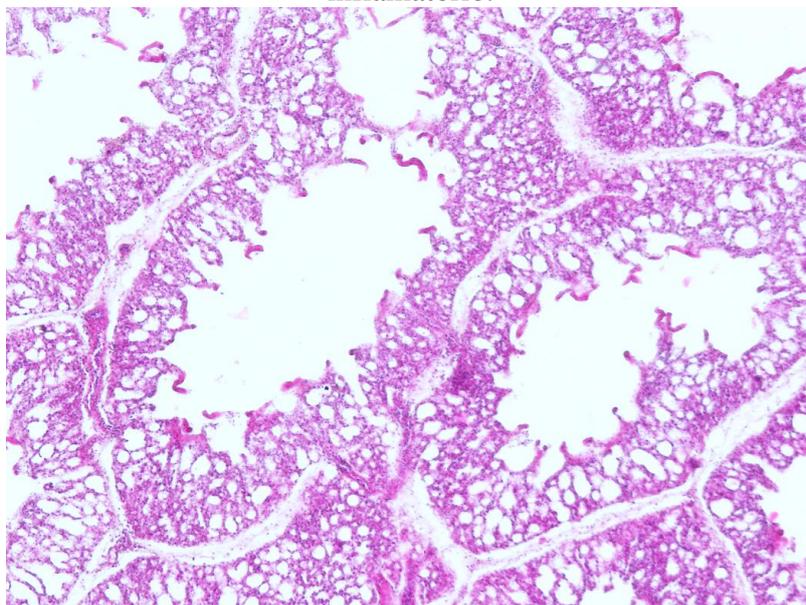
Figuras 3 e 4 - Rato. pulmão. Grupo Infestados evidenciando Pneumonia granulomatosa multifocal leve a moderada: Histopatologia das lesões microscópicas granulomatosas, predominantemente compostas por macrófagos, associadas a inúmeros esporos basofílicos em formato de bastão KPC no citoplasma de macrófagos e livres.



FONTE: autores

No grupo *Infestado*, foi observada pneumonia multifocal, composta predominantemente por macrófagos, e linfócitos.

Figura 5 - Rato. pulmão. Grupo Tratado-Infected não evidenciando nenhum processo inflamatório.



FONTE: autores

Já no grupo *tratado-infected não* foi observada pneumonia, grupo composto por células morfológicamente compatíveis com macrófagos.

Nossos resultados mostraram que a infecção por *KPC* causou efeitos inflamatórios associados a pneumonia granulomatosa. Assim, considerando os 10 dias de infecção, concluímos que a bactéria *KPC* é altamente virulenta ao tecido pulmonar

Em conjunto, os resultados indicam um importante papel do óleo *Calendula officinalis L.* na resposta imune inata contra a pneumonia causada por *KPC*, onde obteve os mesmos resultados de um pulmão sadio sem infecção.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo sobre os mecanismos de resistência bacteriana tem se tornado, ao longo de décadas, extremamente importante e essencial, uma vez que possibilita o esclarecimento quanto às direções estratégicas que poderão auxiliar na queda e erradicação das IRAS. Vale ressaltar o quão fundamental é a participação dos laboratórios na identificação das linhagens causadoras dos surtos, e uma vez apontado o microrganismo, a chance de se obter um tratamento adequado com uso correto dos antibióticos tende a aumentar. Hoje, o apelo por um maior interesse no isolamento destas bactérias e aclaração dos mecanismos de resistência pelas indústrias é incessante, pois é a partir destas informações, que as mesmas têm condições reais de produzirem novos antibióticos, que apresentem alta potência no combate aos microrganismos multidroga resistentes. A via mais comumente associada à disseminação das IRAS é a contaminação de patógenos entre as mãos de profissionais de saúde e pacientes. Entretanto, o ambiente hospitalar tem contribuição importante na disseminação dos microrganismos multirresistentes. Isto porque, na maioria das vezes, o ambiente ocupado por pacientes colonizados e/ou infectados por estes patógenos torna-se contaminado. Uma vez nesta situação, a dificuldade de descontaminação favorece o desenvolvimento de outros mecanismos de resistência, pela troca de material genético com informações de resistência aos antimicrobianos, o que dificulta ainda mais o tratamento.

As técnicas termoanalíticas (TG e DTA) utilizadas para o planejamento do desenvolvimento do gel de *C. officinalis L.* proporcionaram a obtenção de parâmetros tecnológicos em controle de qualidade, confirmando a compatibilidade entre os excipientes e o extrato liofilizado de calêndula e fornecendo dados relevantes acerca da estabilidade térmica dos constituintes da formulação

fitoterápica.

## REFERÊNCIAS

1. Gazola AM, Freitas G, Evangelista-Coimbra CCB. O Uso da Calendula officinalis no tratamento da reepitelização e regeneração tecidual. Rev. UNINGÁ Review. 20 (3), 54-59.
2. Ferraz RO, Oliveira-Friestino JK, Francisco PMSB. Tendência de mortalidade por pneumonia nas regiões brasileiras no período entre 1996 e 2012. J Bras Pneumol.
3. Alves J, Grando K, Lima LC, Pinto JM, Sampaio M, Saracini K, Souza L. Pneumonia nosocomial: diagnósticos e intervenções de Enfermagem. JMPHC;
4. Casagrande T, Machado DD. PERITONITE INFECCIONSA FELINA: RELATO DE DOIS CASOS CLÍNICOS; Ver. Ciên. Cidadania;
5. Alencar MPI, Silva JM, Vidal ME, et.al. KLEBSIELLA PNEUMONIAE: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. Mostra Científica em Biomedicina, Volume 1, Número 01, Jun. 2016;
6. Moreira VC, Freire D. *Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos. PUC Goiás;
7. Oliveira, EE. Avaliação do efeito dos óleos essenciais de Ocimum Gratissimum e Mentha x Villosa em linhagem de células de adenocarcinoma humano de pulmão: citotoxicidade, ciclo celular e produção de TGF-  $\beta$ 1. Juiz de Fora; Universidade Federal de Juiz de Fora;
8. Cavalaro V. IN VITRO STUDY ACTIVITY PROLIFERATIVE FIBROBLAST HUMAN SUBMITTED TO TREATMENT ZINCUM METALLICUM AND CALENDULA OFFICINALIS IN ULTRA DILUTIONS HOMEOPATHIC. International Journal of High Dilution Research;
9. Hornitzk M. Nosema Disease – Literature review and three surveys of beekeepers – Part 2. Rural Industries Research and Development Corporation. 2008; 8(6).
10. Lallo MA, Hirschfeld MPM. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. Exper paras. 2012; 131(3): 339-343.
11. Da Costa LF, Alvares-Saraiva AM, Dell`Armeline Rocha PR, et al. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. Immunobiology (jena. 1979), v. 222, p.218-227,2017.
12. Field A. Discovering statistics using IBM SPSS statistics. Sage, 2013.
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica nº 1/2013 – Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Brasília (DF): ANVISA; 2013.
14. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward D, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing Beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(4):1151-61.
15. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of Klebsiella pneumonia carbapenemase-producing bacteria. South Med J. 2011;104(1):40-5. Review.
16. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 44, de 26 de outubro de 2010. Ementa: Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isolados ou em associação e de outras providências. Diário oficial da união, Seção 1, N° 207, quinta-feira, 28 de outubro de 2010. Disponível em: <http://www.in.gov.br>. Acesso em: 15 fev. 2011
17. DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) in Enterobacteriaceae de Ambiente Hospitalar. J. Bras. Patol. Med. Laboratório., Rio de Janeiro, v.46, n. 1, fevereiro 2010. Disponível em: . Acesso em: 03 abr. 2011.
18. TOLEDO, A. C.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. Revista Lecta, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

19. BASSANI, V.L.; GONZÁLES, O.G.; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. Revista Fitos. v. 1, n.1, p. 14-17, 2005.
20. NETTO, E.M.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; BALBINO, E.E.; CARVALHO, A.C. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos/Comments on the Phytomedicines Register. Revista Fitos. v. 1, n. 3, março, 2006.
21. OLIVEIRA, A.H.; BERRETTA, A.A. Avaliação da qualidade de insumos farmacêuticos a base de calêndula e própolis utilizados pelas farmácias magistrais. Revista Eletrônica de Farmácia. v. IV n. 2, p. 169-174, 2007.
22. COLLINS, H.C.; BRAGA, L.G.; BONATO, S.P. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP : Editora Unicamp, 2006.
23. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. NOTA TÉCNICA No 1/2010. 25 out 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/161dcf8044726d11972ad77d15359461/nota25-10-2010.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 11 jan. 2011.
24. BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? Drug Information Journal, v. 32, p. 101–110, 1998.
25. MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Editora Tecmedd, 2004.