



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E  
ANTINEOPLÁSICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA E FOLHAS DA  
*Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc (COMBRETACEAE).**

**PATRÍCIA SIQUEIRA DE MELO RODRIGUES**

**PALMAS – TO**

**2016**

**PATRÍCIA SIQUEIRA DE MELO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E  
ANTINEOPLÁSICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA E FOLHAS DA  
*Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc (COMBRETACEAE).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin

PALMAS – TO

2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins**  
**Campus Universitário de Porto Nacional**

R696 Rodrigues, Patrícia Siqueira de Melo

Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antineoplásica dos extratos etanólicos da casca e folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc (Combretaceae). / Patrícia Siqueira de Melo Rodrigues. Palmas, TO: UFT, 2016.

105 p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente.

1. Meio Ambiente. 2. Ecologia. 3. Plantas medicinais.  
6. Tocantins. I. Título.

CDD 581.634

**Bibliotecária: Janira Iolanda Lopes da Rosa CRB-10/420**

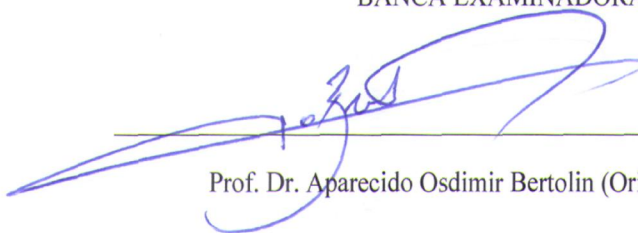
**TODOS OS DIREITOS RESERVADOS** – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Termo de Aprovação

Patrícia Siqueira de Melo Rodrigues

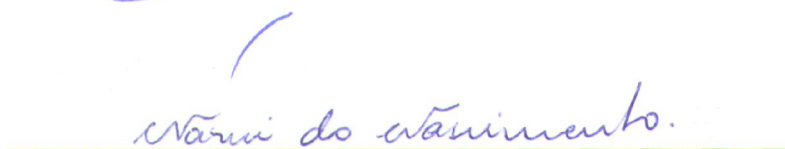
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E  
ANTINEOPLÁSICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA E FOLHAS DA  
*Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc (COMBRETACEAE).

BANCA EXAMINADORA:



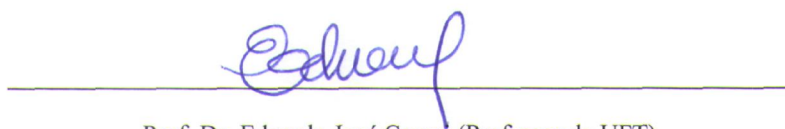
---

Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin (Orientador – UFT)



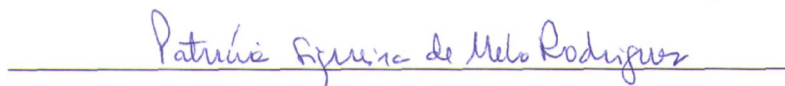
---

Prof.ª Dr.ª Nanci do Nascimento (Participante externo)



---

Prof. Dr. Eduardo José Cezari (Professor da UFT)



---

Patrícia Siqueira de Melo Rodrigues (Aluna)

Palmas, 30 de maio de 2016.

*Dedico esse trabalho à minha família, amigos e à  
comunidade Mumbuca.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida!

Ao Mestre Divino Jesus por não me desamparar, por estar orientando meus passos e encorajando-me a enfrentar todos os desafios com sabedoria e paciência.

Durante essa jornada, muitas pessoas entraram e passaram a fazer parte da minha vida colaborando direta ou indiretamente com minha formação pessoal e com a conclusão deste trabalho. Por esta razão, deixo aqui registrada minha sincera gratidão:

Ao meu marido Wesley Adriano por me incentivar e apoiar na realização desse trabalho.

Aos meus filhos Felipe e Leonardo por aguentarem firmes as ausências da mamãe.

Aos meus pais Josias e Dinair, minha irmã Andréa, minha sogra Doralice e minha cunhada Welma pela ajuda com meus filhos nos momentos de muito trabalho e ausência.

Ao Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin, por ter me acolhido como orientanda no meu retorno ao meio acadêmico, pelo tempo e empenho dedicados na orientação e acima de tudo pela doação de experiência e conhecimentos que foram muito além desse trabalho.

Ao Laboratório de Fitoquímica do Campus de Porto Nacional/TO, em especial, ao Prof. Dr. Marcio Galdino, pela disposição e colaboração na obtenção dos extratos vegetais.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nanci do Nascimento pelo apoio no IPEN.

À Tamara Mieco Fucase e à Fernanda Mouro Galluzzi do laboratório de Biotecnologia/IPEN pela imensa colaboração com os ensaios biológicos.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Belline Marumo, pesquisadora do IPEN, pela imensa colaboração nas análises estatísticas dos ensaios biológicos.

Aos técnicos de laboratório da UFT/Porto, Izabel, Alexandre e Assuélcio pela cooperação e boa vontade em ajudar.

Ao técnico do Herbário Tocantins Vagner pela colaboração.

Ao técnico do Geoprocessamento Raony pela ajuda na construção do mapa de localização da comunidade.

Aos amigos Aluísio, Luiz Carlos e Késia Naves pelo apoio nas coletas no Jalapão sempre com muita disposição, companheirismo e risadas pelos caminhos.

Aos companheiros Thompson, Gabriela, André e Raquel pelo apoio em São Paulo.

À minha Comadre Andréa Lorena e o amigo Thompson pelas horas dispensadas de estudo sobre análises estatísticas.

À Dona Rosa Finholdt e Rafael Finholdt pelas correções e sugestões.

À Werson, Raissa e André pelas colaborações.

Às minhas queridas Fisioterapeutas Raimundinha, Leidiane, Lucimara e Dulcinara, por sempre estarem dispostas a me ajudar.

Aos colegas de trabalho, no Centro de Ensino Médio Félix Camoa, pela compreensão.

Aos colegas do CIAMB, em especial à Leilane, Eva, Thays, Janaína, Aluísio e Virgínia pelas trocas de experiências, conversas e apoio nos momentos complicados.

À Secretaria de Educação do Estado do Tocantins pela liberação do afastamento para aperfeiçoamento profissional.

A Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Mestrado Ciências do Ambiente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1 Plantas Medicinais.....	22
2.2 Etnobotânica.....	24
2.3 Comunidades Tradicionais.....	26
2.4 Antioxidantes .....	29
2.5 A espécie <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. et Zucc e o gênero <i>Terminalia</i> .....	30
2.6 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
2.7 Resistência Microbiana.....	34
2.8 Prognósticos do Câncer (Neoplasias).....	35
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 Geral .....	38
3.2 Específicos: .....	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>39</b>
4.1 Seleção da espécie em estudo .....	39
4.2 Coleta do material botânico e Identificação.....	39
4.3 Preparação do extrato .....	41
4.4 Ensaio Microbiológico.....	43
4.4.1 Material Microbiológico.....	43
4.4.2 Método de diluição.....	43
4.4.3 Preparo do meio de cultura e caldo .....	43
4.4.4 Controles.....	43
4.4.5 Preparo dos inóculos bacterianos e contagem de bactérias .....	44
4.4.6 Preparo das soluções dos extratos para os testes microbiológicos e determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs).....	44



4.4.7 Método da difusão em ágar pela técnica dos poços – Antibiograma.....	45
4.4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - Gradiente de Ação.....	46
4.4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - Gradiente de Concentração... 46	
4.5 Atividade antioxidante.....	48
4.6 Ensaio Biológico.....	49
4.6.1 Culturas celulares.....	49
4.6.2 Avaliação da citotoxicidade.....	50
4.6.3 Preparo dos extratos vegetais.....	50
4.6.4 Avaliação da citotoxicidade do DMSO.....	50
4.6.3.1 Diluição dos extratos.....	51
4.6.5 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos pelo ensaio MTS.....	51
4.7 Análises estatísticas.....	54
<b>5 RESULTADOS:.....</b>	<b>54</b>
5.1 Estimativa de rendimentos dos extratos.....	54
5.2 Difusão em Ágar pela técnica dos poços.....	55
5.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	61
5.4 Comparação dos extratos.....	62
5.5 Concentração Inibitória Mínima - Gradiente de Concentração.....	64
5.6 Ensaio Biológico.....	70
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>105</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01 -</b> Árvore, folhas e frutos da <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. et Zucc.....	<b>31</b>
<b>Figura 02 -</b> Mapa da localização da Comunidade Quilombola Mumbuca. ....	<b>40</b>
<b>Figura 03 -</b> Preparo dos extratos da casca e das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> : A) Filtragem; B) Retirada do solvente no evaporador rotativo; C) Extrato sem solvente; D) Extratos no liofilizador; E) Extratos liofilizados. ....	<b>42</b>
<b>Figura 04 -</b> Preparo do Antibiograma e da Concentração Inibitória Mínima: A) Preparo do meio de cultura; B) Preparo das placas de Petri com meio de cultura; C) Diluição seriada dos extratos; Preparo da CIM. ....	<b>48</b>
<b>Figura 05 -</b> Preparo das culturas celulares e teste de viabilidade celular: A) Preparo do meio de cultura; B) Retirada dos criotubos com células congeladas em nitrogênio líquido; C) Criotubo contendo linhagem celular; D) Garrafa com cultura celular sendo semeada; E) Preparo do ensaio de viabilidade celular; F) Microplaca com teste de viabilidade e representação da distribuição das diluições. ....	<b>52</b>
<b>Figura 06 -</b> Mapa de placas para os testes com os extratos. As concentrações finais estão em mg/mL. Diluições em ordem decrescente de concentração. Em Amarelo: extrato da casca; Laranja: extrato das folhas; Verde: DMSO (Controle Negativo); Azul: DMEM + Células. ....	<b>53</b>
<b>Figura 07 -</b> Fotografia do teste de difusão em ágar pela técnica dos poços – 7A) extrato da casca da <i>Terminalia fagifolia</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> ; CN – controle negativo; CP - controle positivo; Poços: 1– 100 mg/mL; 2 – 200 mg/mL; 3 – 300 mg/mL; 7B) Halo de inibição contra <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	<b>56</b>
<b>Figura 08 -</b> Fotografia do teste de difusão em ágar pela técnica dos poços – 8A) extrato das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> ; CN – controle negativo; CP - controle positivo; Poços: 1– 100 mg/mL; 2 – 200 mg/mL; 3 – 300 mg/mL; 8B) Halo de inibição contra <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	<b>56</b>

Figura 09 - Comparação da atividade antibacteriana das cascas da <i>Terminalia fagifolia</i> entre as concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL e o controle positivo. ....	57
Figura 10 - Comparação da atividade antibacteriana das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> entre as concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL e o controle positivo. ....	58
Figura 11 - CIM seriada do extrato da casca da <i>Terminalia fagifolia</i> .....	61
Figura 12 - CIM seriada do extrato das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> .Erro! Indicador não definido.	
Figura 13 - Fotografia do teste de Concentração Inibitória Mínima do extrato da casca da <i>Terminalia fagifolia</i> - na concentração de 300 mg/mL contra <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	63
Figura 14 - Fotografia do teste de Concentração Inibitória Mínima do extrato das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> - na concentração de 300 mg/mL contra <i>Staphylococcus aureus</i> ....	63
Figura 15 - CIM – gradiente de concentração do extrato da casca da <i>Terminalia fagifolia</i> . ....	64
Figura 16 - CIM – gradiente de concentração do extrato das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> . ....	64
Figura 17 - CIM - Gradiente de concentração do extrato da casca da <i>Terminalia fagifolia</i> nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL. ....	68
Figura 18 - CIM - Gradiente de concentração do extrato das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL.....	69
Figura 19 - Ensaio de citotoxicidade do DMSO sobre as culturas celulares NIH 3T3, L929, PC3 e B16F10.....	70
Figura 20 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células NIH 3T3 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = $p < 0,001$ para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....	71

<b>Figura 21 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células NIH 3T3 após tratamento com extrato das folhas com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = p &lt; 0,001 para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 22 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células L929 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = p &lt; 0,001 para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 23 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células L929 após tratamento com extrato das folhas com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = p &lt; 0,001 para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 24 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células PC3 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = p &lt; 0,001 para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 25 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células PC3 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = p &lt; 0,001 para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 26 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células B16F10 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = p &lt; 0,001 para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 27 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células B16F10 após tratamento com extrato das folhas com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = p &lt; 0,001 para comparação com grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Dados Georreferenciais da espécie coletada para o estudo.....	40
Tabela 02 - Critérios para a atividade antimicrobiana dos extratos segundo Parekh e Chanda (2007) e Santos et al. (2007). .....	45
Tabela 03 - Classificação do grau de citotoxicidade de materiais de acordo com a porcentagem de viabilidade celular de acordo com Sletten e Dahl (1999) e Lönroth e Dahl (2001, 2003) (comparado ao grupo controle negativo).....	53
Tabela 04 - Rendimento dos extratos utilizados nos ensaios. ....	55
Tabela 05 - Análises estatísticas do controle positivo e as concentrações (100, 200 e 300 mg/mL) do extrato da casca testado contra o microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i> . ...	58
Tabela 06 - Análises estatísticas do controle positivo e as concentrações (100, 200 e 300 mg/mL) do extrato das folhas testado contra o microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i> .	59
Tabela 07 - Comparação da atividade antibacteriana entre os extratos da casca e das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> . .....	59
Tabela 08 - Comparação da atividade antibacteriana entre os extratos da casca e das folhas da <i>Terminalia fagifolia</i> . .....	62

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 01 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 100 mg/mL..... 65**
- Quadro 02 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 200 mg/mL..... 65**
- Quadro 03 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 300 mg/mL..... 66**
- Quadro 04 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 100 mg/mL..... 66**
- Quadro 05 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 200 mg/mL..... 67**
- Quadro 06 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 300 mg/mL..... 67**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AH</b>	- Antioxidante
<b>AMH</b>	- Ágar Mueller Hinton
<b>%AA</b>	- Porcentagem de Atividade Antioxidante
<b>BHA</b>	- Butil-Hidroxi-Anisol
<b>BHI</b>	- Brain-Heart Infusion
<b>BHT</b>	- Butil-Hidroxi-Tolueno
<b>CIM</b>	- Concentração Inibitória Mínima
<b>CE<sub>50</sub></b>	- Concentração Eficiente 50%
<b>CI<sub>50</sub></b>	- Concentração Inibitória 50%
<b>CN</b>	- Controle Negativo
<b>CP</b>	- Controle Positivo
<b>DMEM</b>	- Dulbecco/Vogt modified Eagle's (Harry Eagle) Minimal Essential Medium
<b>DMSO</b>	- Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>D.O.</b>	- Densidade Óptica
<b>E.L</b>	- Extrato Liofilizado
<b>ERO</b>	- Espécie Reativa de Oxigênio
<b>HTO</b>	- Herbário do Tocantins
<b>IPEN</b>	- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
<b>ISO</b>	- International Organization for Standardization

<b>MTS</b>	-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium
<b>MRSA</b>	- <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Penicilina
<b>M.S.T.</b>	- Massa Seca Total
<b>NCCLS</b>	- National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>OMS</b>	- Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	- Tampão fosfato salino
<b>PMS</b>	- Phenazine methosulfate
<b>R</b>	- Radicalar
<b>RPMI</b>	- Roswell Park Memorial Institute Medium
<b><i>S. aureus</i></b>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>TEA</b>	- Teor de Extrato Total
<b><i>T. fagifolia</i></b>	- <i>Terminalia fagifolia</i>
<b>UI</b>	- Unidade Internacional
<b>UFC</b>	- Unidade Formadora de colônia
<b>UFT</b>	- Universidade Federal do Tocantins
<b>USP</b>	- Universidade de São Paulo



## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>B16F10</b>	- Melanoma de camundongo
<b><math>\beta</math></b>	- Beta
<b>°C</b>	- Graus Celsius
<b>C</b>	- Densidade óptica Média do Controle
<b>D</b>	- Densidade Óptica Média de Cada Tratamento
<b>EtOH</b>	- Extrato Etanólico
<b>g</b>	- Grama
<b>HEP2</b>	- Células de Câncer de Laringe
<b>H2P2</b>	- Células Mucoepidermóide
<b>L</b>	- Litro
<b>L929</b>	- Fibroblastos de Camundongos
<b><math>\pm</math></b>	- Mais ou menos
<b>MCF – 7</b>	- Câncer de Mama
<b><math>\mu</math>g</b>	- Micrograma
<b><math>\mu</math>g/mL</b>	- Micrograma por mililitro
<b><math>\mu</math>L</b>	- Microlitro
<b>mg</b>	- Miligrama
<b>mg/mL</b>	- Miligrama por mililitro
<b>Mi</b>	- Massa inicial
<b>Min</b>	- Minuto

<b>Mf</b>	- Massa final
<b>mL</b>	- Mililitro
<b>mm</b>	- Milímetro
<b>nm</b>	- Nanômetro
<b>NIH 3T3</b>	- Fibroblastos de Camundongos
<b>%</b>	- Por cento
<b>PC3</b>	- Câncer de Próstata Humano
<b>TFHEXF</b>	- Fração Hexânica

## RESUMO

A procura por novas alternativas terapêuticas, como as que utilizam as plantas medicinais, tem despertado grande interesse da comunidade científica na busca por tratamentos mais eficientes para as doenças causadas por microrganismos patogênicos e terapias mais eficazes contra o câncer. *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc é uma planta medicinal encontrada no Cerrado brasileiro, usada popularmente no tratamento de aftas e tumores. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante dos extratos brutos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*, avaliar a atividade citotóxica dos extratos em linhagens celulares normais NIH 3T3 e L929 e em linhagens celulares tumorais PC3 e B16F10. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de difusão em ágar pela técnica dos poços e pela Concentração Inibitória Mínima (CIM). No método de difusão em ágar pela técnica dos poços o extrato da casca da *Terminalia fagifolia* apresentou melhor atividade antibacteriana do que o extrato das folhas. Na determinação da Concentração Inibitória Mínima, tanto o extrato da casca quanto o extrato das folhas apresentaram CIM de 75 mg/mL, possuindo dessa forma uma boa atividade antimicrobiana, pois nessa concentração inibiram o crescimento de 100% e mais de 90% do inoculo bacteriano, respectivamente. A avaliação da atividade citotóxica foi investigada através do ensaio MTS. Os resultados adquiridos mostraram que os extratos apresentam viabilidade celular para as células normais NIH 3T3 e L929 e citotoxicidade para as células tumorais PC3 e B16F10. Dessa forma, torna-se necessária a continuidade dos estudos com essa planta, pois ambos os extratos apresentaram atividades antimicrobianas e antitumorais muito promissoras.

Palavras-chave: antibacteriana, citotoxicidade, *Terminalia fagifolia*, tumorais, viabilidade celular.

## ***ABSTRACT***

The search for new therapeutic approaches, such as the ones with medicinal plants, has been raising great interest of the scientific community in the search for more effective treatments for diseases caused by pathogenic microorganisms and more effective cancer therapies. *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc is a medicinal plant found in the Brazilian Cerrado, commonly used in the treatment of cancer sores and tumors. This study aimed to evaluate the antibacterial and antioxidant activity of the rough ethanolic extracts of the barks and leaves of *Terminalia fagifolia* and assay the cytotoxic activity of the extracts in normal cell lineages NIH 3T3 and L929 and tumor cell lineages PC3 and B16F10. The antibacterial activity was determined by agar diffusion method by well technique and by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). In the agar diffusion technique the *Terminalia fagifolia* bark extract showed better antibacterial activity than the extract of the leaves. In the determination of Minimum Inhibitory Concentration, both bark and leave's extract showed MIC of 75 mg/ml, having thus a good antimicrobial activity, once, in this concentration, they inhibited the growing of bacterial inoculum in 100% and more than 90%, respectively. The evaluation of the cytotoxic activity was investigated by MTS assay. The obtained results showed that the extracts has cell viability for normal cells NHI 3T3 and L929 and cytotoxicity for tumor cells PC3 and B16F10. Thus, it becomes necessary to continue the studies with this plant, once both extracts showed very promising antimicrobial and antitumor activities.

keywords: antibacterial, cytotoxicity, *Terminalia fagifolia*, tumor cells, cell viability.

## 1 INTRODUÇÃO

Os conhecimentos dos benzedores, curandeiros e Xamãs adquiridos dos magos e feiticeiros do passado, estão na atualidade sendo avaliados nos laboratórios científicos, para a comprovação de informações, proporcionando a descoberta de novos medicamentos (DI STASI, 1996) posto que desde a antiguidade os povos tradicionais desvendam e resgatam os conhecimentos relacionados aos elementos que os cercam na natureza. Esses saberes a respeito dos vegetais têm como finalidade tratar, curar ou melhorar sintomas de doenças que percorreram os séculos e continuam até os dias atuais e os quais são utilizados por boa parte da população mundial como alternativa terapêutica (JORGE e MORAIS, 2003).

No Brasil, os povos indígenas, considerados pioneiros, já utilizavam as plantas na alimentação, no preparo de corantes e para curar suas doenças, adicionalmente após a colonização, os conhecimentos das culturas africanas e europeias somaram-se às práticas indígenas locais (RODRIGUES e CARVALHO, 2001a).

Essas práticas botânicas, além de fazerem parte das tradições culturais dessas comunidades locais e colonizadoras, promoveram a conservação de Biomas como, por exemplo, o Cerrado, cenário de uma relevante ocupação por comunidades remanescentes de negros (ALCORN, 1995; BALICK e COX, 1997; COELHO, 2009).

O Bioma Cerrado, o segundo maior Bioma do Brasil, abrange uma grande quantidade e qualidade da diversidade biológica, ocupando mais de 200 milhões de hectares, compondo os estados de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Tocantins, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, e parte dos estados do Paraná, Bahia, Ceará, Maranhão, Rondônia, Roraima, Amazônia, Pará e São Paulo (DIAS, 1992; MENDONÇA et al., 1998; RODRIGUES e CARVALHO, 2001b; GUARIM-NETO e MORAIS, 2003; MACHADO et al., 2004). Vários autores apresentam e defendem a importância deste Bioma por ele ser detentor de uma flora vascular que ultrapassa as doze mil espécies, das quais uma grande quantidade apresenta valor alimentício e medicinal (ALMEIDA et al., 1998; SOUZA e FELFILI, 2006; SANO et al., 2008; MOREIRA e GUARIM-NETO, 2009; FORZZA et al., 2010; DEUS, 2011).

Para Ratter et al. (2003) 44% da flora deste Bioma são endêmicas, sendo então considerada a savana tropical mais diversificada do mundo.

Apesar da sua relevância ecológica e econômica, o Cerrado está em processo de devastação em função da ocupação e utilização dos recursos naturais de forma desordenada (PIRES e SANTOS, 2000), levando à perda de material genético vegetal nativo, praticamente desconhecido do ponto de vista científico (VIEIRA e MARTINS, 2000). Se não houver medidas racionais drásticas, o Cerrado pode desaparecer por completo até 2030 (MACHADO et al., 2004) esta triste observação é reforçada pelos estudos de Guarim-Neto e Morais (2003), que afirmam que o Cerrado é atualmente a vegetação em maior risco no país, sendo considerado um dos *hotspots*<sup>1</sup> mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000).

Inúmeras são as espécies de plantas de ocorrência no Cerrado que devem ser foco de investigações, ampliando desta forma, a possibilidade de descobertas de novas moléculas para tratamentos de doenças, inclusive as consideradas graves e/ou de difícil controle e cura, como por exemplo, o câncer (COSTA - LOTUFO et al., 2010).

A título de informação, até o momento apenas cerca de 2% das plantas superiores foram avaliadas para identificação de atividades antineoplásicas (COSTA - LOTUFO et al., 2010).

Por outro lado, e não menos importante, os vegetais constituem uma importante fonte de busca de novas drogas antimicrobianas, considerando que os produtos naturais obtêm uma diversidade molecular superior aos derivados de processos de síntese química (NOVAIS et al., 2003), os quais estão se tornando limitados, caros e, em muitos casos, inexistentes, aumentando dessa forma o uso de drogas com potenciais tóxicos ao homem (NATIONAL CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002).

Desta forma, para que obtenhamos progressos, é fundamental o empenho de grupos de pesquisa, que sejam dirigidos para a descoberta de novas drogas vegetais e o desenvolvimento de melhores métodos analíticos de controle de qualidade (COSTA - LOTUFO et al., 2010; NASCIMENTO, 2008; HOSTETTMANN et al., 2003; CRAGG et al., 1993).

---

<sup>1</sup> Hotspot foi um termo criado em 1988 pelo ecólogo inglês Norman Myers para definir áreas prioritárias para conservação, isto é, de alta biodiversidade e ameaçada no mais alto grau, sendo que no Brasil há dois hotspots: Mata Atlântica e Cerrado (CI-Brasil, 1999).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas Medicinais

Povos como os Chineses, Árabes, Caldeus, Egípcios, Incas e muitos outros dominaram, no passado, os segredos da ação das plantas sobre o organismo humano (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). Em suas experiências com ervas, tais civilizações observavam reações diferentes nos indivíduos, muitas vezes com curas, porém em outros casos com efeitos colaterais severos ou até mesmo morte (TOMAZZONI; NEGRELLE e CENTA, 2006). Na Idade Média e na Era Moderna, as escolas médicas só diplomavam aqueles que demonstrassem um profundo conhecimento sobre as plantas medicinais (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). Este conhecimento empírico foi a base para as descobertas humanas das propriedades benéficas ou nocivas dos vegetais, que são utilizados até hoje nas pesquisas farmacológicas (TOMAZZONI; NEGRELLE e CENTA, 2006).

A quantidade de plantas existentes no planeta, reconhecida sob o ponto de vista científico, situa-se entre 250 a 500 mil espécies, sendo que somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor, avaliadas sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). O valor da biodiversidade, principalmente nas florestas tropicais, tem sido muito discutido pela indústria farmacêutica, devendo-se considerar ainda que os tratamentos baseados em produtos naturais são de uso corrente por 80% da população mundial (JOYCE, 1994; BIAVATTI, 2001). A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de plantas tem permitido descobrir muitos fármacos clinicamente úteis para tratar muitas doenças (SARTORI, 2005).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais da metade dos habitantes do planeta, especialmente aqueles de países pobres e em desenvolvimento, fazem uso de algum tipo de erva na busca de alívio de sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total pelo menos 30% ocorrem por indicação médica (ESTRELA, 1995). Há informações de que os produtos naturais e as preparações fitoterápicas são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento (COSTA, 2010). Diante desse panorama, a OMS vem estimulando os países, ricos em biodiversidade, a elaborarem políticas e a desenvolverem produtos de qualidade para o uso na saúde pública (PIMENTA et al. 2012).

No Brasil, a dimensão da importância de pesquisas etnobotânicas é dada pela sua alta diversidade cultural e biológica, as quais se encontram intimamente ligadas. O país apresenta variados agrupamentos com mais de uma centena de povos indígenas, milhares de quilombolas, pescadores, ribeirinhos, extrativistas e rurais e detém cerca de 22% de todas as espécies de plantas descritas no mundo. Estas são fontes de recursos naturais genéticos, simbólicos e econômicos para a subsistência e reprodução sociocultural desses povos (ALBUQUERQUE e LUCENA, 2004). Portanto, uma manutenção constante das comunidades associada a uma conservação duradoura dos recursos naturais é fundamental para explicar não só a preservação destes, mas também, as prováveis potencialidades acerca dos saberes botânicos, que são uma inestimada fonte de conhecimento etnobotânico (COELHO, 2009).

Em relação a esses aspectos Martin (2001) nos elucida que:

Los conocimientos etnobotánicos locales pueden conservarse como parte integral de los sistemas culturales-ecológicos vivos, ayudando con ello a sostener el sentimiento de estima por estos conocimientos y las prácticas culturales locales, fortaleciendo asimismo el vínculo entre las comunidades y el medio ambiente, el cual es tan imprescindible para la conservación de los recursos naturales (MARTIN, 2001, p.xiv).<sup>2</sup>

Nesse sentido, esse conhecimento além de envolver profissionais de várias áreas, pode promover estudos inter e/ou multidisciplinares que investiguem, sob vários olhares, as relações planta-homem (ALBUQUERQUE, 2005; MARTIN, 2001).

No entanto, apesar da grande riqueza de saberes e práticas culturais a respeito das plantas, de acordo com AMORIM et al. (2003), no Brasil apenas 8% das espécies vegetais nativas foram estudadas em busca de moléculas bioativas.

Das espécies catalogadas, estas podem ser medicinais, aromáticas ou apresentar outras utilidades. Entretanto essa biodiversidade encontra-se seriamente ameaçada pelo ritmo atual de extinção de plantas que já é entre 50 e 100 vezes maior que as taxas médias observadas no passado (GUERRA, 2003). As principais causas de perda da diversidade genética têm sido

---

<sup>2</sup> *Conhecimento etnobotânico local pode ser preservado como parte integrante dos sistemas vivos cultural-ecológicos, contribuindo assim para sustentar o sentimento de estima para com essas práticas de conhecimento local e culturais também reforçar a ligação entre as comunidades e o meio ambiente, que é tão essencial para a conservação dos recursos naturais (Martin, 2001, p.xiv).*



associadas à destruição e à fragmentação dos ecossistemas e aos estresses ambientais como poluição e as mudanças climáticas globais (BAUR e SCHMID, 1996).

De acordo com Myers et al. (2000), o Cerrado é considerado como uma das 25 áreas de grande biodiversidade mais ameaçadas do planeta. Porém, Aguiar et al. (2004) relatam que apesar das pesquisas e o conhecimento básico sobre a diversidade biológica do Cerrado serem ainda incipientes, é possível ter-se uma ideia da riqueza potencial existente no bioma.

Na flora do Cerrado existem em torno de 12.356 espécies (MENDONÇA et al., 2008), sendo que destas, cerca de 500 espécies são utilizadas medicinalmente pela população (GUARIM-NETO e MORAES, 2003).

O Ministério do Meio Ambiente (2013) acrescenta que o Cerrado tem grande importância social, pois muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais, incluindo etnias indígenas, raizeiros, ribeirinhos, babaqueiras, vazanteiros e comunidades quilombolas que, juntas fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro, e detêm um conhecimento tradicional de sua biodiversidade.

No Estado do Tocantins, praticamente 92% da vegetação é composta pelo bioma Cerrado (BRASIL, 2008), sucumbindo por ser considerado a nova fronteira agrícola do país. Este processo de antropização que vem ocorrendo na região poderá impedir a descoberta de espécies animais, vegetais, microrganismos que biossintetizam substâncias bioativas até então não desvendadas, causando enorme prejuízo para a busca por tratamentos mais eficazes para diversas patologias (SILVA, 2011).

## **2.2 Etnobotânica**

O termo “etnobotânica” foi utilizado pela primeira vez no ano de 1895 pelo botânico J. M. Harshberger, ao publicar a obra “The purposes of ethnobotany” onde apresentou estudos do uso das plantas por uma sociedade aborígine, relacionando aspectos simbólicos, ecológicos e culturais (SOERJATO et al., 2005).

Ford (1978) refere-se à etnobotânica como "o estudo das inter-relações diretas entre seres humanos e plantas" e Alcorn (1995) nos traz que estas inter-relações ocorrem em sistemas dinâmicos.

Inicialmente, a etnobotânica estava restrita aos povos aborígenes ou sociedades “primitivas”, e hoje atua em um vasto campo incluindo conhecimento sobre povos de diferentes matrizes culturais e organizações sociais, cujas interações estão estabelecidas em diferentes unidades de paisagem e regiões do planeta (ALMADA, 2010; CARNIELLO et al., 2010). Portanto, a etnobotânica conecta a botânica à antropologia cultural, consolidando-se desta forma como uma ciência que permeia por uma gama de disciplinas agregadas abordando a interação que grupos populacionais têm com as plantas (ALBUQUERQUE, 2005; OLIVEIRA, 2008).

Um dos principais objetivos da etnobotânica é investigar e estudar o uso de plantas com finalidades medicinais pelas populações tradicionais, com o propósito de oferecer elementos práticos para outros investigadores nas áreas de fitoquímica e farmacologia, favorecendo a descoberta de novos medicamentos (ALBUQUERQUE, 2005).

No Brasil, muitos pesquisadores estão interessados nessa nova área de pesquisa, demonstrando que há uma consciência sobre o grande potencial da biodiversidade brasileira, portanto um celeiro para busca de novas substâncias. Embora tenham a mão à matéria-prima mais abundante e diversificada do planeta, deve-se priorizar os estudos nas áreas com elevada degradação ambiental, cujas espécies que apresentam maior risco de extinção concentram-se no Cerrado e Mata Atlântica (PINTO et al., 2002).

O bioma Cerrado apresenta uma grande diversidade taxonômica em níveis superiores, sendo de grande importância para pesquisas com plantas, pois, quanto maior é o distanciamento filogenético entre as espécies, maior é a diferença e diversidade química entre plantas, indicando o forte potencial desta região para a descoberta de novos agentes terapêuticos (GUARIM-NETO e MORAIS, 2003).

Entretanto, segundo as observações de Machado et al. (2004), 880.000 Km<sup>2</sup> de Cerrado já foram devastados com atividades como a agropecuária, produção de carvão vegetal, especulação imobiliária e construção de hidroelétricas levando a diminuição da biodiversidade. Esta realidade, somada às possíveis perdas dos conhecimentos tradicionais, justificam estudos que busquem conhecer o amplo espectro das diversidades vegetais e culturais inseridos neste bioma.

### 2.3 Comunidades Tradicionais

No Brasil, construiu-se ao longo do tempo uma rica cultura popular a respeito do uso de ervas medicinais. Esse conhecimento deu-se por meio das antigas práticas indígenas em conjunto com as práticas africanas e a dos colonizadores portugueses (ALVES e SILVA, 2003). Durante a colonização, os escravos africanos que desembarcaram no Brasil, trouxeram junto de si, plantas com propriedades farmacológicas descobertas de forma empírica, que utilizavam para tratar suas doenças e para usarem em seus rituais religiosos. No entanto, os índios que já habitavam os solos brasileiros, possuíam grande conhecimento e prática com as plantas medicinais, porém, acreditavam que havia uma influência divina, e através dos pajés esse conhecimento era passado às gerações seguintes. Quando os colonizadores europeus aportaram no Brasil, além de encontrarem uma vasta flora medicinal, passaram a utilizar os conhecimentos das comunidades tradicionais para aprimorarem seus saberes a respeito dos medicamentos fitoterápicos e para atenderem suas necessidades alimentares (LORENZI e MATOS, 2002).

Diegues (2000) nos esclarece que as “sociedades tradicionais” são espaços necessários à reprodução cultural, social e econômica dos povos e comunidades tradicionais, sejam eles utilizados de forma permanente ou temporária, observando, no que diz respeito aos povos indígenas e não indígenas (quilombolas, ribeirinhos, pantaneiros, caiçaras, extrativistas, entre outros) que historicamente reproduzem seu modo de vida, de forma mais ou menos isolada, com base em modos de cooperação social e formas específicas de relações com a natureza. Essa noção refere-se tanto a povos indígenas quanto aos segmentos da população nacional que desenvolveram modos particulares de existência, adaptados a nichos ecológicos específicos.

Dessa forma, ao nos depararmos com essa valiosa construção de saberes no Brasil, a população vem utilizando as plantas medicinais para tratar doenças durante séculos (GOTTIEB e MORS, 1993; TOMAZZONI; NEGRELLE e CENTA, 2006; VEIGA JÚNIOR, 2008).

Do início do século XVI até a segunda metade do século XIX, período de escravidão no Brasil, os negros escravos fugiam dos cativeiros e se embreavam nas matas, originando dessa forma os grupos chamados de quilombos (CARNEIRO, 2001).

Atualmente no Brasil, os remanescentes de antigos quilombos são conhecidos popularmente como: “mocambos”, “comunidades negras rurais,” ”quilombos contemporâneos”, “comunidades quilombolas” ou “terras de preto” e referem-se ao mesmo patrimônio territorial e cultural (ANJOS e CYPRIANO, 2006).

Um dos fatores, que favorecia a formação dos quilombos no Brasil, era o tipo de terreno. A capitania do estado de Goiás possuía ecossistemas que protegiam escravos fugidos (LOPES, 2009). Nessa região havia a predominância do Cerrado, segunda maior formação vegetal do país, considerado como tal em virtude de sua fisionomia, fitofisionomia, biodiversidade e que possuía originalmente uma área de 2 milhões de quilômetros quadrados (RIBEIRO e WALTER, 1998) com chapadões, vãos, serras, morros, depressões, vales estreitos e rios encaixados (ALMEIDA, 2010) que possibilitaram os negros escravos a se refugiarem.

Nesse contexto, o bioma Cerrado é um local de importante ocupação por comunidades remanescentes de negros, visto que nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Piauí, São Paulo e Tocantins, onde há predominância do bioma, a Fundação Cultural Palmares já certificou em torno de 1798 comunidades (FUNDAÇÃO CULTURAL PALMARES, 2016).

Estas comunidades apresentam uma íntima relação com os recursos naturais, encontrados nos ambientes ocupados por elas, com predominante utilização de plantas para fins medicinais (SANTOS et al., 2006; CALIXTO e RIBEIRO, 2002; RODRIGUES e CARLINI, 2003). A planta é vista como recurso terapêutico histórico preservado, portanto de grande importância para os quilombolas, não só pelas questões culturais, mas também pelas dificuldades de acesso aos medicamentos alopáticos (LOPES, 2009).

Entretanto, estudos envolvendo a relação planta-homem em comunidades quilombolas no Tocantins e no Cerrado ainda têm sido pouco documentados (COELHO, 2009).

Mumbuca (nome dado por indígenas a uma espécie de abelha) é uma importante comunidade dessa região, que se originou no final do século XIX a partir da chegada de duas famílias de negros vindos da Bahia, com o propósito de povoar a região da bacia do rio do Sono. Essa comunidade foi formada a partir da miscigenação de negros e índios da região, provavelmente os da nação Xerente (LOPES, 2009).

Pires e Oliveira (2006) relatam que os primeiros negros a chegarem a essa região fugiam da seca, procurando terra com bastante água para o plantio. Acreditavam que o Jalapão lhes proporcionaria melhores condições de vida.

O povoado Mumbuca é considerado uma comunidade tradicional. Diegues (1996) traz a seguinte definição para comunidades tradicionais:

“Comunidades tradicionais estão relacionadas com um tipo de organização econômica e social com reduzida acumulação de capital, não usando força de trabalho assalariado. Nela produtores independentes estão envolvidos em atividades econômicas de pequena escala, como agricultura, pesca, coleta e artesanato [...] o conhecimento tradicional pode ser definido como o saber e o saber fazer – a respeito do mundo natural [...] transmitidos, em geral, oralmente de geração em geração” (Diegues, 1996 p. 87).

Santos et al. (2006) realizaram levantamento etnobotânico nas comunidades remanescentes da Barra do Aroeira e Mumbuca na região do Jalapão e constataram que, nessas comunidades são utilizadas várias plantas com fins medicinais, com propriedades calmantes, cicatrizantes expectorantes, vitamínicas, no tratamento de doenças crônicas como hipertensão, doenças parasitárias e também para a cura de envenenamento causado pela picada de animais peçonhentos. O uso intenso das plantas medicinais nessas comunidades deve-se também ao difícil acesso aos centros de saúde, da precariedade do atendimento oferecido pelos órgãos públicos além do agravante que ocorre nos períodos chuvosos onde os moradores de locais mais distantes ficam ilhados, tendo que esperar a água baixar.

Esse conhecimento acumulado pelas sociedades tradicionais, através de séculos de estreita relação com a natureza, desempenha papel fundamental para a manutenção da biodiversidade, assegurando a utilização racional dos recursos naturais. Sendo assim, cada vez mais se reconhece que a forma de exploração dos ambientes naturais por povos tradicionais pode nos fornecer subsídios para estratégias de manejo e exploração que sejam sustentáveis em longo prazo (MONTELES e PINHEIRO, 2007; AMOROZO, 2002) além de nos fornecer indicações de plantas com grandes potenciais farmacológicos.

## 2.4 Antioxidantes

Muitas pesquisas sobre os antioxidantes vêm sendo realizadas nos últimos anos, devido, principalmente, às descobertas sobre os efeitos dos radicais livres no organismo. Os radicais livres são moléculas orgânicas ou inorgânicas e átomos, que contêm um ou mais elétrons não emparelhados, instáveis e muito reativos, que causam danos às células e patologias relacionadas como artrite, catarata, câncer, diabetes, disfunção cerebral, aterosclerose, doenças cardíacas e neurodegenerativas, dentre outras (SOUSA, 2007; KUMARAN e KUMARAN, 2006). Esses radicais livres, também chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO), são continuamente produzidos pelo organismo. Calcula-se que aproximadamente 5% de todo oxigênio inspirado transforma-se em ERO e geralmente são inativados pelas defesas antioxidantes do organismo. Entretanto, quando estas são geradas em grandes quantidades, seja por aumento de produção por processos mórbidos ou fatores ambientais, seja por redução da capacidade antioxidante, tornam-se maléficas para todas as estruturas orgânicas. Isto é agravado na presença de íons, tais como ferro e cobre. Os radicais livres podem causar lesões de células, membranas celulares, e várias condições clínicas como: injúrias da isquemia, enfarte, câncer, artrite, várias doenças sanguíneas, doenças degenerativas, como Parkinson, Alzheimer (DANIEL, 2004; REZENDE, 2005).

Os antioxidantes podem bloquear ou retardar as ações dos radicais livres. Essas ações podem ser basicamente de duas categorias: naturais e sintéticas. Na categoria dos sintéticos estão incluídos o BHA (butil-hidroxi-anisol) e o BHT (butil-hidroxi-tolueno), frequentemente utilizados em alimentos contendo lipídios, porém apresentam problemas de segurança e toxicidade. Desta forma, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com potencial antioxidante que possam substituí-los ou serem usados em associação (SOUSA, 2007).

Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes de origem natural e têm chamado muito a atenção por sua função química e apresentar propriedades redutoras. Apresentam-se de várias formas, como: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (SILVA, 2010). Os flavonóides contribuem para a ação antioxidante reduzindo os níveis de radicais livres e protegem as células pelo do fenômeno da peroxidação das membranas lipídicas neutralizando os radicais livres, podendo-se destacar ainda a sua ação inibitória sobre a enzima tirosinase (AMORIM, 2007).

Ao analisarmos essas características, pode-se observar que os flavonoides têm grande importância na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA et al., 2007).

Existem vários métodos que são utilizados para a determinação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas. O mais usado consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH• (SOUSA et al., 2007).

## **2.5 A espécie *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc e o gênero *Terminalia***

A espécie *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc faz parte da família Combretaceae, e é constituída por aproximadamente 600 espécies distribuídas em 18 gêneros, sendo o gênero *Terminalia* composto por cerca de 200 espécies. Apresentam muitas espécies nas Florestas Tropicais do sudeste da Ásia, na África, nas Florestas Tropicais das Américas, com representantes na Savana Brasileira (PETTIT et al., 1996; ROGERS e VEROTTA, 1996; LAWRENCE, 1951). É conhecida popularmente como capitão-do-mato, mirindiba e pau-de-bicho no cerrado brasileiro (AYRES et al., 2009). Também chamada vulgarmente de “camaçari”, “cachaporra-do-gentio”, “capitão-do-seco”. É uma planta semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, secundária, característica das matas xerófitas, do Vale do São Francisco e dos cerrados e cerradões secos do Brasil central e Pantanal Mato-grossense. Floresce durante os meses de agosto-outubro (LORENZI, 1998).

*Terminalia fagifolia* é uma árvore hermafrodita de até 10 m densamente fulvo-vilosa, exceto os frutos acráceos ou acinzentado-pubescentes e o androceu e gineceu glabrosos. Folhas alternadas congestas com 3 a 8 x 1 a 3 cm, oboval, oblanceolado ou elíptico, membranáceo; ápice mucronado, obtuso ou agudo; nervuras secundárias ascendentes, mais ou menos ocultas pelo indumento; pecíolo com até 8 mm de comprimento, biglanduloso. Inflorescência racemo axilar pêndulo, congesto, bracteado, com aproximadamente 15 flores. Flores com cerca de 7 mm de comprimento, hermafroditas ou masculinas, sésseis; cálice

campanulado com 4 a 5 lobos ovais; pétalas livres, rudimentares, logo caducas; estames 8 a 10, exsertos, em duas séries; filetes longos, anteras rimosas, elípticas, com conectivo apiculado; ovário ínfero, unilocular, anguloso, com uma constrição logo abaixo do cálice, com 2 a 3 óvulos pêndulos. Fruto samaroide em torno de 7 mm de comprimento, transverso-elíptico, bialado; núcleo seminífero central imperfeitamente delimitado; alas descentralizadas, papiráceas, finamente estriadas; semente adnata ao endocarpo (ALMEIDA et al., 1998) (Figura 01).



**Figura 01 - Árvore, folhas e frutos da *Terminalia fugifolia* Mart. et Zucc  
(Fotografias por Patrícia Siqueira de Melo Rodrigues – Comunidade Mumbuca - TO)**

É árvore melífera e ornamental. Os frutos secos são utilizados como artesanato, na montagem dos arranjos. A madeira é utilizada na marcenaria, carpintaria e construção civil. As cinzas das cascas são usadas em curtumes para curtir couro (ALMEIDA et al., 1998)



A casca e o caule são utilizados na medicina popular no combate a aftas e tumores (AYRES et al., 2009) e também como digestivo no tratamento de afecções do estômago e do intestino (FREIRE et al., 1992).

O gênero *Terminalia* é conhecido por ser rico em metabólitos secundários, tais como triterpenos pentacíclicos e seus derivados glicosilados, taninos, flavonóides e outros compostos aromáticos. Em virtude de muitas plantas deste gênero serem consideradas medicinais, estão sendo efetuados diversos estudos de espécies de *Terminalia*, os quais levaram ao isolamento de metabólitos secundários com atividades biológicas consideráveis, destacando-se: anticancerígena, antimalárica, antifúngica, hepatoprotetora, antibacteriana, anti-herpes e anti-HIV (GARCEZ et al., 2005), hipoglicêmica, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antioxidante, antiulcerogênica, antidepressora, tripanocida, moluscicida, imunomodulatória e cardioprotetor, dentre outros (ARAÚJO e CHAVES, 2005).

Vários estudos realizados com a espécie *Terminalia fagifolia* demonstraram que o extrato etanólico da casca apresenta atividades citotóxica e antioxidante (GARCEZ et al., 2006) e o extrato etanólico das folhas apresenta forte potencial antioxidante no ensaio do DPPH (SOUSA, 2007).

Ayres et al. (2009), afirmam que a principal substância isolada e responsável pela atividade antioxidante nas folhas da *Terminalia fagifolia* é a (+) – catequina.

Estudos etnofarmacológicos mostraram que *Terminalia fagifolia* apresenta atividade citotóxica sobre células de carcinoma de laringe (HEP2) e células mucoepidermoide (H292) de câncer de pulmão (GARCEZ et al., 2006).

Cerqueira et al. (2004) revelaram que análises realizadas com extratos desta planta detectaram a presença de atividade antidepressiva e potencializadora de barbitúricos.

Em outras análises realizadas Cruz et al. (2004) obtiveram atividades inibitórias do crescimento de promastigotas de *Leishmania major*.

Araújo et al. (2015) observaram que o extrato etanólico, aquoso, hidroalcoólico e frações da casca apresentaram atividade antibacteriana para o microrganismo *Staphylococcus aureus* e citotoxicidade moderada para as linhas de células NIH 3T3 e atividade antitumoral potencial em células MCF – 7 (câncer de mama).

Nunes et al. (2014) realizaram testes do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* administrado por via oral como tratamento para úlceras gástricas de ratos e obtiveram uma redução antiulcerogênica significativa.

Cezari (2010) realizou análise da atividade antitumoral do extrato da casca desta planta e observou que este demonstrou significância na sua ação contra o edema de pata.

## 2.6 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* são microrganismos do gênero *Staphylococcus*, composto por aproximadamente 27 espécies, classificados como cocos Gram positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positiva e que fermentam glicose com produção de ácido (BAKER et al., 2008). Apresentam-se geralmente em arranjos individuais, aos pares, tétrades, em cadeias curtas de três a quatro células ou em forma de grupamento irregular semelhante a cacho de uva (HERMANS et al., 2010). Têm aproximadamente entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e fazem parte da família Micrococcaceae (SANTOS et al., 2007). As colônias apresentam coloração que variam de branca a amarelo alaranjado por apresentarem a presença de pigmentos carotenoides (BIBERSTEIN e HIRSH, 1999; GOMES, 2013).

A espécie *Staphylococcus aureus* pode ser encontrada nas narinas e na pele e pelos de animais de sangue quente. Aproximadamente de 30-50% da população humana é portadora natural dessa bactéria, podendo se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura entre 7 a 48,5°C com uma temperatura ótima de 30 a 37°C, de acordo com Schimitt et al. (1990), e pH entre 4,2 até 9,3 com ótimo entre 7 a 7,5 de acordo com Bergdoll (1989) e em altas concentrações de cloreto de sódio, acima de 15% de NaCl, de acordo com Chapaval et al. (2009). Este microrganismo representa uma importante fonte de infecção para o próprio indivíduo ou para outras pessoas (AZULAY e AZULAY, 1997).

Algumas dessas infecções podem ser agudas e gerar focos metastáticos, espalhando-se para outros tecidos. Existem ainda o risco de infecções consideradas mais graves como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais (GELATTI et al., 2009). É importante ressaltar que estes últimos são episódios que estão frequentemente associados a uma alta morbidade e mortalidade (JONES, 1999).

Sabe-se que nos últimos séculos vem ocorrendo uma grande resistência microbiana a antibióticos, ocasionando sérios riscos a saúde coletiva, prejudicando e estabelecendo obstáculos ao controle de microrganismos patogênicos de interesse médico-sanitário (DANTAS et al., 2010).

## 2.7 Resistência Microbiana

Desde o surgimento da resistência dos patógenos, uma gama de estudos sobre as características e a capacidade dos microrganismos de adquirirem resistência às drogas já foram realizados. Esses estudos ocorrem desde o ano de 1905, iniciados pelos pesquisadores Ehrlich, Franke e Roehl, ao observarem resistência em culturas de tripanossomas, que ao serem tratadas com arsênico os mecanismos adquiridos passavam a ser hereditários (ALBERT, 1968).

No ano de 1929, Alexandre Fleming, considerado o pai da microbiologia e descobridor da capacidade de resistência das bactérias aos antimicrobianos, descreveu cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, resistente ao antibiótico, por mecanismo natural (BAUER et al., 1960).

Na década de 30, pesquisas com cepas bacterianas puras foram submetidas a concentrações de sulfonamidas a longo prazo, originando dessa forma cepas resistentes, em colônias que anteriormente se mostravam sensíveis (ALBERT, 1968).

Já nas décadas de 50 e 70, epidemias por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina e linhagens multirresistentes (MRSA), chamaram a atenção para o problema da resistência adquirida aos antimicrobianos (COUTO e PEDROSA, 1999).

Profissionais da área da saúde e pesquisadores estão preocupados diante da resistência aos antibióticos adquiridos pelas bactérias Gram positivas, o que tem se tornado um grande problema de saúde pública, especialmente os estafilococos coagulase positivo isolados de comunidades, já resistentes aos diferentes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tais como: penicilina G, penicilina V, amoxicilina, ampicilina e carbenicilina e também resistentes à metilina, oxacilina e as cefalosporinas de primeira e segunda geração (BRUMFITT e HAMILTON,

1989; HALEY et al., 1982; LACEY, 1984; MAPLE et al., 1989; MOREIRA e DAUM, 1995).

O uso indiscriminado de antimicrobianos, além de levar ao surgimento de microrganismos multirresistentes acarreta elevação dos custos das internações. As principais situações que levam à utilização inadequada de antimicrobianos são o desconhecimento das doenças infecciosas, a imprecisão do diagnóstico e a não conscientização dos profissionais acerca da seriedade do problema da resistência bacteriana (LEVY, 2004; ANDRADE, et al., 2006).

Drogas para o tratamento de infecções comuns estão se tornando limitadas e caras e em casos mais graves sendo necessário o uso de drogas com efeitos tóxicos ao homem e que geralmente se encontram em fase de testes (NATIONAL CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002).

Novas drogas antimicrobianas podem ser encontradas nos produtos naturais, pois sabe-se que a diversidade molecular destes é superior aos derivados dos processos de síntese química (NOVAIS et al., 2003). Em torno de 75% dos compostos puros naturais utilizados na indústria farmacêutica foram isolados de acordo com a medicina popular (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Além do mais, muitos consumidores estão preocupados em utilizar produtos menos agressivos ao organismo (PACKER e LUZ, 2007).

## **2.8 Prognósticos do Câncer (Neoplasias)**

Segundo Anderson et al. (1982), as várias neoplasias existentes podem se originar, basicamente, de todos os tipos de células humanas. Estas podem acometer, além dos seres humanos, a maioria dos vertebrados, alguns insetos e plantas o que têm sido de grande importância para estudos de sua origem e comportamento. As neoplasias chamadas de “benignas” crescem de forma lenta e permanecem localizadas, e geralmente não causam muitos problemas aos pacientes afetados. As chamadas malignas ou cancerosas tendem a multiplicar-se rapidamente e a se espalharem pelo corpo. Nesse caso se o tratamento não obtiver sucesso, possivelmente leva o paciente à morte. Embora os tipos descritos sejam neoplasias, são as malignas (cânceres) que acarretam os problemas mais expressivos.

Moffat et al. (2000), consideram o câncer uma doença celular que causa alterações nos mecanismos relacionados ao controle da multiplicação e diferenciação das células e dos processos relacionados com a morte celular. Bertram (2001) acrescenta que o câncer surge quando uma célula, por diversas razões, perde o controle sobre o ciclo, ou seja, sobre o processo de proliferação, diferenciação e morte, passando a se dividir descontroladamente. Duesberg e Rasnick (2000) esclarecem que esta perda do controle do ciclo celular pode ser causada por alteração da expressão de genes devida a alguma mutação ocorrida no DNA, o que determina o aparecimento da neoplasia.

Nos últimos anos, o câncer ganhou grandes proporções, tornando-se um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, espera-se 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2012).

No Brasil, as doenças tumorais neoplásicas vêm sendo indicadas como a terceira causa mortis mais frequente (INCA, 2008).

O número de casos novos de câncer de pele não melanoma estimado para o Brasil em 2016 é o de 80.850 entre homens e de 94.910 nas mulheres. O câncer de pele não melanoma é o primeiro mais incidente em homens nas regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste. Nas regiões Nordeste e Norte encontram-se na segunda posição. Nas mulheres é o mais frequente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste. Já na região Norte ocupa a segunda posição. Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul. É o câncer mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Apresenta altos percentuais de cura, se for detectado precocemente. É mais comum em pessoas com mais de 40 anos, sendo relativamente raro em crianças e negros, com exceção daqueles já portadores de doenças cutâneas anteriores. Pessoas de pele clara, sensível à ação dos raios solares, ou com doenças cutâneas prévias são as principais vítimas (INCA, 2015).

O câncer de pele não-melanoma pode apresentar tumores de diferentes linhagens. Os mais frequentes são carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos, e o carcinoma epidermoide, representando 25% dos casos. O carcinoma basocelular, apesar de mais incidente, é também o menos agressivo. O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que

determina a cor da pele) e tem predominância em adultos brancos. O melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à alta possibilidade de metástase. O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor (INCA, 2015).

Entre os homens, o câncer de próstata é o segundo mais comum (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma). É o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. Mais do que qualquer outro tipo, é considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. Alguns desses tumores podem crescer de forma rápida, espalhando-se para outros órgãos e podendo levar à morte. A estimativa em 2016 é de 61.200 novos casos no Brasil (INCA, 2015).

Atualmente a medicina tem utilizado muito de novos medicamentos para combater várias doenças, porém, apesar de existirem muitos fármacos importantes para o tratamento do câncer, ainda não há terapêutica capaz de fazer regredir totalmente as diferentes manifestações desta doença (CARVALHO, 2012). Segundo Brody (2006), a maioria dos quimioterápicos utilizados (se não todos), eliminam as células por um processo programado, que depende de energia, chamado de apoptose, e não por necrose. De acordo com Béliveau (2007) este processo auxilia o organismo na eliminação de uma célula de forma limpa, não provocando danos as células vizinhas e nem reações inflamatórias no nível dos tecidos.

Pesquisas em busca de novos fármacos com atividades antitumorais menos agressivas do que a quimioterapia têm sido de grande relevância. Ainda existe uma gama de tumores que não possuem uma terapêutica totalmente eficaz e os quimioterápicos utilizados até então, causam a diminuição de leucócitos, oportunizando o paciente a infecções, sendo que tratamentos que estimulem o sistema imunológico dos mesmos auxiliam na sua recuperação (GALLIN e SNYDERMEN, 1999; HENTY et al., 2001; NEVIN e VIJAYMMAL, 2003; PAGNO et al., 2006, ROSEMBLAT et al., 2008, BUSKÜHL, 2007).

Muitas linhas de pesquisas no intuito de obter novos compostos antineoplásicos estão em andamento, além de análises em vários sistemas tumorais e cultura de tecidos, com o objetivo de selecionar substâncias mais eficazes para o tratamento e controle das neoplasias (HUSSAR, 2000; ASLANI et al., 2000).

Muitos fármacos decorrentes de produtos naturais estão em fase de testes clínicos. A natureza é fonte rica de substâncias para realização de pesquisas e aprimoramento de novos medicamentos para tratamento de doenças como o câncer e outras doenças infecciosas. No ano de 1954, o patologista Sidney Farber utilizou pela primeira vez um produto natural para tratar um tumor a partir da Antinomicina D, um antibiótico extraído da *Streptomyces*. Nessa ocasião, foi tratado um paciente com tumor de Wilms em fase metastática onde realizou o tratamento com o primeiro fármaco antineoplásico oriundo de produto natural, o que gerou grande interesse dos cientistas nessa área de pesquisa (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e antineoplásica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc pertencente à família Combretaceae.

#### 3.2 Específicos:

- ✓ Avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*;
- ✓ Descrever as atividades antioxidantes dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*;
- ✓ Avaliar os efeitos dos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* quanto à citotoxicidade em linhagens de fibroblastos NIH 3T3 e L929 e linhagens tumorais B16F10 e PC3.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

As análises experimentais foram realizadas nos Laboratórios de Fitoquímica e Laboratório de Microbiologia Médica e Ambiental do Instituto de Biologia e Saúde Pública da Universidade Federal do Tocantins - UFT/Campus de Porto Nacional e no Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP na cidade de São Paulo.

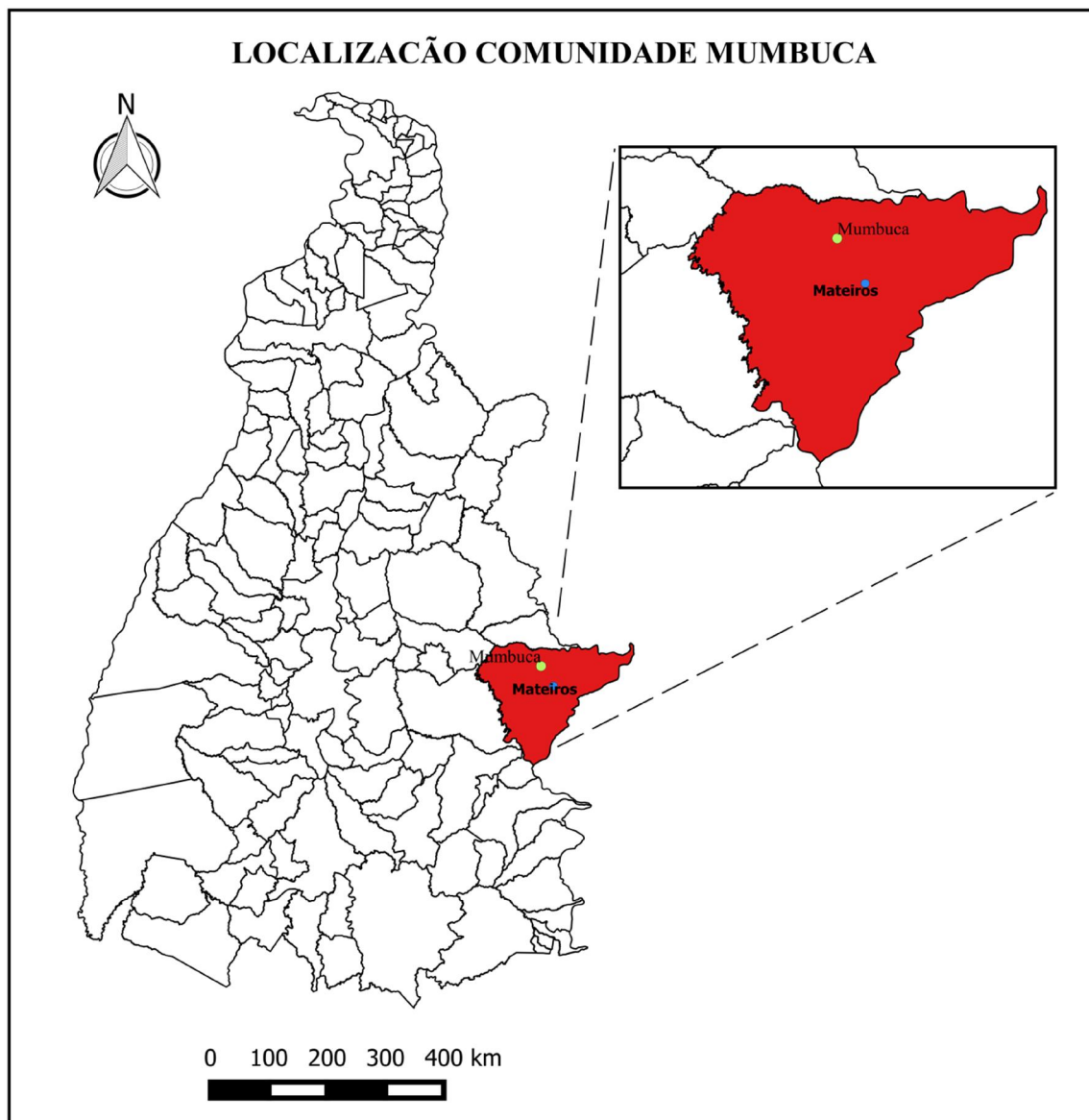
### **4.1 Seleção da espécie em estudo**

A espécie em estudo foi escolhida baseada nos conhecimentos empíricos de curandeiros, pertencentes à comunidade de remanescentes de negros quilombolas Mumbuca, localizada na região do Jalapão – TO.

### **4.2 Coleta do material botânico e Identificação**

Cascas e folhas da *Terminalia fagifolia* foram coletadas no mês de janeiro de 2015 na Comunidade Quilombola Mumbuca, a aproximadamente 40 km da cidade de Mateiros na região do Jalapão – TO (Figura 02). Para coleta e herborização do material, foram seguidas as técnicas usuais em trabalhos botânicos (FIDALGO e BONONI; MORI et al., 1989). Todo o material coletado foi identificado e depositado no Herbário HTO da Universidade Federal do Tocantins. Sendo suas respectivas coordenadas listadas na Tabela 01.





**Figura 02 - Mapa do Estado do Tocantins com a localização da Comunidade Quilombola Mumbuca.**

**Por: Raony Pereira dos Santos.**

**Tabela 01 - Dados Georreferenciais da espécie coletada para o estudo.**

Nº de registro HTO	Vernáculo	Nome científico	Coord. (**GPS)
10842	Camaçari	<i>Terminalia fagifolia</i>	S 10° 41 478' W 046° 24 214' *EL. 371 m

(\*) El. Elevação em relação ao nível do mar.

(\*\*) GPS: Garmin GPS Map 60 CSX.

### 4.3 Preparação do extrato

O material vegetal coletado no mês de janeiro de 2015 foi acondicionado separadamente em sacos de papel, identificado e levado à estufa para secagem, mantido a uma temperatura média de 60° C, durante sete dias. O material vegetal já seco, casca e folhas, foram triturados separadamente em moinho de facas (MARCONI, Mod. MA-340/A) e acondicionado em recipientes de vidro (3 L). Posteriormente, estes vidros contendo as partes vegetais moídas foram preenchidos com etanol 70%, para a solubilização dos princípios ativos. Após 72 horas, as soluções foram filtradas com a utilização de bomba a vácuo, funil de Büchner e papel filtro onde o extrato foi separado dos componentes sólidos e concentrado em Evaporador Rotativo (MARCONI, Mod. MA120-TH), obtendo-se assim, os extratos brutos de cada parte vegetal coletada. Em seguida, estes extratos brutos foram liofilizados seguindo o protocolo padrão de liofilização em Liofilizador (LIOTOP/ Mod. L101) para retirada do excesso de solvente, por um tempo de aproximadamente 24 horas, para obtenção de extratos do tipo pó (Figura 03).

O rendimento do extrato foi estimado utilizando a expressão matemática: Rendimento (%) = (massa do extrato/massa do material vegetal) x 100 utilizando a seguinte equação, onde TEA = teor de extrato total (%); Mi = massa inicial da amostra (g); Mf = massa final do extrato seco (g) (PANSERA et al., 2003).

$$\text{TEA (\%)} = \frac{M_f}{M_i} \times 100$$



Figura 03 - Preparo dos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*: A) Filtragem; B) Retirada do solvente no evaporador rotativo; C) Extrato sem solvente; D) Extratos no liofilizador; E) Extratos liofilizados.

## **4.4 Ensaios Microbiológicos**

### **4.4.1 Material Microbiológico**

A espécie de microrganismo utilizado para a realização da pesquisa foi o *Staphylococcus aureus* fornecido pelo banco de estoque de cepas do Laboratório de Microbiologia, isolados a partir de acne de pele.

### **4.4.2 Método de diluição**

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi obtida através do método de macrodiluição em caldo de acordo com a Norma M7-A6 do NCCLS (2003a), com modificações, que consistiu em preparar diluições sucessivas dos extratos testados em um meio líquido e após incubação verificou-se a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano.

### **4.4.3 Preparo do meio de cultura e caldo**

Preparou-se o Ágar Mueller Hinton (AMH - ACUMEDIA) e o caldo Brain-Heart Infusion (BHI - HIMEDIA) conforme especificações do fabricante e foram esterilizados em autoclave vertical (PRISMATEC/Mod. CS) por 15 min à 121°C. Nas placas de Petri foram dispensados 20 mL de AMH e nos frascos 1 mL do caldo Brain-Heart Infusion (BHI).

### **4.4.4 Controles**

Foi utilizado como controle positivo (CP) o antibiótico comercial de referência, respeitando o perfil de sensibilidade do microrganismo. O antibiótico Penicilina G (SENSIFAR) foi utilizado como substância controle para as colônias de *Staphylococcus aureus*. E como controle negativo (CN) foi utilizado DMSO puro (ORLANDO, 2005; SOUSA, 2007).

#### 4.4.5 Preparo dos inóculos bacterianos e contagem de bactérias

Para o preparo dos inóculos bacterianos, retirou-se uma alçada do tubo com estoque de colônias de *Staphylococcus aureus* transferindo-a para um tubo estéril contendo 9 mL de solução salina a 0,9%. A turvação salina foi ajustada com a escala 0,5 de MacFarland (ORLANDO, 2005). Logo após agitar o tubo com auxílio de um agitador (QUIMIS/Mod. 220.B.2), retirou-se 1 mL da solução bacteriana realizando diluições seriadas até o tubo de número 6, obtendo-se as seguintes concentrações:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  UFC/mL.

Para a contagem de bactérias utilizou-se a mesma diluição seriada do inóculo bacteriano, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri previamente identificadas e preparadas com AMH. Com auxílio de pipeta automática, foi dispensado 100 µl do inóculo de cada diluição em cada placa de Petri. Com auxílio de uma alça de Drigalski, pela da técnica de espalhamento em superfície “spread-plate”, o inóculo foi cuidadosamente espalhado. Após o espalhamento as placas foram mantidas em estufa (QUIMIS/Mod 316.25) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias em contador de colônias (PHOENIX/CP 600 PLUS). Todo o procedimento foi realizado em duplicata, com materiais previamente autoclavados e em capela de fluxo laminar.

#### 4.4.6 Preparo das soluções dos extratos para os testes microbiológicos e determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs)

Para a realização do método de difusão em ágar e determinação das CIMs, foram preparadas três soluções de diferentes concentrações dos extratos utilizados, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a saber (SYNTH): 100 mg/mL (0,5 g de extrato dissolvidos em 5 mL de DMSO); 200 mg/mL (1 g de extrato dissolvidos em 5 mL de DMSO) e 300 mg/mL (1,5 g de extrato dissolvidos em 5 mL de DMSO) (ORLANDO, 2005).

#### 4.4.7 Método da difusão em ágar pela técnica dos poços – Antibiograma

O teste de difusão em ágar foi fundamentado na Norma M2-A8 do NCCLS (2003b), com modificações (NCCLS, 2003b; ORLANDO, 2005).

Foram dispensados, com o auxílio de uma pipeta automática, 100 µl do inóculo bacteriano de concentração  $10^4$  UFC/mL nas placas de Petri previamente preparadas com AMH. O inóculo foi distribuído em toda a superfície do meio de cultura com auxílio de uma alça de Drigalski, utilizando a técnica de espalhamento em superfície “spread-plate”. Após alguns minutos, com auxílio de um tubo de Durham, foram feitas quatro perfurações no meio de cultura contido nas placas, medindo aproximadamente 6 mm cada um, que em microbiologia tem a denominação de “poços”. A partir da confecção dos poços, 100 µl dos extratos nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL, junto com o CN foram introduzidos em cada poço devidamente identificados. Para o CP utilizou-se discos de penicilina comercial na concentração de 10 UI (SENSIFAR), que foram alocados no meio da placa e logo em seguida as placas foram levadas para a estufa (QUIMIS/Mod. 316.25) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após a incubação, o halo de inibição foi medido em milímetros, utilizando-se uma régua milimetrada, e o valor estimado foi a média dos halos em triplicata. Todos os procedimentos foram realizados com materiais previamente autoclavados e em capela de fluxo laminar (FILTERFLUX/Mod. FLV 656/3). Na tabela 02 estão listados os critérios seguidos para os diâmetros dos halos.

**Tabela 02 - Critérios para a atividade antimicrobiana dos extratos segundo Parekh e Chanda (2007) e Santos et al. (2007).**

Diâmetros dos Halos	Resultados
<b>Inibição menor que 9 mm</b>	Inativo
<b>Inibição entre 9 a 12 mm</b>	Parcialmente ativo
<b>Inibição entre 13 e 18 mm</b>	Ativo
<b>Inibição acima de 18 mm</b>	Muito ativo

#### 4.4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - Gradiente de Ação.

A determinação da CIM foi realizada tendo como fundamento a Norma M7-A6 do NCCLS com modificações (NCCLS, 2003a; SOUSA, 2007).

Para a determinação da concentração inibitória mínima dos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*, foram utilizados seis frascos de vidro (13 mL) devidamente esterilizados e identificados, contendo 1 mL de caldo BHI. Foram dispensados 100 µl da solução estoque do extrato na concentração de 300 mg/mL no primeiro frasco e logo após realizando diluições seriadas, transferindo-se 100 µl do frasco anterior para o subseqüente desprezando-se 100 µl no final, variando a diluição 1:1 até 1:32 obtendo-se as seguintes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 mg/mL. Em seguida, foi inoculado nestes frascos, 100 µl da concentração  $10^4$  UFC/mL de bactérias. Os frascos foram incubados por 24 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Após 24 horas de incubação, 100 µl do inóculo de cada frasco foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura AMH, espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski, utilizando a técnica de espalhamento em superfície “spread-plate” e em seguida as placas foram levadas para a estufa (QUIMIS/Mod. 316.25) a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada observando o aparecimento ou não de colônias de *Staphylococcus aureus*. Os testes foram realizados em duplicata e todos os procedimentos foram desempenhados com materiais previamente autoclavados e em capela de fluxo laminar.

#### 4.4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - Gradiente de Concentração.

Para obtenção do gradiente de concentração dos extratos da casca e folhas da *Terminalia fagifolia* foram utilizados três frascos de vidro (13 mL) devidamente esterilizados e identificados. Em cada frasco dispensou-se 1 mL de caldo BHI. Em seguida, dispensou-se no primeiro frasco 100 µl do inóculo bacteriano com concentração  $10^4$  UFC/mL, no segundo frasco dispensou-se 100 µl do inóculo bacteriano com concentração  $10^5$  UFC/mL e no terceiro frasco dispensou-se 100 µl do inóculo bacteriano com concentração  $10^6$  UFC/mL. Logo após, dispensou-se 100 µl da solução de extrato da concentração de 100 mg/mL em cada um dos frascos. Todos os procedimentos foram desempenhados com materiais previamente autoclavados e em capela de fluxo laminar. Foi realizado o mesmo procedimento

para as concentrações de extratos de 200 mg/mL e 300 mg/mL. Os frascos foram incubados em estufa (QUIMIS/Mod. 316.25) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Após 24 horas de incubação, placas de Petri foram previamente preparadas com AMH. Dispensou-se 100  $\mu\text{l}$  do inóculo de cada frasco em toda a superfície do meio de cada placa de Petri com auxílio de uma alça de Drigalski, utilizando a técnica de espalhamento em superfície “spread-plate”. As placas foram incubadas em estufa (QUIMIS/Mod. 316.25) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada observando o aparecimento ou não de colônias de *Staphylococcus aureus*. Os testes foram realizados em duplicata e todos os procedimentos foram desempenhados com materiais previamente autoclavados e em capela de fluxo laminar (Figura 04).

Utilizando os critérios de Hörner et al., (2008) e Hawser e Islam (1999), adaptados para esse ensaio, a inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada determinada a CIM a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas.





**Figura 04 - Preparo do Antibiograma e da Concentração Inibitória Mínima: A) Preparo do meio de cultura; B) Preparo das placas de Petri com meio de cultura; C) Diluição seriada dos extratos; Preparo da CIM.**

#### 4.5 Atividade antioxidante

Foi realizado levantamento bibliográfico a respeito dos efeitos antioxidantes da casca e folhas da *Terminalia fagifolia*. Os estudos citados tiveram como método de avaliação da atividade antioxidante o DPPH que consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila de coloração púrpura que absorve a 515 nm (ROGINSKY e LISSI, 2005). Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente

no meio reacional (BRAND-WILLIAMS, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, 1998 *apud* SOUSA, 2007).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA, 2007).

#### **4.6 Ensaios Biológicos**

Uma vez que foi demonstrada atividade antimicrobiana para os extratos avaliados, tornou-se importante conhecer a citotoxicidade que os mesmos poderiam apresentar. Para tanto, utilizou-se metodologia de determinação de morte celular em ensaio com monocamada de células utilizando o ensaio MTS.

##### **4.6.1 Culturas celulares**

As linhagens celulares utilizadas foram: NIH 3T3 (fibroblastos de camundongos – células normais), L929 (fibroblastos de camundongo - células normais), PC3 (câncer de próstata humano) e B16F10 (melanoma murinho – células cancerígenas de pele) cultivadas no Laboratório de Cultura de Células do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. Os ensaios foram realizados sob condições assépticas, em ambiente controlado, utilizando materiais e reagentes esterilizados.

As células L929, PC3 e B16F10 foram mantidas em meio de cultura RPMI (Gibco), e as células NIH 3T3, foram mantidas em meio DMEM. Tanto o RPMI quanto o DMEM foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% da solução de estreptomicina/penicilina/anfotericina (antibiótico e antimicótico) (Gibco) e 1% de L-Glutamina (Gibco).

As passagens para amplificação de cultura foram realizadas a partir da tripsinização (tripsina/EDTA) das células e contagem em câmara de Neubauer. Após atingirem 80% de confluência as células foram plaqueadas para ensaio de citotoxicidade e congeladas para estoque das linhagens.

#### **4.6.2 Avaliação da citotoxicidade**

O ensaio de MTS é um método colorimétrico baseado na biorredução do composto [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium], em um produto cromogênico solúvel em meio de cultura (formazan), o qual adquire uma coloração violácea. Este processo é realizado apenas por enzimas mitocondriais de células viáveis, dessa forma, a mudança na coloração do meio de cultura reflete diretamente a viabilidade celular, podendo ser medida em absorbância.

Para realização deste ensaio, as células ( $1 \times 10^5$ /poço) em quadruplicata foram semeadas em placas de 96 poços.

Em cada poço foram aplicados 20  $\mu$ L da solução Cell Titer96, a placa foi agitada para homogeneização da solução e mantida, por 2 horas, em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após esse período de incubação as placas foram lidas em comprimento de ondas de 490 nm utilizando o leitor de microplacas Multiskan EX (Labsystems, Milford, MA, EUA) (Figura 5).

#### **4.6.3 Preparo dos extratos vegetais**

#### **4.6.4 Avaliação da citotoxicidade do DMSO**

As culturas celulares (NIH 3T3, L929, PC3 e B16F10) foram avaliadas em relação à citotoxicidade do DMSO, atribuindo-se dessa forma a concentração máxima de DMSO que as células suportariam, porém que dissolvesse os extratos da casca e das folhas da *Terminalia*

*fagifolia*. Para tanto foi utilizada uma placa de 96 poços preenchidos com células na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço. Foram testadas as seguintes concentrações de DMSO: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL (Figura 06). Todas as concentrações foram avaliadas em quadruplicata. A leitura foi realizada de acordo com o item 4.6.2.

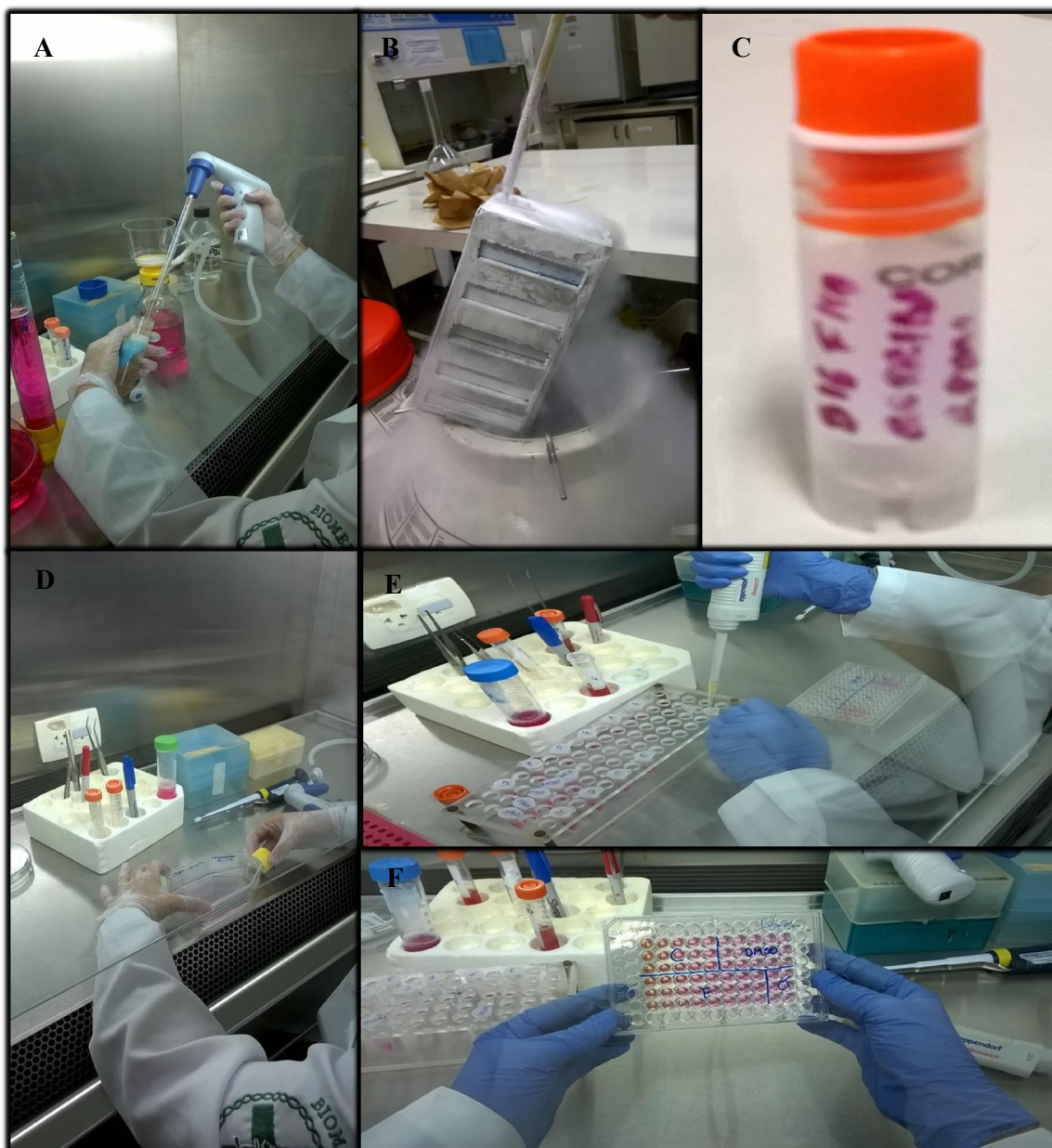
#### **4.6.3.1 Diluição dos extratos**

Após avaliação da citotoxicidade de DMSO que as culturas celulares suportariam, preparou-se uma solução mãe dos extratos liofilizados da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* da seguinte forma: colocou-se em um falcon 100  $\mu$ L de DMSO e adicionou-se 20 mg do extrato liofilizado e logo após acrescentou-se 900  $\mu$ L de meio RPMI, obtendo-se uma concentração de cada extrato de 2 mg/mL. As diluições seriadas foram feitas em tubos estéreis separados e identificados.

#### **4.6.5 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos pelo ensaio MTS**

As células foram semeadas como descrito no item 4.6.1 Após 24 horas o meio foi substituído por meio de cultura contendo os extratos.

As concentrações finais nos poços foram: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,03125 mg/mL; 0,015625 mg/mL (Figura 06). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com PBS e o ensaio MTS foi realizado de acordo com o item 4.6.2.



**Figura 05 - Preparo das culturas celulares e teste de viabilidade celular: A) Preparo do meio de cultura; B) Retirada dos criotubos com células congeladas em nitrogênio líquido; C) Criotubo contendo linhagem celular; D) Garrafa com cultura celular sendo semeada; E) Preparo do ensaio de viabilidade celular; F) Microplaca com teste de viabilidade e representação da distribuição das diluições.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	2	1	0,5	0,25	0,125	Bco
B	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	2	1	0,5	0,25	0,125	Bco
C	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	2	1	0,5	0,25	0,125	Bco
D	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	2	1	0,5	0,25	0,125	Bco
E	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	2	1	Bco
F	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	2	1	Bco
G	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	2	1	Bco
H	bco	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	2	1	Bco

**Figura 06 - Mapa de placas para os testes com os extratos. As concentrações finais estão em mg/mL. Diluições em ordem decrescente de concentração. Em Amarelo: extrato da casca; Laranja: extrato das folhas; Verde: DMSO (controle Negativo); Azul: DMEM + células.**

A avaliação quantitativa da citotoxicidade em ensaios *in vitro* pode ser efetuada pela classificação das substâncias-teste avaliadas em não-citotóxicas, levemente citotóxicas, moderadamente citotóxicas e severamente citotóxicas, conforme os resultados dos ensaios realizados de acordo com as normas 10993-5 da ISO.

Na tabela 03 estão expressas faixas de porcentagem representativas da viabilidade celular definidas por Sletten e Dahl (1999) e Lönroth e Dahl (2001, 2003).

**Tabela 03 - Classificação do grau de citotoxicidade de materiais de acordo com a porcentagem de viabilidade celular de acordo com Sletten e Dahl (1999) e Lönroth e Dahl (2001, 2003) (comparado ao grupo controle negativo).**

Citotoxicidade	Viabilidade Celular (%)
<b>Não citotóxico</b>	<b>&gt;90</b>
<b>Levemente</b>	<b>80 a 89</b>
<b>Moderadamente</b>	<b>50 a 79</b>
<b>Severamente</b>	<b>0 a 49</b>

#### **4.7 Análises estatísticas**

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise estatística por testes paramétricos com a aplicação da ANOVA:

- Os ensaios microbiológicos foram feitos pelo teste de Tukey visando identificar diferenças significativas entre as medidas dos halos do controle positivo (CP) e as concentrações dos extratos, usando o software BioEstat, versão 5.3;
- Os ensaios biológicos foram feitos pelo teste Two-way seguido pelo pós-teste Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

A determinação da CIM foi avaliada através da moda dos resultados encontrados (ARANGO, 2005).

### **5 RESULTADOS:**

#### **5.1 Estimativa de rendimentos dos extratos**

A verificação do rendimento dos extratos é uma avaliação importante, tendo em vista que em experimentos posteriores, será possível definir melhor a quantidade de material biológico a ser coletado para a realização dos procedimentos experimentais, evitando assim coleta de material em excesso (PAVAN-FRUEHAUF, 2000).

Para preparação do extrato hidroalcoólico foi utilizado o método de preparação de Cechinel e Yunes (1998), ou seja, foi análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam geralmente partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas.

A tabela 04 apresenta uma estimativa de rendimento dos extratos quando comparado com o total de amostras vegetais colhidas.

**Tabela 04 - Rendimento dos extratos utilizados nos ensaios.**

<i>Terminalia fagifolia</i>	*M.S.T. (g)	**E.L. (g)	Rendimento %
<b>Cascas</b>	<b>716</b>	<b>76,81</b>	<b>10,72</b>
<b>Folhas</b>	<b>157,58</b>	<b>46,79</b>	<b>29,69</b>

(\*) M.S.T. = massa seca total.

(\*\*) E.L = extrato liofilizado (tipo pó).

## 5.2 Difusão em Ágar pela técnica dos poços

Na metodologia da difusão em ágar pela técnica dos poços, o solvente DMSO, empregado para solubilizar os extratos liofilizados, foi utilizado como controle negativo. Pelas figuras 7A e 8A pode-se observar que nos poços de CN (controle negativo) não houve halos de inibição do crescimento bacteriano, demonstrando que não houve intervenção do solvente na atividade antibacteriana. Como controle positivo (CP) foi utilizado o antibiótico Penicilina G (SENSIFAR) na concentração de 10 UI. Nesta mesma figura, é possível visualizar os halos de inibição para as diferentes concentrações testadas.

Nas figuras 7A e 8A é possível visualizar o halo de inibição do crescimento bacteriano formado ao redor dos poços (1, 2 e 3) onde foram aplicados os extratos e observa-se também o crescimento bacteriano ao redor dos CNs, a sensibilidade do microrganismo testado onde foram aplicados os discos CPs e as diferentes concentrações dos extratos. Nas figuras 7B e 8B, os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* inibiram respectivamente o crescimento bacteriano.



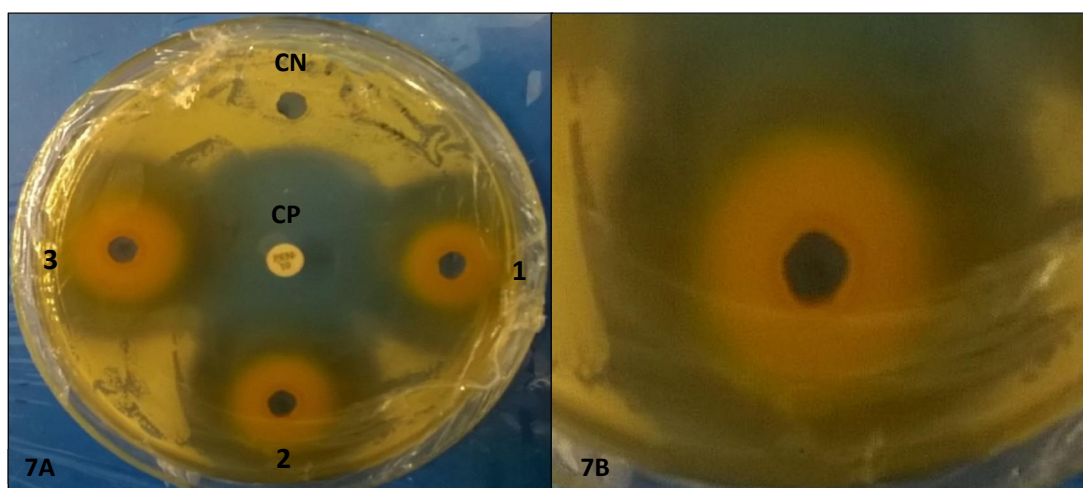


Figura 07 - Fotografia do teste de difusão em ágar pela técnica dos poços – 7A) extrato da casca da *Terminalia fagifolia* contra *Staphylococcus aureus*; CN – controle negativo; CP - controle positivo; Poços: 1– 100 mg/mL; 2 – 200 mg/mL; 3 – 300 mg/mL; 7B) Halo de inibição contra *Staphylococcus aureus*.

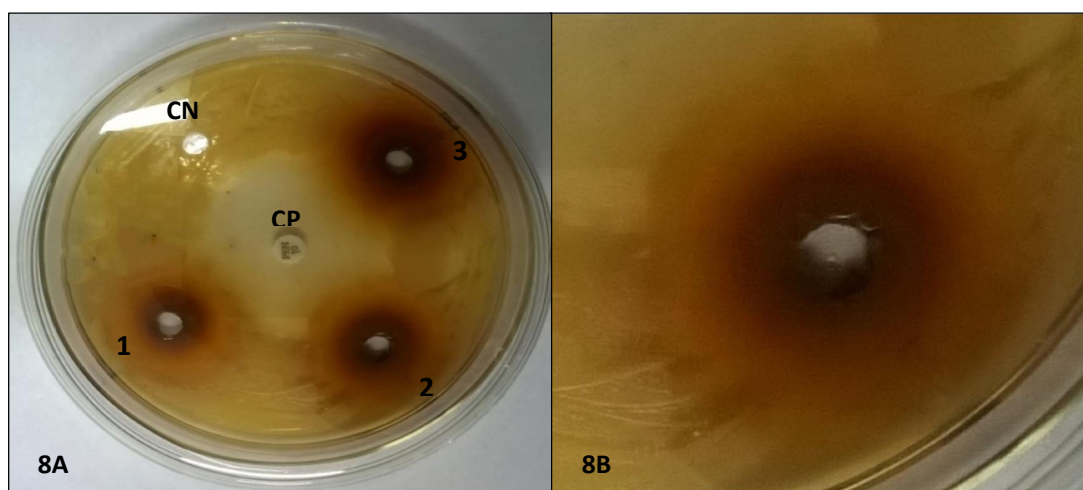
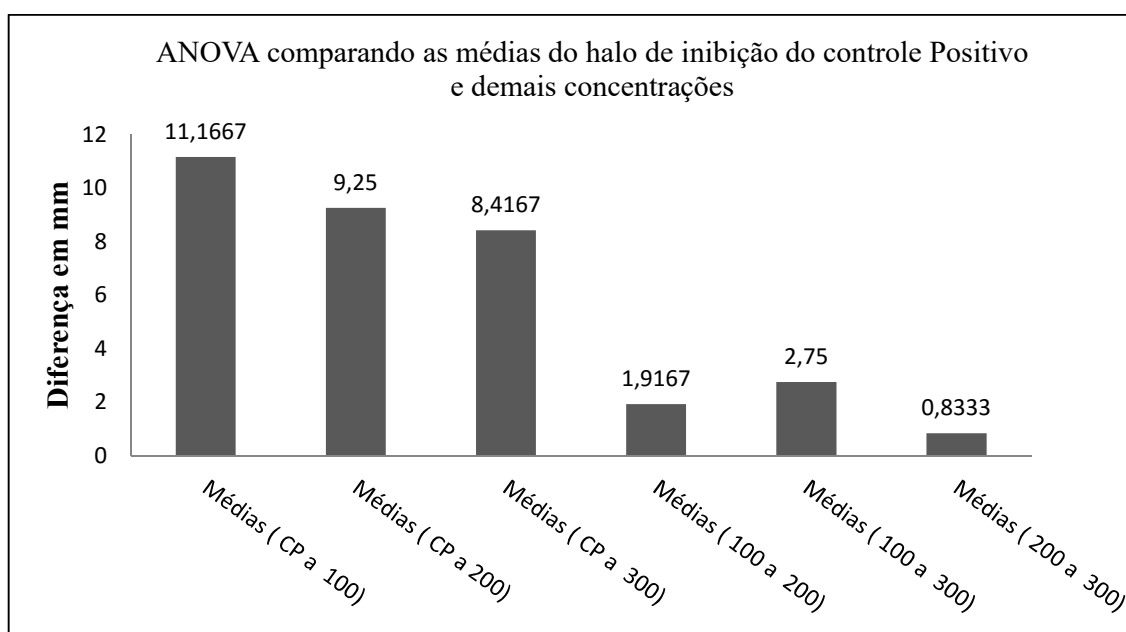


Figura 08 - Fotografia do teste de difusão em ágar pela técnica dos poços – 8A) extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* contra *Staphylococcus aureus*; CN – controle negativo; CP - controle positivo; Poços: 1– 100 mg/mL; 2 – 200 mg/mL; 3 – 300 mg/mL; 8B) Halo de inibição contra *Staphylococcus aureus*.

Ao analisarmos a figura 09, observa-se que houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) dos halos de inibição entre o controle positivo e as diversas concentrações do extrato da casca. Entre as concentrações de 100 mg/mL e 300 mg/mL do extrato da casca, houve diferença significativa, apresentando  $p < 0,05$ . Porém, não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações de 100 mg/mL e 200 mg/mL e entre 200 mg/mL e 300 mg/mL o que também pode ser verificado na tabela 05.

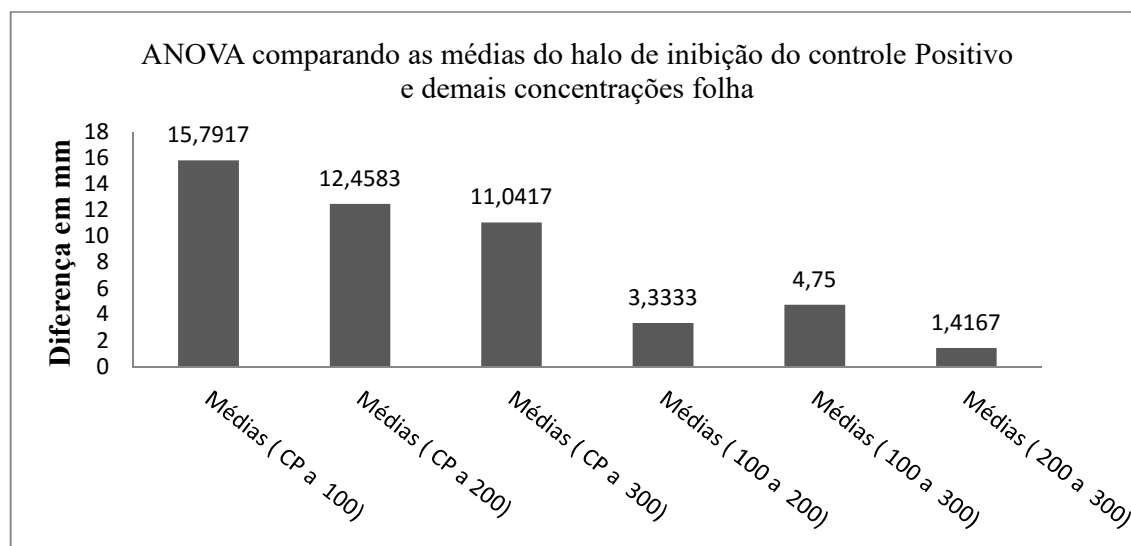


**Figura 09 - Comparação da atividade antibacteriana da casca da *Terminalia fagifolia* entre as concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL e o controle positivo.**

**Tabela 05 - Análises estatísticas do controle positivo e as concentrações (100, 200 e 300 mg/mL) do extrato da casca testado contra o microrganismo *Staphylococcus aureus*.**

	CP_C	C_100	C_200	C_300
Média	42.292	31.125	33.042	33.875
Mediana	41.000	31.000	33.000	34.500
Moda	40.000	33.000	33.000	30.000
DP	3.201	1.569	2.137	2.317
CV	0.076	0.050	0.065	0.068

Ao analisarmos a figura 10, observa-se que houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) dos halos de inibição entre o controle positivo e as diversas concentrações do extrato das folhas. Entre as concentrações de 100 mg/mL e 200 mg/mL e entre 100 mg/mL e 300 mg/mL do extrato das folhas, apresentaram diferença significativa, com  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. Porém, não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações de 200 mg/mL e 300 mg/mL, o que pode ser verificado na tabela 06.



**Figura 10 - Comparação da atividade antibacteriana das folhas da *Terminalia fagifolia* entre as concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL e o controle positivo.**

**Tabela 06- Análises estatísticas do controle positivo e as concentrações (100, 200 e 300 mg/mL) do extrato das folhas testado contra o microrganismo *Staphylococcus aureus*.**

	CP_F	F_100	F_200	F_300
Média	40.125	24.333	27.667	29.083
Mediana	39.500	24.500	28.500	29.000
Moda	37.500	24.000	30.000	27.500
DP	3.821	2.136	2.847	1.782
CV	0.095	0.088	0.103	0.061

Ao compararmos a atividade antimicrobiana entre os extratos da casca e das folhas, observamos que o extrato da casca produziu em média halos de inibição do inóculo bacteriano maiores do que o extrato das folhas ( $p > 0,0001$ ). Entre os controles positivos (CPs) (médias 1 a 6) e entre as concentrações de 100 mg/mL da casca e 300 mg/mL das folhas (médias 2 a 9) não apresentaram diferenças significativas. Porém, ao compararmos as demais concentrações do extrato da casca com o extrato das folhas, observa-se que apresentaram diferenças significativas, o que pode ser verificado na Tabela 07.

**Tabela 07 - Comparação da atividade antibacteriana entre os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*.**

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	7	31.1 e+02	444.898
Erro	88	583.896	6.635
F =	67.0515		
(p) =	< 0.0001		
Médias			
Média (Coluna 1)(CP_C) =		42.2917	
Média (Coluna 2)(C_100) =		31.125	
Média (Coluna 3)(C_200) =		33.0417	
Média (Coluna 4)(C_300) =		33.875	
Média (Coluna 6)(CP_F) =		40.125	
Média (Coluna		24.3333	

<b>7)(F_100)=</b>			
<b>Média (Coluna 8)(F_200)=</b>		27.6667	
<b>Média (Coluna 9)(F_300) =</b>		29.0833	
<b>Tukey:</b>	<b>Diferença</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>
<b>Médias (1 a 2) =</b>	11.1667	15.0172	< 0.01
<b>Médias (1 a 3) =</b>	9.25	12.4396	< 0.01
<b>Médias (1 a 4) =</b>	8.4167	11.3189	< 0.01
<b>Médias (1 a 6) =</b>	2.1667	2.9138	Ns
<b>Médias (1 a 7) =</b>	17.9583	24.1507	< 0.01
<b>Médias (1 a 8) =</b>	14.625	19.668	< 0.01
<b>Médias (1 a 9) =</b>	13.2083	17.7628	< 0.01
<b>Médias (2 a 3) =</b>	1.9167	2.5776	Ns
<b>Médias (2 a 4) =</b>	2.75	3.6983	Ns
<b>Médias (2 a 6) =</b>	9	12.1034	< 0.01
<b>Médias (2 a 7) =</b>	6.7917	9.1336	< 0.01
<b>Médias (2 a 8) =</b>	3.4583	4.6508	< 0.05
<b>Médias (2 a 9) =</b>	2.0417	2.7457	Ns
<b>Médias (3 a 4) =</b>	0.8333	1.1207	Ns
<b>Médias (3 a 6) =</b>	7.0833	9.5258	< 0.01
<b>Médias (3 a 7) =</b>	8.7083	11.7111	< 0.01
<b>Médias (3 a 8) =</b>	5.375	7.2284	< 0.01
<b>Médias (3 a 9) =</b>	3.9583	5.3232	< 0.01
<b>Médias (4 a 6) =</b>	6.25	8.4051	< 0.01
<b>Médias (4 a 7) =</b>	9.5417	12.8318	< 0.01
<b>Médias (4 a 8) =</b>	6.2083	8.3491	< 0.01
<b>Médias (4 a 9) =</b>	4.7917	6.4439	< 0.01
<b>Médias (6 a 7) =</b>	15.7917	21.237	< 0.01
<b>Médias (6 a 8) =</b>	12.4583	16.7542	< 0.01
<b>Médias (6 a 9) =</b>	11.0417	14.8491	< 0.01
<b>Médias (7 a 8) =</b>	3.3333	4.4827	< 0.05
<b>Médias (7 a 9) =</b>	4.75	6.3879	< 0.01
<b>Médias (8 a 9) =</b>	1.4167	1.9052	Ns

### 5.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM

A concentração inibitória mínima para obtenção do gradiente de ação foram realizadas com diluições seriadas dos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* na concentração de 300 mg/mL, respectivamente, e concentração do inóculo bacteriano de  $10^4$  UFC/mL (Figuras 11 e 12).



Figura 11 - CIM seriada do extrato da casca da *Terminalia fagifolia*.

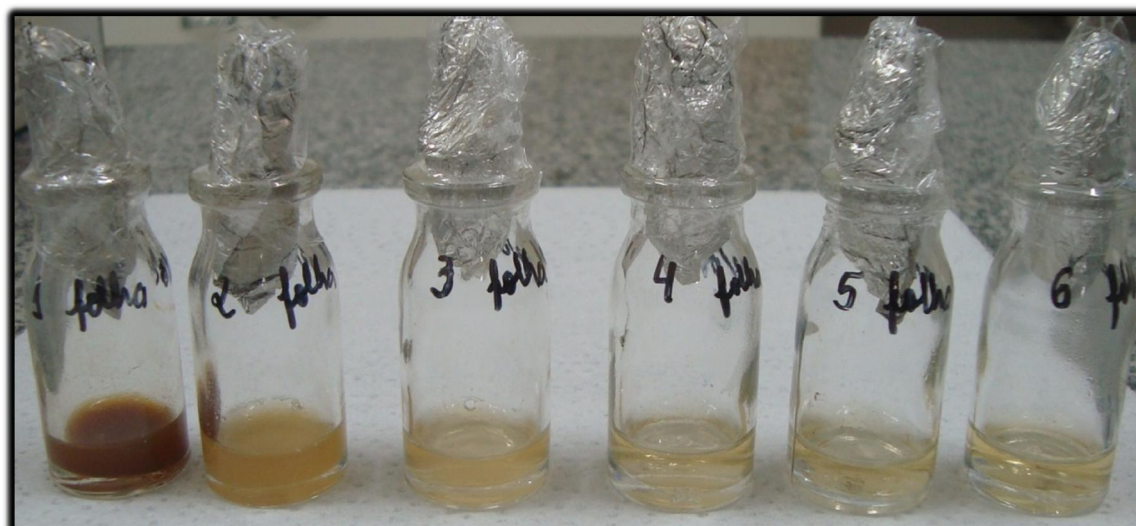


Figura 12 - CIM seriada do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia*.

#### 5.4 Comparação dos extratos

De acordo com a tabela 08, que expõe os valores dos testes da determinação da CIM, verifica-se que tanto o extrato da casca como o das folhas apresentam CIM de 75 mg/mL, o que também pode ser verificado pelas figuras 13 e 14.

**Tabela 08 - Comparação da atividade antibacteriana entre os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*.**

CIM/casca - <i>T. fagifolia</i> 300 mg/mL G. Ação				CIM/folhas - <i>T. fagifolia</i> 300 mg/mL G. Ação			
Dil. seriada do extrato	Conc. mg/mL	Placas	Colônias. <i>S. aureus</i>	Dil. seriada do extrato	Conc. mg/mL	Placas	Colônias <i>S. aureus</i>
1→1	300	1A	0	1→1	300	1A	0
1 → 1	300	1B	0	1 → 1	300	1B	0
1 → 2	150	2A	0	1 → 2	150	2A	0
1 → 2	150	2B	0	1 → 2	150	2B	0
1 → 4	75	3A	0	1 → 4	75	3A	5
1 → 4	75	3B	0	1 → 4	75	3B	10
1 → 8	37,5	4A	>300	1 → 8	37,5	4A	>300
1 → 8	37,5	4B	>300	1 → 8	37,5	4B	>300
1 → 16	18,75	5A	>300	1 → 16	18,75	5A	>300
1 → 16	18,75	5B	>300	1 → 16	18,75	5B	>300
1 → 32	9,375	6A	>300	1 → 32	9,375	6A	>300
1 → 32	9,375	6B	>300	1 → 32	9,375	6B	>300

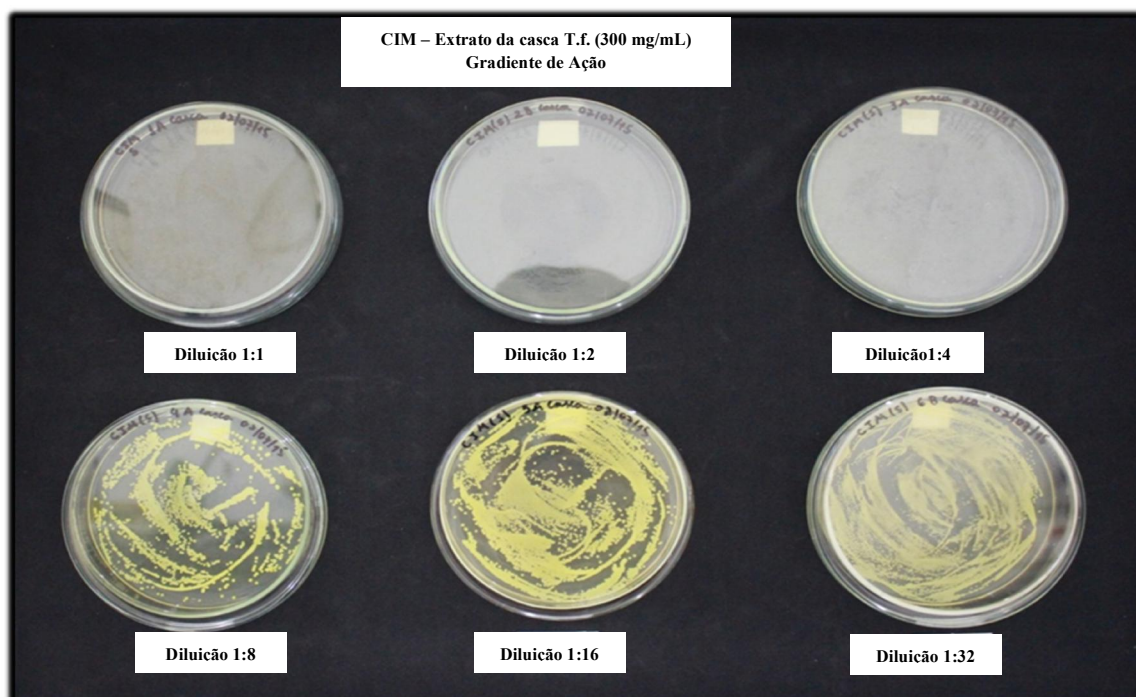


Figura 13 - Fotografia do teste de Concentração Inibitória Mínima do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* - na concentração de 300 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*.

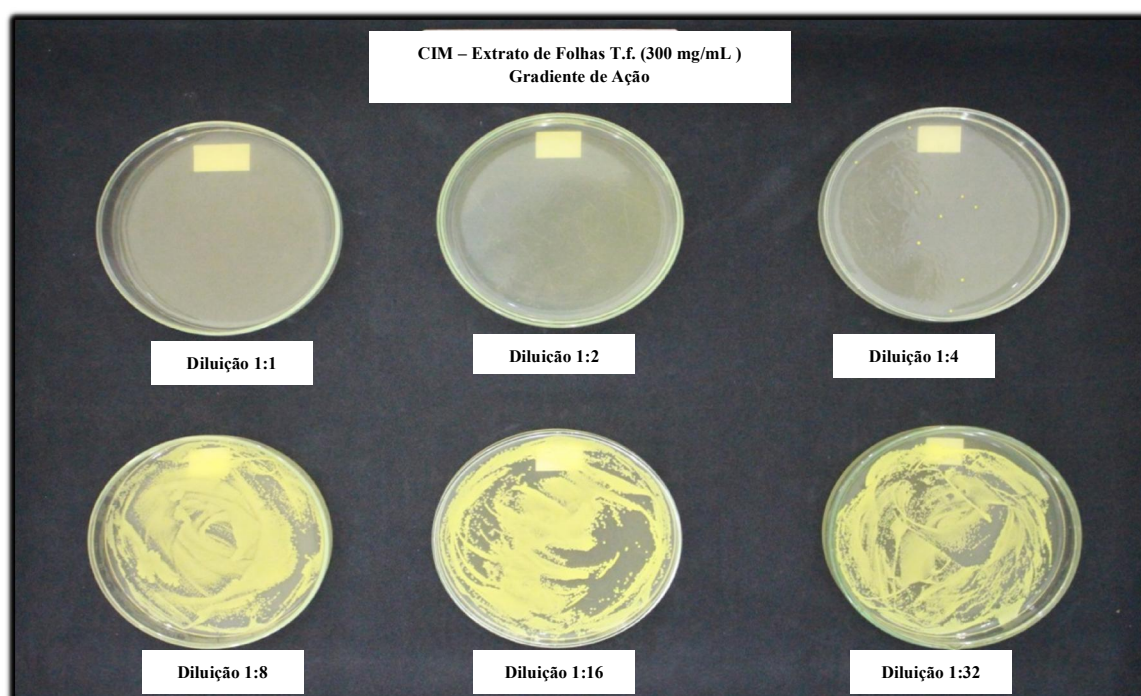


Figura 14 - Fotografia do teste de Concentração Inibitória Mínima do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* - na concentração de 300 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*.



### 5.5 Concentração Inibitória Mínima - Gradiente de Concentração

A concentração inibitória mínima para obtenção do gradiente de concentração foi realizado com diluição nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL dos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* com as respectivas concentrações do inóculo bacteriano de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL (Figuras 15 e 16).

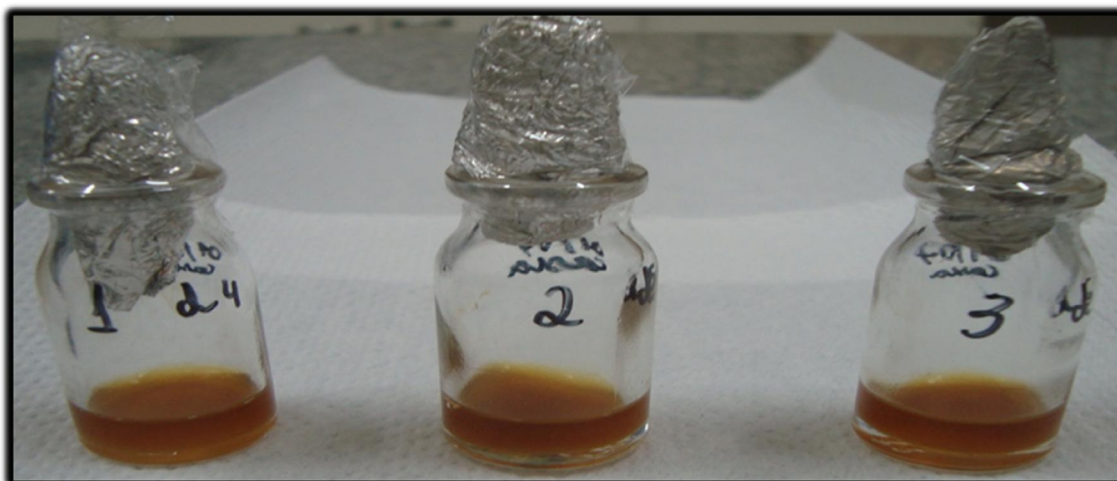


Figura 15 - CIM – gradiente de concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia*.

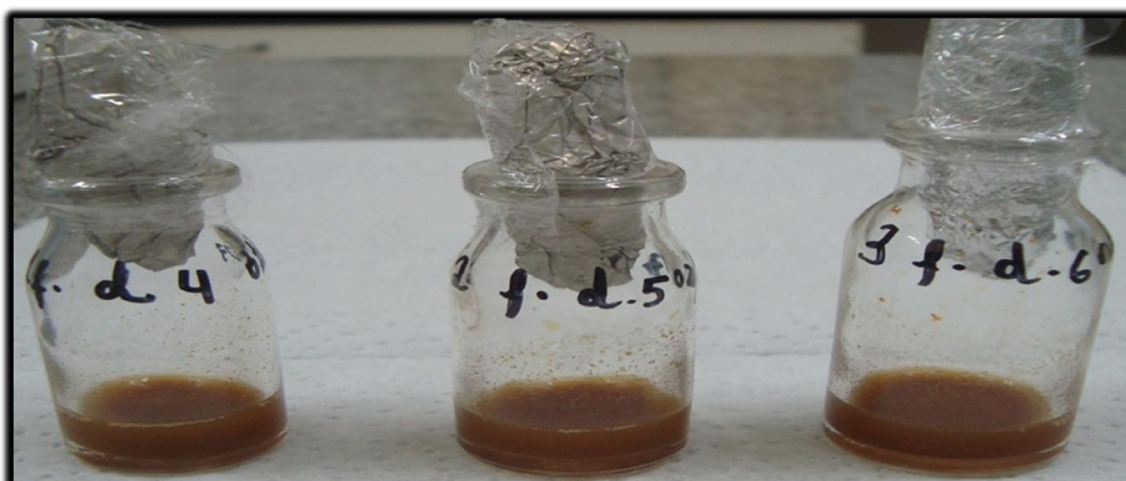


Figura 16 - CIM – gradiente de concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia*.

Como observados nos quadros 1 a 6 em todas as concentrações dos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* (100, 200 e 300 mg/mL) os inóculos bacterianos foram inibidos nas concentrações de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  UFC/mL o que também pode ser verificado nas figuras 17 e 18.

**Quadro 01 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 100 mg/mL.**

CIM/Casca - <i>T. fagifolia</i> – 100 mg/mL G. Concent.			
Diluições bact.	Conc. UFC /mL	Placas	Colônias. <i>S. aureus</i>
Tubo 4	$0,0001 \rightarrow 10^{-4}$	1A	0
Tubo 4	$0,0001 \rightarrow 10^{-4}$	1B	0
Tubo 5	$0,00001 \rightarrow 10^{-5}$	2A	0
Tubo 5	$0,00001 \rightarrow 10^{-5}$	2B	0
Tubo 6	$0,000001 \rightarrow 10^{-6}$	3A	0
Tubo 6	$0,000001 \rightarrow 10^{-6}$	3B	0

**Quadro 02 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 200 mg/mL.**

CIM/Casca - <i>T. fagifolia</i> – 200 mg/mL - G. Concent.			
Diluições bact.	Conc. UFC/mL	Placas	Colônias. <i>S. aureus</i> .
Tubo 4	$0,0001 \rightarrow 10^{-4}$	1A	0
Tubo 4	$0,0001 \rightarrow 10^{-4}$	1B	0
Tubo 5	$0,00001 \rightarrow 10^{-5}$	2A	0
Tubo 5	$0,00001 \rightarrow 10^{-5}$	2B	0
Tubo 6	$0,000001 \rightarrow 10^{-6}$	3A	0
Tubo 6	$0,000001 \rightarrow 10^{-6}$	3B	0

**Quadro 03 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 300 mg/mL.**

CIM/Casca – <i>T. fagifolia</i> – 300 mg/mL - G. Concent.			
Diluições bact.	Conc. UFC/mL	Placas	Colônias. <i>S. aureus</i>
Tubo 4	0,0001 → 10 <sup>-4</sup>	1A	0
Tubo 4	0,0001 → 10 <sup>-4</sup>	1B	0
Tubo 5	0,00001 → 10 <sup>-5</sup>	2A	0
Tubo 5	0,00001 → 10 <sup>-5</sup>	2B	0
Tubo 6	0,000001 → 10 <sup>-6</sup>	3A	0
Tubo 6	0,000001 → 10 <sup>-6</sup>	3B	0

**Quadro 04 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 100 mg/mL.**

CIM/Folhas - <i>T. fagifolia</i> – 100 mg/mL - G. Concent.			
Diluições bact.	Conc. UFC/mL	Placas	Colônias. <i>S. aureus</i>
Tubo 4	0,0001 → 10 <sup>-4</sup>	1A	0
Tubo 4	0,0001 → 10 <sup>-4</sup>	1B	0
Tubo 5	0,00001 → 10 <sup>-5</sup>	2A	0
Tubo 5	0,00001 → 10 <sup>-5</sup>	2B	0
Tubo 6	0,000001 → 10 <sup>-6</sup>	3A	0
Tubo 6	0,000001 → 10 <sup>-6</sup>	3B	0

**Quadro 05 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 200 mg/mL.**

CIM/Folhas - <i>T. fagifolia</i> – 200 mg/mL - G. Concent.			
Diluições bact.	Conc. UFC/mL	Placas	Colônias. <i>S. aureus</i>
Tubo 4	0,0001→10 <sup>-4</sup>	1A	0
Tubo 4	0,0001→10 <sup>-4</sup>	1B	0
Tubo 5	0,00001→10 <sup>-5</sup>	2A	0
Tubo 5	0,00001→10 <sup>-5</sup>	2B	0
Tubo 6	0,000001→10 <sup>-6</sup>	3A	0
Tubo 6	0,000001→10 <sup>-6</sup>	3B	0

**Quadro 06 - Moda dos resultados das CIMs – Gradiente de Concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* testados na concentração de 300 mg/mL.**

CIM/Folhas - <i>T. fagifolia</i> – 300 mg/mL - G. Concent.			
Diluições bact.	Conc. UFC/mL	Placas	Colônias. <i>S. aureus</i>
Tubo 4	0,0001→10 <sup>-4</sup>	1A	0
Tubo 4	0,0001→10 <sup>-4</sup>	1B	0
Tubo 5	0,00001→10 <sup>-5</sup>	2A	0
Tubo 5	0,00001→10 <sup>-5</sup>	2B	0
Tubo 6	0,000001→10 <sup>-6</sup>	3A	0
Tubo 6	0,000001→10 <sup>-6</sup>	3B	0

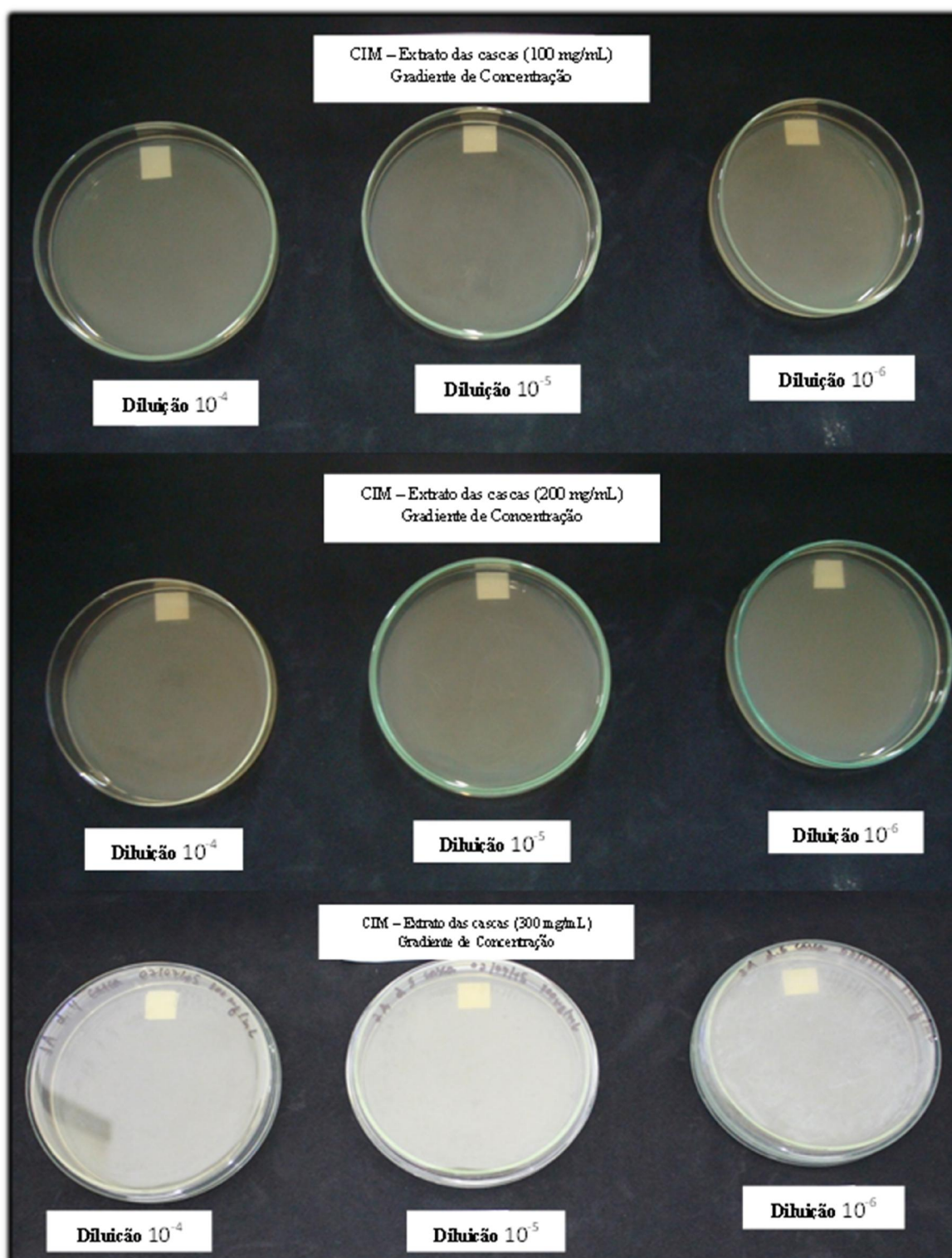


Figura 17 - CIM - Gradiente de concentração do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL.

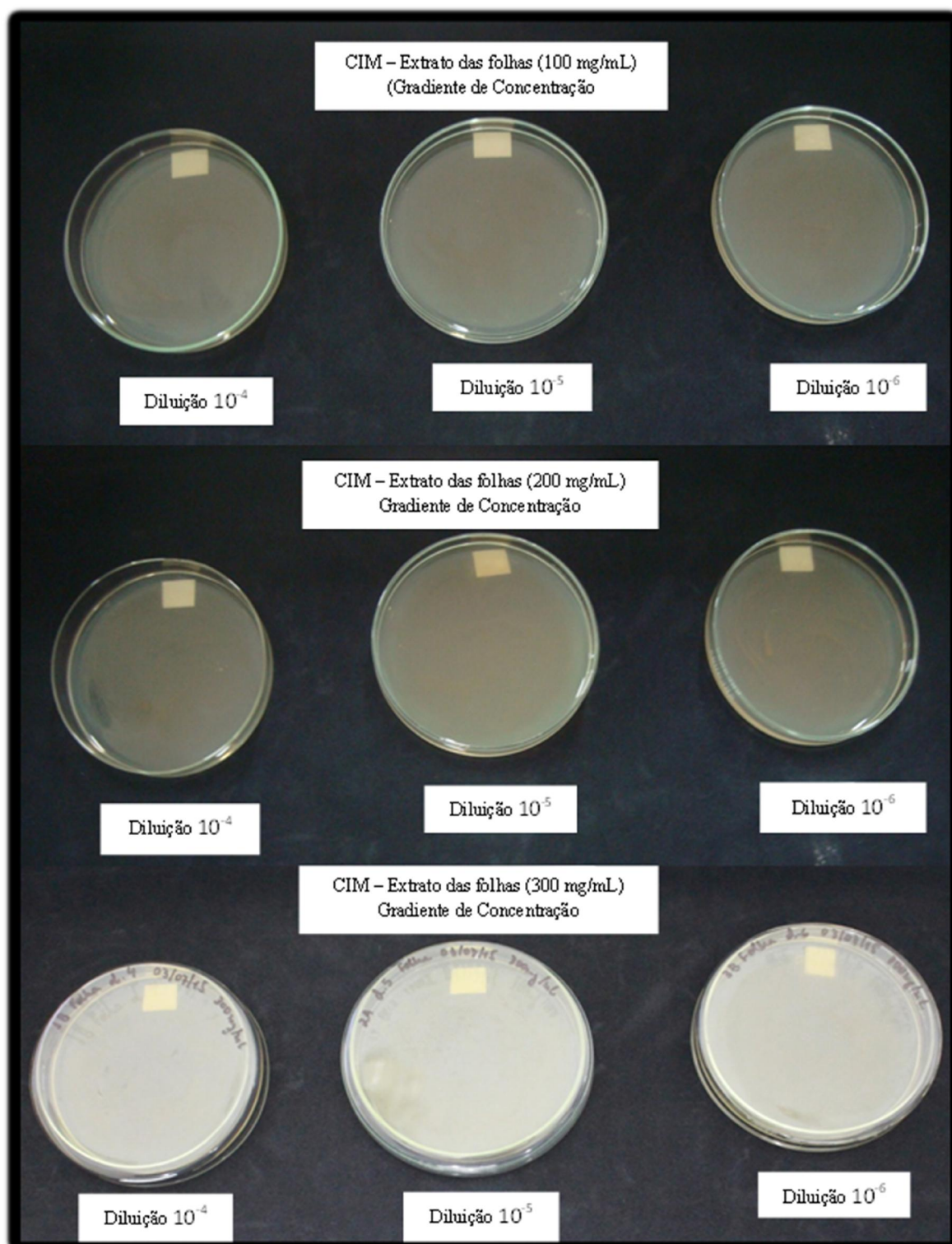
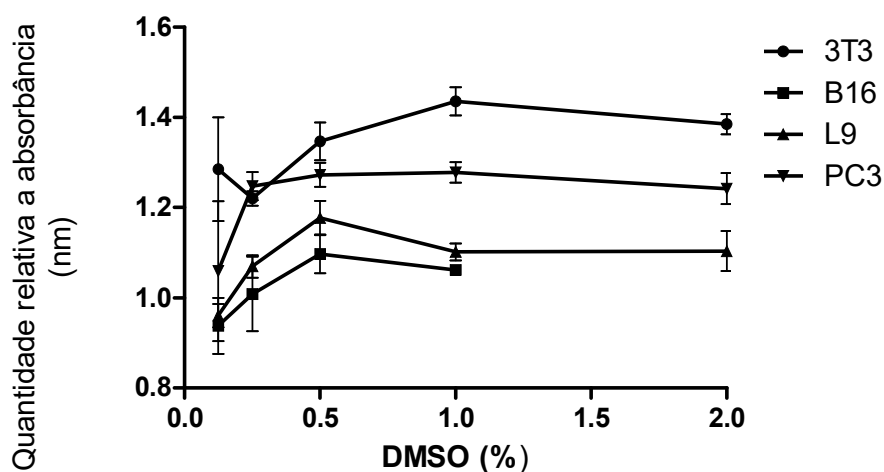


Figura 18 - CIM - Gradiente de concentração do extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL.

## 5.6 Ensaios Biológicos

Ao realizar avaliação da citotoxicidade do DMSO (expresso em porcentagem) sobre as culturas celulares determinou-se, desta forma, a concentração máxima de DMSO que poderia ser utilizada nas concentrações dos extratos sem causar morte celular (Figura 19).

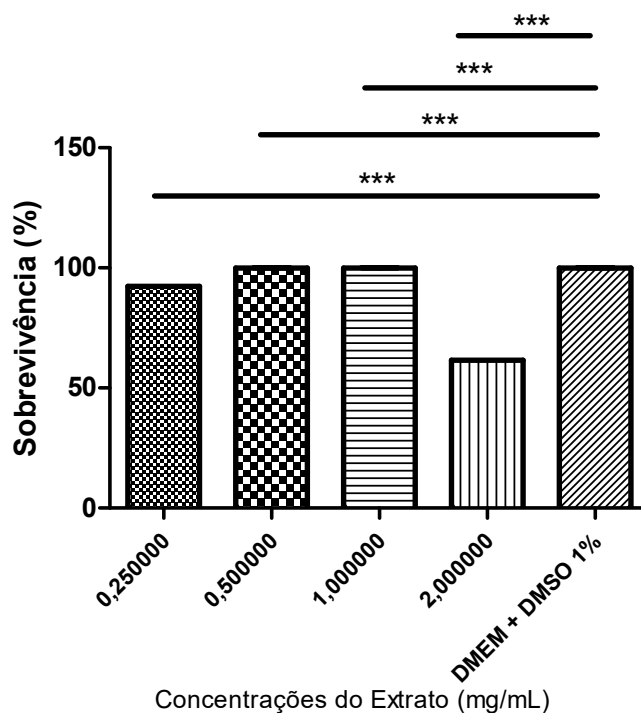


**Figura 19 - Ensaio de citotoxicidade do DMSO sobre as culturas celulares NIH 3T3, L929, PC3 e B16F10.**

Após 24 horas de exposição das linhagens normais de fibroblastos NIH 3T3 e L929 e das linhagens de células tumorais PC3 e B16F10 aos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*, foi realizada avaliação da viabilidade celular (sobrevivência das células) em cada diluição dos extratos (tratamentos), sendo que os valores de absorvância obtidos foram convertidos em % de viabilidade celular em relação às células expostas aos diferentes tratamentos, tendo como grupo controle negativo o DMSO em meio DMEM, considerado como 100%.

Observa-se que as células do grupo controle permaneceram vivas. Verifica-se também que não apresentaram diferenças significativas do grupo controle para ambos os extratos em todos os ensaios.

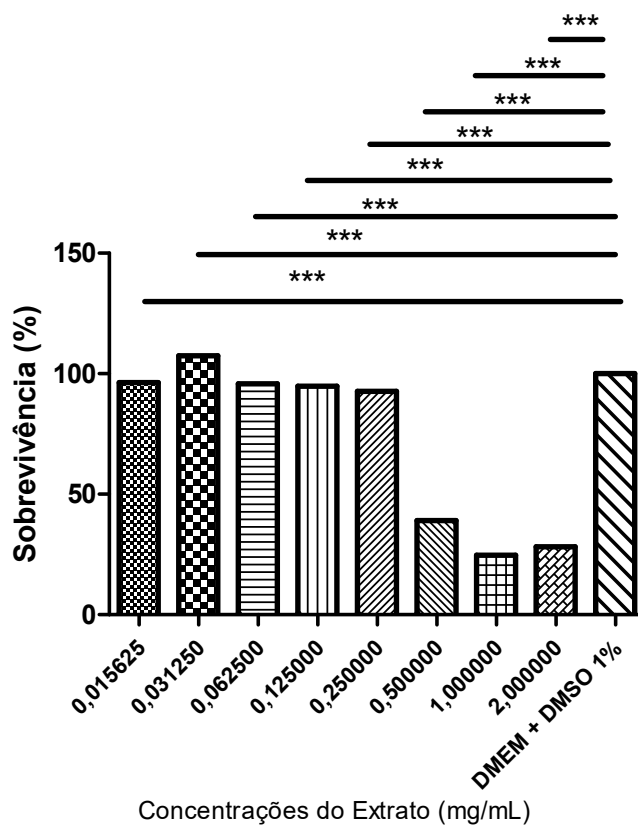
Na análise da figura 20, observando as concentrações do extrato da casca, a viabilidade celular das células normais NIH 3T3 foi superior a 70% para as concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 20 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais NIH 3T3 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.**

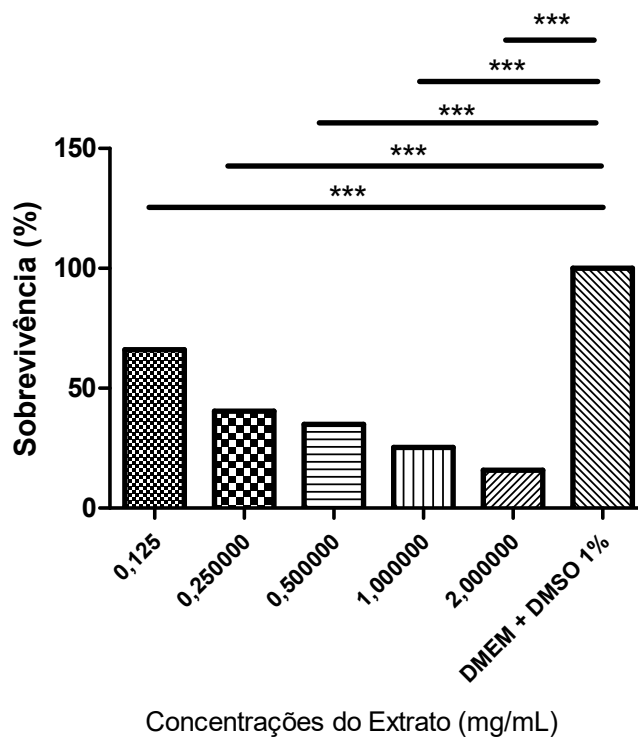


Na análise da figura 21, observando as concentrações das folhas, a viabilidade celular das células normais NIH 3T3 foi superior a 90% nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL e 0,015625 mg/mL, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



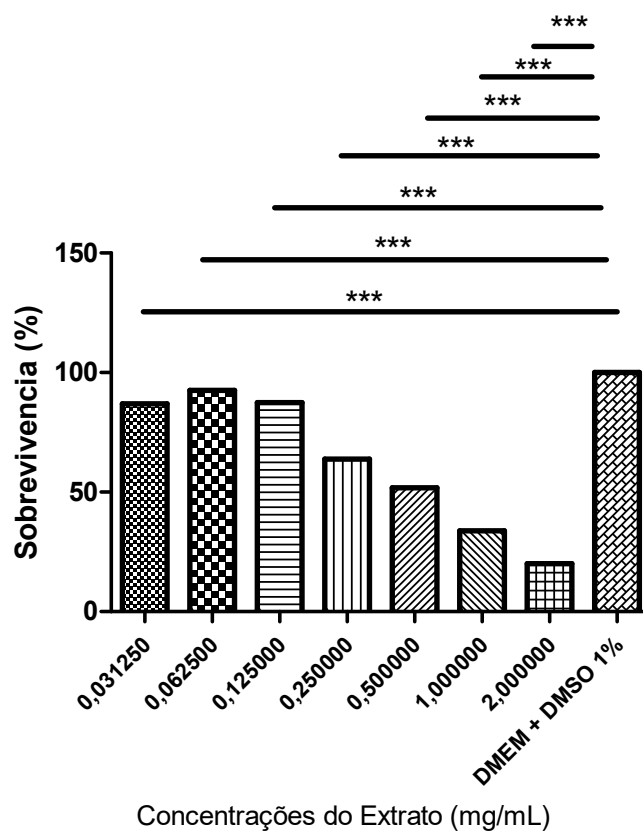
**Figura 21 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais NIH 3T3 após tratamento com extrato das folhas com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.**

Na análise da figura 22, observando as concentrações do extrato da casca houve viabilidade celular das células normais L929 superior a 50% somente para a concentração de 0,125 mg/mL quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



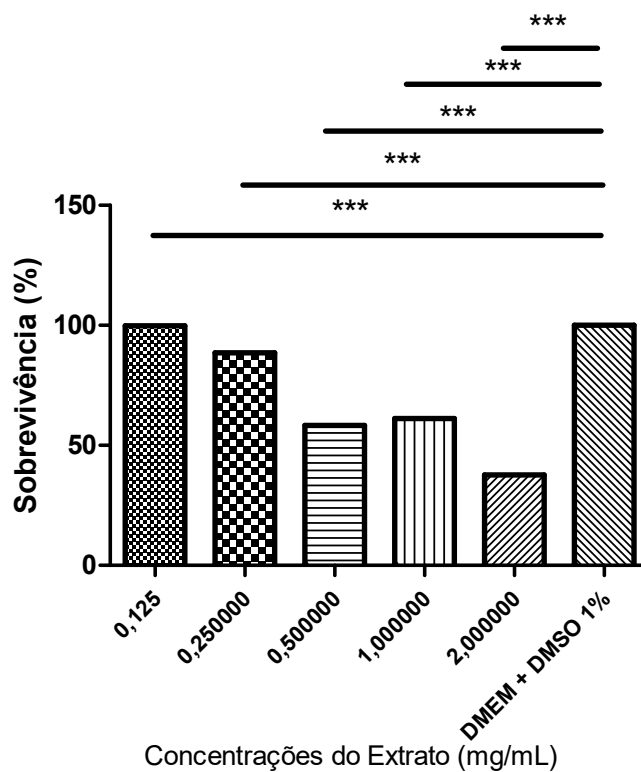
**Figura 22 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais L929 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.**

Na análise da figura 23, observando as concentrações do extrato das folhas, houve viabilidade celular das células normais L929 superior a 50% para as concentrações 0,03125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



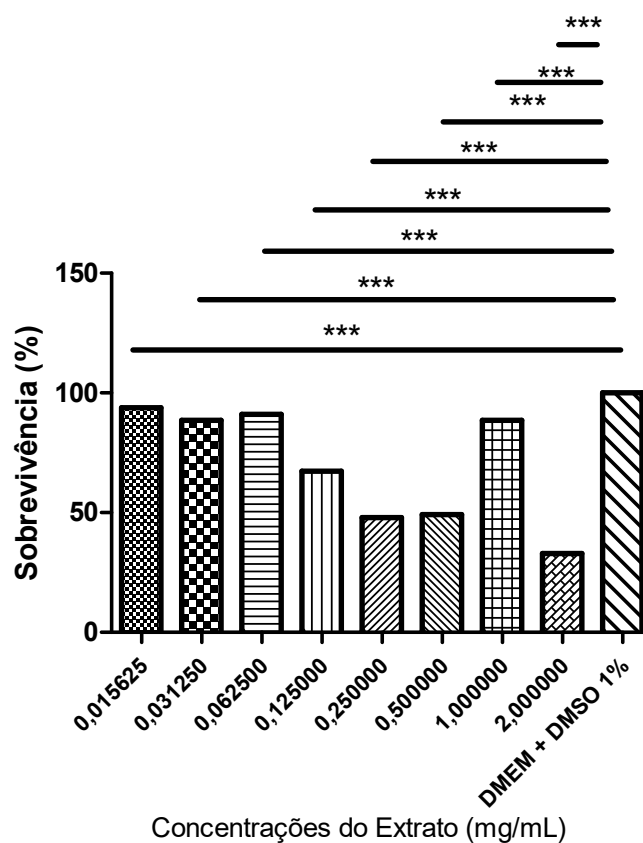
**Figura 23 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais L929 após tratamento com extrato das folhas com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com grupo o tratado com DMEM + DMSO 1%.**

Na análise da figura 24, observando as concentrações do extrato da casca, houve redução da viabilidade celular para as células tumorais PC3 somente na concentração de 2 mg/mL, quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). As demais concentrações apresentaram viabilidade celular acima de 60%.



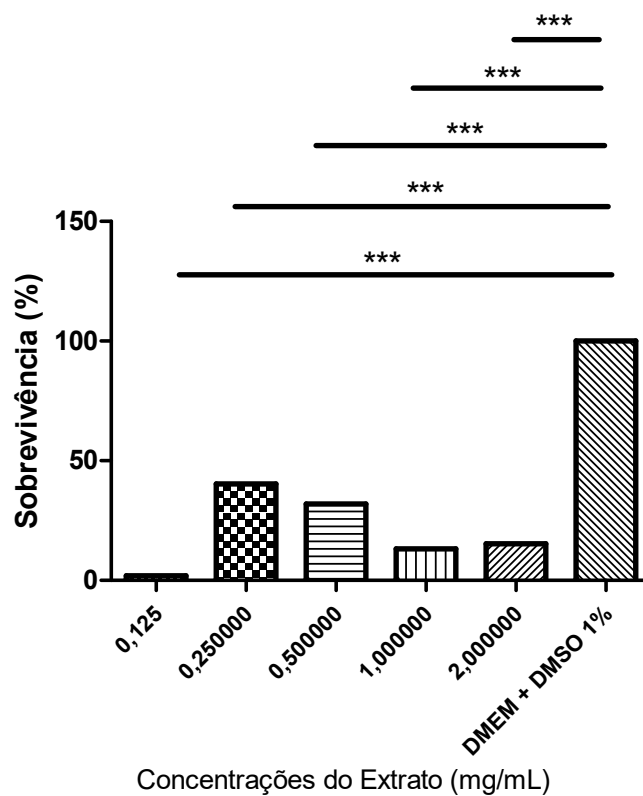
**Figura 24 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células tumorais PC3 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.**

Na análise da figura 25, observando as concentrações do extrato das folhas, houve redução da viabilidade celular para as células tumorais PC3 na concentração de 0,25 mg/mL e 2 mg/mL quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). As demais concentrações apresentaram viabilidade celular acima de 70%.



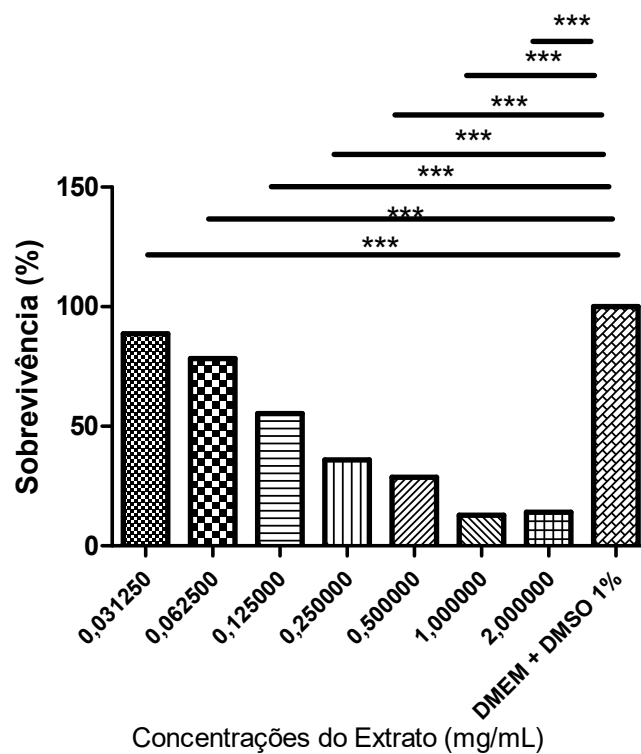
**Figura 25 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células tumorais PC3 após tratamento com extrato das folhas com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com grupo o tratado com DMEM + DMSO 1%.**

Na análise da figura 26, observando as concentrações do extrato da casca, houve redução da viabilidade celular para as células tumorais B16F10 em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 26 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células tumorais B16F10 após tratamento com extrato da casca com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.**

Na análise da figura 27, observando as concentrações do extrato das folhas, houve redução da viabilidade celular para as células tumorais B16F10 nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 27 - Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células tumorais B16F10 após tratamento com extrato das folhas com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. \*\*\* =  $p < 0,001$  em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.**

## 6 DISCUSSÃO

Em relação à coleta de material, os resultados apresentados na tabela 04 possibilitam verificar que os extratos apresentaram uma grande variação no que se refere a rendimento. Para todos os ensaios realizados utilizou-se aproximadamente 4 gramas de cada extrato. Nesse sentido, sugere-se que em futuros trabalhos com esta planta, sejam observados tais resultados no intuito de coletar apenas a quantidade necessária para o desenvolvimento dos ensaios, evitando a retirada de material vegetal em excesso.

Nas análises realizadas, os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* apresentaram atividade inibitória contra o microrganismo *Staphylococcus aureus* como se pode observar no teste de difusão em ágar pelo método dos poços (figuras 7A, 8A, 7B e 8B). Black (2002) esclarece que a atividade antimicrobiana nesta técnica ocorre pela difusão do agente quimioterápico em todas as direções do ágar durante a incubação.

Os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* apresentaram halos de inibição maiores que 10 mm. Este fato é importante, pois a maioria dos antibióticos de uso clínico é ativa contra microrganismos sensíveis a partir de halos superiores a este valor (GONÇALVES et al., 2006). De acordo com a tabela 02 que apresenta critérios para a atividade antimicrobiana dos extratos segundo Parekh e Chanda (2007) e Santos et al. (2007) tanto o extrato da casca quanto o extrato das folhas apresentaram atividade antimicrobiana, sendo considerados muito ativos. Esta observação tem sido adotada por diversos pesquisadores para que se possa indicar qual espécie vegetal deve passar para a etapa de determinar o valor da concentração inibitória mínima (ESSAWI e SROUR, 2000; BRANTNER et al., 1994; ALVES et al., 2000).

Na análise da figura 09, observa-se que apresentaram halos de inibição com diferença significativa entre a menor concentração (100 mg/mL) e a maior concentração (300 mg/mL) testadas da casca. Na figura 10, observa-se que apresentaram halos de inibição com diferença significativa entre a menor concentração (100 mg/mL) e a concentração intermediária (200 mg/mL) e a menor concentração (100 mg/mL) e a maior concentração (300mg/mL) testadas das folhas.



De acordo com a tabela 07, pode-se observar que a média dos halos nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL do extrato da casca é de 31,125, 33,0417 e 33,875 mm, respectivamente, e a média dos halos nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/mL do extrato das folhas é de 24,3333, 27,6667 e 29,0833 mm, respectivamente. Ficando evidente que em todas as concentrações testadas o extrato da casca da *Terminalia fagifolia* demonstrou maior inibição contra o microrganismo *Staphylococcus aureus* do que o extrato das folhas.

Em relação aos ensaios das CIMs, gradiente de ação (tabela 08) e gradiente de concentração (Quadros 1 a 6), considerando os critérios sugeridos por Hawser e Islam (1999) e Hörner et al., (2008) os resultados revelaram que os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* inibem o crescimento do microrganismo *Staphylococcus aureus*, demonstrando inibição de 100% e mais de 90%, respectivamente, do inóculo bacteriano na concentração de 75 mg/mL. Portanto, esses extratos apresentam potencial para serem usados na produção de fitoterápicos contra infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, ressaltando que ainda não havia sido testado o extrato das folhas desta planta contra esse microrganismo.

Araújo et al. (2015) também observaram em seus experimentos, que o extrato etanólico e frações da casca da *Terminalia fagifolia* apresentaram atividade antibacteriana para o microrganismo *Staphylococcus aureus*.

No estudo conduzido por Santos e Alves (2012) *Staphylococcus aureus* foi testado frente a onze diferentes extratos vegetais e também obtiveram a inibição do crescimento. Em vista disso, os extratos vegetais e suas frações, em diferentes concentrações, podem ser capazes de afetar o crescimento desse microrganismo, posto que vários estudos revelam algum grau de sensibilidade.

Na literatura podemos encontrar vários estudos realizados com o gênero *Terminalia* que revelam atividades antibacterianas. Fyhrquist et al. (2002) citam a *Terminalia kaiserana* F. Hoffm. e a *Terminalia sericea* Burch. ex DC., utilizadas em países africanos para tratarem várias enfermidades como gonorreia, sífilis, diarreia, hipertensão, câncer e demonstraram atividade antibacteriana em ensaios realizados. As espécies *Terminalia macroptera* Guill et Perr (CONRAD et al., 1998; SILVA et al., 1997) e *Terminalia mantaly* H. Perrier (KOKORA et al., 2013) também apresentam atividade antibacteriana.

A avaliação do potencial antimicrobiano da *Terminalia fagifolia* contra *Staphylococcus aureus* teve grande relevância devido à importância desse microrganismo para a Saúde Pública, justificando as razões de investigações em compostos de plantas, pois podem ser usados para tratar infecções crônicas, além de representar uma saída para os grandes problemas relacionados com o aumento da resistência microbiana aos medicamentos, presença de efeitos colaterais nos medicamentos sintéticos, segurança e eficácia com menor efeito adverso e menor custo da terapia (ALBERNAZ et al., 2010; ABDOLLAHZADEH et al., 2011; SASIDHARAN et al., 2011; SILVA et al., 2010), além da possibilidade de obtenção de um novo fitoterápico ou mesmo um medicamento sintético produzido a partir de seus compostos.

Estudos realizados com o intuito de conhecer as substâncias químicas presentes no extrato etanólico da casca da *Terminalia fagifolia* apresentaram vários constituintes químicos como flavanonas 1, 2, 4 - 8; chalconas 9 e 10; diaril propanos 11 e 12, flavana 13; ácido gálico 14; triterpenos 15 - 23 e o esteróide sitosterol (Anexo 1) (GARCEZ et al., 2006; NUNES, 2014), constituintes estes que podem conferir ao extrato uma maior atividade de inibição do *Staphylococcus aureus* em relação ao extrato etanólico das folhas que, de acordo com Ayres et al. (2009), apresenta a estrutura de um flavonoide (**1**), dois tocoferóis (**3** e **4**), três triterpenos em mistura (**5-7**) e dois esteroides (**2** e **8**) (Anexo2).

Considerando que substâncias naturais como os extratos de plantas podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos causados pela ação dos radicais livres no organismo, em relação à atividade antioxidante Nunes et al. (2014) avaliaram o extrato etanólico da casca da *Terminalia fagifolia* e frações, obtendo uma CE<sub>50</sub>, a partir da atividade sequestradora do radical DPPH, mais elevada do que os controles utilizados, butil-hidroxi-tolueno (BHT) e catequina.

Sousa et al. (2007), avaliaram o extrato etanólico das folhas da *Terminalia fagifolia* e mostraram que há atividade sequestradora do radical DPPH e que na concentração de 100 µg/mL, esta atividade apresentou-se superior a 60% em relação aos controles, ácido gálico e rutina, utilizados no ensaio. Relatam ainda, que o extrato avaliado desta espécie apresentou alto teor de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies descritos na literatura (VELIOGLU et al., 1998; KÄHKÖNEN et al., 1999).

Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes de origem natural e têm chamado muito a atenção por sua função química e apresentarem propriedades redutoras. Apresentam-se de várias formas, como: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (SILVA, 2010), constituintes estes presentes nos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* (GARCEZ et al., 2006; AYRES et al., 2009; NUNES, 2014).

Ayres et al. (2008) também realizaram análises antioxidantes no extrato EtOH das folhas e frações da *Terminalia fagifolia* os quais exibiram atividade antioxidante superior ao controle BHT em todas as concentrações testadas.

Estas análises sugerem que existem constituintes químicos que contribuem particularmente e mais efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres, nos extratos da casca e das folhas, sendo de grande importância a continuidade dos estudos para avaliação da ação antioxidante de substâncias isoladas desta espécie.

Para verificar o efeito citotóxico dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* procurou-se avaliar os seus efeitos sobre a viabilidade celular em linhagens normais de fibroblasto NIH 3T3 e L929 e linhagens tumorais PC3 e B16F10 a partir do método colorimétrico com MTS.

Primeiramente foi realizada avaliação da citotoxicidade do veículo utilizado para a diluição dos extratos, o DMSO, determinando desta forma a concentração máxima de DMSO que poderia ser utilizada nas concentrações dos extratos sem causar morte celular, o qual ficou estabelecido em 1%, de acordo com a figura 19.

Ao analisarmos as figuras 20, 21, 22 e 23 fica evidente que o extrato das folhas mantém uma melhor viabilidade celular do que o extrato da casca para as linhagens normais NIH 3T3 e L929, sendo de 70% e 50%, respectivamente, e em concentrações menores que 0,5 mg/mL.

Em relação às linhagens tumorais PC3 e B16F10, analisando as figuras 24, 25, 26 e 27, observa-se que tanto o extrato das cascas quanto o extrato das folhas promoveram uma redução da viabilidade celular, ficando em torno de 60% a 70% para as duas linhagens tumorais, ressaltando que a linhagem celular tumoral B16F10 apresentou redução da viabilidade celular em concentrações menores que 0,25 mg/mL.

Em relação ao extrato da casca os dados adquiridos estão de acordo com os resultados encontrados por Garcez et al. (2006), onde em seus ensaios com o extrato da casca da *Terminalia fagifolia* obtiveram atividade citotóxica sobre células de carcinoma de laringe (HEP2) e células mucoepidermoide (H292) de câncer de pulmão.

Araújo et al. (2015) ao realizarem testes do extrato da casca em linhagem MCF – 7 (câncer de mama), também obtiveram atividade antitumoral em potencial.

Ressalta-se que não foram encontrados na literatura trabalhos sobre atividade antineoplásica em linhagens celulares tumorais com o extrato das folhas da *Terminalia fagifolia*.

Existem vários trabalhos citando outras espécies do gênero *Terminalia* que foram investigadas quanto às atividades antineoplásicas e citotóxicas. A espécie *Terminalia arjuna* Wight & Arn. apresenta atividades anticâncer e citotóxica (KANDIL; NASSAR,1997; DWIVEDI, 2007; SAXENA et al., 2007; CHENG; LIN; LIN, 2002; EL-AMEEN et al., 2013; MANDLOI, 2013) a espécie *Terminalia sericea* apresenta atividade citotóxica (MOSHI; MBWAMBO, 2005; ELDEEN et al., 2006; MOCHIZUKI; HASEGAWA,2007) e *Terminalia catappa* L. que demonstra atividade anticâncer (CHYAU; KO; MAU, 2006; KINOSHITA et al.,2007; NAGAPPA et al., 2003, CHU et al., 1993; MANDLOI, 2013).

A ISO 10993-5 estabelece a classificação dos compostos em quatro categorias quanto à sua toxicidade, a saber: não citotóxico, levemente citotóxico, moderadamente citotóxico e severamente citotóxico (Tabela 03). A partir dessa informação pode-se inferir que o extrato da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* demonstraram citotoxicidade severa, respectivamente, para as linhagens tumorais PC3 e B16F10.

Conforme o *Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests* (OECD/GD 129, 2010), para que o ensaio seja considerado aceitável pelo menos uma das concentrações avaliadas devem apresentar citotoxicidade  $> 0\%$  e  $\leq 50\%$  de viabilidade celular, e citotoxicidade  $> 50\%$  e  $< 100\%$ . Então, de acordo com esses parâmetros, foi verificado que o ensaio de viabilidade celular quantitativo pelo método colorimétrico com MTS apresentou valores que estão em conformidade com os critérios de aceitabilidade.

A procura por novas moléculas que apresentem atividades de inibição de células tumorais e que causem o mínimo de danos às células normais têm sido de grande relevância

(KLEIN, 2012) na busca por medicamentos mais efetivos para tratar tumores, reduzir a resistência do paciente às drogas, diminuir a toxicidade, aumentar a especificidade e biodisponibilidade de fármacos (CHABNER e ROBERTS, 2005).

Dessa forma, a crescente incidência e resistência às terapias convencionais (ILKOVITCH e LOPES, 2008; NAKAYAMA, 2010), tem levado à busca por novas estratégias terapêuticas para o melanoma, considerado o tipo de câncer de pele mais letal (VERONEZ, 2012) e para o câncer de próstata considerado o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma (INCA, 2015).

O melanoma quando comparado aos outros cânceres, apresenta uma das piores taxas de resposta à quimioterapia. Poucos agentes demonstram atividade antitumoral significativa contra o melanoma metastático (ATKINS, 1997; GOGAS et al., 2007). Com uma taxa de resposta a cada agente ou à combinação de agentes de 15 a 25% (JILAVEANU et al., 2009).

A avaliação da citotoxicidade em células tumorais como a B16F10 e PC3 é de suma importância para pesquisadores e pacientes acometidos por essas doenças. Portanto, resultados relevantes, como os obtidos nesse trabalho com os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* podem ser considerados para futuros estudos de novas drogas antibacterianas e antitumorais.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho permitiram concluir que:

- ✓ Os extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, portanto são considerados muito ativos pois apresentaram halos de inibição acima de 20 milímetros;
- ✓ O extrato da casca demonstrou maior inibição do microrganismo *Staphylococcus aureus* do que o extrato das folhas, apresentando média de halos acima de 30 milímetros e acima de 24 milímetros, respectivamente. Sabendo que o extrato da casca contém mais constituintes químicos do que o extrato das folhas os resultados do antibiograma sugerem que existe algum ou alguns destes constituintes que contribuem de forma mais efetiva para essa ação;
- ✓ Tanto o extrato da casca quanto o extrato das folhas apresentam atividades antioxidantes significativas;
- ✓ Os extratos da casca e das folhas demonstraram viabilidade celular nas linhagens celulares normais NIH 3T3 e L929, apresentando viabilidade celular  $\geq 50\%$ ;
- ✓ Os extratos da casca e das folhas demonstraram atividade citotóxica para as linhagens tumorais PC3 e B16F10, apresentando redução da viabilidade celular em torno de 60% e 70%, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, S. H. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry (Tehran)**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.

AGUIAR, L. M. S. et al. A Diversidade Biológica do Cerrado. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Org.) **Cerrado: ecologia e caracterização**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

ALBERNAZ, L. C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600775>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

ALBERT, A. **Selective Toxicity**. 4th edition, Methuen Co, London, 1968.

ALBUQUERQUE, U. L. **Introdução à etnobotânica**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 93 p.

ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P. (Org.). **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica**. Recife: Livro rápido, 2004. 189 p.

ALCORN, J. B. The scope and aims of ethnobotany in a developing world. **Ethnobotany: Evolution of a discipline**, v. 23, 1995.

ALMADA, E. D. Sociobiodiversidade Urbana: por uma etnoecologia das cidades. In: SILVA, V. A.; ALMEIDA, A. L. S.; ALBUQUERQUE, U. P. **Etnobiologia e Etnoecologia**. Pessoas & Natureza na América Latina, 1. ed., Recife: NUPEEA, 2010. p. 39-63.

ALMEIDA, M. G. Territórios de quilombolas: pelos vãos e serras dos Kalunga de Goiás-patrimônio e biodiversidade de sujeitos do Cerrado. Instituto de Estudos Sócio-Ambientais-IESA-Universidade Federal de Goiás-Brasil. **Ateliê Geográfico – EDIÇÃO ESPECIAL**, Goiânia-GO, v. 1, n. 9. 2010. p. 36-63. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/1186/1/16682-68326-1-PB.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA CPAC, 1998. p. 287 – 556.

\_\_\_\_\_. Flora Vascular do Cerrado. In: S.M. SANO e S.P. ALMEIDA (Eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa, 1998.

ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 85-91, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342003000400010>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

AMORIM, A. P. O. **Estudo fitoquímico do caule de *Talinum Triangulare* (Portulacaceae) e propriedades antioxidante, quelante e de inibição da enzima tirosinase**. 2007. 97 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2007. 97 p. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp036423.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2014.

AMORIM, E. L. C. et al.. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarna**, v.15, n. 1-3, p. 66-69, 2003. Disponível em: <[http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path\[\]=848&path\[\]=621](http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path[]=848&path[]=621)>. Acesso em: 05 out. 2015.

AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Basílica**, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002. Acesso em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v16n2/a06v16n2.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2015.

ANDERSON, W. A. D.; JOHN M. KISSANE, M. D. **Pathology**, 7 ed. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan S.A. 1982.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, Vanessa Cristina; HAAS, Vanderlei José. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbti/v18n1/a06v18n1.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

ANJOS, R. S. A; CYPRIANO, A. **Quilombolas – tradições e cultura da resistência**. Aori Comunicações. São Paulo: Petrobras, 2006.

ARANGO, H. G. **Bioestatística: teórica e computacional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ARAUJO, A. R. et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015. Disponível em: <<http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-015-0084-2>>. Acesso em: 21 agos. 2015. *PMC*. Web. 18 Abr. 2016.

ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 28 n. 6, p. 996, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n6/26828.pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2014.

ASLANI, A. et al. The predictive value of body protein for chemotherapy-induced toxicity. **Cancer**, v. 88, p. 796-803, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097->



[0142%2820000215%2988:4%3C796::AID-CNCR10%3E3.0.CO;2-P/pdf](#)>. Acesso em: 03 jan. 2016.

ATKINS, M. B. The treatment of metastatic melanoma with chemotherapy and biologics. **Current Opinion in Oncology**. v. 9, p. 205-13, 1997.

AYRES, Mariane Cruz Costa et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1509-1512. 2009. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600028>>. Acesso em: 08 jul. 2014.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Piodermites, outras infecções bacterianas da pele e rickettsioses**. (2<sup>a</sup>ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 163-73.

BAKER, S. R. et al. **A pilot study of the prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in swine populations of Brazil and United States**. Proceedings in: American Association of Swine Veterinarians, 2008.

BALICK, M. J.; COX, P. A. **Plants, people and culture**. New York: Scientific American Library, 1997.

BARLTROP, J. A. et al. “5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, Inner Salt (MTS) and Related Analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reducing to Purple water-soluble Formazans as cell-viability Indicators”, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 11, p. 611-614, 1991. Disponível em: <[http://doi:10.1016/S0960-894X\(01\)81162-8](http://doi:10.1016/S0960-894X(01)81162-8)>. Acesso em: 25 mar. 2016.

BAUER, A. W, PERRY, D. M, KIRBY, W. M. M. Drug usage and antibiotic susceptibility of *Staphylococci*. **Journal of the American Medical Association**. 173:475-480, 1960.

BAUR, B.; SCHMID, B. Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. In: GASTON, K. J. **Biodiversity, a biology of numbers and differences**. Oxford: Blackwell Science, p. 169-201, 1996.

BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. **Os alimentos contra o câncer: A prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação**. Tradução de Lucy Magalhães: Petrópolis, RJ: Vozes, 2007. p. 19-42.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M. P. (Ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 463-523, 1989. (Food science and technology, 31).

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167-223, 2001. Disponível em: <[http://doi:10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](http://doi:10.1016/S0098-2997(00)00007-8)>. Acesso em: 19 jan. 2016.

BIAVATTI, M. W. **Química e bioatividade da *Raulinoa echinata*, espécie endêmica do Vale do Itajaí – SC.** 2001. 248 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Estafilococcus. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (ed.) **Microbiologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BOREFREUND, P. “A Simple Quantitative Procedure using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assay (HTD/NR-90)”, **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, p. 7-9, 1984. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2F01666038>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

BRANTNER, A.; PFEIFFER, K. P.; BRANTNER, H. Applicability of diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. **Die Pharmazie**, v. 49, n. 7, p. 512-516, 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **PORTALBio.** Alertas de Desmatamento para o Bioma Cerrado, 2008. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_chm\\_rbbio/\\_arquivos/alertas\\_desmatamento.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/alertas_desmatamento.pdf)>. Acesso em: 08 jun. 2014.

BRODY, T. M. **Farmacologia Humana/Editores Kenneth P. Minneman, Lynn Wecker;** Editor Associado Joseph Lerner, Theodore M. Brondy; [Tradução Vilma Ribeiro De Souza Varga...et al.]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 491-510

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 18, p. 1188-1196, 1989. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198905043201806>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

BUSKÜHL, H. **Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de Lactonas Sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides* (LAM) PERS.** 2007. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Humberto%20Buskuhl.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2016.

CALIXTO, J. S.; RIBEIRO, E. M. O Cerrado como fonte de plantas medicinais para uso dos moradores de comunidades tradicionais do alto Jequitinhonha, MG. **II Encontro nacional de Pós graduação em Ambiente e Sociedade, Indaiatuba**, 2004. Disponível em: <[http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/cea/Texto\\_Calixto.pdf](http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/cea/Texto_Calixto.pdf)>. Acesso em: 17 de out. 2015.

CARNEIRO, E. Singularidades dos Quilombos. In: MOURA, C. (Org.) **Os Quilombos na Dinâmica Social do Brasil.** Maceió: Edufal, 2001.

CARNIELLO, M. A. et al. Quintais urbanos de Mirassol D'Oeste-MT, Brasil: uma abordagem etnobotânica. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 3, p. 451-470, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/aa/v40n3/05.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2015

CARVALHO, G. P. **Avaliação in vivo da atividade antitumoral extrato bruto etanólico e fração clorofórmica de *Vernonia scorpioides***. 59 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Florianópolis, 2012. Disponível em: < <https://ead.ufsc.br/biologia/files/2014/05/Gilbrair-Paulo-de-Carvalho.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre Modificação estrutural para otimização de atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000107&pid=S0100-4042199800050000800004&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000107&pid=S0100-4042199800050000800004&lng=en)>. Acesso em: 05 out. 2015.

CERQUEIRA, M. A. F. et al. Estudo dos efeitos ansiolíticos, antidepressivos e relaxante muscular de *Terminalia brasiliensis* CAMB. e *Terminalia fagifolia* MART. et ZUCC. In: XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2004, Manaus - AM. **Anais do XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2004.

CEZARI, E. J. **Plantas medicinais: atividade antitumoral do extrato bruto de sete plantas do cerrado e o uso por povos tradicionais**. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Universidade Federal do Tocantins – Palmas, 2010.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. JR. Timeline: chemotherapy and the war on câncer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 65-72, 2005.

CHAPAVAL, L. et al. Cultura, crescimento e identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* em leite de cabra. **Embrapa Caprinos e Ovinos. Circular Técnica**, 2009. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/748116/1/ct41.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

CHENG, H; LIN, C.; LIN, T. Antiherpes simplex virus types 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Research**, v. 55, p. 447-455, 2002. Disponível em: < [doi:10.1016/S0166-3542\(02\)00077-3](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00077-3)>. Acesso em: 05 abr. 2016.

CHYAU, C, K. O. P.; MAU, J. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Science and Technology-Lebensmittel**, v. 39, p. 1099 – 1108, 2006. Disponível em: < [doi:10.1016/j.lwt.2005.07.016](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.016)>. Acesso em: 08 abr. 2016.

CI-Brasil. CONSERVATION INTERNATIONAL. **Hotspots. Preservando as riquezas mais ameaçadas da terra**. Belo Horizonte, 1999.

COELHO, F. B. R. **O uso das plantas no cotidiano da comunidade quilombola Kalunga do Mimoso –Tocantins: um estudo etnobotânico.** 2009. 113 p. Dissertação de Mestrado: Curso de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins. 2009. 113 p. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp126172.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

CONRAD, J.;VOGLER, B.; KLAIBER, I.; ROOS, G.; WALTER, U.; KRAUS, W. Two Triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 647-650, 1998. Disponível em: <[doi:10.1016/S0031-9422\(98\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00154-X)>. Acesso em 05 abr. 2016.

COSTA - LOTUFO, L. V. et al. A contribuição de produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, vol. 2, n.1, p. 47-58, 2010. Disponível em: <<http://rvq.s bq.org.br/index.php/rvq/article/viewDownloadInterstitial/65/119>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

COSTA, R. S. **Estudos de pré-formulação e formulação de Heliotropium indicum (L.) DC (Boraginaceae).** 2010. 141 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/5634>>. Acesso: 31 out. 2015.

COUTO, R. C. et al. **Infecções hospitalares no Brasil e no mundo. Couto RC, Pedrosa TM, Nogueira JM. Infecção hospitalar: epidemiologia e controle.** Rio de Janeiro: Medsi, p. 1-5, 1999.

CRAGG, G. M. et al. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1657-1668, 1993. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np50100a001>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

CRUZ, F. J. S. M. et al. Efeito Inibitório dos extratos etanólicos de *Terminalia fagifolia* e *Qualea grandiflora* e do extrato etanólico e frações de *Terminalia brasiliensis* sobre promastigotas de *Leishmania major*. In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2004, Manaus - AM. **Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2004.

CUNHA, T. L. C. et al. Atividade antibacteriana e citotóxica de *Terminalia brasiliensis*, *Terminalia fagifolia*, *Combretum leprosum* e *Qualea grandiflora*. In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2004, Manaus - AM. **Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2004.

DANIEL, J. F. S. **Metabólitos especiais isolados de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) e de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae).** 2004. Tese de Doutorado, UFRRJ, p. 293-294, 2004. Disponível em:<<http://www.ice.ufrj.br/posgrad/pdf/tese-023-r.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

DANTAS, L. I. S. et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis schauer* sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. **Holos**, v. 26, n. 5, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15628/holos.2010.560>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

DEUS, M. J. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500**. Brasília: MMA/SBF, 2011. 532 p.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230. p.

DIAS, B. F. S. **Cerrados: uma caracterização. Alternativas de desenvolvimento dos cerrados**. IBAMA, 1992. p. 11-25.

DIEGUES, Antônio Carlos Sant'Ana. **Etnoconservação: novos rumos para a conservação da natureza**. São Paulo: Ed. HUCITEC, 2000.

\_\_\_\_\_. **O mito moderno da natureza intocada**. São Paulo: USP/NUPAUB, 1996.

DUESBERG, P.; RASNICK, D. **Aneuploidy, the Somatic Mutation That Makes Cancer a Species of Its Own. Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 47, p. 81-107, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0169%28200010%2947:2%3C81::AID-CM1%3E3.0.CO;2-%23/pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

DWIVEDI, S. *Terminalia arjuna* wight & Arn- A useful drug for cardiovascular disorders. **Journal Ethnopharmacology**, v.114, p. 114-129, 2007. Disponível em: <[doi:10.1016/j.jep.2007.08.003](http://doi:10.1016/j.jep.2007.08.003)>. Acesso em: 05 abr. 2016.

EL-AMEEN, S. M. et al. Chemical Investigation and Antioxidant Activity of Phenolic Acids from the Leaves of *Terminalia arjuna*. **Global Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 448-456, 2013. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/273350842\\_Chemical\\_Investigation\\_and\\_Antioxidant\\_Activity\\_of\\_Phenolic\\_Acids\\_from\\_the\\_Leaves\\_of\\_Terminalia\\_arjuna](https://www.researchgate.net/publication/273350842_Chemical_Investigation_and_Antioxidant_Activity_of_Phenolic_Acids_from_the_Leaves_of_Terminalia_arjuna)>. Acesso em: 08 abr. 2016.

ELDEEN, I. M. S.; ELGORASHI, E. E.; MULHOLLAND, D. A.; STADEN, J. V. Anolignan B. A bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 103, p. 135-138, 2006. Disponível em: <[doi:10.1016/j.jep.2005.09.005](http://doi:10.1016/j.jep.2005.09.005)>. Acesso em: 08 abr. 2016.

ESSAWI, T.; SROUR, M. J. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal Ethnopharmacology** v. 70, n. 3, p. 343-349 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874199001877>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

ESTRELA, E. Tratado de Cooperação Amazônica – Secretaria Protempore, **Plantas medicinales Amazônicas: Realidad y Perpectativas**, Lima: TCA, 1995. 302 p.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. (Coord.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica. 1989. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/fidalgo111/fidalgo-e-bononi-1989#>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

FORD, R. I. Ethnobotany: historical diversity and synthesis. Names. **Journal of the American Name Society Postdam**, NY, v. 67, p. 33-49, 1978.

FORZZA, R. C. et al. Introdução. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2010. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Acesso em: 30 abr. 2015.

FREIRE, F. M. T. et al. Plantas Medicinais do Trópico Semi-Árido do Piauí. Aspectos Botânicos. **Produção Científica do Programa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Nordeste na UFPI**, p. 160-172, 1992.

FUNDAÇÃO CULTURAL PALMARES. 2016. Disponível em:<[http://www.palmares.gov.br/?page\\_id=37551](http://www.palmares.gov.br/?page_id=37551)>. Acesso em: 15 fev. de 2016.

FYHRQUIST, P. et al. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of Terminalia and Combretum (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 169-177, 2002. Disponível em: <[http://doi:10.1016/S0378-8741\(01\)00375-0](http://doi:10.1016/S0378-8741(01)00375-0)>. Acesso em: 05 abril 2016.

GALLIN, J. L.; SNYDERMAN, R. **Inflammation**, 3: ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

GARCEZ, F. R. et al. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1223-1228, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000700005>>. Acesso em: 06 jul. 2014.

GARCEZ, F. R. et al. Estudo Químico de *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). Em: **28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005**, Poços de Caldas. Livro de Resumos da 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, p. PN253, 2005. Disponível em: <[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/38/111/38111199.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/111/38111199.pdf)>. Acesso em: 06 jul. 2014.

GELATTI, L. C. et al. Sepse por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 4, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000400019>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

GOGAS, H. J.; KIRKWOOD, J. M.; SONDAK, V. K. Chemoterpy for metastatic melanoma: time for a change? **Cancer**. v. 109, p. 6455-64, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.22427/pdf>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

GOMES, M. J. P. Gênero *Staphylococcus* spp. **LABACVET-URGS** – Porto Alegre, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2016.

GONÇALVES, A. L. et al. Atividade antimicrobiana de algumas plantas medicinais nativas contra bactérias encontradas em úlceras de decúbito. **O Biológico**, v. 68, p. 133, 2006. Disponível em <[http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68\\_supl\\_raib/133.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/133.pdf)>. Acesso em: 12 nov. 2015.

GOTTIEB, O. R.; MORS, W. B. A floresta brasileira: fabulosa reserva fitoquímica. **Revista Correio da Unesco**: Rio de Janeiro: p. 35–37,1993.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso state Brazil: a review. **Acta Botânica Brasílica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062003000400009>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

GUERRA, C. B. Biodiversidade e extinção de PLANTAS MEDICINAIS In: BRANDÃO, M. G. L. (org.). **Plantas medicinais e fitoterapia. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais**. Ed. Gráfica O Lutador, Belo Horizonte, MG, p. 37 – 45. 2003.

HALEY, ROBERT, W. et al. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals: possible role of the house staff-patient transfer circuit. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, n. 3, p. 297-308, 1982.

HENTY, P. H. et al. **Harrison's – principles of internal medicine**. 15. Ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Companies, 2001.

HERMANS, K. et al. *Staphylococcus*. In: GYLES, C. L.; et al. (ed.) **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4° ed. Iowa: Wiley - Blackwell, 2010. cap. 5, p. 75 – 89.

HOSTETTMANN, K. et al. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. **Série de textos da Escola de Verão em Química IV**, São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003. 152 p.

HUSSAR, D. A. **New drugs 2000. Part I**. Nursing. v. 30, p. 55-62, 2000.

ILKOVITCH, D.; LOPEZ, D. M. Immune modulation by melanoma-derived factors. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 977-985, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0625.2008.00779.x/pdf>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro : Inca, 2011. 128 p.: il. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc do cancer.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Câncer de pele melanoma.** Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma). Acesso em: 20 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. **Câncer de pele não-melanoma.** Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_ao\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma). Acesso em: 20 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. **Câncer de pele.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-tipos.asp>. Acesso em: 20 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. **Câncer de próstata.** Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>. Acesso em: 20 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p. Disponível em: [http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas\\_incendencia\\_cancer\\_2012.pdf](http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incendencia_cancer_2012.pdf). Acesso em: 04 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Estimativa 2016/2017.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/estimativa\\_incendencia\\_cancer\\_2016](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/estimativa_incendencia_cancer_2016). Acesso em: 20 dez. 2015.

ISO 10993-5; Biological evaluation of medical devices, Part 5, **Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods, American National Standard, Published by Association for the advancement of Medical instrumentation,** 2009. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>. Acesso em: 07 abr. 2016.

JILAVEANU, L. B.; AZIZ, S. A.; KLUGER, H. M. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? **Clinics in Dermatology**, 27(6): 614-25, 2009.

JONES, M. **Methicillin resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis.** European Network for Antimicrobial Resistant (ENARE). Eijkman-Winkler Institute. University Hospital Utrecht. The Netherlands. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10442417>. Acesso em: 20 dez. 2015.

JORGE, S. S. A.; MORAIS, R.G. Etnobotânica de Plantas Medicinais. In: COELHO, M.F.B; JÚNIOR, P.C.; DOMBRESKI, J.L.D. (Org.). **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais.** Cuiabá. MT, p. 89-98, 2003.

JOYCE, C. **Earthly goods: medicine hunting in the rainforest.** New York. Ed. Little, Brown and company, 1994. 304 p.



KÄHKÖNEN, M. P. et al. **Journal of Agricultural**. Food Chemistry. 1999, 47, 3954.

KANDIL, F. E.; NASSAR, M. I. A Tannin anti-cancer promoter from *Terminalia arjuna*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1567-1568, 1997. Disponível em: <[doi:10.1016/S0031-9422\(97\)01078-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01078-9)>. Acesso em: 05 abr. 2016.

KINOSHITA, S.; INOUE, Y.; NAKAMA, S.; ICHIBA, T.; ANIYA, Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. **Phytomedicine**, v. 14, p. 755 – 762, 2007. Disponível em: <[doi:10.1016/j.phymed.2006.12.012](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.12.012)>. Acesso em: 08 abr. 2016.

KLEIN, J. B. **Estudo da atividade citotóxica do poliacetileno 5 octa-2,4,6-triil-furan-2(5H)-ona**. 111 f. Dissertação de Mestrado: Universidade do Vale do Itajaí. Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Itajaí, 2012. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Juliana%20Bagatini%20Klein.pdf>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

KOKORA, A. et al. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of four medicinal plants on the in vitro growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 3, n. 3, p. 113-116, 2013. Disponível em: <<http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/530>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J.; **Food Chemistry**, v. 97, p. 109, 2006.

LACEY, R. W. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Streptococci*. **British Medical Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 77-83, 1984.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomy of Vascular Plants Macmillan**. New York: The Macmillan Company, 1951. 823 p.

LEVY, C. E. et al. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_microbiologia\\_completo.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf)>. Acesso em: 04 jan. 2016.

LÖNROTH, E. C.; DAHL, S. E. Citotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. **Acta Odontologica Scand**, v. 59 n.1, p. 34-9, 2001.

\_\_\_\_\_. Citotoxicity of liquid and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyl tetrazolium and neutral red tests. **Acta Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 52-6, 2003.

LOPES, M. A. O. Experiências históricas dos quilombos no Tocantins: Organização, resistência e identidades. Ver. **Patrimônio e Memória**. UNESP – FCLAs – CEDAP, v. 5, n.1, p. 99-118 - out. 2009. Disponível em: <<http://pem.assis.unesp.br/index.php/pem/article/view/116/518>>. Acesso em: 16 out. 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, Vol. II, 1998. 352 p.

LORENZI, H.; MATOS, Francisco J.; FRANCISCO, J. Matos. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Conservation International do Brasil, Brasília**, 2004.

MANDLOI, S.; SRINIVASA, R.; VARMA, R. M. R. Antifungal Activity of Alcoholic Leaf Extracts of *Terminalia Catappa* and *Terminalia Arjuna* on Some Pathogenic and Allergenic Fungi. **Advances in Life Science and Technology**, v. 8, 2007. Disponível em: <<http://iiste.org/Journals/index.php/ALST/article/view/5949/6117>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

MAPLE, P. A. C.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; BRUMFITT, W. World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 333, n. 8637, p. 537-540, 1989. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90076-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90076-7)>. Acesso em: 08 jan. 2016.

MARTIN, G. J. **Etnobotânica: manual de métodos**. Montevideo: Nordan-Comunidad, 2001.

MENDONÇA, R. C. et al. **Flora Vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies**. Cerrado: ecologia e flora. Volume 2. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 423-1279.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2013. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 13 fev. 2014.

MOCHIZUKI M.; HASEGAWA N. Anti-inflammatory effect of extract of *Terminalia sericea* Roots in an experimental model of colitis. **Journal Health Science**, v. 53. n. 3 p. 329-331, 2007. Disponível em: <doi: 10.1248/jhs.53.329>. Acesso em: 08 abr. 2016.

MOFFATT, J. et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 12, p. 2151-2157, 2000. Disponível em: <<http://carcin.oxfordjournals.org/content/21/12/2151.full.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2016.

MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B.. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, Nº 2, p. 38-48, 2007. Disponível em: <<http://joaootavio.com.br/bioterra/workspace/uploads/artigos/etnobotanica-518178b5ca552.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2015.

MOREIRA, B. M.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci*. *Pediatric Clinics of North America*, v. 42, n. 3, p. 619-648, 1995.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. Usos múltiplos de plantas do cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade Sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, n. 27, p. 159-190, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682009000100010](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682009000100010)>. Acesso em 10 mar 2016.

MORI, S. A. et al. **Manual de manejo do herbáceo fanerogâmico**. CEPLAC-CEPEC, 1989.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v403/n6772/pdf/403853a0.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2015.

NAGAPPA A. N.; THAKURDESAI P. A.; RAO N. V.; SINGHI J. Antidiabetic activity of *Terminalia Catappa* Linn. fruits. **Journal Ethnopharmacology**, v. 88, p. 45-50, 2003. Disponível em: <[doi:10.1016/S0378-8741\(03\)00208-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00208-3)>. Acesso em: 08 abr. 2016.

NAKAYAMA, K. Growth and progression of melanoma and non-melanoma skin cancers regulated by ubiquitination. **Pigment Cell Melanoma Research**, 23: 338-351, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-148X.2010.00692.x/pdf>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

NASCIMENTO, A. M. **Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron Adstringens* (Martius) Coville**. 2008. 159 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2008. 159 f.: il. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/LFSA-83DGRE/dissertacaoandrenascimento2008.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

NATIONAL CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Letter to health care providers from Maxine Hayes**. 2002. Disponível em <[www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)>. Acesso em 14 de jan. 2016.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada** – 6. ed. Norma M7-A6 do NCCLS. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003a. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

\_\_\_\_\_. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada** – 8. ed. Norma M2-A8 do NCCLS. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003b. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

NEVIN, K. G.; VIJAYAMMAL, P. L. Effect of *Aerva lanata* on solid tumor induced by DLA cells in mice. **Fitoterapia**, v. 74, n. 6, p. 578 – 582, 2003. Disponível em: <[doi:10.1016/S0367-326X\(03\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00148-5)>. Acesso em: 19 jan. 2016.

NOVAIS, T. S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 5-8, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v13s2/a03v13s2.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

NUNES, P. H. M. et al. Gastric Antiulcerogenic and Hypokinetic Activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.(Combretaceae). **BioMed research international**, v. 2014, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/261745>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

OLIVEIRA, H. B. et al. **Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais em Rosário da Limeira-MG**. 84 f. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. Disponível em: <[http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde\\_arquivos/18/TDE-2008-07-21T123313Z-1252/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/18/TDE-2008-07-21T123313Z-1252/Publico/texto%20completo.pdf)>. Acesso em 10 nov. 2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO- OPERATION AND DEVELOPMEN. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**, No. 129. Paris: OECD, 2010. (OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, n. 129 - ENV/JM/MONO (2010) 20). Disponível em: <<http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282010%2920&doclanguage=en>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

ORLANDO, S. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão)**. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca, Franca-SP, 2005. Disponível em <[http://www.unifran.br/mestrado/promocaoSaude/dissertacoes/2005/SANDRA\\_CHRISTINA\\_ORLANDO.pdf](http://www.unifran.br/mestrado/promocaoSaude/dissertacoes/2005/SANDRA_CHRISTINA_ORLANDO.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2015.

PACKER, J. F. et al. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a19v17n1>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

PAGNO, T. et al. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1483 – 1491, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000034>>. Acesso em: 02 jan. 2016.

PANSERA M. R., et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. Ver. Bras. Farmacogn. Vol. 13, pg. 17-22. 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X200300010000>>. Acesso em: jul. 2014.

PAREKH, J.; CHANDA, S. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2007. Disponível em:<

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.1644&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 15 fev. 2016.

PAVAN-FRUEHAUF, S. Plantas Medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem. São Paulo: Annablume: Fapesp, 2000.

PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents 338. The cancer cell growth inhibitory. Constituents of *Terminalia arjuna* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 2, p. 57-63, 1996. Disponível em: <[doi:10.1016/S0378-8741\(96\)01421-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01421-3)>. Acesso em: 04 jan. 2016.

PIMENTA, A. F. G. et al. Economia verde, sustentabilidade e as plantas medicinais de Minas Gerais. **XV Seminário sobre Economia Mineira – 30 anos**. Diamantina, 2012. Disponível em: <[https://www.ufmg.br/online/arquivos/anexos/Economia\\_plantas\\_medicinais.pdf](https://www.ufmg.br/online/arquivos/anexos/Economia_plantas_medicinais.pdf)>. Acesso em: 12 de dez. 2015.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25s1/9413.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

PIRES, A. L. C. S.; OLIVEIRA, R. (ORG.S). **Sociabilidades Negras. Comunidade Remanescente, Escravidão e Cultura**. Belo Horizonte: Editora Gráfica. Daliana Ltda, 2006.

PIRES, M. O.; SANTOS, I. M. (ORG.) **Construindo o Cerrado sustentável: experiências e contribuições das ONG's**. Gráfica Nacional, Goiás, 2000. 147p.

RATTER, J. A. et al. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**. v. 60. n. 1, p. 57-109, 2003. Disponível em: <[doi: http://dx.doi.org/10.1017/S0960428603000064](http://dx.doi.org/10.1017/S0960428603000064)>. Acesso em 10 mar 2016.

REZENDE, A. D. **Prospecção química das folhas de *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. (Portulacaceae)**. Monografia, UFRRJ, 2005.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. p. 87-166. In: S. M. Sano e S.P. Almeida (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa Cerrados, Planaltina. 1998.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 1, n. 2, p. 80-87, 2003. Disponível em: <[http://www.cee.unifesp.br/negros\\_abfc.pdf](http://www.cee.unifesp.br/negros_abfc.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2015.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A **Plantas Medicinais no Domínio dos Cerrados**. Lavras, 2001a. 180p.

\_\_\_\_\_. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 102-123, 2001b. 180 p.

ROGERS, C. B.; VEROFF, L. **Chemistry, biological and pharmacological properties of African medicinal plants**. University of Zimbabwe Publications, Harare, p. 121-141, 1996.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROZENBLAT, S. et al. Induction of G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 369 – 382. 2008. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.bcp.2007.08.024>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

SANO, S. M. et al. **Cerrado: Ecologia e Flora**, Brasília, DF. Embrapa Cerrado. 2 v., 2008. 1279 p.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, p. 413-423, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v43n6/v43n6a05.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

SANTOS, M. G. et al. **Levantamentos etnobotânicos realizados em duas comunidades** de remanescentes de negros da região do Jalapão, Estado do Tocantins. In: PIRES, A. L. C. S.; OLIVEIRA, R. (Org.s) **Sociabilidades Negras. Comunidades Remanescentes, Escravidão e Cultura**. Belo Horizonte, Editora: Editora gráfica Daliana Ltda, p. 29-49, 2006.

SANTOS, S. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochiliocarpos* (Gomes) Barnaby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 215-219. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000145&pid=S1516-0572201300010001500030&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000145&pid=S1516-0572201300010001500030&lng=en)>. Acesso em: 12 dez. 2015.

SANTOS, S. J. D.; ALVES, F. Análise comparativa da ação de extratos de plantas com atividade antimicrobiana (in vitro) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Periódico Científico do Núcleo de Biociências, v. 2, n. 4, p. 230 2012. Disponível em: <<http://www.bibliotekevital.org/revistas/Methodista-IH/PCNB/v02n04/v02n04a03.pdf>>. Acesso em 13 mar. 2016.

SARTORI, M. R. K. **Atividade Antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 81 p. Dissertação de Mestrado: Universidade do Vale do Itajaí. Centro de Ciências da Saúde – Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Julho de 2005. Disponível em: <[http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/1343\\_a.pdf](http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/1343_a.pdf)> Acesso em: 05 out. 2015.

SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative**

**Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218439/>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

SCHMIDT, M. et al. Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production on of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 11, p. 1-19, 1990.

SILVA, O.; DUARTE, A.; PIMENTAL, M.; VIEGAS S.; BARROSO H.; MACHADO J. et al. Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. **Journal Ethnopharmacology**, v. 57, p. 203-207, 1997. Disponível em: <[doi:10.1016/S0378-8741\(97\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00068-8)>. Acesso em: 05 abr. 2016.

SILVA, J. K. M. **Levantamento epidemiológico da hipertensão arterial versus conhecimentos etnobotânicos: Conexão entre saúde e meio ambiente**. 110 p. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal do Tocantins. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente. Palmas, 2011. Disponível em: <<http://download.uft.edu.br/?d=aaab88b2-4047-45f7-b131-2b366c198faf:Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Juliana%20K%C3%AAnia%20Martins%20da%20Silva.pdf>>. Acesso em: 08 jun. 2014.

SILVA, M. L. C. et al. "Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais." **Semina: Ciências Agrárias** v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010. Disponível em: < DOI: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p669>>. Acesso em 28 dez. 2015.

SLETTEN, G. B.; DAHL, J. E. Cytotoxicity effects of extracts of compomers. *Acta Odont Scand.*1999; 57(6):316-22.

SOEJARTO, D. D. et al. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 15-22, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003478>>. Acesso em 06 nov. 2015.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>>. Acesso em: 08 jul. 2014.

SOUZA, C. D; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n.1, p.135-142, 2006.

TOMAZZONI, M. I. et al. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Revista Texto & Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-07072006000100014>>. Acesso em: 08 jun. 2014.

UNITED NATIONS. ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE. SECRETARIAT. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**.

United Nations Publications, 2009. Disponível em: <[https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/English/ST-SG-AC10-30-Rev5e.pdf](https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/English/ST-SG-AC10-30-Rev5e.pdf)>. Acesso em: 01 abr. 2016.

VEIGA-JR. V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modos de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200027>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

VELIOGLU, Y. S. et al. **Journal of Agricultural. Food Chemistry**. 1998, 46, 4113.

VERONEZ, L. C. **Atividade da fosfoetanolamina sintética em melanoma murino experimental**. 80 p. Dissertação de Mestrado: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2012. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&q=Atividade+da+fosfoetanolamina+sint%C3%A9tica+em+melanoma+murino+experimental&btnG=&lr=>>> Acesso em: 22 jan. 2016.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

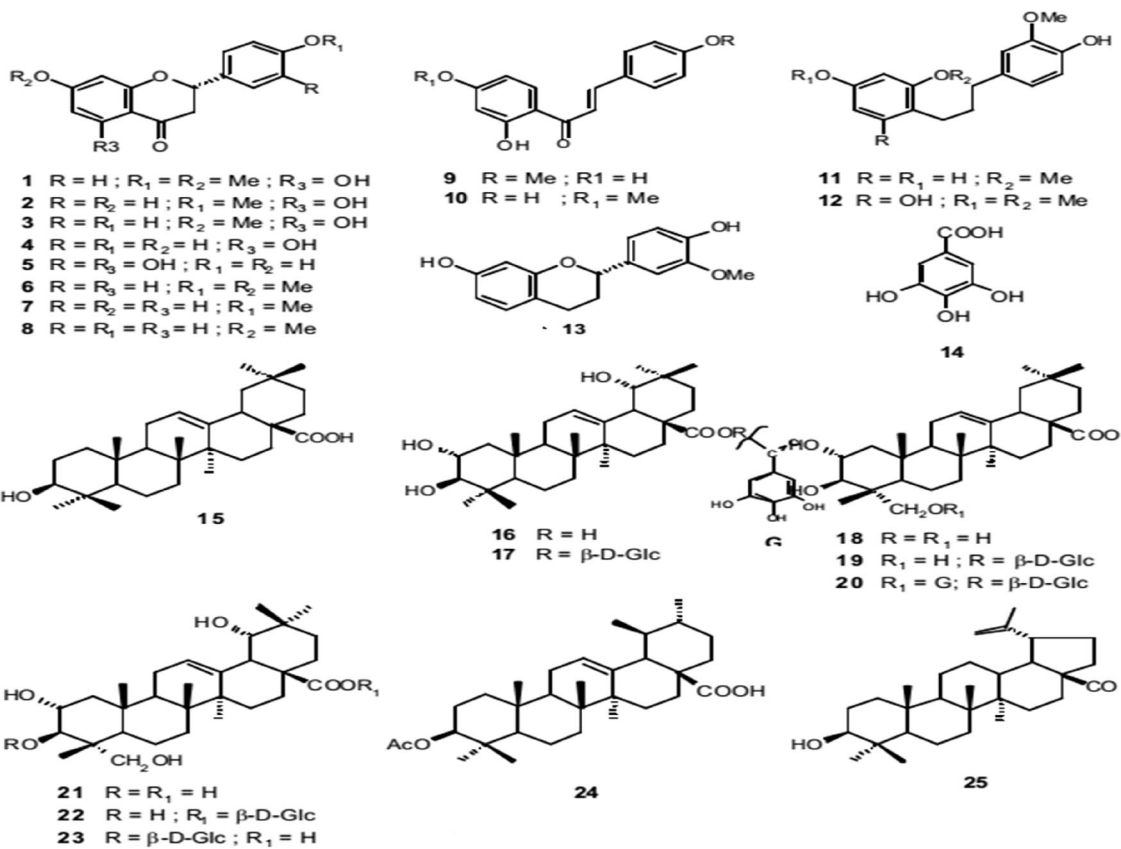
VON LINSINGEN, L.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na região sul do Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 3, p. 738-750, 2009.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química das plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p. 18-42, 2001.

ZADEH, S. H. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184731/pdf/jod-8-001.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2016.

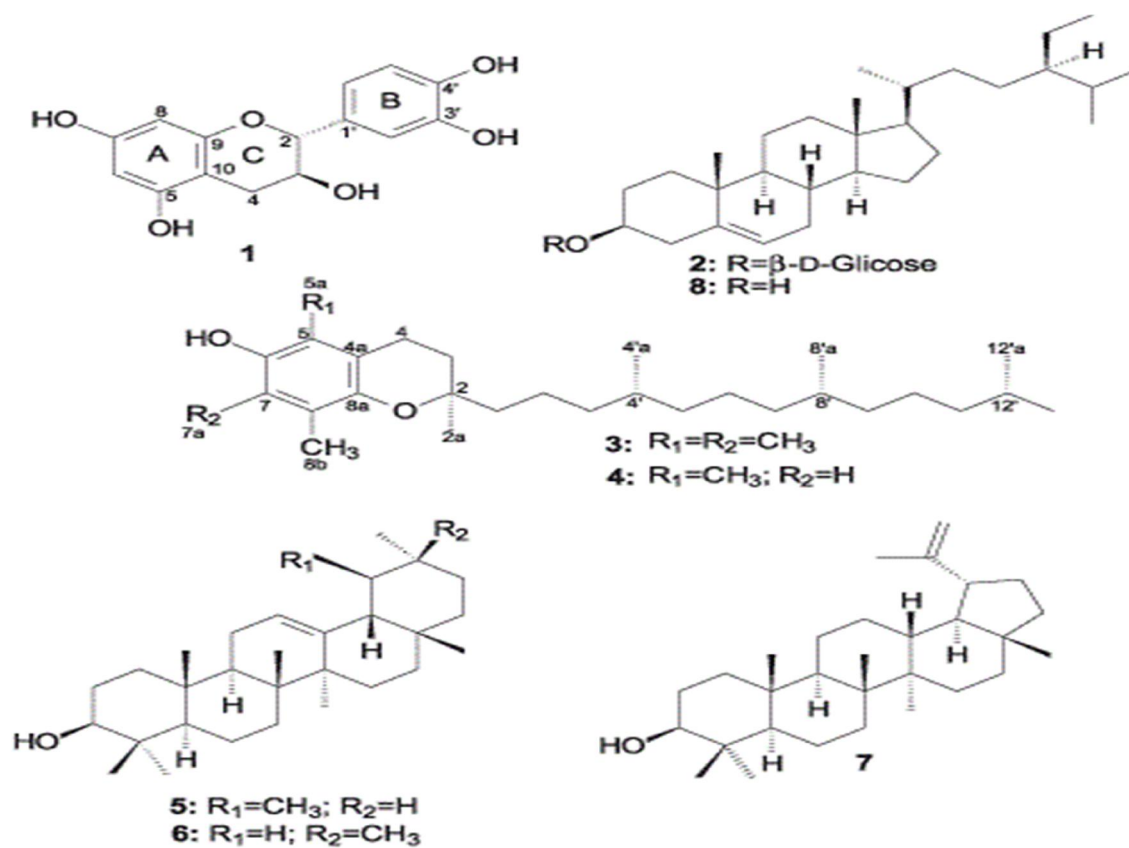


## ANEXO 1



Constituintes químicos da casca da *Terminalia fagifolia*. Fonte: Garcez et al. (2005).

## ANEXO 2



Constituintes químicos das folhas da *Terminalia fagifolia*. Fonte: Ayres, et al. (2009).