



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

NABUÊR FRANCIELI DA SILVA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, EFEITOS ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE
E CITOTÓXICO DE CASCAS DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.)
COVILLE (BARBATIMÃO)**

Recife
2018

NABUÊR FRANCIELI DA SILVA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, EFEITOS ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE
E CITOTÓXICO DE CASCAS DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.)
COVILLE (BARBATIMÃO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Biociência da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Rosângela Estevão Alves Falcão

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Nabuêr Francieli da

Composição química, efeitos antifúngico, antioxidante e citotóxico de cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão) / Nabuêr Francieli da Silva- 2018.

128 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ivone Antonia de Souza

Coorientadora: Rosângela Estevão Alves Falcão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Recife, 2018.

Inclui referências

1. Plantas medicinais 2. Cancer de mama 3. Citotoxicidade I. Souza, Ivone Antonia de (orient.) II. Falcão, Rosângela Estevão Alves (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-504

NABUÊR FRANCIELI DA SILVA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, EFEITOS ANTIFÚNGICO, ANTIOXIDANTE E
CITOTÓXICO DE CASCAS DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE
(BARBATIMÃO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Biociência da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 30/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza
(Orientadora/Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luciana Maria Silva de Seixas Maia (Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenorio (Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

“E por que andais preocupados quanto ao que vestir? Observai como crescem os lírios do campo. Eles não trabalham nem tecem” (MATEUS, 6:8).

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser o meu alicerce, por seu inigualável e indescritível amor, por não desistir jamais de mim, pelo seu agir, condução e guia ao propósito me confiado. Toda honra e glórias a ti Senhor, pois até aqui a tua mão me sustentou.

À Profa. Dr^a Tania Maria Sarmiento da Silva, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por todo o acolhimento e paciência, pelo aprendizado adquirido e oportunidade concedida para a realização de experimentos em seu laboratório (BIOFITO), bem como pela disponibilidade para execução de ensaios da sua aluna de mestrado Amanda Monteiro, por todo o auxílio dado, dedicação e paciência. Meu muito obrigada a vocês.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, do departamento de Ciências Farmacêuticas desta instituição, pela oportunidade de realização de ensaios em seu laboratório (NUDATEF), especialmente a sua aluna de iniciação científica, Wliana Alves, pelo auxílio na execução dos experimentos, paciência, acolhimento e aprendizado proporcionado.

À Profa. Dr^a Márcia Silva do Nascimento do Departamento de Antibióticos desta instituição pela enorme paciência, acolhimento e explicações valiosíssimas junto à interpretação de dados da análise fitoquímica.

Ao doutorando Leandro Aguiar, pela disponibilidade, colaboração e auxílio junto à análises estatísticas.

À profa. Dr^a Maria Aparecida Seabra, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pela colaboração e auxílio prestados no decorrer deste trabalho.

À minha orientadora, a Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza, pela oportunidade de orientação, pela confiança depositada, pela perseverança transmitida, pela amizade, pelo incentivo e apoio com que me conduziu, os quais foram fundamentais para a conclusão deste ciclo acadêmico.

À minha co-orientadora, a Profa. Dra. Rosângela Estevão Alves Falcão, pelo apoio incondicional, pela fortaleza, paciência, sabedoria, condução e direcionamento proporcionados da graduação ao mestrado, por me apresentar ao mundo da pesquisa, e acima de tudo pelo carinho e amizade.

À Profa. Dr^a Silvana Alves (UFRPE) (BIOFITO) por todo o auxílio dado desde o princípio da seleção do mestrado, meu muito obrigada a senhora pela paciência e apoio fundamental, por tudo mesmo, me faltam palavras para transmitir e expressar toda a minha gratidão e respeito.

À Profa. Dr^a Patrícia Lins (ASCES) e aos seus alunos João Paulo e Taysnara por se disporem a me ajudar na coleta do material vegetal, por toda a colaboração, empenho e esforço, principalmente o seu aluno João Paulo. Muito obrigada a vocês!

À minha ex-co-orientadora, a Profa. Dra. Marina Araújo (UPE) e sua mãe dona Silvia, por sempre estarem ao meu lado e acreditarem em mim desde o princípio da minha vida acadêmica na UPE, pela motivação, pelo incentivo e apoio dado desde a graduação. Vocês são as principais responsáveis por esta conquista. Quão grata e feliz sou por vocês existirem, por todo o carinho e amizade proporcionados, o meu muito, muito obrigada por existirem em minha vida.

À minha prima Sinara Almeida, por ser uma das pessoas responsáveis pela conclusão deste ciclo acadêmico pelo apoio dado até aqui. Tenho muito orgulho da pesquisadora que você se tornou, e espero um dia ser parcela da pesquisadora que és, e aos seus pais, meu primo Geraldo e dona Adenilda pelas suas orações e por torcerem por mim. Obrigada a vocês, não apenas por serem parentes e compartilharmos genes em comum, mas por serem família.

A todos os professores que já passaram por minha vida e que igualmente contribuíram com a minha formação, do ensino fundamental, médio e superior, a todos vocês a minha eterna gratidão, respeito e admiração.

À minha família matriarcal, à minha mãe Maria Silva e à minha irmã Mayara Silva, por serem compreensivas à minha ausência em vários momentos e pela paciência nos momentos de dificuldades. Ao amor que dedicam a mim, principalmente a minha mãe. Especialmente por vocês espero continuar perseverando em minha caminhada, dar-lhes bons frutos e continuar sendo-lhes motivo de orgulho.

Ao meu pai Luiz Cavalcante (*in memoriam*), pela presença viva e eterna em minha vida. A minha gratidão, silenciosa e eterna, pelo seu amor, calma e ternura, que sempre de algum lugar me encorajam e permanecem eternos, e principalmente por seu exemplo de vida, o qual me fazem sentir um enorme orgulho de ser sua filha, transmitindo força e perseverança para prosseguir na minha caminhada diária.

Em especial, com carinho e muito amor, agradeço a todos os meus grandes e fieis amigos que me acompanharam até aqui, pelas conversas descontraídas, pela escuta, conselhos, incentivos e apoio, por sempre estarem do meu lado, e acreditarem em mim, sem ordem de importância a Gizelly Araújo (Gi), Gisele Silva (Craca), Tamires Espindola (“mãe Tamires”), Janaina Oliveira, Sammara Correia, Emília Brito (Brito), e as amigas tão queridas, técnicas dos laboratórios da Universidade de Pernambuco, *Campus Garanhuns*: Laura Geordana (Laurinha), Alessandra Freitas (Alê) e Elaine Rafaelle (coleguinha), além de Marta (Martinha) então

funcionária daquela instituição, e todos os outros não citados, de longe ou de perto obrigada pela torcida de todos vocês.

A todos os funcionários desta instituição pela colaboração, assistência e paciência, especialmente a Stella, Verônica e Itacira da secretaria do programa da Morfotecnologia.

As meninas do Laboratório de Cancerologia Experimental, Yhasminie Silva e Renatha Sobreira pelo acolhimento e apoio fundamental logo que cheguei em Recife, minha profunda gratidão a vocês por tudo mesmo. E por fim, em especial a Raíra Justino, pela escuta, conselhos e apoio na reta final do mestrado e a Marília Muniz pelo apoio, pela torcida e amizade.

Aos colegas de turma do programa de Pós-graduação em Morfotecnologia pelas conversas e aprendizado e a todas as demais pessoas não citadas pelas conversas e colaboração, que tive a oportunidade de conhecer durante o percurso desse mestrado.

E finalizo deixando o meu muito, muito obrigada a todos que participaram e contribuíram direta e indiretamente, para o meu fazer Ciência.

Dedico este trabalho ao meu pai Luis Cavalcante (*in memoriam*) por ser o meu exemplo de vida e a minha amada e eterna vizinha Petronila Cavalcante (*in memoriam*).

RESUMO

O conhecimento acerca da aplicação de plantas com propriedades farmacológicas para o emprego no desenvolvimento de novos fármacos ou produtos fitoterápicos vêm ampliando-se e instigando os pesquisadores na descoberta de tais propriedades em plantas pouco ou nada estudadas, como as espécies da família Fabaceae. Nesse intuito, o presente estudo teve como objetivo analisar a composição química, a atividade citotóxica em linhagens de tumor mamário humano MCF-7 e MDA-MB-435, do extrato acetônico e suas frações de cascas de *Stryphnodendron adstringens*, espécie vulgarmente conhecida por barbatimão, além da composição química, potencial antifúngico, antioxidante e citotóxico do extrato etanólico desta espécie. As cascas de barbatimão foram coletadas, secas e utilizadas para o preparo dos extratos bruto etanólico (EBE) e acetônico (EBA). Este último foi particionado com solventes de polaridades distintas, obtendo-se duas frações, acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ). Para determinação do teor de fenólicos totais do extrato EBE foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu e o seu potencial antioxidante foi determinado através da avaliação da redução do radical DPPH[•] e cátion ABTS^{•+} por espectrofotometria. A análise quantitativa dos compostos fenólicos foi caracterizada com valor de 156,58 mg EAG/g para o extrato EBE. Como resultado apresentou potencial antioxidante frente ao DPPH e ABTS e atividade antifúngica contra cepa resistente de *Candida krusei*. Os extratos EBE e EBA e as frações testadas FAE e FAQ exibiram um IC₅₀ variando entre 11,89 a 43,98 µg/mL para células MCF-7 e para as células MDA-MB-435 entre 20,33 a 48,02 µg/mL, sendo as células MCF-7 mais sensíveis ao tratamento. As amostras obtidas de cascas de barbatimão foram analisadas por CCD e UHPLC-PDA-qTOF-MS e MS/MS no modo negativo (ESI⁻). Foram detectados 14 picos para o extrato EBE, os quais foram identificados principalmente como flavonoides e taninos condensados. Até onde é de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que relata os efeitos citotóxicos do extrato etanólico das cascas de barbatimão sobre as linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-435. As cascas de barbatimão parecem ser uma valiosa fonte de substâncias bioativas, justificando a sua ampla aplicação e contribuição para o tratamento de diversas patologias na medicina popular.

Palavras-chave: Câncer de mama. Citotoxicidade. Compostos fenólicos. *Stryphnodendron adstringens*.

ABSTRACT

The knowledge about the application of plants with pharmacological properties for use in the development of new drugs or herbal products come from enlarging and instigating the researchers in the discovery of such properties in plants or anything studied, such as species of legume in the Fabaceae family. In this order, the present study aimed to analyze the chemical composition, the cytotoxic activity in human breast tumor lines MCF-7 and MDA-MB-435, acetonc extract and fractions of *Stryphnodendron adstringens* peels, species commonly known as barbatimão, in addition to the chemical composition, antifungal, antioxidant and cytotoxic potential of ethanolic extract of this species. The barbatimão shells were collected, dried and used for the preparation of crude ethanolic extracts (SBS) and acetonc (EBA). The latter was partitioned with solvents of different polarities, obtaining two fractions, ethyl acetate (FAE) and watery (FAQ). For determination of total phenolics EBE extract was used the Folin-Ciocalteu reagent, and the your antioxidant potential was determined by evaluating the DPPH[•] radical reduction and ABTS^{•+} cation by spectrophotometry. Quantitative analysis of phenolic compounds was characterized with value 156.58 mg/g extract EAG EBE. As a result presented in front of the DPPH antioxidant potential and ABTS and antifungal activity against resistant strain of *Candida krusei*. EBE and EBA extracts and fractions tested FAE and FAQ exhibited an IC₅₀ ranging from 11,89 the 43,98 µg/mL for MCF-7 cells and the cells MDA-MB-435 between 20,33 to 48,02 µg/mL, and MCF-7 cells more sensitive to treatment. The samples obtained from Barbatimão shells were analyzed by CCD and UHPLC-PDA-qtof-MS and MS/MS in the negative mode (ESI⁻). 14 peaks were detected for the EBE extract, which were identified mainly as flavonoids and condensed tannins. As far as we know, this is the first study that reports the cytotoxic effects of the ethanolic extract of Barbatimão shells on breast cancer lineages MCF-7 and MDA-MB-435. The shells of Barbatimão appears to be a valuable source of bioactive substances, justifying its wide application and contribution to the treatment of various pathologies in folk medicine.

Keywords: Breast Neoplasms. Citotoxicidad. Phenolic compounds. *Stryphnodendron adstringens*.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Principais fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários em plantas.....	22
Figura 2 – Estrutura molecular da vitexina (1), um flavonoide presente no extrato de <i>Passiflora incarnata</i> (Passiflorace).....	23
Figura 3 – Estrutura química de antraquinona (1) com boa seletividade e alta atividade contra micro-organismos anaeróbios isolada pela primeira vez por Cunha e colaboradores (2017) de <i>Cassia bakeriana</i>	25
Figura 4 – Estrutura química de flavonoide (1) substância anticancerígena isolada de <i>Cassia bakeriana</i> pela primeira vez por Almeida et al. (2005)	25
Figura 5 – Estrutura química de alcaloides eritrínicos (1-2) com atividade ansiolítica isolados de <i>Erythrina mulungu</i>	25
Figura 6 – Fotos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville. A – Planta inteira; B – Ramos; C e D – Frutos e sementes; E – cascas.....	28
Figura 7 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria, por meio da qual recebe quatro elétrons (e ⁻) e quatro íons de hidrogênio (H ⁺), formando duas moléculas de água (H ₂ O) e várias espécies reativas de O ₂ durante o processo.....	36
Figura 8 – Reação em cadeia representando a lipoperoxidação, mostrando as etapas de iniciação, propagação e terminação.....	38
Figura 9 – Perfil simplificado da anatomia da glândula mamária. A: dutos; B: lóbulos; C: dutos dilatados para armazenar leite; D: mamilo; E: tecido adiposo; F: músculo peitoral maior; G: caixa torácica. Detalhe do duto mamário no aumento. A: células ductais normais; B: membrana basal; C: lúmen.....	53
Figura 10 – Tecido mamário com carcinoma ductal in situ (I) e carcinoma ductal invasivo (II) em uma secção aumentada do duto. No aumento em I: A - célula ductal normal; B - células ductais transformadas; C - membrana basal; D - lúmen. No aumento em II: A - células ductais normais; B - células ductais transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal.....	55
Figura 11 – Tecido mamário com carcinoma lobular in situ (III) e carcinoma lobular invasivo (IV) em uma secção aumentada do lóbulo. No aumento em III: A - célula lobular normal; B - células lobulares transformadas; C - membrana basal. No aumento em IV: A - células ductais normais; B - células lobulares transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal.....	56

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Correlação entre citações de indicação popular e as respectivas confirmações de atividade biológica relatados na literatura.....	18
Tabela 2 – Principais agentes terapêuticos obtidos de plantas e seus derivados ou análogos sintéticos.....	19
Tabela 3 – Classificação das principais estruturas de compostos fenólicos em plantas com base no número de átomos de carbono na molécula.....	32
Tabela 4 – Alguns exemplos de plantas da flora brasileira com atividade antitumoral contra diferentes linhagens celulares.....	51
Tabela 5 – Sistemas, reveladores e padrões utilizados na análise qualitativa do screening fitoquímico preliminar das cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	67
Tabela 6 – Resultados da análise qualitativa do screening fitoquímico com as cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	69
Tabela 7 – Resultados da análise química por UHPLC-PDA-TOF-MS do extrato bruto etanólico (EBE) das cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	76
Tabela 8 – Conteúdo de fenólicos totais (FT), atividade antioxidante (CE ₅₀) do extrato bruto etanólico das cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	77
Tabela 9 – Comparação entre as médias (mm) ± desvio padrão (D.P) dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento do fungo <i>Candida krusei</i> submetido à exposição do extrato etanólico das cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> in vitro, obtidos pela metodologias de disco e poço.....	78
Tabela 10 – Valor de IC ₅₀ para a citotoxicidade dos extratos e frações de cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> frente as linhagens de células tumorais de mama.....	80

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 A FLORA MEDICINAL COMO FONTE POTENCIAL NA BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS.....	17
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE.....	23
2.2.1 Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de <i>Stryphnodendron adstrigens</i> (Mart.) Coville.....	26
2.3 RELEVÂNCIA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE PLANTAS.....	31
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
2.5 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE FONTES NATURAIS.....	40
2.6 AVALIAÇÃO IN VITRO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
2.6.1 Método de detecção de atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH').....	42
2.6.2 Método de detecção de atividade antioxidante pelo cátion radical ABTS ^{•+}	43
2.7 RESISTÊNCIA MICROBIANA E A BUSCA POR NOVOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	43
2.8 COMPOSTOS DE ORIGEM VEGETAL COMO FONTE POTENCIAL DE NOVOS AGENTES ANTICÂNCER.....	47
2.8.1 Câncer de mama.....	52
3 OBJETIVOS.....	58
3.1 GERAL.....	58
3.2 ESPECÍFICOS.....	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES, PADRÕES.....	59
4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E DETERMINAÇÃO DA ORIGEM BOTÂNICA.....	60
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO.....	60
4.3.1 Quantificação do conteúdo fenólico total.....	60
4.3.2 Teste antioxidante pela inibição do radical livre DPPH'.....	61
4.3.3 Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical ABTS ^{•+}	62

4.3.4	Análises por UHPLC-PDA-ESI (-)-QTOF-MS/MS.....	63
4.3.5	Cultura fúngica.....	64
4.3.5.1	Atividade antifúngica.....	64
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ACETÔNICO.....	65
4.4.1	Fracionamento do extrato abruto cetônico por extração líquido-líquido....	66
4.4.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	66
4.5	ENSAIO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	67
4.5.1	Linhagens e cultivo celular.....	67
4.5.2	Ensaio de viabilidade – MTT.....	68
5	RESULTADOS	69
5.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO EBA E SUAS FRAÇÕES DE <i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i>	69
5.2	ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO EBE: UHPLC-PDA-TOF-MS.....	69
5.2.1	Doseamento de fenólicos e testes antioxidantes.....	77
5.2.2	Atividade antifúngica.....	77
5.3	ENSAIO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	79
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

A natureza tem sido fonte de agentes medicinais por milhares de anos, exemplificando-se o uso milenar de plantas superiores com propriedades terapêuticas pelos povos tradicionais para assistência e cuidados primários à saúde. Todavia, a importância das plantas medicinais não se restringe apenas a sua utilização nos cuidados básicos de saúde, estas ainda continuam sendo uma abundante fonte de novos quimiotipos e farmacóforos (YUNES; FILHO, 2016; VENCATO et al., 2016). É nesse sentido que a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece as plantas empregadas com finalidades terapêuticas e a cultura tradicional como norteadores na busca de novos compostos para o desenvolvimento de novos medicamentos (WHO, 2013a). Assim, o conhecimento popular das plantas, para tratar os mais variados tipos de enfermidades, vem auxiliar nas investigações farmacológicas servindo como ponto de partida na escolha de possíveis alvos para estudo (SOUZA et al., 2013).

Dados da Organização Mundial da Saúde, indicam que percentual significativo da população mundial, cerca de 80%, adere ao uso de ervas medicinais para o alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (FILHO, 2010). Entretanto, apesar de toda a diversidade de estruturas químicas que a natureza fornece, pequena parcela da flora permanece conhecida e poucos estudos têm avaliado o potencial medicinal das substâncias que levam estas plantas a possuir tal capacidade de cura (GUERRA; NODARI, 2003). Verifica-se, portanto, que ainda não está claro o mecanismo entre a atividade medicinal e a sua estrutura química, bem como existe ainda uma falta de conhecimento sobre propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas com o propósito de assegurar a eficácia e segurança das plantas medicinais (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010). Mesquita, Pinto e Moreira (2017) sustentam em levantamento bibliográfico que, ainda são poucos os relatos sobre o isolamento de princípios ativos, ficando clara a necessidade de mais estudos sobre o assunto.

No Brasil, embora muitas plantas tenham atividade farmacológicas reconhecidas, muitas vezes a composição química das espécies nativas não é estudada, asseveram Dias, Luzia e Jorge, (2013). Nessa perspectiva, segundo Messias e colaboradores (2015), estima-se que metade das espécies nativas tenha alguma propriedade medicinal, e que nem mesmo 1% tenha sido adequadamente avaliada. Dentro desse contexto, a prática tradicional do uso medicinal de plantas é amplamente difundida no país, porém, quase sempre realizada de forma indiscriminada e sem orientação médica, embasada no argumento de que o “natural” não faz mal, sem considerar os efeitos tóxicos e as consequências que as mesmas podem causar

(ASARE et al., 2012). Nesse intuito, é sabido que compostos presentes em plantas medicinais também podem causar toxicidade, em nível sistêmicos e celular, dependendo do tempo de exposição e das concentrações utilizadas (SILVA et al., 2015). Com isso, reforça-se que o conhecimento com relação a composição química de algumas plantas ainda é desconhecido, representando um importante potencial a ser explorado (CECÍLIO et al., 2012).

Nesse âmbito, plantas com atividades fitoterápicas são encontradas em diversas famílias botânicas, as famílias Anacardiaceae, Mirtaceae, Moraceae, Cannellaceae e Asclepiadaceae, destacando-se entre as angiospermas, a família Fabaceae (FELICIANO, FILHO, 2014). Estudos têm comprovado o vasto potencial de aplicação de extratos ou moléculas de plantas oriundas da medicina popular, pertencentes a essas famílias, tais como: bactericidas, fungicidas, atividade citotóxica, atividade antiproliferativa, efeito analgésico e anti-inflamatório (BARREIRO; BOLZANI, 2009; COSTA-LOTUFO et al., 2010; YUNES; FILHO, 2016), o que vem despertando o interesse científico.

Dentre as espécies agrupadas na família Fabaceae, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, vulgarmente conhecida como barbatimão, apresenta ampla variedade de aplicações na medicina popular, descando-se como excelente agente cicatrizante e anti-inflamatório. Guiados pelo saber popular dos usos terapêuticos desta espécie, inúmeros estudos científicos foram conduzidos com os extratos, frações e substâncias isoladas de diferentes partes da planta, registrando uma abundância de propriedades farmacológicas (LIMA et al., 2016). E, embora trate-se de uma espécie exaustivamente pesquisada, ressalta-se no entanto para a relevância da introdução de estudos com as suas cascas com ênfase na investigação dos seus efeitos antúngicos e citotóxicos, dada a escassez de relatos destas atividades para a espécie na literatura consultada.

Diante do exposto é evidente que, as plantas são, sem dúvida, excelentes fontes de matérias-primas e modelos para novos medicamentos, destacando-se pela sua variabilidade de atividades biológicas na terapêutica. No entanto, ainda são necessários novos estudos conclusivos sobre seus efeitos benéficos bem como possíveis efeitos colaterais. É nesse sentido que o presente estudo se propôs a analisar a composição química, os efeitos antioxidante, citotóxico e antifúngico, das cascas da espécie vegetal, *Stryphnodendron adstringens*, comumente empregada na medicina popular para o tratamento de diferentes males.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A FLORA MEDICINAL COMO FONTE POTENCIAL NA BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS

A busca por novas alternativas terapêuticas para tratar das mais leves às mais severas doenças que afligem os seres humanos, como o câncer, o mal de Alzheimer, a AIDS, etc., tem ampliado o número de pesquisas nas mais distintas fontes de seres vivos, optando-se desta forma por diferentes estratégias de bioprospecção, incluindo plantas superiores, produtos marinhos, animais, micro-organismos, etc. (NEWMAN; CRAGG, 2003; MALHEIROS et al., 2010; SHARMA; GUPTA, 2015; NEWMAN; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Nessa perspectiva, a diversidade química e biológica da flora vem se destacando ao longo da história como importante fonte de recurso terapêutico, especialmente no que refere a descoberta de novos fármacos, registrando-se a sua larga contribuição para o desenvolvimento de inúmeros medicamentos disponíveis no mercado com ação efetiva contra as mais variadas e graves patologias. Como exemplo, pode-se citar o paclitacel (Taxol) isolado das cascas de *Taxus brevifolia*, os derivados ou análogos do Taxol, o Cabazitaxel, o Milataxel e o Larotaxel, além do resveratrol na ação anticâncer; o alcaloide pilorcapina isolado de *Pilocarpus* sp (Rutaceae) uma espécie vegetal da biodiversidade brasileira, a partir do qual foi desenvolvido o fármaco Salagen (Novartis), medicamento lançado no mercado para aliviar a xerostomia que ocorre como consequência do hipofuncionamento das glândulas salivares que são afetadas pela radiação em pacientes com câncer de cabeça e pescoço em fase de tratamento radioterápico; a morfina com atividade analgésica obtida a partir de *Papaver somniferum*, e tantos outros (FILHO, 2015a; CRAGG; NEWMAN, 2016; PACHOLEC et al., 2010; KUMAR et al., 2014; BRANDÃO et al., 2008; DUTRA et al., 2016).

O conhecimento empírico que diferentes grupos étnicos, como comunidades quilombolas e indígenas, detêm em informações acerca da utilização medicinal de plantas, por sua vez, tem mobilizado pesquisadores nas áreas da etnobotânica e etnofarmacologia e motivado inúmeros estudos para seleção e investigação das substâncias que possivelmente são responsáveis pelos efeitos terapêuticos de plantas na medicina popular, em virtude da vasta gama de propriedades farmacológicas já vinculadas as mesmas na literatura (CÁCERES; SARAIVA-OTTEN, 2014; MACIEL et al., 2017; OLIVEIRA, 2014).

Nesse contexto, estudos científicos realizados nas mais distintas áreas, as quais destacam-se ciências farmacêuticas, biologia, química, farmacologia e medicina, tem

confirmado e reforçado a importância do saber tradicional repassado pela transmissão do conhecimento oral ao longo de gerações por grupos culturais sobre as plantas empregadas como medicinais, na investigação de substâncias bioativas, possibilitando desta maneira a ampliação e descoberta de novos agentes terapêuticos para a prevenção, controle e tratamento de inúmeras afecções, como pode ser observado em dados obtidos por Brito e Brito (1993) sumarizados na Tabela 1 que segue abaixo.

Tabela 1. Correlação entre citações de indicação popular e as respectivas confirmações de atividade biológica relatados na literatura.

Atividade Biológica	Número de Citações (Indicação)	Número de Confirmação (Atividade)	Percentual de Sucesso
Espasmogênico	05	05	100,0
Tóxico	34	34	100,0
Hipotensivo	56	54	96,4
Depressor snc	29	26	92,8
Analgésico	59	54	91,5
Antitumoral	12	09	75,0
Hipoglicêmico	04	39	72,2
Anti-inflamatório	93	63	67,7
Antimicrobiana	116	64	55,2
Antiúlcera	29	15	51,7
Espasmolítico	55	24	43,6
Diurético	26	08	30,8

Fonte: Adaptado de Brito; Brito (1993).

Assim, as plantas priorizadas, de uso popular, nas pesquisas acima para avaliação de atividades biológicas, demonstram que estudos sobre plantas medicinais constituem uma etapa importante da bioprospecção, auxiliando na seleção de plantas-alvo para investigações farmacológicas, justificada pelo uso tradicional destas para o tratamento de diversas disfunções biológicas por comunidades tradicionais, fato este também constatado em estudo conduzido por Battisti et al. (2013). Tais registros ainda chamam a atenção para a diversidade molecular desses vegetais destacada por Andrade et al. (2012) e consequentemente suas variadas vias de ação terapêutica.

Tendo em vista a enorme quantidade de exemplos de substâncias oriundas de plantas supracitada, que foram ou são usadas na terapêutica ou que geraram o desenvolvimento de eficazes análogos ou derivados sintéticos, descreve-se na Tabela 2 um resumo contendo o nome da substância, o nome comercial, a fonte, o principal uso terapêutico e os possíveis medicamentos gerados a partir do produto natural (plantas), de acordo com dados reunidos por Filho (2015b).

Tabela 2: Principais agentes terapêuticos obtidos de plantas e seus derivados ou análogos sintéticos.

Substância	Fonte	Doença	Derivados ou Análogos
Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>	Malária	Artemeter e Arteter
Pilocarpina	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Glaucoma	-
Reserpina	<i>Rauvolfia serpentina</i>	Hipertensão	-
Efedrina	<i>Ephedra sinica</i>	Asma	Salbutamol e Salmeterol
Digoxina	<i>Digitalis purpurea</i>	Insuficiência cardíaca	Digitoxina
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Câncer	-
Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Câncer	-
Camptotecina	<i>Cyanea acuminata</i>	Câncer	Irinotecano
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Doenças neurológicas	Ipratrópio
Berberina	<i>Artemisia vulgaris</i>	Disenteria	-
Papaverina	<i>Papaver somniferum</i>	Distúrbios vasculares	Sildenafil
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	Fadiga	-
Galantamina	<i>Galanthus nivalis</i>	Mal de Alzheimer	-
Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i>	Anorexia	Anfetamina
Canabidiol	<i>Cannabis sativa</i>	Psicose	-
Huperzina-A	<i>Hydrangea serrata</i>	Demência senil	-
Metiformina	<i>Galega officinalis</i>	Diabetes	-
Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i>	Doenças cardiovasculares	-
Genisteína	<i>Glycine max</i>	Câncer	-

Nota: “-” dado não encontrado pelo referido autor. Fonte: Adaptado de Filho (2015b).

Diante de todo o respaldo teórico referido acima é indiscutível o potencial das plantas em fornecer substâncias novas, evidenciando uma probabilidade significativa de sucesso de encontrar agentes com finalidades terapêuticas em plantas selecionadas a partir de seu uso medicinal. Em face da discussão que ora se apresenta, Svetaz e colaboradores (2010) corroboram a partir de estudo conduzido com 327 espécies vegetais de 92 famílias e 251 gêneros oriundas de 7 países da América Latina, muitas selecionadas com base no reportado uso popular, etno-medicinal, em comparação com plantas selecionadas ao acaso. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram uma maior probabilidade de se encontrar agentes anti-infecciosos fundamentado em indicações da medicina popular (40,3% de plantas ativas contra pelo menos um tipo de fungo) do que contra plantas selecionadas ao acaso (21,3% de plantas ativas contra pelo menos um tipo de fungo), confirmando a utilidade das informações etno-medicinais para guiar os cientistas na busca de novas possibilidades terapêuticas contra infecções causadas por fungos. Cabe ressaltar, no entanto, que as informações técnicas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais, de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança no uso das mesmas, conforme apontam alguns pesquisadores como Souza (2016) e Vilegas et al. (2016), sendo indispensável, portanto, o desenrolar de pesquisas que aprofundem e avaliem os efeitos desses compostos em sistemas biológicos complexos.

O Brasil assume posição privilegiada, em relação as demais nações, quando se fala da exploração econômica da biodiversidade no âmbito do desenvolvimento de novos produtos. A

sua variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna, abrigando a maior biodiversidade do planeta. Essa abundante variedade de vida se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra, elevando-o ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos. Além disso, possui uma rica sociobiodiversidade, representada por mais de 200 povos indígenas e por diversas comunidades, entre elas quilombolas, caiçaras e seringueiros, que reúnem um inestimável acervo de conhecimentos tradicionais sobre a conservação de sua biodiversidade (BRASIL, 2018a).

No que se refere a biodiversidade da flora no contexto mundial, o Brasil ainda se destaca por abrigar uma mega biodiversidade, contabilizando cerca de 20% de angiospermas, 20% de briófitas e 10% das pteridófitas conhecidas (BOLZANI; JÚNIOR; VALLI, 2016). Até a presente data, segundo informações que constam do Ministério do Meio Ambiente, são reconhecidas 46.519 espécies para a flora brasileira, sendo 4.754 de Algas, 33.123 de Angiospermas, 1.565 de Briófitas, 5.718 de Fungos, 30 de Gimnospermas e 1.329 de Samambaias e Licófitas (BRASIL, 2018b). Quanto a estimativa total de espécies de plantas descritas no ranking mundial que é de 264.000 a 279.400 espécies, o país contribui com 45.300 a 49.500 das espécies vegetais catalogadas (LEWINSONHN; PRADO, 2002).

Nesta mesma abordagem, pesquisadores ressaltam, de forma particular, a flora brasileira, quanto a riqueza na produção de moléculas com potencial terapêutico, a qual vem sendo comprovada experimentalmente em numerosos estudos, através da eficácia de extratos, frações, e substâncias puras nos mais distintos modelos *in vitro* e *in vivo* (FILHO, 2000; ALVES; SANTOS, 2013; CAMPOS et al., 2014).

Nas plantas, a síntese de moléculas ativas está ligada ao seu metabolismo secundário, o qual desempenha funções essenciais à sua sobrevivência, como regulação, equilíbrio, adaptação aos inúmeros habitats, incluindo fatores físicos e climáticos, além de proteção contra agentes patógenos e predadores (BOLZANI; JÚNIOR; VALLI, 2016). Diferentemente, do seu metabolismo primário, responsável pela síntese de substâncias inerentes a realização de suas funções vitais, como respiração e biossíntese de aminoácidos e outras substâncias necessárias à manutenção da vida da célula, os produtos gerados pelo metabolismo secundário vegetal apresentam-se em concentrações reduzidas e em grupos específicos de plantas (FILHO, 2010; BERG; LUBERT, 2008). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários, representados pelos terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados (EMERY et al., 2010; PERES, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A biossíntese de moléculas, os produtos gerados pelo metabolismo secundário vegetal, no entanto, é constantemente influenciada por diferentes variáveis ambientais quanto ao seu

teor na planta, como uma forma química de resposta aos estímulos externos (bióticos e abióticos), que podem causar alguma modificação no metabolismo secundário vegetal, uma vez que esses metabólitos constituem uma via importantíssima de comunicação e interação entre a planta e o seu meio ambiente, garantindo a sua sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis (GOUVEA et al., 2016). Tal contexto remete as propostas sobre o efeitos de bordas de mata, levantadas pelo então renomado químico e pesquisador na área, o Professor Otto Richard Gottlieb, o qual frisava que espécies nativas de um ambiente quando ocorriam no limite desse habitat com outro potencialmente diferente deveriam expressar um número maior de substâncias de defesa ou comunicação entre as espécies (GOUVEA et al., 2016). Em fase disso, os achados do estudo desenvolvido por Sobrinho et al. (2010) corroboram a teoria desse pesquisador ao constatarem em pesquisa introduzida com uma espécie da Caatinga brasileira, *Bauhinia chelanth*, da família Fabaceae, que os espécimes localizados na borda da mata produziram mais flavonoides em relação aos espécimes localizados em seu interior, desta forma os pesquisadores argumentam que os espécimes localizados na borda recebem maior incidência luminosa, causando alterações fisiológicas nas folhas, o que pode atrair insetos, herbívoros e pássaros, suscitando, assim, no maior teor desse metabólito.

Visando orientar sobre as variáveis que podem interferir em relação à variabilidade da atividade biológica de plantas ou no conteúdo de metabólitos secundários destas, e portanto, devem ser consideradas para a análise de amostras (extratos, frações), Filho (2015a) enfatiza sobre alguns desses fatores, que não devem passar despercebido pelo pesquisador, como:

a) falta de reprodutibilidade dos testes biológicos selecionados: problemas com os animais utilizados, com os equipamentos, como o uso de extratos ora com água, ora sem, modificando a concentração da massa a ser usada, etc.;

b) diferentes coletas do material vegetal, sem considerar, por exemplo, o estágio de crescimento da planta;

c) influência dos fatores ambientais na biossíntese dos metabólitos secundários, como clima, tipo de solo, além da variação sazonal, constituição química.

Dentro desse contexto, no esquema abaixo ilustrado na Figura 1, elaborado por Gobbo e Lopes (2007), temos uma representação reunindo os fatores que são essenciais na manutenção da homeostasia vegetal, como a temperatura, disponibilidade hídrica, intensidade de radiação ultravioleta, presença de gases atmosféricos, tipo de solo e nutrientes. E como mencionado acima, mudanças desses fatores (bióticos e abióticos), somados aos anteriormente citados, podem gerar estresse e afetar o acúmulo dos metabólitos secundários, influenciando em relação à variabilidade da atividade biológica das amostras (extratos, frações).

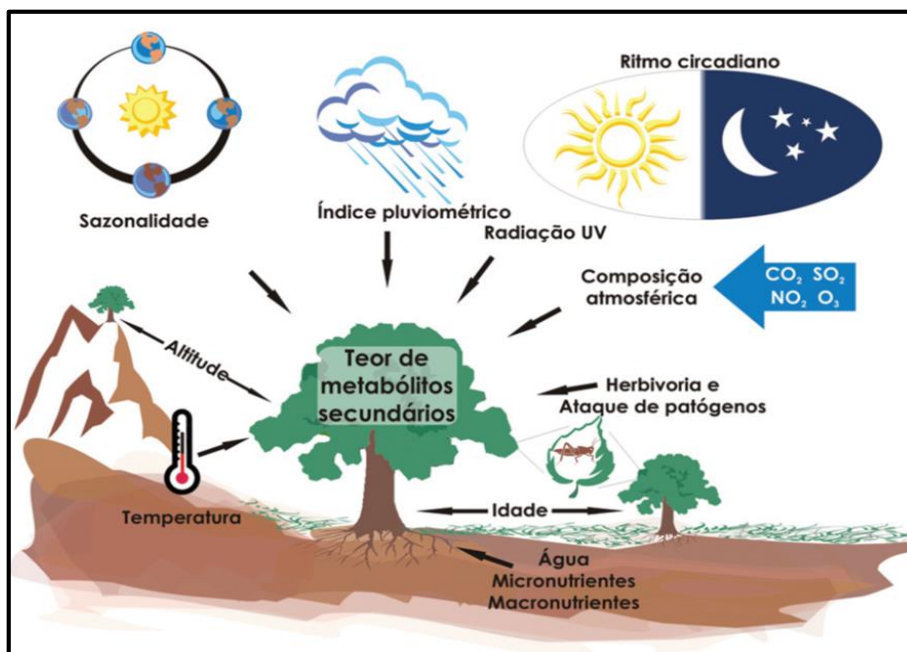
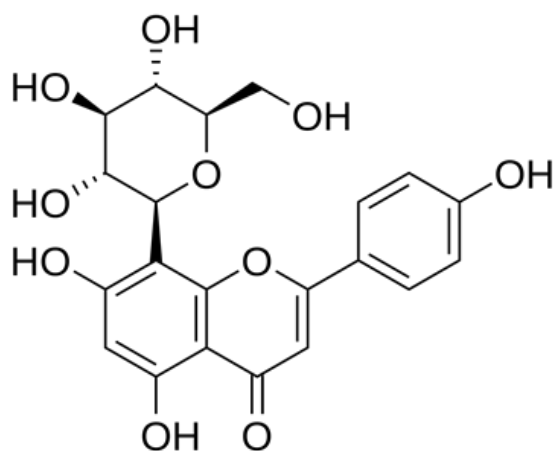


Figura 1: Principais fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários em plantas. Fonte: Adaptado de Gobbo e Lopes (2007).

Considerando a extensão territorial do Brasil e os diferentes habitats em que as plantas tiveram que se adaptar durante sua evolução, é notório que a flora brasileira guarda uma diversidade química extraordinária, fator importante que poderia impulsionar e subsidiar o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos nacional, ainda pouco explorada (BOLZANI; JÚNIOR; VALLI, 2016). Filho (2015b) assinala que somente nos últimos anos tem-se avançado nesse sentido, presumindo-se que apenas 5 a 10% das plantas foram ou estão sendo submetidas a algum tipo de estudo científico, visando comprovar a sua eficácia terapêutica. O autor ainda salienta que inúmeros resultados relevantes e promissores têm sido descritos pelos mais diversos grupos de pesquisadores brasileiros.

Dentre os medicamentos desenvolvidos exclusivamente à base de plantas (fitoterápicos) pelo mercado brasileiro, cita-se o anti-inflamatório de uso tópico Acheflan, formado por uma mistura de 2,3%-2-9% de alfa-humulenos constituintes do óleo essencial de *Cordia verbenaceae* (Borraginaceae); o fitoterápico Escaras cuja base vegetal é a espécie medicinal *Stryphnodendron adstringens*, planta típica do Cerrado, popularmente conhecida como barbatimão, com alto poder cicatrizante, e o recente fitoterápico ansiolítico Sintocalmy, desenvolvido pela indústria farmacêutica Achê, preparado com o extrato de *Passiflora incarnata* padronizado em 21 mg (7%) de flavonoides totais expressos em vitexina (apigenina-8-C-glucosídeo) (**1**) (Figura 2), constituindo alguns dos poucos exemplos de fitoterápicos advindos da flora nacional (BOLZANI; JÚNIOR; VALLI, 2016). Nesse contexto, muitos

aspectos da nossa biodiversidade vegetal permanecem ainda inexplorados, sendo, portanto, uma área de pesquisa com grande potencial.



1

Figura 2: Estrutura molecular da vitexina (**1**), um flavonoide presente no extrato de *Passiflora incarnata* (Passifloraceae). Fonte: <https://images.google.com.br>.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae compreende uma das maiores famílias botânicas, sendo a terceira família mais numerosa dentre as angiospermas. Apresenta distribuição cosmopolita, totalizando 727 gêneros e 19.327 espécies. No Brasil são estimados 1.500 espécies e 175 gêneros, dos quais 31 são endêmicos, estando representada em todos os biomas brasileiros (AGUIAR, 2013; SOUZA; LOURENZI, 2008; LIMA, 2000). Tradicionalmente, tem sido dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, contudo estudos de filogenia molecular a categorizaram em quatro grupos distintos ou subfamílias (Caesalpinioideae, Cercideae, Faboideae e Mimosoideae) (LORENZI; MATOS, 2002; SANCHES, et al.; 2007). Conforme Scalon (2007), a subfamília Mimosoideae é a que possui o menor número de representantes em relação às demais subfamílias, englobando aproximadamente 40 gêneros e 2.800 espécies. Ainda segundo o autor, as espécies dessa subfamília podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais.

Este táxon (família) pode ser caracterizado por uma combinação de características. A fisionomia inclui espécies de hábitos variados, como arbustos, subarbustos, lianas e árvores, que habitam diferentes ambientes. Caracteriza-se por apresentar folhas geralmente compostas, podendo ocorrer folhas simples, pinadas, bipinadas, trifoliales ou digitadas, com estípulas que às vezes se transformam em espinhos, alternas e ocasionalmente opostas (AGUIAR, 2013).

Entre as espécies arbóreas mais populares da família Fabaceae, podemos citar o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville), o jucá (*Caesalpinia férrea* Martius ex Tul) (FAÇANHA et al., 2012), o jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) (SALES et al., 2014), o pau-ferro (*Caesalpinia leiostachya* Benth.), o pau-cigarra (*Senna multijuga* Rich.), a canafístula (*Peltophorum dubium*) (Spreng.) Taub (KÄFER et al., 2016), entre outras muitas espécies.

A família Fabaceae inclui espécies de grande interesse farmacológico, com significativa abrangência de aplicação medicinal. Nesse âmbito, inúmeras atividades farmacológicas já foram comprovadas cientificamente para representantes dessa família, de acordo com registros de buscas na literatura, tais como: atividade inseticida (*Lonchocarpus* spp, *Pterodon* spp, *Pentaclethra* spp) (GARCEZ et al., 2013); atividade antimicrobiana (*Plathymenia reticulata* Benth, *Hymenaea courbaril* L.) (FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005); atividade antiviral (*Senna occidentalis*) (LOMBARDO et al., 2004); atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (*Pterodon emarginatus* Vogel) (ALVES, 2012) e antineoplásica (*Mimosa caesalpiniiifolia*) (SILVA et al., 2016).

Em termos de diversidade fitoquímica as espécies de Fabaceae oferecem uma fonte riquíssima de moléculas das diferentes classes de metabólitos secundários. De espécies dessa família, por exemplo, foram isolados a antraquinona, ácido 1,8-di-hidroxi-antraquinona-3-carboxílico (**1**), substância ilustrada na Figura 3, também conhecido como ácido cassico ou reina, que é um composto bioativo fenólico, extraído da espécie *Cassia bakeriana*, conhecida como cassia rosa (CUNHA et al., 2017), o flavonoide denominada diploflavona (**1**) (Figura 4), isolada de *Diploptropis ferruginea* Benth (ALMEIDA et al., 2005), e os metabólitos: alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonoides, taninos e saponinas, identificados em extrato etanólico das folhas de *Bauhinia forficata* L, vulgarmente conhecida como pata-de-vaca (OLIVEIRA; LIMA, 2017). Alguns outros trabalhos reportam a descoberta de novas substâncias em plantas pertencentes a este táxon, como os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados por Flausino Jr e colaboradores (2007), os quais isolaram da espécie *Erythrina mulungu*, os alcaloides eritrínicos, (+) - 11 α -hidroxieritravina (**1**) e (+) - 11 α -hidroxierisotrina (**2**), mostrados na Figura 5, identificando-os como os responsáveis pelo efeito ansiolítico dessa planta respaldado pelo conhecimento tradicional, o que os tornam candidatos promissores para o desenvolvimento de fármacos ansiolíticos.

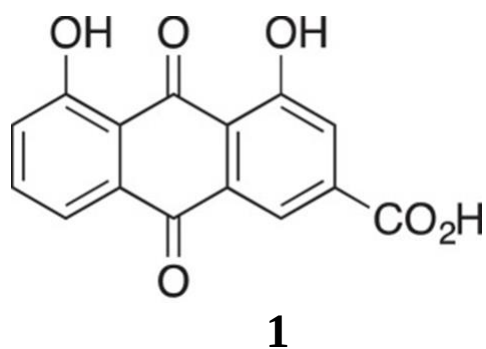


Figura 3: Estrutura química de antraquinona (1) com boa seletividade e alta atividade contra micro-organismos anaeróbios isolada pela primeira vez por Cunha e colaboradores (2017) de *Cassia bakeriana*. Fonte: Cunha et al. (2017).

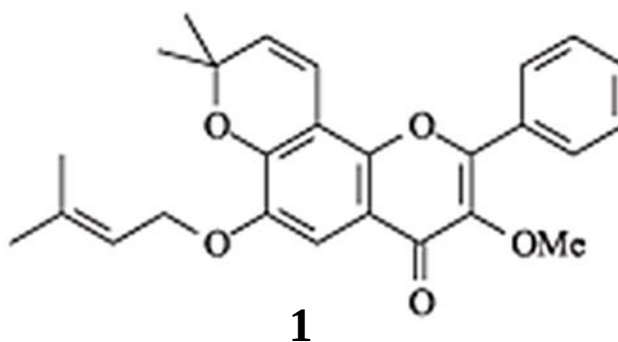


Figura 4: Estrutura química de flavonoide (1) substância anticancerígena isolada de *Cassia bakeriana* pela primeira vez por Almeida et al. (2005). Fonte: <https://images.google.com.br>.

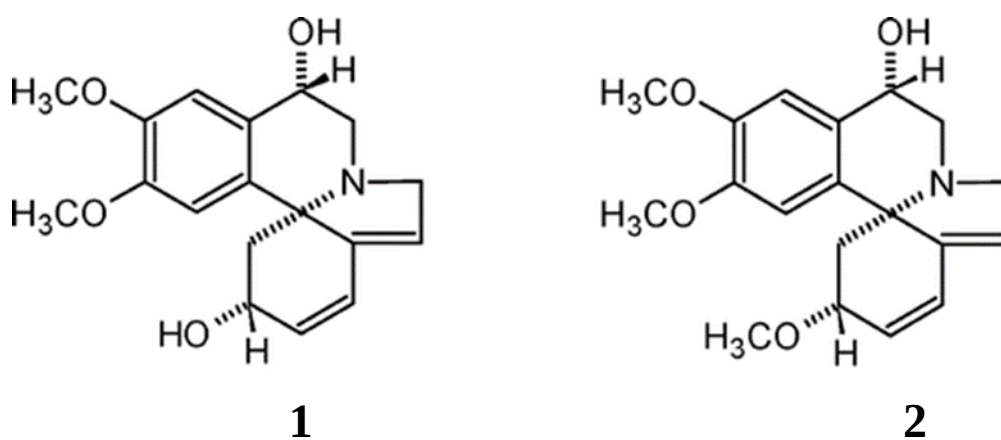


Figura 5: Estrutura química de alcaloides eritrínicos (1-2) com atividade ansiolítica isolados de *Erythrina mulungu*. Fonte: Flausino Jr et al. (2007).

Na botânica, o conjunto de plantas que compartilham características comuns entre si, pertence a uma mesma família botânica (KÄFER et al., 2016). Assim sendo, mediante aos diversos estudos etnobotânicos expostos somados a confirmação da eficácia terapêutica de diversas espécies vegetais da família Fabaceae, é notório o potencial terapêutico das espécies medicinais representantes desse táxon. Os dois últimos exemplos com os alcaloides de (+) - 11 α -hidroxieritravina (**1**) e (+) - 11 α -hidroxierisotrina (**2**) (Figura 5) demonstraram como a grande variedade de compostos dessa família pode ser promissora em termos químico-farmacológicos podendo gerar um grande avanço na indústria farmacêutica brasileira, uma vez que, como nos aponta Rodrigues e Amaral (2012), apenas cerca de 25% dos medicamentos produzidos no Brasil são derivados de plantas.

2.2.1 Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

A espécie medicinal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Quadro 1) pertencente à família Fabaceae, apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas cinco regiões do Brasil (LIMA, 2010). A etiologia do gênero *Stryphnodendron* vem do grego *Stryphnos*, que significa duro e *Dendron* é árvore, enquanto que o seu epíteto específico *adstringens* significa adstringente (PANIZZA et al., 1988). O gênero *Stryphnodendron* apresenta ocorrência predominante na América do Sul e de acordo com Almeida e colaboradores (1998), as 25 espécies que constituem o gênero podem ser encontradas em território brasileiro, ocorrendo em diversos tipos de vegetação, mas principalmente em Cerrados e na Floresta Amazônica, acrescenta Scalon (2007). Vulgarmente, esta espécie é conhecida como barbatimão, barba-de-timão, borãozinho-roxo, casca-da-virgindade, uabatimô, abaramotemo, casca-da-mocidade, faveiro e enche-cangalha (GOULART, 2010). As variações nos nomes vernaculares ocorrem conforme as diferentes regiões do país.

Quadro 1: Classificação taxonômica de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, segundo banco de dados do ILDIS (International Legume Database e Information Service) (2018).

Reino: Plantae
Filo: Tracheophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Fabales
Família: Fabaceae
Gênero: <i>Stryphnodendron</i>
Espécie: <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville

Fonte: Produção do autor (2018).

S. adstringens é uma das espécies mais coletadas e amostradas de seu gênero em herbários brasileiros, no entanto, muitas exsicatas são encontradas nas coleções botânicas identificadas com nomes de suas sinonímias, principalmente *S. barbatiman* ou *S. barbadetimam*. Também é frequentemente confundida com outros gêneros de Leguminosae, particularmente *Plathymenia* (Leguminosae-Mimosoideae) e *Dimorphandra* (Leguminosae-Caesalpinioideae) (SCALON, 2007).

No que concerne as características morfológicas de *S. adstringens*, esta espécie possui hábito arbóreo, de pequeno a médio porte (mas nunca subarbastivo), de copa baixa e arredondada, troncos e ramos suberosos e tortuosos (Figura 6A-B). Distingue-se pelos frutos cilíndricos e túrgidos, os quais formam vagens de 6-9 cm de comprimento, com mesocarpo esponjoso envolvendo as sementes (Figura 6C) (SCALON, 2007); sementes de coloração verde (imaturos) ou parda (maduros) (Figura 6D); folhas bipinadas, apresentando 5 a 8 pares de pinas, com 6 a 8 pares de folíolos em cada pina (Figura 6B) (LORENZI; MATOS, 2002); as cascas possuem sabor característico, forte e adstringente (Figura 6E) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A floração ocorre no período de setembro a novembro, período em que brotam pequenas flores creme-esverdeadas assentadas em inflorescências que possuem forma de espiga. A frutificação ocorre entre os meses de novembro a junho e a sua maturação geralmente acontece no final da estação entre agosto e setembro (LORENZI; MATOS, 2002). É considerada uma espécie perenifólia, isto é, sua folhagem persiste durante todo o ano (SOARES et al., 2008).



Figura 6: Fotos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. A – Planta inteira; B – Ramos; C e D – Frutos e sementes; E – cascas. Fonte: Lorenzi (1998) (fotos A – D) e Silva (2007) (foto E).

Esta espécie possui pronunciada indicação medicinal com emprego de várias partes deste vegetal (Cascas, caules, folhas), sendo utilizada para o tratamento de afecções como: gonorreia, leucorreia, diarreia, úlceras, hemorragias vaginais, impinges, assim como, pode ser usada como agente anti-inflamatório, cicatrizante, adstringente, hemostático, antisséptico e anti-hipertensivo (LIMA et al., 2016). Em relação a sua forma de uso, as cascas têm utilização difundida na medicina popular: internamente como um antiulcerígeno e externamente como cicatrizante e anti-inflamatório. O emprego das cascas por mulheres, é feito na forma de banho de assento com a decocção, no tratamento de problemas ginecológicos; ferimentos vaginais, inflamações uterinas, e, também, hemorroidas (LORENZI; MATOS, 2002). Além disso, a casca tem uso medicinal reconhecido na forma de chá para o tratamento de alterações gastrintestinais e cura de feridas (MARTINS; LIMA; RAO, 2002). Segundo Filizola e Sampaio (2015) a casca desempenha papel fundamental na planta, dada a função de proteção do tronco contra o ataque de pragas, mas, além de representar uma barreira física à entrada destas em seu interior, também podem conter substâncias químicas que atuam como repelentes, ou até mesmo, como inseticidas, bactericidas, fungicidas e assim, evitam que as pragas e doenças se proliferem nos troncos.

Quanto a composição química, o barbatimão é uma importante fonte de compostos fenólicos. Em extratos de cascas e folhas de *S. adstringens* é relatada a presença de taninos, alcaloides, flavonoides, terpenos, estilbenos, esteroides, inibidores de proteases (como a tripsina) que podem ser responsáveis pela sua atividade anti-inflamatória e supostamente antimicrobiana (LIMA et al., 2016). Sendo que somente na casca desta planta estima-se a presença de pelo menos 20% do seu componente majoritário, os taninos, que por sua vez, são ricos em polímeros de proantocianidinas que inclui vários flavonóis como prodelfinidinas e prorobinetinidinas, revelando desta maneira, uma abundância de inúmeros compostos com propriedades farmacológicas, que justificam estudos sobre uso da planta em diferentes patologias (LIMA, 2010; LIMA et al., 2016).

S. adstringens apresenta inúmeras atividades farmacológicas comprovadas cientificamente, a partir de investigações direcionadas pela utilização desta planta na medicina popular. O extrato bruto e frações do barbatimão apresentou efeito antinociceptivo em dois modelos experimentais de indução de dor, no teste de contorção induzida pelo ácido acético e no teste da formalina (MELO et al., 2007). Com isso, os autores sugeriram que o extrato levou ao efeito antinociceptivo por mecanismos de ação periféricos.

Em pesquisa conduzida por Felipe et al. (2006), o extrato acetônico de cascas de barbatimão inibiu a replicação de poliovírus e herpesvírus bovino e a síntese de antígenos virais. Em relação à atividade antiparasitária, Holetz e colaboradores (2005) avaliaram este efeito para o extrato acetônico bruto das cascas de *S. adstringens* (acetona 70%) sobre o protozoário *Herpetomonas samuelpessoai* (ATCC 30252). Os autores relataram que o extrato testado inibiu o crescimento de *H. samuelpessoai* em uma taxa de 75% quando testado na concentração de 1000 µg/ mL. Adicionalmente, o extrato hidroalcolólico seco (etanol 90%, V/V) das cascas de *S. adstringens* foi investigado por Luize et al. (2005) quanto ao seu efeito leishmanicida e tripanocida frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, e nas formas epimastigotas de cepa de *Tripanosoma cruzi*. Os resultados dos ensaios evidenciaram que o extrato seco das cascas de *S. adstringens*, na concentração 100 µg/ mL, inibiu em 36,5% o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, em 21% o crescimento das formas amastigotas de *L. amazonensis* e em 51,9% o crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Efeitos antioxidante e antimicrobiano foram descritos para a classe de metabólitos secundários de extratos das cascas de *S. adstringens*. Souza e colaboradores (2007a), determinaram que extratos da casca de *S. adstringens* apresentaram atividades antioxidante e antimicrobiana devido aos metabólitos secundários derivados da classe de taninos, que são os principais constituintes desta droga vegetal.

Minatel e colaboradores (2010) em fase II de estudo clínico, analisaram a eficácia da pomada contendo fitocomplexo fenólico de *S. adstringens* a 3% na cicatrização de úlceras de decúbito por período de 6 meses avaliando as lesões semanalmente e verificaram que houve redução de 30% na área inicial das lesões após a primeira semana de tratamento e cicatrização de 100% das lesões no período de tratamento, sendo que 70% das lesões apresentaram cicatrização em período de 2 meses.

Em estudo realizado por Rebecca et al. (2002) em relação ao efeito tóxico do extrato metanólico da casca de barbatimão *in vivo*, verificou-se que a administração para camundongos, por 7 dias, não apresentou toxicidade. Entretanto, a administração após um período de 30 dias para ratos foi tóxica, induzindo diminuição da massa corporal, aumento de glicose e aspartato aminotransferase séricas, além de involução do timo. Com relação as alterações observadas, os pesquisadores embasaram que podem estar relacionadas ao estresse oxidativo ocasionado pela planta, que ativam mecanismos reguladores, com a liberação de corticosteroides endógenos.

De acordo com as referências consultadas de estudos com extratos, frações e substâncias isoladas de *S. adstringens*, é indiscutível o potencial farmacológico da espécie em estudo, no entanto, autores ressaltam, como Lima et al. (2016), que ainda, há necessidade de mais estudos em modelos animais e ensaios em humanos que comprovem o uso dessa planta como anticancerígeno, antinociceptivo, antimicrobiano, antiviral, antiparasitário, antioxidante, cicatrizante entre outras atividades, já que a maioria das pesquisas reportadas na literatura se restringem a ensaios *in vitro*. Em referência aos ensaios *in vitro* com as cascas desta espécie, percebe-se no entanto, que ainda são poucos os ensaios para verificação dos seus efeitos citotóxicos, potencial antioxidante e antifúngico, conduzidos na literatura, sendo necessárias abordagens científicas nesse sentido.

Contudo, o extrativismo predatório, desinente da exploração indiscriminada e extensiva dessa espécie em busca de matéria prima de interesse terapêutico, como folhas, caules, mas principalmente as cascas, devido a sua alta concentração em taninos, o principal componente vegetal dessa espécie responsável pelos seus efeitos medicinais, tem provocado grande impacto ambiental em sua população. Embora o extrativismo seja mencionado para *S. adstringens* como possível causador de danos nas estruturas populacionais em algumas regiões do Brasil, conforme assinalam Filho e Felfili (2003), esta espécie não está ameaçada de extinção da natureza, de acordo com base de dados disponíveis e critérios da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) (IUNC, 2018).

Sobre o exposto acima, Filho e Felfili (2003) ainda expõem solução para a redução da extração predatória desse recurso genético vegetal, esclarecendo que é possível obter a casca

através de podas e cortes e, fazendo isso, ao mesmo tempo, propicia-se o crescimento das árvores que serviram para a coleta.

Dentro dessa perspectiva ressalta-se a importância e a crescente preocupação em se associar crescimento social, político e econômico à exploração de recursos e a ocupação de áreas intocadas tendo como principal foco o desenvolvimento sustentável e a exploração racional sem esgotamentos desses recursos. Pavarini et al. (2012a) acrescentam que interesses econômicos desprovidos de sustentabilidade também colocam em risco a biodiversidade do país, frisando e reforçando a urgência em ações que protejam as espécies nativas e promovam sustentabilidade social e econômica sem danos ao patrimônio genético.

2.3 RELEVÂNCIA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NAS PROPRIEDADES BIOLÓGICA DE PLANTAS

A literatura aborda diversos estudos sobre os compostos fenólicos e evidencia seu amplo potencial de aplicação em diversas áreas. Assim, com base nas atividades biológicas atribuídas a estes compostos, muitas pesquisas têm sido empreendidas para a sua utilização como agentes farmacologicamente ativos contra uma variedade de patologias. Nesse contexto, testes *in vitro* realizados com extratos vegetais ricos em compostos fenólicos têm identificado inúmeras atividades biológicas para a classe dessas substâncias: atividade antimicrobiana (AMORIM; SANTOS, 2003), atividade antioxidante (SOUSA, 2015), atividade antifúngica (DINIZ et al., 2010), atividade leishmanicida (ODA et al., 2011), atividade antidepressiva (FERRERES et al., 2013), bem como ação terapêutica constada, em testes com animais, como por exemplo, aos sistemas imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso (GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014).

Quimicamente, os compostos fenólicos, são caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ligados a um anel aromático, estando representados pelos fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas, e demais classes de metabólitos reunidas na Tabela 3 (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A diversidade de estruturas químicas no grupo, refletindo nas diferenças individuais existente dentro de cada classe na natureza, resulta da variação e do número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificação nos anéis e no grau de metilação e glicosilação (DESHPANDE; SATHE; SALUNKHE, 1984; SILVA et al., 2015).

Tabela 3: Classificação das principais estruturas de compostos fenólicos em plantas com base no número de átomos de carbono na molécula.

Estrutura química	Classe fenólica
C ₅	Fenóis simples
C ₆ .C ₁	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C ₆ .C ₂	Acetofenonas e ácidos fenilacético
C ₆ .C ₃	Ácidos cinâmico, aldeídos/álcoois cinamil
C ₆ .C ₃	Cumarinas, Isocumarinas, cromonas
C ₆ .C ₁ .C ₆	Benzofenonas, xantonas
C ₆ .C ₂ .C ₆	Estilbenos
C ₆ .C ₃ .C ₆	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C ₆ .C ₃ .C ₆	Flavonas
C ₆ .C ₃ .C ₆	Flavonois
C ₆ .C ₃ .C ₆	Flavanona
C ₆ .C ₃ .C ₆	Flavanonois
C ₆ .C ₃ .C ₆	Flavan-3-óis
C ₆ .C ₃ .C ₆	Isoflavonoides
C ₆ .C ₃ .C ₆	Antocianidinas / antocianinas
(C ₆ .C ₃ .C ₆) ₂	Biflavonoides
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas
C ₁₈	Betacianinas
Lignanas, neolignanas	Os dímeros e oligômeros
Lignina	Polímeros
Flobafenos	Polímeros

Fonte: Deshpande; Sathe e Salunkhe (1984).

Nas plantas, os fenólicos, constituem um importante arsenal químico de defesa contra herbívoros, patógenos ou competidores. Dentre as substâncias fenólicas, os flavonoides, são responsáveis pela sinalização visual da planta, como a pigmentação de frutos e flores e proteção contra agentes oxidativos, por exemplo, a radiação ultravioleta (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Com relação aos flavonoides com ação medicinal, encontram-se os flavonois, presentes exclusivamente em frutos e folhas (LAZARY, 2010). Com ênfase as quercetinas, Pirie et al. (2014), utilizando a concentração de 35 mg/Kg desse metabólito em tratamento crônico com ratos wistar saudáveis, verificaram que a suplementação com quercetina, apresentou ação vasodilatadora em função de alteração na biossíntese de eicosanoides, que conforme Silva e colaboradores (2015) é a resposta anti-prostanóide e anti-inflamatória de proteger o colesterol LDL da oxidação com a função de impedir a formação de placa aterosclerótica, e de prevenir a agregação plaquetária. Ainda, segundo Schreuder et al. (2014), a administração de quercetinas, na concentração de 150 mg/Kg em tratamento crônico, através de estudo randomizado e cruzado, com 20 pessoas saudáveis, promoveu efeitos anti-hipertensivo e anti-isquêmico.

Outro estudo também evidenciou ação farmacológica para a classe dos flavonois. Dong et al. (2013), verificaram efeito hepatoprotetor de flavonoides da flor de *Inula britannica* (IBFF), os quais atribuíram o efeito as atividades antioxidante e anti-inflamatória exercidas por estes compostos. A lesão hepática no estudo foi induzida por isquemia-reperfusão a partir da

administração de D-Galactosamina (D-Gal; 850 mg/kg) utilizando modelo de camundongo. Os IBFF foram administrados por via oral nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/kg uma vez ao dia por 7 dias. Os resultados revelaram que os IBFF inverteram o aumento dos níveis séricos de aminotransferase e peroxidação lipídica, e estimularam a síntese de glutathione hepática, um antioxidante enzimático endógeno. Além disso, os IBFF atenuaram o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a síntese de óxido nítrico induzível (iNOS) e os níveis de mRNA da ciclooxygenase-2 (COX-2), induzidos por D-Gal.

Yan e colaboradores (2014), em um trabalho, demonstraram que isoflavonoides isolados a partir do extrato metanólico dos frutos de *Manga prunus*, podem estimular a atividade de polimerases de revisão reduzindo as injúrias ocasionadas ao DNA e inibir o surgimento de tumores em vários tipos de câncer iniciados a partir da atividade de radicais livres. A atividade anti-osteoporose também foi investigada pelos autores, para os isolados, usando células MC3T3-E1 osteoblásticas de camundongo, verificando-se que tais substâncias fenólicas foram capazes de estimular significativamente a diferenciação das células MC3T3-E1 osteoblásticas para aumentar a síntese de colágeno potencializando as funções de mineralização dos osteoblastos.

Estudos têm demonstrado que o grupo dos polifenóis atuam na regulação da atividade de enzimas antioxidantes e detoxificantes; na inibição das enzimas geradoras de substâncias carcinogênicas e no processo de detoxificação biológico. Os polifenóis presentes no chá verde, por exemplo, inibem o desenvolvimento do câncer, bloqueando a formação de substâncias potencialmente cancerígenas, suprimindo a ativação da carcinogênese e aumentando a detoxificação de agentes cancerígenos (SALGADO, 2009). Ainda sobre os compostos polifenóis, e em relação as demais substâncias com propriedades farmacológicas que representam o grupo, tem-se as catequinas, as quais apresentam características incolores e hidrolisáveis, contribuindo para o amargor e a adstringência de plantas. Representando este grupo, encontram-se a catequina, epigallocatequina, epigallocatequinagalato. Estes compostos destacam-se pela redução na incidência de certos tipos de câncer, redução do colesterol sérico e ativação do sistema imunológico, dentre vários outros efeitos benéficos à saúde humana (COZZOLINO, 2009).

Outra importante classe de compostos fenólicos são os taninos. Estes são solúveis em água, com peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton. Caracterizam-se pela habilidade em formar complexos insolúveis em água com diversas substâncias, entre elas alcaloides, gelatina e outras proteínas. A capacidade dessas substâncias em formar complexos com proteínas está diretamente associada as suas propriedades biológicas, como fatores de

controle de insetos, fungos e bactérias, envolvendo plantas taníferas, além das atividades farmacológicas associadas a esses compostos: anti-sépticos; antioxidantes; vasoconstritores; antídotos em intoxicação por metais pesados, devido a sua propriedade em precipitar alcaloides; cicatrizantes; protetores e reepitelizantes e antidiarreicos; e até como inibidores da transcriptase reversa do vírus HIV, afetando assim a replicação viral (SANTOS; MELLO, 2010; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; PEREIRA, CARDOSO, 2012; OLIVEIRA; LIMA, 2017; KILKUSKIE et al., 1992).

Na área de câncer, destacam-se as mais diversas substâncias inseridas no grupo desses metabólitos. Aung et al. (2017), em recente artigo de revisão, descrevem um arsenal de compostos naturais, incluindo as plantas, ressaltando o potencial anticâncer de inúmeras moléculas fenólicas, tanto em relação ao uso de forma pura ou combinada (Sinergismo). A revisão destaca a ocorrência do sinergismo em plantas comprovada por inúmeros exemplos relatados em pesquisas na literatura científica, tanto em um único extrato como em misturas de extratos (plantas), cuja eficiência terapêutica contra o câncer é baseada na ação multialvo de compostos naturais como sesquiterpenos, flavonoides, alcaloides, diterpenoides, saponinas e compostos polifenólicos.

Todos os relatos acima descritos, da diversidade estrutural muito ampla e do grande espectro de atividades biológicas atribuídas as substâncias pertencentes a classe dos compostos fenólicos, têm figurado como os principais motivadores para a pesquisa com este grupo. No entanto, os poucos trabalhos na literatura científica sobre a toxicidade desses compostos, são categóricos que em doses elevadas e em uso prolongado, os fenólicos demonstram ter ação tóxica: alterações morfológicas nas membranas dos hepatócitos de camundongos, promovendo necrose celular e morte do animal (VERMA et al., 2013); atividade mutagênica em células de medula óssea de ratos Wistar, em função dos radicais epóxidos formados durante a sua biotransformação no trato gastrointestinal destes animais (PORTO et al., 2013); interferência na função da tireoide, inibindo a captação de iodeto em ratos Sprague Dawley (GIULIANI et al., 2014). Vale ressaltar ainda, que o número de trabalhos avaliando as ações medicinais de fenólicos, conforme argumenta Silva et al. (2015) em estudo de revisão, é superior ao número de pesquisas de avaliação da sua toxicidade. Dessa forma, o estabelecimento de doses consideradas ideais de uso, ou seja, a determinação de em quais doses e tempo de exposição estes compostos são tóxicos, a partir do respaldado de sistema-teste, é indispensável para o seu emprego seguro.

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O metabolismo oxidativo, isto é, a produção de radicais livres, constitui um mecanismo necessário às vias bioquímicas dos organismos aeróbios e do nosso metabolismo, parte indispensável de seu processo fisiológico natural. Desse modo, a produção de radicais livres, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; regulação do crescimento celular e participação nos mecanismos de defesa durante o processo de infecção, na fagocitose de agentes patogênicos. Contudo, a sua produção exacerbada, pode acarretar no desenvolvimento de diversas patologias, as quais destacam-se o câncer, o Alzheimer, a esclerose, o diabetes, as cardiopatias, o envelhecimento, a disfunção cerebral, entre outras (BARREIRO; DAVID; DAVID, 2006; PELIELO, 2012; BIANCHI; ANTUNES, 1999; BARBOSA et al., 2010; ABRAHÃO et al., 2010). Portanto, radicais livres, são produtos gerados pelo metabolismo celular aeróbio, decorrentes de reações químicas essencialmente importantes à realização das funções biológicas dos mais distintos seres vivos, que podem gerar danos celulares, como indução de danos oxidativos a biomoléculas, entre elas, lipídios, açúcares, proteínas e DNA (GOUVÊA, 2004), em consequência do estresse oxidativo gerado pelo seu acúmulo no ambiente celular.

O termo radical livre é definido de maneira simplificada por Ferreira e Matsubara (1997), como sendo qualquer átomo ou molécula que apresenta em sua camada de valência número ímpar de elétrons, ou seja, são átomos ou moléculas altamente reativos, em efeito ao não-emparelhamento de elétrons em sua última camada eletrônica. No entanto, os autores explicam que o termo “radical livre” não seria o ideal para se referir aos agentes reativos patogênicos, uma vez que, nem todas as formas reativas como a exemplo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apresentam elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Nessa mesma perspectiva, Ferreira e Matsubara (1997) acrescentam que embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não seja considerado um radical livre devido à ausência de elétrons pareados em sua camada externa, trata-se de um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila ($OH^\bullet$), considerado o agente oxidante mais reativo em sistemas biológicos, dessa forma, sugerem que os radicais livres sejam designados como “espécies reativas do metabolismo do oxigênio” (ERMO). Entretanto, no decorrer deste texto utilizaremos o termo “espécies reativas de oxigênio” (ERO's) para referirmo-nos a eles ou espécies reativas não-radicais quando for feito menção as formas reativas que não

apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, como encontram-se convencionalmente designadas na maioria das pesquisas registradas na literatura.

No que concerne ao estresse oxidativo, Barbosa e colaboradores (2010), pontuam como sendo um desequilíbrio existente entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (falha na atuação dos sistemas de defesa antioxidante). Nesse sentido, quando a produção contínua de formas reativas radicais intermediárias Figura 7, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), formado após a primeira redução do oxigênio; o radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) que representa a forma radicalar do superóxido em sua forma protonada (ligada a uma molécula de H^+); o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), formado na penúltima etapa de redução do oxigênio e a forma não-radical, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambas provenientes do metabolismo do oxigênio por meio da sua redução tetravalente, normalmente na mitocôndria, a qual encontra-se ilustrada na Figura 7, supera a capacidade de ação dos antioxidantes, se favorece a oxidação de biomoléculas, gerando o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; BARBOSA et al., 2010).

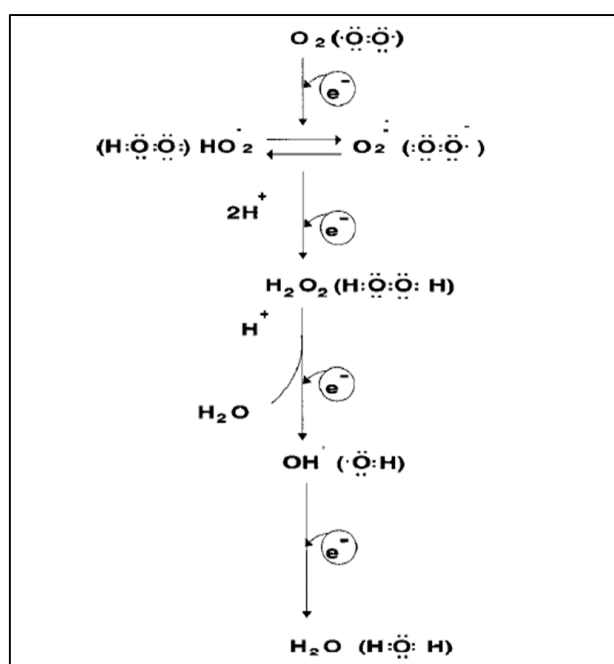


Figura 7: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria, por meio da qual recebe quatro elétrons (e^-) e quatro íons de hidrogênio (H^+), formando duas moléculas de água (H_2O) e várias espécies reativas de O_2 durante o processo. Fonte: adaptado de Cohen (1989).

Várias são as implicações que as EROs podem gerar sobre o sistema biológico, em contrapartida a ineficiência dos agentes antioxidantes, variando o mecanismo de lesão celular,

conforme o grau de toxicidade atribuído a cada espécie reativa. O radical superóxido é moderadamente reativo e precursor da maioria das EROS (Figura 7). Apesar da sua baixa toxicidade, o $O_2^{\bullet}$ pode gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO), potencialmente reativa, através da reação com o radical livre óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O radical hidroperoxila, é considerado mais reativo que o próprio $O_2^{\bullet}$, estando associado a destruição de membranas celulares (FERREIRA; ABREU, 2007; BHATTACHARJEE, 2010).

O radical hidroxila, é a espécie reativa considerada de maior poder tóxico, e para a qual, uma vez formada, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, devido ao fato de que esta não pode ser sequestrada *in vivo*, portanto, é apontada como a espécie reativa mais importante já conhecida, pois essa ERO pode se combinar rapidamente com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzida, formando compostos oxidativos que podem alterar a constituição de macromoléculas importantes, como o DNA, proteínas, lipídeos e enzimas (BARREIRO; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007). Adicionalmente, a exposição frequente somada ao ataque intensivo por este radical pode originar mutações no DNA, levando ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos, de acordo com Barreiro; David e David (2006). Assim sendo, as lesões ocasionadas por radicais livres ao material genético, desempenham papel importante para o início dos processos de mutagênese e carcinogênese (ABRAHÃO et al., 2010).

A forma não radicalar representada pelo peróxido de hidrogênio, é considerada um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, contudo, pode dar início a reações radicalares e peroxidações lipídicas, ao reagir lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases. Assim, em presença de metal de transição, como íons ferro (Fe^{2+}) o H_2O_2 é oxidado gerando $OH^{\bullet}$, através da reação de Fenton, apresentando-se potencialmente tóxico para as células (VASCONCELOS et al., 2007; GIL; TUTEJA, 2010). Autores afirmam que a sua toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004)

Assim, a toxicidade do oxigênio, na grande maioria das células aeróbias, decorre da formação de EROs que podem interagir com diversas moléculas orgânicas, principalmente os lipídios, um ácido graxo insaturado, constituintes das membranas celulares, ocasionando a peroxidação lipídica no intuito de recuperarem a sua estabilidade eletrônica, lesando estas estruturas celulares, em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, perdendo ou recebendo elétrons (Figura 8), o que pode causar a perda da função celular, e consequente, disfunções no sistema biológico envolvido (BARBOSA et al., 2010; CAMPOS; LEME, 2017).

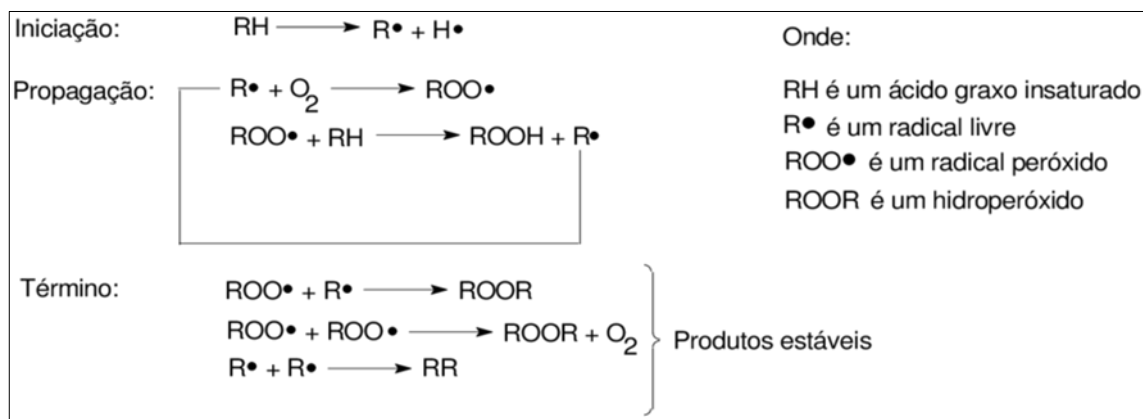
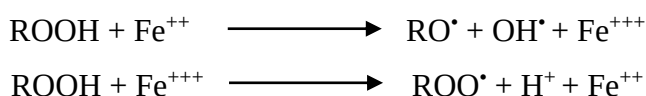


Figura 8: Reação em cadeia representando a lipoperoxidação, mostrando as etapas de iniciação, propagação e terminação. Fonte: <https://images.google.com.br>.

Ainda sobre a reação de peroxidação lipídica ilustrada na Figura 8, esta é iniciada pelo sequestro do hidrogênio ($H\bullet$) do ácido graxo insaturado (RH), da membrana celular. A etapa de iniciação com o sequestro do hidrogênio pode ser realizada pelo radical livre $OH\bullet$, representado pelo $R\bullet$ na Figura 8, com formação de um radical livre ($R\bullet$), chamado agora de radical lipídico. Na sequência da reação de propagação o $R\bullet$ formado na equação anterior, irá reagir rapidamente com o O_2 , resultando em $ROO\bullet$ (radical peroxila). O $ROO\bullet$, por sua vez, irá abstrair novo hidrogênio do ácido graxo insaturado (RH), formando novamente o radical lipídico ($R\bullet$), na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação, culminará na propagação dos radicais lipídico ($R\bullet$) e peroxila ($ROO\bullet$) produzidos nas etapas anteriores, até destruírem-se a si próprios (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A participação de íons ferro (relação equimolar Fe^{+3}/Fe^{+2}), também é considerada fator determinante para iniciação da lipoperoxidação, através da conversão de hidroperóxidos lipídicos (ROOH) (Figura 8) em radicais altamente reativos (alcoxila, $RO\bullet$ e peroxila, $ROO\bullet$), dando início a uma nova cadeia de reações, chamada de ramificação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SOUSA et al., 2007). A velocidade desta reação será determinada pela valência do ferro, em lenta, equação 1 ou rápida, equação 2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997):



A reação de peroxidação lipídica acima descrita irá resultar na destruição das membranas celulares em função da sua perda de seletividade na troca iônica e em consequência da liberação de produtos tóxicos das organelas, principalmente dos lisossomos, provocará,

posteriormente, o fenômeno de morte celular (VASCONCELOS et al., 2007). Contudo, é importante enfatizar que assim como a produção de EROs, o processo de peroxidação lipídica nem sempre é maléfico, apresentando a sua importância para a fisiologia celular. Quando em condições de homeostasia, os produtos resultantes da peroxidação lipídica estão envolvidos na reação em cascata a partir do ácido aracídico (formação de prostaglandinas), e portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Devido ao potencial lesivo das EROs em sistemas orgânicos, mecanismos de proteção endógenos e exógenos, representados por compostos antioxidantes, entram em ação para neutralizar ação desses agentes oxidativos, onde ao final são gerados produtos eletronicamente estáveis, impedindo a injúria celular (CAMPOS; LEME, 2017). Desta maneira, em condições normais, a concentração dessas formas reativas dentro das células é regulada por diversos agentes antioxidantes, que mantêm os seus níveis extremamente baixos por meio da sua remoção, ou impedindo a sua formação (JÚNIOR; HÖEHR; VELLASCO, 2001). Dessa forma, segundo assinalam Barbosa e colaboradores (2010) os agentes antioxidantes têm como função primordial manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, o que irá impedir ou minimizar que eventuais danos oxidativos venham a se propagarem, resultando em patologias sistêmicas irreparáveis.

O sistema de proteção celular responsável pela manutenção da integridade da homeostasia do metabolismo oxidativo, é formado por um conjunto de moléculas que categoriza-o em antioxidante enzimático e não-enzimático. A proteção antioxidante não-enzimática, relaciona-se a um grupo de agentes antioxidantes que são divididos em endógenos, como é o caso da ubiquinona (coenzima Q) e do ácido úrico, produzidos *in vivo*, e em agentes exógenos (ou diéticos) de origem dietética tais como vitaminas E, C, β -caroteno e flavonoides obtidos via alimentação. Estas moléculas localizam-se, principalmente, no meio extracelular. Enquanto que o sistema de defesa enzimático é composto pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutatona (GSH), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx). Estando presentes, predominantemente, no meio intracelular (BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007; DESCALZO; SANCHO, 2008; ANDRADE et al., 2010).

Campos e Leme (2017), em estudo de revisão, ratificam que a geração de radicais livres desencadeia eventos patológicos, acrescentando que a cronicidade de tal processo tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de enfermidades crônicas não transmissíveis, a exemplo das doenças cardiovasculares, endócrinas e oncológicas. Dentro desse contexto, as evidências existentes de que as ERO's podem ser causa ou consequência de

doenças humanas ou eventos nosológicos relacionados ao estresse oxidativo, tem estimulado a recomendação de antioxidantes naturais e sintéticos para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e, mesmo, para bloquear sua evolução (CURTIS, 2013; SILVA; JASIULIONIS, 2014; RUSSO; BRACARENSE, 2016).

2.5 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE FONTES NATURAIS

De acordo com Halliwell (2000), “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. A geração de formas radicais a partir da ação de agentes antioxidantes, por sua vez, não é capaz de propagar atividade reativa em cadeia, devido a rápida neutralização destas por outro radical, formando produtos estáveis, ou podem ser reciclados por outro agente antioxidante (ATOUI et al., 2005).

As substâncias antioxidantes podem agir sob diferentes mecanismos de proteção do organismo. A primeira via de atuação desses compostos acontece impedindo a formação de radicais livres, através da interceptação das reações em cadeia envolvendo os íons ferro e cobre (ABRAHÃO et al., 2010). Em uma segunda via de proteção podem impedir a lesão ou o ataque de espécies reativas produzidas no próprio corpo ou por fontes exógenas sobre moléculas lipídicas, aminoácidos, a dupla ligação de ácidos graxos poli-insaturados e as bases nitrogenadas que constituem o DNA. Por último podem atuar reparando a lesão oxidativa causada as moléculas orgânicas, fazendo a remoção de danos da molécula de DNA e reconstituindo as membranas celulares danificadas (LIMA et al., 2012).

Adicionalmente, a atuação dos compostos antioxidantes pode variar de acordo com o compartimento celular ou tecido no qual exerce atividade. Determinados compostos como a vitamina C apresentam variações em seu potencial antioxidante neste sentido, em meio hidrofílico essa apresenta intensa atividade antioxidante contra radicais gerados neste ambiente, já em meios lipofílicos tal vitamina pode não ser capaz de inibir os radicais livres que propagam as reações de peroxidação lipídica (BARBOSA et al., 2010). No entanto, alguns compostos como os flavonoides são capazes de agir como antioxidantes em ambos os compartimentos celulares, inativando radicais livres tanto em ambiente hidrofílico como em meio lipofílico (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Nessa incursão, pesquisas com plantas tem demonstrado a sua fundamental importância como fonte de novos agentes antioxidantes. Componentes vegetais, entre eles, monoterpenoides, flavonoides, taninos e outras substâncias fenólicas, vem se destacando por

sua potencial atividade antioxidante, principalmente, por atuarem como sequestradores de radicais de oxigênio (ANDRADE et al., 2012; QUETTIER-DELEU et al., 2000; PEREIRA; CARDOSO, 2012; FENG et al., 2015). Dentre as diversas classes de compostos antioxidantes em plantas, os fenólicos, tem recebido considerável destaque em pesquisas nos últimos anos, por suas propriedades antioxidantes *in vitro* como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais, agindo nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

Cabral et al. (2015) em estudo com o óleo essencial de *Ridolfia segetum*, verificaram a alta capacidade antioxidante deste nas concentrações testadas (0,05-0,20 µL / mL) e sua significativa inibição na produção de NO, espécie reativa de nitrogênio. Os resultados forneceram evidências inclusive de que a atividade antioxidante constata para o óleo, devido especialmente ao seu principal constituinte químico, o monoterpeneo α -felandro, foi mais pronunciada que os antioxidantes sintéticos hidroxianisol de butila (BHA), na ausência de peroxidação induzida e que o hidroxianisol de butila (BHT) na presença de peroxidação induzida, avaliado pelo método de determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A partir dos efeitos terapêuticos observados para este óleo, os autores concluíram que a atividade anti-inflamatória em doses sem citotoxicidade em células de mamíferos, combinadas com seu potencial antioxidante e cheiro agradável, podem ser de grande valor no desenvolvimento de novos produtos fitofármacos.

Calleja e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antioxidante do sesquiterpeneo β -cariofileno, componente comum do óleo essencial de inúmeras plantas, frutas e ervas medicinais, verificando atividade inibidora da peroxidação lipídica e alta capacidade de eliminação dos radicais hidroxila e ânion superóxido para este composto em modo concentração-dependente *in vitro*. Os autores relataram, ainda, que ratos tratados com tetracloreto de carbono que receberam o β -cariofileno nas respectivas concentrações de 2, 20 e 200 mg / kg, apresentaram redução da atividade da 5-lipoxigenase, uma enzima que participa ativamente da fibrogênese, e da expressão dos genes Col1a1, Tgfb1 e Timp1, genes marcadores fibróticos. Segundo os pesquisadores, a atividade hepatoprotetora *in vivo*, está associada ao efeito de inibição do estresse oxidativo. Portanto, trata-se de um efetivo inibidor de dano celular induzido por espécies reativas de oxigênio, e seu mecanismo na prevenção de fibrose hepática pode estar relacionado, em parte, a sua atividade antioxidante.

Na indústria o interesse ligado aos antioxidantes está voltado para a sua aplicação na conservação/proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade. Os antioxidantes sintéticos mais

importantes utilizados para esta finalidade são o hidroxianisol de butila (BHA), hidroxitolueno de butila (BHT) e galato de propila (PG). No entanto, questionamentos sobre a segurança e efeitos adversos desses compostos sintéticos, a exemplo do galato de propila, que quando em presença de peróxido de hidrogênio reagi com íons ferro formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos, têm levado, inclusive, a propostas de sua substituição por compostos naturais, por seus benefícios à saúde e por serem prontamente assimilados pelo organismo, impulsionando, desta forma, inúmeras pesquisas em busca de compostos antioxidantes em plantas (SOUSA et al., 2007; HENRIGUES; DANIELLI; APEL, 2016).

2.6 AVALIAÇÃO IN VITRO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.6.1 Método de detecção de atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH[•])

A atividade antioxidante *in vitro* de extratos e substâncias isoladas é realizada por meio de uma variedade de técnicas, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias potencialmente ativas. Todavia, destacam-se os métodos de sequestro de radicais livres, o DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e o ensaio de captura do radical 2,2' - azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), os quais estão fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração de uma solução contendo os radicais livres quando da adição de substâncias que podem ceder elétrons ou doar átomos de hidrogênio. O primeiro, o método de DPPH tem sido bastante utilizado e consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestrante do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (HENRIGUES; DANIELLI; APEL; 2016).

O método de inibição de radicais DPPH[•] baseia-se na transferência de átomos de hidrogênio de um composto antioxidante formando o DPPH-H (hidrazina) (SILVA et al., 2006). Em suma, por ação de um antioxidante o radical livre estável DPPH[•] é reduzido a difenil-picril-hidrazina, ocorrendo mudança simultânea de coloração de violeta (DPPH[•]) a amarelo pálido (DPPH-H). O grau de descoloração indicará o potencial de captura de radicais livres pela amostra, e conseqüentemente a sua capacidade antioxidante, a qual será monitorada pelo decréscimo da absorbância (HENRIGUES; DANIELLI; APEL; 2016).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) calculada no ensaio *in vitro*, será determinada a partir da quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. Os resultados obtidos no ensaio são expressos em CE₅₀ denominada concentração eficiente, que é a

quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ou também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). O consumo de DPPH pela amostra será inversamente proporcional a sua CE_{50} , ou seja, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

2.6.2 Método de detecção de atividade antioxidante pelo cátion radical ABTS^{•+}

A segunda metodologia para seleção *in vitro* de substâncias com potencial antioxidante, o ABTS, mede a habilidade dos antioxidantes em sequestrar o cátion radical de vida longa ABTS^{•+}. Para tanto, a solução composta pelo ABTS, é exposta a oxidação pelo radical peroxil ou por outros oxidantes para conversão no radical cátion, ABTS^{•+}, intensamente colorido. Trata-se mais uma vez de um método colorimétrico, onde a atividade antioxidante da amostra é medida pela sua capacidade em diminuir a intensidade da cor da solução contendo o cátion ABTS^{•+}, reagindo diretamente com este radical (RUFINO et al., 2007). Esta metodologia é aplicável para o estudo de substâncias antioxidantes de caráter lipossolúvel e hidrossolúvel (KUSKOSKI et al., 2005).

2.7 A RESISTÊNCIA MICROBIANA E A BUSCA POR NOVOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

O impacto da crescente resistência dos micro-organismos a antibióticos e substâncias específicas, seja pela utilização generalizada, ou pouco criteriosa, para fins terapêuticos e profiláticos, intensificou a pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de combater as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram (PRATES; BOLCH, 2000; WHO, 2007; CARNEIRO et al., 2011; ZIMERMAN, 2012; VIEIRA; VIEIRA, 2017). Silva e colaboradores (2018) também enfatizam que conforme mostram estudos é cada vez mais irrefutável a assertiva, de que o mau uso de antimicrobianos é o principal responsável pela seleção de resistência microbiana.

O número de surtos hospitalares causados por espécies resistentes vem aumentando consideravelmente com a mudança no padrão de sensibilidade microbiana aos fármacos disponíveis, como consequência do uso indiscriminado destes (SANTANA et al., 2014; NETA et al., 2017). Machado; Carvalho e Oliveira (2011) verificaram em uma pesquisa realizada em um Centro de Terapia Intensiva (CTI) que, entre os anos de 2000 e 2004, foi registrado o uso prévio de 593 antimicrobianos por 286 pacientes acometidos com infecções hospitalares, no período anterior ao registro da infecção hospitalar naquela CTI, correspondendo a uma taxa de

utilização de 2,10 antimicrobianos por paciente, o que pode vir a se tornar um fator causal no incremento das taxas de resistência microbiana no ambiente hospitalar e eventualmente comunitário. É nesse sentido que Zimerman (2012) corrobora, afirmando que as taxas de resistência microbiana são maiores em contextos de consumo mais intenso desses fármacos. Diante da exposição, Grillo e colaboradores (2013) veem acrescentar, que dentre os fatores contribuintes para a maior prevalência de crescimento microbiano em UTIs, refletindo nas altas taxas de infecções e mortalidade para pacientes instalados em nessas unidades, estão a gravidade da doença, os procedimentos que requerem mais tempo e os invasivos, e por último, os longos períodos de internação.

Costelloe e colaboradores (2010), em estudo de revisão, ratificam a relação causa-efeito entre a exposição de pacientes a antimicrobianos e o posterior desenvolvimento de resistência no contexto comunitário e em âmbito individual. Segundo os autores, estudos relatando a quantidade de antibiótico prescrito demonstraram que a maior duração e múltiplos cursos estavam associados a maiores taxas de resistência em pacientes nas respectivas unidades hospitalares avaliadas. Os indivíduos os quais haviam sido prescritos um antibiótico na atenção primária para uma infecção respiratória ou urinária desenvolveram resistência bacteriana a esse antibiótico. Os pesquisadores verificaram ainda, que o efeito é maior no mês imediatamente após o tratamento, mas pode persistir por até 12 meses, concluindo que este efeito não só aumenta o transporte populacional de organismos resistentes aos antibióticos de primeira linha, mas também cria as condições para o aumento do uso de antibióticos de segunda linha na comunidade.

A difusão do uso irracional de antimicrobianos no contexto hospitalar é extremamente preocupante, já que infecções causadas por micro-organismos resistentes são de mais difícil tratamento e se associam a maior morbidade, sendo portanto, o advento de resistência mais dramático nesse ambiente, e particularmente entre pacientes gravemente enfermos. Tais implicações justificam para esta última condição, a maior preocupação dos profissionais da área de saúde em relação as infecções que ocorrem nas unidades que atendem pacientes mais suscetíveis à infecção - Pediatria, Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e Unidades Oncológicas (MACGOWAN, 2008; GRILLO et al., 2013). Livermore (2005) destaca que o emprego de antimicrobianos no espaço ambulatorial, concentra 80% do consumo humano, e segundo Louro, Lieber e Ribeiro (2007) é responsável por 20-50% dos gastos com medicamentos.

A multirresistência microbiana crescente é considerada atualmente um dos maiores problemas mundiais em saúde pública, a qual pode ser compreendida, principalmente, pela correlação temporal entre a comercialização de novos agentes e o posterior desenvolvimento

de resistência de patógenos aos mesmos (MACGOWAN, 2008; DEL FIO et al., 2010; GARCIA-MIGURA et al., 2014; NUNES et al., 2017). Diante de tal problemática tem-se o alarmante fato, evidenciado por Federico (2006), e Botelho; Martins e Reis (2018), de que o processo de aparecimento da resistência microbiana é muito rápido comparado ao processo de desenvolvimento de novos fármacos, estando a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro, incerta. Dessa forma, torna-se indiscutível a necessidade urgente da implementação de estratégias de incentivo à pesquisa e priorização para o desenvolvimento de medicamentos, no intuito de diminuir a desproporção em relação à carga de doença e contribuir para o desenvolvimento de medicamentos inovadores necessários ao quadro epidemiológico global da emergência da resistência microbiana em curso (BOTELHO; MARTINS; REIS, 2018).

Nesta perspectiva, vários estudos têm sido desenvolvidos e direcionados à investigação de novos agentes antimicrobianos em extratos vegetais, bem como em outras fontes de produtos naturais, com o objetivo de descobrir antimicrobianos com ação similar aos tradicionalmente utilizados, mas com maior efetividade contra a resistência de micro-organismos patogênicos, menor toxicidade e com menor impacto ambiental. No tocante a bioprospecção de novos fitoterápicos, os estudos conduzidos por diversos autores (VANIN, 2014; BRAQUEHAIS et al., 2016; CARVALHO, 2017; PONTES et al., 2018), comprovaram o efeito antimicrobiano de várias plantas. Além de representarem escolhas menos agressivas e de menor custo aos usuários, conforme afirmam Guimarães et al. (2017).

2.7.1 Candidíase

A candidíase é uma patologia que representa grande impacto para a saúde pública, cujas espécies causadoras pertencem ao gênero *Candida*. Este gênero engloba um grupo de fungos oportunistas, os quais manifestam-se em decorrência de fatores que debilitam as barreiras imunitárias do paciente. Desta maneira, aspectos que interfiram na homeostase da microbiota normal alterando a resposta imunológica ao fungo, constituem fatores de risco para o seu desenvolvimento. Por exemplo, pacientes com resposta imunitária deficiente, como portadores do vírus HIV, estados hiperestrogênicos, diabetes mellitus, imunossupressão a medicamentos ou doenças de base, gravidez, uso indiscriminado de tamoxifeno, consumo irracional de antibióticos, bem como hábitos alimentares e vestes que propiciam o crescimento contínuo dos fungos, incluindo-se também o uso prévio de várias automedicações inapropriadas como fator predisponente a sua ocorrência (GOMPERTZ et al., 2015; JUNIOR; GRIGOLETO; FREGONEZI, 2011).

As infecções causadas pelos fungos leveduriformes do gênero *Candida*, podem ser classificadas em candidíase oral e candidíase vulvovaginal. O primeiro tipo caracteriza-se por ser uma enfermidade mortal, mesmo que, ao provocar moléstias de diferentes níveis, compromete o paladar e a deglutição, levando a uma diminuição do apetite, principalmente nos casos de pacientes HIV-positivo ou pacientes hospitalizados e idosos. A segunda condição patológica resulta em intensa coceira, odor, prurido, corrimento, ardor ao urinar, eritemas, dispareunia e desconforto vaginal. Tais infecções são responsáveis por milhões de visitas a consultórios médicos a cada ano. Estimativas revelam que metade das mulheres universitárias terá tido pelo menos uma ocorrência dessa doença diagnosticada por um clínico ao chegar aos 25 anos (BARBEDO; SGARBI, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Dentre as espécies causadoras da candidíase, *Candida albicans* e a que possui maior representatividade nos diagnósticos clínicos, estando associada com 85% a 90% dos casos, existindo ainda as infecções causadas por outras espécies, como *Candida krusei*, caracterizando-se por apresentarem maior resistência aos antifúngicos comerciais. Contudo, diagnósticos patogênicos envolvendo as demais espécies de *Candida* spp estão se tornando comuns, indicando uma tendência de mudança na etiologia nas candidíases invasivas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; JUNIOR; GRIGOLETO; FREGONEZI, 2011).

A sintomatologia envolvendo quadros clínicos de candidíase por *C. albicans*, são frequentemente transparentes a realização de diagnóstico, quando comparada a outras espécies denominadas não-*albicans*, ou seja, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, as quais geralmente são mais resistentes as terapias habituais (SIMÕES, 2005). De forma geral, as infecções que atingem o trato genital feminino causadas por micro-organismos desempenham rotineiramente um caráter considerável nos serviços de saúde ginecológica (CAVALCANTE; MIRANDA; PORTUGAL, 2005). Em países como a Inglaterra a incidência da candidíase vaginal varia entre 28 e 37% das mulheres, já nos Estados Unidos a incidência desta infecção tem apresentado crescimento acentuado, constituindo, deste modo, a segunda causa de vaginite (JUNIOR; GRIGOLETO; FREGONEZI, 2011).

A alteração na etiologia das candidíases tem sido frequente no ambiente hospitalar, nota-se um crescimento no número de infecções por *Candida* spp resistentes a antifúngicos, por sua vez, esse quadro de resistência tem levado a taxa de insucesso na terapêutica contra essa infecção, somando-se o aumento da morbidade e mortalidade (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Casos de resistência adquirida a drogas antifúngicas de uso sistêmico, como a azóis, em espécies naturalmente sensíveis, tem sido relatado para pacientes expostos prolongadamente a

estes medicamentos. Quanto à resistência a anfotericina B, os relatos são mínimos (COLOMBO; GIMARÃES, 2003).

O uso irracional ou excessivo de fármacos são fatores que vem favorecendo o surgimento de leveduras resistentes, especialmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes (VANDEPUTTE et al., 2005; CALLOU et al., 2012). Desse modo, a resistência microbiana dessas espécies constitui, em âmbito mundial, um problema de saúde pública, sendo necessário o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento das doenças associadas, tendo em vista a alta frequência de infecções pelas espécies de *Candida* somada ao aumento da resistência aos antifúngicos comercialmente disponíveis. Assim, uma das alternativas que está surgindo é o estudo de antifúngicos de origem vegetal (CAVALCANTI et al., 2012; CAMPOS et al., 2016). A utilização de fitoterápicos surge como uma possibilidade de maior eficácia e tratamento alternativo. Estes se diferem por apresentar uma diversidade molecular superior aos sintéticos, proporcionando novas descobertas, com pesquisa nas atividades biológicas que podem favorecer na prevenção e tratamento de doenças (ANDRADE et al., 2012).

2.8 COMPOSTOS DE ORIGEM VEGETAL COMO FONTE POTENCIAL DE NOVOS AGENTES ANTICÂNCER

As doenças e agravos não transmissíveis (DANT) vêm aumentando progressivamente no Brasil, passando a predominar nas estatísticas de óbitos, a exemplo das neoplasias malignas (BRASIL, 2013). Da mesma forma, no panorama global as DANT são as principais responsáveis pelo adoecimento e óbito da população. Estima-se que, em 2008, 36 milhões dos óbitos (63%) ocorreram em consequência das DANT, com destaque para as doenças cardiovasculares correspondendo a 48% das DANT seguidas pelo câncer responsável por 16% (INCA, 2018).

Nessa perspectiva, o câncer continua se destacando como uma das mais expressivas doenças crônicas não-transmissível, sendo responsável somente no período de 2012 por 8,2 milhões de mortes conforme dados da Organização Mundial de Saúde. Concomitantemente, é apontado como a principal causa de mortes por doença no mundo (WHO, 2013b).

No Brasil, estimativas realizadas pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer, Brasil) para o biênio 2018-2019, apontam para a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer por ano, compreendendo a segunda causa de morte da população brasileira, com números extraordinariamente preocupantes que refletem a morte de 225 mil indivíduos anualmente, sendo as neoplasias malignas responsáveis por aproximadamente 15% de todas as mortes no

país (SEFFRIN; ADAMS; WILD, 2014, INCA, 2018). O cálculo global corrigido para o sub-registro alertava para a ocorrência de 640 mil casos novos, de acordo Mathers et al. (2003), reforçando a magnitude do problema do câncer no país, o que demonstra a necessidade da criação de estratégias terapêuticas para sua minimização e prevenção.

Estimativas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) sobre a ocorrência de neoplasias, discorrem que estas representam o maior desafio que os países irão enfrentar nos próximos anos, e que, apesar dos avanços no tratamento do câncer e melhorias contínuas no atendimento e na prevenção, os dados estatísticos levantados mostram que esta doença é causa de mais de um quarto de todas as mortes, tendo um custo humano enorme, mortalidade elevada e diminuição da probabilidade de sobrevivência, demonstrando que a luta contra o câncer ainda está distante de resultados otimistas. As informações adquiridas pela OCDE, avaliam que em poucos anos, haverá um enorme impacto social e econômico, devido aos gastos diretos com a doença pelo governo em todos os países (OCDE, 2013).

Dentro desse contexto, Siqueira e colaboradores (2016) analisaram o impacto evolutivo das internações, das quimioterapias e dos afastamentos temporários e/ou definitivos ocorridos no Brasil no período de 2008 a 2015 por neoplasia maligna de mama e verificaram que houve um aumento no impacto econômico referente as variáveis estudadas de 110%, do valor aproximado de R\$ 302 milhões no ano de 2008 para R\$ 633 milhões no ano de 2015.

Por definição a patogênese do câncer é caracterizada por uma desregulação a nível celular, a qual é iniciada por exposição lesiva do material genético, e consequente, comprometimento da informação genética e padrões anormais de expressão gênica, dado o acúmulo de mutações adquiridas em função das injúrias sofridas, ocasionando desta forma, uma disfunção metabólica em cascata conhecida como câncer. Como consequências dessa alteração, os genes que controlam o crescimento, sobrevivência e migração celular terão os seus efeitos exacerbados, estimulando as células à proliferação descontrolada, ao passo que os efeitos dos genes supressores dessas funções celulares são reprimidos levando à perda de regulação das células importante para o controle da divisão celular. Esses genes são chamados de proto-oncogenes e supressores de tumor, respectivamente (HARRINGTON, 2011; JOHNSON et al., 2004).

Muitas abordagens para o gerenciamento do câncer são muitas vezes ineficazes devido a reações adversas, resistência à terapia anticâncer disponível ou especificidade de alvo inadequada de agentes anticâncer únicos (AUNG et al., 2017). Dada à etiologia complexa e à fisiopatologia do câncer “um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo

espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo” (INCA, 2014), é relativamente difícil tratar a doença com um único alvo terapêutico, e ao mesmo tempo facilita o entendimento de falha terapêutica, na maioria dos casos, da monoterapia no combate à doença. Em contraste, uma abordagem combinatória com a aplicação de dois ou mais agentes anticancerígenos nas suas respectivas dosagens efetivas pode atingir um efeito sinérgico que aumenta a citotoxicidade para as células cancerígenas (ZHOU et al., 2016).

Em fase do exposto acima, a adoção da polifarmacologia se impõe na terapia de doenças multifatoriais que para ser melhor tratada, necessita da ação de mais de um fármaco, em associação ou pela utilização de fármacos multialvos. Esta última estratégia terapêutica consiste no uso de uma entidade química capaz de ser efetiva em mais de uma biomacromolécula alvo, relacionadas ao mesmo processo fisiopatológico (BOLOGNESI, 2013).

Por esta razão, o tratamento do câncer utiliza regime de quimioterapia múltipla. A terapia do câncer de mama, por exemplo, o segundo tipo de neoplasia maligna mais incidente entre as mulheres no mundo, em geral inclui a ciclofosfamida (CP), tanto no tratamento adjuvante como neo-adjuvante e ainda para tumores avançados e recorrentes, terapia antiestrogênica, baseada principalmente no uso de tamoxifeno. Apesar das vantagens do regime de quimioterapia múltipla, a toxicidade (hematopoiética, renal e cardíaca) limita seu uso. Além disso, tem-se a quimiorresistência apresentada por alguns tumores mamários, o que representa um desafio clínico (SAEKI et al., 2006; INCA, 2018; PESSOA et al., 2007; PEINTINGER et al., 2008; YAMASHIRO; TOI, 2008; SABINO, 2010).

Por outro lado, o tratamento do câncer por compostos naturais e seus análogos semi-sintéticos tanto *in vitro* como *in vivo* mostram resultados promissores contra diferentes neoplasias malignas (FILHO, 2015b). Em fase disso, Newman, Cragg e Snader (2003) ratificam que os compostos naturais de várias fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos oferecem uma ótima oportunidade para a descoberta de novos candidatos terapêuticos para o tratamento do câncer.

Os compostos naturais com potentes atividades anticancerígenas estão amplamente disponíveis em diferentes tecidos vegetais, entre os quais cita-se alcaloides, flavonoides, saponinas, terpenos, polifenóis, ácidos graxos e óleos essenciais como ingredientes bioativos nessas espécies (SUN et al., 2006; LIU; HENKEL, 2002; SILVA et al., 2002).

Os resultados obtidos pelo grupo de Castanho e colaboradores (2007), em estudo de revisão, sobre o extrato de *Ginkgo biloba* (Egb 761), demonstraram que esta espécie é um importante agente antitumoral, que resulta na inibição da angiogênese e na indução de apoptose, podendo prevenir processos de invasão e metastatização do tumor. De acordo com os estudos

reunidos pelos pesquisadores, a ação antioxidante de *G. biloba* diminui os níveis de EROs na célula, o que leva à inibição da ativação de fatores de transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento e na agressividade do câncer. Dessa forma, os autores concluem que esta espécie vegetal constitui uma nova classe de fitoterápicos com potente atividade antitumoral e seu uso tanto na prevenção quanto no tratamento de vários tipos de câncer pode ser considerado na medicina convencional, sugerindo ainda que a ação anticancerígena constada deve-se principalmente aos componentes mais importantes da planta, os terpenoides (ginkgoglídeos e bilobalídeos) e os flavonóides (glicosídeos ginkgoflavonas).

Em pesquisa conduzida por Yu et al. (2009), a matrina um alcaloide de quinolizindina encontrado na planta *Sophora Flavescens* Aiton (LIU et al., 2014), reprimiu a metástase do câncer através da regulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína Kinase B (Akt) e do fator nuclear kappa-encarecimento (NF-kB) da cadeia leve de sinalizadores de células B ativadas em células de câncer de mama MDA-MB-231.

Outra importante classe de metabólito vegetal com evidente potencial anticancerígeno registrada na literatura científica, são os fenólicos. Devido ao amplo espectro de atividades biológicas, já supracitado e exaustivamente discutido nesta revisão, estes compostos podem exercer efeito protetor no organismo contra a oxidação de proteínas e lipídeos minimizando os efeitos deletérios de espécies reativas, e diminuir desta forma os riscos de doenças como o câncer (GOUVÊA, 2004). Adicionalmente, os polifenóis estão envolvidos com outras atividades que podem estar relacionadas à capacidade de sequestrarem radicais livres. Estas atividades são mediadas por interação a receptores e incluem atividade antiproliferativa, de regulação do ciclo celular e indução de apoptose, constituindo-se importantes na prevenção e bloqueio do crescimento de células tumorais (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Assim, a atividade anticancerígena destes compostos é atribuída a combinação de seus efeitos protetores sobre as células normais e os seus efeitos citotóxicos sobre linhagens de células neoplásicas (MOTILVA et al., 2014).

Diante da extensa biodiversidade da flora brasileira ressalta-se a importância dos organismos vegetais como fontes produtivas na busca de novas substâncias anticancerígenas. De acordo Cavalcanti et al. (2012) por se tratar de um país de caráter tropical, as plantas em território nacional produzem de três a quatro vezes mais constituintes químicos ativos quando comparadas às plantas de áreas onde o clima é temperado. Dessa forma, as espécies vegetais brasileiras adquirem relevância na busca de produtos naturais com potencial atividade biológica, capazes de serem empregadas clinicamente para o tratamento de enfermidades como

o câncer, tendo em vista a descoberta de novos fármacos eficientes, preferencialmente sem efeitos colaterais indesejáveis.

Considerando o rico potencial da biodiversidade brasileira como fonte de moléculas bioativas, conforme já mencionado anteriormente, inúmeras espécies de plantas nativas e exóticas vêm sendo avaliadas quanto ao seu potencial farmacológico. Alguns exemplos de estudos com promissores resultados encontram-se agrupados na Tabela 4 a seguir, particularmente aqueles com ação contra linhagens celulares de diferentes tipos de câncer, de acordo com dados reunidos por Campos e colaboradores (2014), evidenciando o potencial anticancerígeno de espécies vegetais da flora brasileira.

Tabela 4: Alguns exemplos de plantas da flora brasileira com atividade antitumoral contra diferentes linhagens celulares.

Gênero/ Espécie	Família	Extrato/ composto	Citotoxicidade/ célula
<i>Allamanda schottii</i>	Apocynaceae	Extrato etanólico raiz	K562
<i>Bides pilosa</i>	Asteraceae	Extrato clorofórmico	Carcinoma ascítico Ehrlich
<i>Calendula officinalis</i> L.	Asteraceae	Extrato metanólico	B16; HL-60; MCF-7; HCT-8; B16-F10; C57BL/6
<i>Casearia silvestres</i>	Salicaceae	Extrato hexânico Casearin X	MOLT-4; MDA/MB-435; SF-295; HCT-8
<i>Drimys brasiliensis</i>	Winteraceae	Óleo essencial	U-138 MG; T-24
<i>Garcinia achachairu</i>	Clusiaceae	Extrato metanólico, frações, xantonas	U-251; NCI/ADR-RES; 786-0; NCI-H460; HT-29; PC-3
<i>Garcinia gardneriana</i>	Clusiaceae	Extrato hidroalcoólico	B16-F10
<i>Himatanthus articulatus</i>	Apocynaceae	Fração clorofórmio Fração butanol	HT-29; NCL-H460; MCF-7; OVCAR-3; RXF-393; NIH-3T3
<i>Hypericum rasiliense</i> Choisy.	Hypericaceae	Extrato hexânico Phloroglucinol (Uliginosin B)	OVCAR-03; NCIADR/RES; UACC-62
<i>Maytenus ilicifolia</i> (Schr.) Planch.	Celastraceae	Extrato metanólico Pristimerina	B16; HL-60; MCF-7; HCT-8
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Asteraceae	Extrato metanólico Extrato aquoso	B16; HL-60; MCF-7; HCT-8
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr.	Anacardiaceae	Extrato etanólico	MDA/MB-435; HL-60; HCT-8; SF-295
<i>Palicourea rigida</i>	Rubiceae	Vallesiacotamina w	SK-MEL-37
<i>Paullinia cupana</i> Mart.	Sapindaceae	Extrato etanólico	B16-F10
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddib	Anacardiaceae	Polifenóis	DU145

Nota: 786-0 (câncer de rim), B16 (melanoma), B16-F10 (melanoma murino); C57BL/6 (melanoma murino), DU145 (carcinoma de próstata), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal), HL-60 (leucemia promielocítica), HT-29 (câncer de cólon), K562 (leucemia mieloide crônica), MCF-7 (câncer de mama), MDA-MB-435 (melanoma), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda), NCI/ADR-RES (câncer de ovário), NCIADR/RES (carcinoma ovariano resistente), NC-H460 (câncer de pulmão), NHI-3T3 (fibroblasto embrionário de rato), OVCAR-3 (carcinoma de ovário), PC-3 (câncer de próstata), RXF-393 (carcinoma renal), SF-295 (glioblastoma), SK-MEL-37 (melanoma),

T-24 (tumor de bexiga), U-138 MG (glioblastoma), U-251 (Glioma), UACC-62 (melanoma). Fonte: Adaptado de Campos e colaboradores (2014).

Por fim, Cragg e Newman (2016) corroboram quanto ao promissor potencial farmacológico de compostos naturais, afirmando que somente na área de câncer, por exemplo, cerca de 60% dos medicamentos disponíveis foram, de alguma forma, obtidos usando produtos naturais, puros ou similares.

2.8.1 Câncer de mama

O câncer de mama faz referência a um tipo de tumor maligno que se desenvolve a partir de células da mama (BREASTCANCER.ORG, 2016). Kourou et al. (2015) definem que o carcinoma invasivo de mama consiste em um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invadir o tecido adjacente e ter elevada tendência à metástase à distância, sendo caracterizado como uma doença heterogênea que apresenta diferentes subtipos. A estratificação do câncer de mama em quatro subtipos moleculares, que são eles (1) luminal A, (2) luminal B, (3) HER-2 amplificado e (4) câncer de mama basal, por sua vez, é determinada pelo perfil de expressão gênica (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

No que diz respeito aos subtipos moleculares de tumor da mama, o subtipo luminal A relaciona-se aos tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER-2. Enquanto que os tumores do subtipo luminal B expressam os dois tipos de receptores, o RE e RP, e exibem superexpressão de HER-2 (CHIANG et al., 2007).

O subtipo HER-2 amplificado apresenta negatividade para os receptores hormonais RE e RP, porém possui elevada expressão da oncoproteína HER-2, que é um produto do proto-oncogene HER-2/Neu, a qual irá atuar como receptora de fatores de crescimento, estimulando o crescimento e divisão das células cancerígenas de forma descontrolada. Por último, o subtipo basal possui negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER-2, sendo denominados de tumores triplo-negativos, em razão da sua não responsividade hormonal (CIRQUEIRA et al, 2011; BURSTEIN et al, 2004; SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009). De acordo com relatos de estudos reunidos por Eisenberg e Koifaman (2001), existe uma associação positiva entre a presença de receptores hormonais, RE e/ou RP, para um prognóstico mais favorável, maior sobrevida livre da doença, e também a uma maior probabilidade de resposta à terapia hormonal, para pacientes acometidos com câncer de mama, ao passo que pacientes com negatividade para ambos os receptores (RE e RP) mostraram-se com pior prognóstico do que aqueles pacientes com negatividade para apenas um dos receptores.

Geralmente, o câncer de mama inicia nas células dos lóbulos, que são as glândulas produtoras de leite, ou a partir de células localizadas nos ductos, que são as passagens que drenam o leite dos lóbulos para o mamilo. Menos comumente, o câncer de mama pode iniciar a partir dos tecidos estromais, que incluem os tecidos conjuntivos gordurosos e fibrosos da mama, conforme ilustrado abaixo na Figura 9 (BREASTCANCER.ORG, 2016). Progressivamente, as células cancerígenas podem invadir o tecido mamário saudável nas proximidades e entrar nos gânglios linfáticos das axilas, pequenos órgãos que filtram substâncias estranhas no corpo. Se as células cancerosas entrarem nos gânglios linfáticos, elas terão um caminho para outras partes do corpo, dando início ao processo de metástase (BREASTCANCER.ORG, 2016).

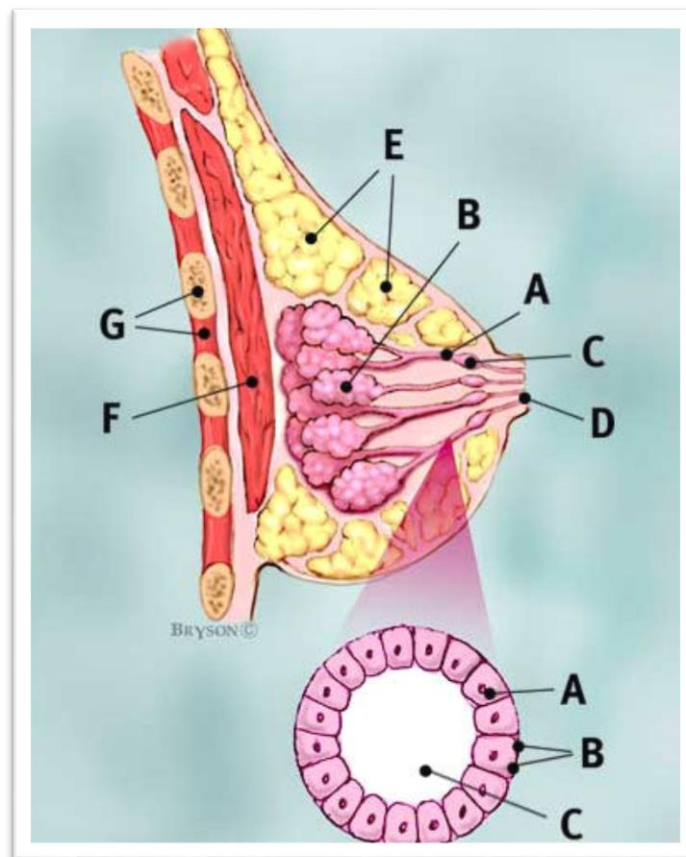


Figura 9 - Perfil simplificado da anatomia da glândula mamária. A: ductos; B: lóbulos; C: ductos dilatados para armazenar leite; D: mamilo; E: tecido adiposo; F: músculo peitoral maior; G: caixa torácica. Detalhe do ducto mamário no aumento. A: células ductais normais; B: membrana basal; C: lúmen. Fonte: breastcancer.org, 2016.

Ainda sobre os tipos de neoplasias da mama, estas podem ser classificadas baseadas na sua penetração ou não na membrana basal limitante, em carcinoma *in situ*, para aqueles que

permanecem restritos a esse limite, ou carcinoma invasivo, designação para os carcinomas que se espalham para além dos limites estabelecidos pela membrana basal. Assim, conforme esta classificação, as principais formas de carcinoma da mama são os não invasivos (carcinoma ductal *in situ*, CDIS, e carcinoma lobular *in situ*, CLIS) e os invasivos (carcinoma ductal invasivo, CDI, carcinoma lobular invasivo, CLI, carcinoma medular, carcinoma coloide, carcinoma tubular, etc) (SIMPSON et al., 2003; BURSTEIN et al., 2004).

Dentre os carcinomas não-invasivo, o ductal *in situ* é o tipo mais comum de câncer de mama. Para esclarecimento, o termo “ductal” significa que o câncer começa dentro dos dutos que transportam leite, “carcinoma” faz referência a qualquer tipo de câncer que tem sua origem a partir de um tecido epitelial, “*in situ*” designa o tipo de câncer na qual as células mantiveram-se dentro de seu local de origem. Desta forma, o CDIS (I) (Figura 10) é denominado “não-invasivo” porque não vai, eventualmente, evoluir espalhando-se para fora do limite circundante da membrana, invadindo os tecidos adjacentes (EHEMAN et al., 2009; BURSTEIN et al., 2004). Este tipo de carcinoma não é fatal para o indivíduo, no entanto, pode aumentar o risco de desenvolver um câncer de mama invasivo (BREASTCANCER.ORG, 2016).

O carcinoma ductal invasivo (CDI) (II) (Figura 10), é o tipo de lesão mais comum de câncer de mama (BATEMAN, 2007). Cerca de dois terços das mulheres, predominantemente com idade de 55 anos ou mais são diagnosticadas com um câncer de mama invasivo, segundo a Sociedade Americana de Câncer. Vale salientar, no entanto, que o carcinoma ductal invasivo pode acometer mulheres em qualquer idade (BREASTCANCER.ORG, 2016). Devido à invasão aos tecidos adjacentes, aos linfonodos, e também devido ao processo de metástase, vinculados a este carcinoma, o CDI está associado a uma elevada taxa de mortalidade, apresentando um prognóstico relativamente ruim, com uma expectativa de 10 anos em 35-50% dos casos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; EHEMAN et al., 2009). O quadro evolutivo deste carcinoma está mais comumente associado ao CDIS e, raramente, ao CLIS, segundo mostram estudos de evolução tumoral (EHEMAN et al., 2009).

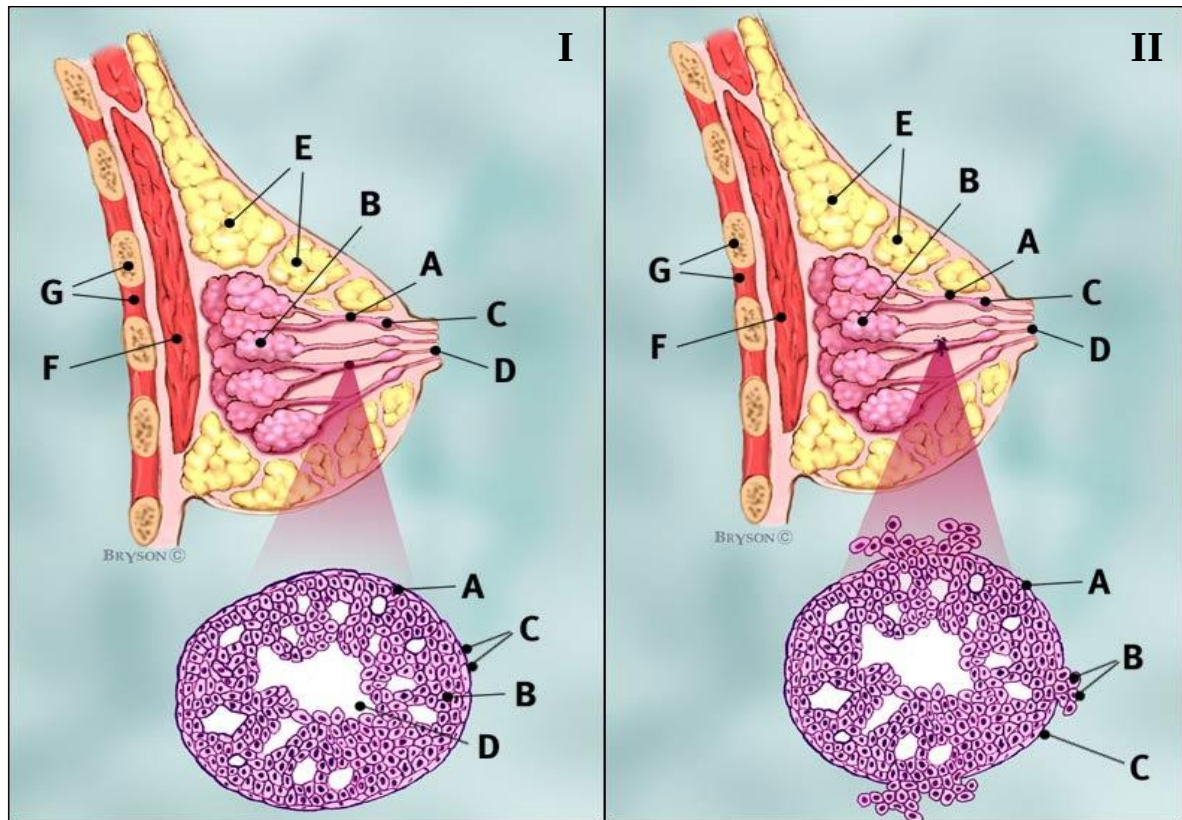


Figura 10 - Tecido mamário com carcinoma ductal *in situ* (I) e carcinoma ductal invasivo (II) em uma secção aumentada do ducto. No aumento em I: A - célula ductal normal; B - células ductais transformadas; C – membrana basal; D - lúmen. No aumento em II: A - célula ductais normais; B - células ductais transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal. Fonte: breastcancer.org, 2016.

O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (III) Figura 11, inclui uma situação de crescimento celular anormal limitante a região lobular, que no futuro, aumenta o risco de uma pessoa vir a evoluir para um câncer de mama invasivo. Assim, lobular significa que o crescimento das células anormais inicia nos lóbulos da mama, onde o leite materno é produzido. Nesse contexto, aproximadamente 33% das mulheres com CLIS acabarão por desenvolver carcinoma invasivo que podem surgir em qualquer mama (BREASTCANCER.ORG, 2018; SIMPSON et al., 2003).

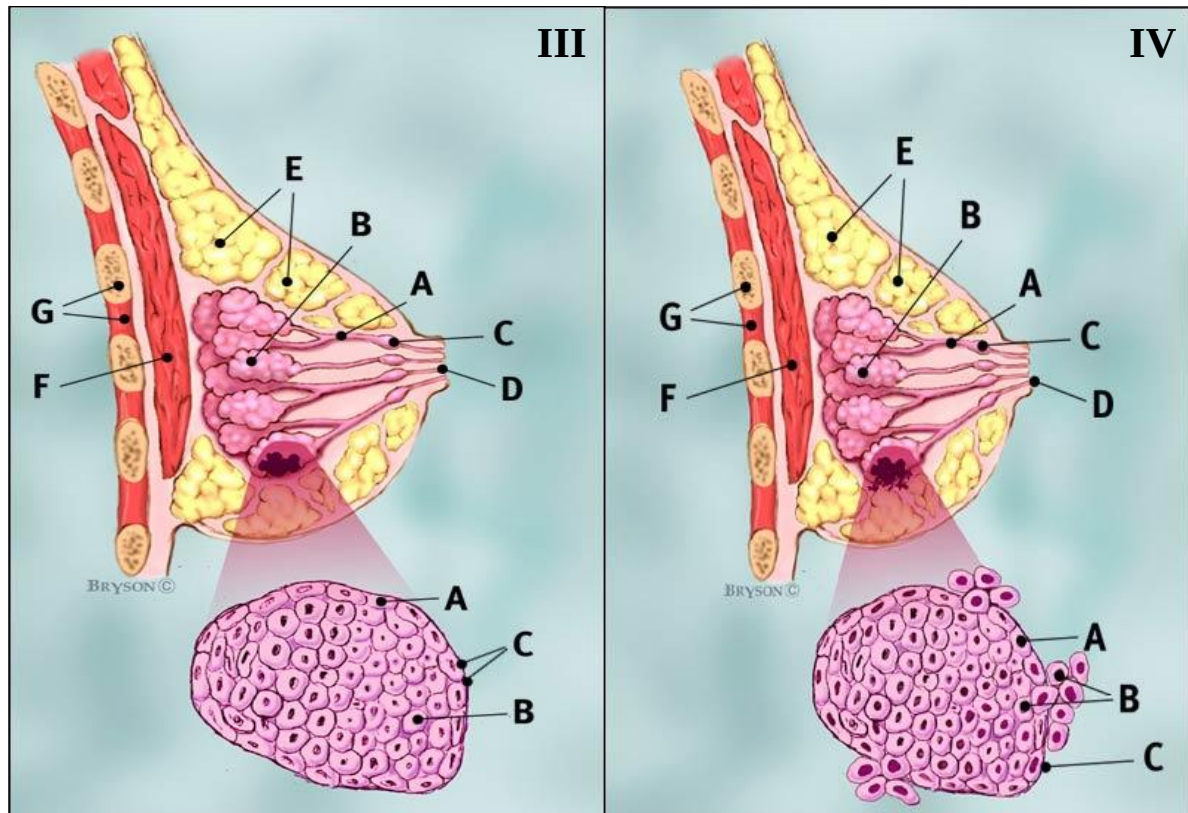


Figura 11. Tecido mamário com carcinoma lobular *in situ* (III) e carcinoma lobular invasivo (IV) em uma secção aumentada do lóbulo. No aumento em III: A - célula lobular normal; B - células lobulares transformadas; C - membrana basal. No aumento em IV: A - célula ductais normais; B - células lobulares transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal. Fonte: breastcancer.org, 2016.

Finalmente, o carcinoma lobular invasivo (CLI) (IV) Figura11, refere-se ao câncer que ultrapassa os limites da parede que circunda o lóbulo e começa a se infiltrar para tecidos próximos da mama, podendo atingir os nódulos linfáticos e, possivelmente, demais áreas do corpo. Similarmente ao CDI, o carcinoma lobular invasivo é mais comum em mulheres com mais idade e tende a ocorrer mais tarde na vida do que o carcinoma ductal invasivo, no início dos 60 anos em oposição do meio para o final dos 50 anos. Dados de algumas pesquisas têm sugerido que o uso de terapia de reposição hormonal durante e após a menopausa, constitui um fator de risco para a ocorrência do CLI (BREASTCANCER.ORG, 2018).

A Sociedade Americana de Câncer, ressalta que a causa do tumor maligno mamário está sempre associada a uma anomalia genética (um "erro" no material genético). Contudo, apenas 5-10% são devido a uma anormalidade herdada da mãe ou do pai. Em vez disso, 85-90% desses

cânceres são devido a anormalidades genéticas que ocorrem como resultado do processo de envelhecimento e do “desgaste” da vida em geral (BREASTCANCER.ORG, 2016).

No que se refere ao perfil de incidência para cada tipo de câncer, as estatísticas levantadas pelo INCA indicam que excetuando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o primeiro mais frequente nas mulheres nas regiões brasileiras: Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil). Dessa forma, para cada ano do biênio 2018-2019, estimam-se 59.700 casos novos de câncer de mama, para o Brasil (INCA, 2018). Nos Estados Unidos, a tendência é ainda mais preocupante. Anualmente, a Sociedade Americana de Câncer estima a incidência, mortalidade, e sobrevivência para cada tipo de câncer nos Estados Unidos. Para o ano 2018, estima-se que 266.120 novos casos de câncer de mama invasivo sejam diagnosticados em mulheres no país, juntamente com 63.960 novos casos de câncer de mama não invasivo (in situ). Quanto a taxa de mortalidade no país, estima-se que cerca de 40.920 mulheres nos EUA devem morrer em 2018 por câncer de mama. Para as mulheres nos EUA, as taxas de mortalidade por câncer de mama são mais altas do que as de qualquer outro câncer, além do câncer de pulmão (BREASTCANCER.ORG, 2018).

Em termos globais, o câncer de mama constitui-se no segundo mais frequente e comum tumor maligno entre as mulheres (INCA, 2008; INCA, 2018). É a primeira causa de morte por câncer entre o público feminino, tendo uma taxa de mortalidade maior do que qualquer outro câncer (STEWART; WILD, 2014). Assim, segundo Buitrago; Uemura e Sena (2011) é provavelmente o tipo de câncer mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, mortalidade. No mesmo contexto, ainda segundo o panorama global, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer (FERLAY et al., 2013). Segundo Almeida (2015), a falta de eficácia dos tratamentos disponíveis atualmente explica as altas taxas de mortalidade da doença, o que vem refletindo sobre a necessidade de intervenções terapêuticas mais eficazes. Neste aspecto, cabe ainda ressaltar, a toxicidade das drogas sintéticas disponíveis no mercado, fortalecendo a necessidade de novas estratégias de tratamento de maior eficácia e com menos toxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a composição química, atividades antifúngica, antioxidante e citotóxica das cascas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville).

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o conteúdo total de fenólicos do extrato etanólico, da casca de barbatimão.
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de *S. adstringens*.
- Analisar a atividade antifúngica do extrato etanólico comparando a eficiência de duas técnicas de difusão em ágar, difusão em discos e em poços.
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato etanólico, acetônico e frações de *S. adstringens* sobre linhagens de células neoplásicas de mama.
- Realizar a análise dos principais constituintes químicos do extrato acetônico e suas frações por CCD.
- Identificar os principais constituintes químicos do extrato etanólico por LC-ESI-MS e UHPLC-PDA-TOF-MS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES, PADRÕES

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada utilizando-se placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha). Como reveladores foram utilizados, os reagentes NEU (Difenilborato de amino – 2 etil), PEG (polietilenoglicol), Vanilina clorídrica, Lieberman-Burchard, KOH (Hidróxido de Potássio), Timol e H₂SO₄ (Ácido Sulfúrico 10%) e o seguinte sistema de eluição: Acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5), Tolueno/acetato (70:30), Éter etílico/acetato de etila/ácido acético 10% (saturação) (50:50:50), Acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (100:11:11:26), Acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (50:20:10:10). Como solvente foi utilizado o metanol (MeOH) (J.T.Baker, Phillipsburger, EUA) e banho ultrassônico 3,5 L (Unic 1600A, Unique, São Paulo, Brasil) para completa solubilização das amostras vegetais, e detecção por irradiação ultravioleta 254 e 366 nm (LUB01, Boitton, Porto Alegre, Brasil).

As análises em LC-ESI-MS foram realizadas na Universidade Federal Rural de Pernambuco, no Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BIOFITO), em cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa Quadupolo–Tof (Xevo G2-XS QTof, Waters) com ionização por eletrospray (ESI), operando no modo negativo.

A leitura de absorbância para determinação das atividades antirradicais, teor de fenólicos totais, foi realizada no aparelho (Asys HiTech UVM 340, Biochrom, EUA), utilizando placa de 96 poços. Foram utilizados os seguintes reagentes: Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico 97%), ABTS [2,2' azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio 98%], ácido gálico, ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha), carbonato de sódio, persulfato de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e etanol (EtOH) (Cinética, São Paulo, Brasil), como agente solubilizador das amostras vegetais.

Para a extração líquido-líquido foi utilizado o solvente acetato de etila (AcOEt) (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e água deionizada por osmose reversa.

Nos ensaios de citotoxicidade foi utilizado meio líquido RPMI 1640 suplementado com 5% e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Difco®). Para os ensaios de atividade antifúngica e citotoxicidade, foi usado o DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha) como reagente solubilizador das amostras. Os meios de cultura utilizados nos ensaios da atividade antifúngica foram: meio sólido ágar Sabouraud 2% e meio líquido caldo Sabouraud

Dextrose. Todos os outros reagentes e produtos químicos não citados foram de grau analítico e foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E DETERMINAÇÃO DA ORIGEM BOTÂNICA

Foram coletadas duas amostras das cascas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville) em área rural, situada no município de Caruaru, Pernambuco, Brasil, nos meses de junho e dezembro de 2017, período que corresponde a estação com altos índices pluviométricos e elevadas temperaturas na região, respectivamente. Foi determinado período específico para a coleta, já que fatores ambientais exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo de metabólitos vegetais, como tem sido demonstrado para a espécie em estudo, o barbatimão, que fatores sazonais podem afetar os teores do seu principal metabólito secundário na casca, os taninos. Nesse sentido, Santos e colaboradores (2006) determinaram que a maior produção de taninos acontece na estação quente e chuvosa, quando preferencialmente, deve ocorrer a coleta de partes deste vegetal para uso medicinal. Posteriormente a coleta, o material da planta foi identificado, um espécime de comprovante foi depositado no Instituto Agrônomo de Pernambuco - (IPA) de Pernambuco, e esta amostra foi utilizada como material de referência.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

Para a obtenção do extrato bruto etanólico (EBE), a espécie vegetal passou por uma trituração, na qual sofreu, mecanicamente, fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o, assim, para a extração de metabólitos de interesse. Posteriormente, 200,0 g da amostra vegetal pulverizada, foi submetida a extração em 100,0 mL de etanol (EtOH) P.A., deixando-se a mistura sob extração por 72h. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida à 40°C para remoção do solvente orgânico, obtendo-se um material viscoso (MATOS, 1997). Para melhor evaporação do solvente, esse material foi colocado em recipientes de vidro tarados e levados ao B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 37°C. O rendimento do extrato foi calculado pela expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato} / \text{massa do material vegetal}) \times 100$.

4.3.1 Quantificação do conteúdo fenólico total

A quantificação de compostos fenólicos totais no extrato etanólico das cascas de *S. adstringens* foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, de acordo com

metodologia descrita por Slinkard e Singleton (1977) seguindo alterações, pela utilização do ácido gálico como composto fenólico padrão. Para o ensaio, alíquotas de 100 µL de extrato na concentração correspondente de 100 µg/mL, previamente preparadas em etanol a 5 mg/mL, foram transferidas para eppendorf de 5 mL, contendo 820 µL de água destilada e 20 µL do reagente de Folin-Ciocalteu homogeneizando com agitação durante 1 minuto. Na sequência foram adicionados 60 µL de carbonato de sódio a 15 % e a mistura foi novamente agitada, permanecendo em repouso pelo período de 2 horas, ao abrigo de luz. Após o tempo estabelecido para a reação, uma alíquota de 300 µL da mistura foi transferida para placa de 96 poços e determinou-se a sua absorbância a 760 nm contra um branco (água destilada) em espectrofotômetro. O teor de compostos fenólicos totais do extrato foi quantificado a partir de uma equação da curva de calibração externa (do padrão ácido gálico) e os resultados foram expressos como miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) de peso seco da amostra, considerando o desvio padrão (D.P.). Todo o procedimento para determinação do teste foi realizado em triplicata.

4.3.2 Teste antioxidante pela inibição do radical livre DPPH[•]

A atividade antiradical utilizando o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi procedida conforme metodologia adaptada da desenvolvida por Silva et al. (2006). As amostras foram preparadas a 1 mg/mL em etanol, e através de triagem preliminar, quantidades suficientes destas foram transferidas para eppendorfs de 500 µL, de modo a atingirem uma concentração final que variasse entre 1,0 a 15 µg/mL. Logo após, foram transferidos para o eppendorf 450,0 µL da solução de DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (23,6 µg/mL em EtOH), juntamente com o volume correspondente de EtOH para completar 500,0 µL. A mistura foi incubada sob agitação durante 30 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente, onde na sequência foi retirado da mesma 300 µL e transferido para placas de 96 poços, para determinação das absorbâncias em espectrofotômetro de Elisa UV-Vis, no comprimento de onda de 517 nm. Foram realizadas três repetições deste teste.

Lidas as absorbâncias calculou-se a percentagem de atividade sequestradora (% AS) das amostras e do padrão conforme a fórmula abaixo:

$$\% AS = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

Onde: A_{controle} é a absorbância do controle (contém somente etanol e solução do radical DPPH[•]), e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato ou do padrão ácido ascórbico (solução sem DPPH).

A atividade antioxidante do extrato etanólico de *S. adstringens* foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 7.0 (DEMO) e o resultado foi expresso em concentração necessária para inibir 50% da atividade sequestradora máxima do radical livre DPPH mais ou menos o desvio padrão ($CE_{50} \pm D.P.$), tendo como controle positivo o ácido ascórbico.

4.3.3 Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical ABTS^{•+}

O método ABTS empregado foi o método descrito por Re et al.(1999), seguindo as alterações adotadas por Kuskoski et al. (2004). O radical ABTS^{•+} é formado pela reação de uma solução aquosa de 7 mM de ABTS (2,5 mL) com persulfato de potássio a 140 mM (44 µL), deixada em repouso, ao abrigo da luz em temperatura ambiente, durante um período de 12-16 horas. Uma vez formado o radical ABTS^{•+}, o mesmo foi diluído em etanol (1:100 v/v, aproximadamente) até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$) a um comprimento de onda de 734 nm. Para o prosseguimento do ensaio, foi preparado uma amostra do extrato etanólico a 1,0 mg/mL em etanol e em eppendorfs de 500 µL foram adicionadas quantidades apropriadas da solução da amostra ou do padrão, adicionando logo em seguida 450,0 µL da solução do radical ABTS^{•+} e o volume completado para 500,0 µL com EtOH, de modo a se obterem concentrações finais que variassem de 1,0 a 15 µg/mL, anteriormente definidas através de triagem preliminar. Após a agitação da mistura em aparelho ultrassônico durante 6 minutos, na ausência de luz em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 734 nm em espectrofotômetro Elisa UV-Vis. Foram realizadas três repetições deste teste. Prepararam-se curvas com soluções-padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (antioxidante sintético similar à vitamina E solúvel em água).

Lidas as absorbâncias calculou-se a percentagem de atividade sequestradora (% AS) das amostras e do padrão conforme a equação abaixo:

$$\% AS = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

Onde: A_{controle} é a absorbância do controle (contém somente etanol e solução do radical ABTS^{•+}), e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato ou do padrão trolox (solução sem ABTS).

A eficiência antirradicalar do extrato etanólico de *S. adstringens* foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 7.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da

concentração da amostra necessária para inibir 50% da atividade sequestradora máxima dos radicais livres ABTS^{•+} mais ou menos o desvio padrão ($CE_{50} \pm D.P.$).

A eficiência antioxidantes das amostras de *S. adstrigens* ensaiadas frente ao radical livre ABTS^{•+} e DPPH[•] em solução, baseou-se na classificação adotada por Reynertson e colaboradores (2005), os quais afirmam que valor de CE_{50} inferior a 50 $\mu\text{g/mL}$ é considerado muito ativo, de 50 – 100 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente ativo, 100 – 200 $\mu\text{g/mL}$ é pouco ativo e valor superior a 200 $\mu\text{g/mL}$ é considerado inativo.

4.3.4 Análises por UHPLC-PDA-ESI (-)-QTOF-MS/MS

O EBE foi analisado por cromatografia líquida com espectro de massas (LC-MS). A amostra foi preparada a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como solvente o EtOH. A análise foi coordenada pela Profa. Dra Tania Maria Sarmiento da Silva, responsável pelo Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BIOFITO), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Os experimentos analíticos de LC-MS foram realizados utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas Quadupolo-Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters, EUA) com ionização por eletrospray (ESI). Para tanto, foi utilizada coluna ACQUITY UPLCTM BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μm , Waters, EUA) a 40°C. A fase móvel consistiu em água com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (solvente B), sendo as condições do gradiente de eluição: 0.0 a 8.0 min 10% - 50% de B; 8.0 a 9,0 min – 50% -95% de B e em 9.1 min 10% de B. Os cromatogramas obtidos com o detector UV foram registrados em 320 nm.

As condições utilizadas no espectrômetro de massas Quadupolo-Tof foram: modo negativo de Ionização (ESI-) no modo sensibilidade; detecção implementada no modo centróide MSE em uma faixa de massa de 50-1200 Da; voltagem capilar ajustada em -0,8 kV para ESI; gás de dessolvatação (N₂) entregue em 1000 L/h e 600 °C; taxa de fluxo de gás do cone fixada em 50 L/h e a fonte de temperatura ajustada para 140 °C; voltagem do capilar definida como 3V, a do cone 40V e a energia de colisão foi utilizada uma rampa em relação à alta energia de 10 a 30 eV. O sistema UPLC ESI(-)-MS foi operado com o software MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA).

4.3.5 Cultura fúngica

A linhagem 5840 do fungo *Candida krusei* empregada nos ensaios, trata-se de um isolado clínico oriundo de amostra sanguínea, proveniente da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, onde havia sido depositada por um laboratório particular. O ensaio microbiológico foi conduzido sob a supervisão da Profa. Dra. Elisângela Ramos Castanha, nos laboratórios de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade de Pernambuco, *Campus Garanhuns*. A cultura do microrganismo foi mantida em freezer em solução de glicerol e caldo Sabouraud Dextrose, obedecendo a seguinte proporção para preservação da mesma: 850µL de inóculo para 150 µL do glicerol. As amostras foram recuperadas em caldo Sabouraud Dextrose, e incubadas sem agitação durante 48 horas a 28°C. Procedeu-se à triagem da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de acordo com a recomendação do protocolo da National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (NCCLS, 2002).

4.3.5.1 Atividade antifúngica

A seleção da planta, *S. adstringens*, para investigação de atividade anticandida, teve como base o potencial uso medicinal desta espécie para o tratamento de afecções vaginais na forma de banho de assento por populares, além do seu excelente efeito cicatrizante, respaldado por estudo etnobotânico realizado com moradores de comunidades quilombolas no município de Garanhuns – PE, no ano de 2014, pelo grupo de Correia e colaboradores (2017).

As leveduras a serem testadas foram suspensas em solução salina 0,85 %, e as suspensões padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em solução fisiológica, correspondente a uma concentração de aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 células por mL de leveduras e 1 mL foram repicados com o auxílio de uma alça de Drigalski na superfície do meio ágar Sabouraud 2%, contidos em placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura (NCCLS, 2002). A seguir, foram preparadas soluções estoque dos extratos etanólicos nas concentrações de 25mg/mL, 50mg/mL, 100mg/mL, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 2,5% e água purificada estéril (1: 1, v / v), com base na metodologia de Alfaia e Aumeida (2016). Como padrão antimicrobiano foi empregado Miconazol 20mg/g e Nistatina 22,1 mg/mL, que são antifúngicos utilizados amplamente. Como controle do diluente foi utilizado uma solução de DMSO 2,5%.

A atividade antifúngica foi verificada *in vitro* pelo método de difusão em ágar por disco e poço. O método de difusão em ágar em disco empregado nos ensaios foi preconizado por Rabanal et al. (2002) e Karaman et al. (2003), onde discos estéreis de papel filtro 6 mm de

diâmetro foram aplicados com pinça estéril sobre placa de Petri contendo ágar Sabouraud 2%, previamente inoculada com o micro-organismo a ser testado e, em seguida, receberam uma alíquota de 10 µL do extrato a ser avaliado.

O teste de difusão em ágar por poço foi realizado segundo assinalam Moody; Adebiyi e Adeniyi (2004), diferenciando-se do disco pela realização de orifícios de 6 mm de diâmetro no meio de cultura ágar sabouraud 2% em placas de Petri, com auxílio de molde para perfuração dos poços. Na sequência os poços foram preenchidos com 50 µL do extrato na concentração a ser testada. Os controles positivo (Miconazol e Nistatina) e negativo (diluyente DMSO) foram testados em triplicatas, ambos no mesmo volume pipetado dos extratos para as metodologias de difusão em ágar por disco e poço.

Após o processo acima descrito, as placas foram incubadas a 28°C durante dois dias. A avaliação consistiu em medir o diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) verificada após 24 horas de incubação, perdurando os dois dias, ou seja, até o momento em que as colônias fúngicas do tratamento testemunha atingiram toda a superfície da placa.

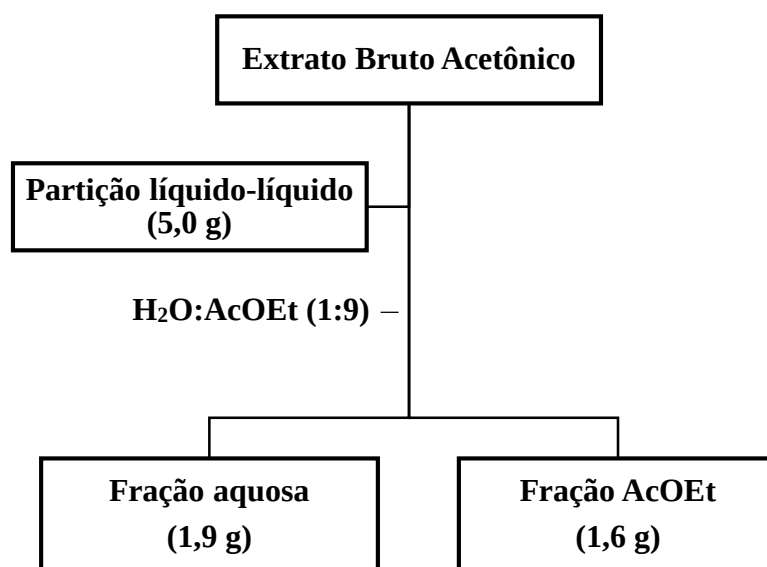
Os valores obtidos dos halos de inibição (HI) nos testes microbiológicos foram calculados com média aritmética e analisados entre si. A atividade antifúngica do extrato etanólico foi classificada em sem atividade antifúngica ($HI = 0 \text{ mm}$), com pouca atividade antifúngica ($0 \text{ mm} < HI < 7 \text{ mm}$), com moderada atividade antifúngica ($7 \text{ mm} \leq HI \leq 13 \text{ mm}$) e com elevada atividade antifúngica ($HI > 13 \text{ mm}$), contra a cepa fúngica desafiado, conforme preconizam Oliveira et al. (2011), com pequenas alterações. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias dos halos de inibição foram comparadas pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 7.0 (DEMO).

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ACETÔNICO

O material vegetal (cascas) foi seco à temperatura ambiente e moído em um moinho Wiley (Modelo TE-680, Tecnal ®), até um pó muito fino e homogêneo. O material vegetal seco e moído (60 g, 10% m/v) foi extraído com acetona: Água (7: 3, v / v) por extração turbo (quatro ciclos extrativos de 30 s, intercalados com 5 minutos de pausa). A solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida (RV10 Basic, IKA ®), e o resíduo foi congelado (-80 ° C, 4 dias) e depois liofilizado (Modelo L101, Liotop ®), obtendo-se o extrato bruto acetônico (EBA) (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1999).

4.4.1 Fracionamento do extrato bruto acetônico por extração líquido-líquido

A partição do extrato bruto acetônico com solventes de polaridades distintas (Esquema 1), foi feita a partir de cerca de 5 g do EBA, que foram reconstituídos em água (50 mL) e divididos com 50 mL de acetato de etila. A fração aquosa residual (FAQ) foi particionada 6 vezes com 50 mL de acetato de etila. As frações foram concentradas, congeladas e liofilizadas, resultando em frações: fração acetato de etila (FAE) e FAQ (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1999). O rendimento do EBA e frações foi calculado pelas expressões: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato} / \text{massa do material vegetal}) \times 100$ e $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa da fração resultante} / \text{massa do extrato}) \times 100$, respectivamente.



Esquema 1: Esquema de extração líquido-líquido

4.4.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A triagem fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada no laboratório do Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos (NUDATEF) na Universidade Federal de Pernambuco, conforme metodologia proposta por Braquehais et al. (2016). Inicialmente, os extratos e frações foram solubilizados em 2 mL de metanol (MeOH) e levados ao aparelho ultrassônico por 5 minutos para completa solubilização. Logo após as amostras foram analisadas em CCD usando Ácido gálico, Catequina, Quercetina e Rutina, Ácido Cafeico e Ácido Clorogênico, β -Sitosterol, Cumarina, Escina, e D-frutose preparados na concentração de 1 mg/mL, como padrão positivo de comparação. As amostras e os padrões foram aplicados manualmente em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 com dimensões de largura e comprimento de 5 cm, a 5 mm da origem e com término de 5 mm

do final da placa cromatográfica para as amostras, enquanto que os padrões foram aplicados com largura de 5 mm e com uma distância entre eles e das bordas das placas de 5 mm. Em seguida, as placas foram eluídas em cubas, previamente saturadas durante 15 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente, com os seguintes sistemas (fase móvel): Acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5), Tolueno/acetato (70:30), Éter etílico/acetato de etila/ácido acético 10% (saturação) (50:50:50), Acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (100:11:11:26), Acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (50:20:10:10), e, após secagem à temperatura ambiente, foram nebulizadas, ou seja, reveladas com os reagentes NEU (Difenilborato de amino – 2 etil), PEG (polietilenoglicol), Vanilina clorídrica, Lieberman-Burchard, KOH (Hidróxido de Potássio), Timol e H₂SO₄ (Ácido Sulfúrico 10%), específicos para cada metabólito, conforme constam dados do ensaio sumarizados na Tabela 5. As placas foram observadas até o aparecimento de manchas características, sob fundo de coloração específica para cada tipo de revelador, indicativo de possível metabólito. Posteriormente, a detecção foi feita por irradiação ultravioleta 254 e 366 nm. Na sequência as placas cromatográficas foram digitalizadas e as bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes. As classes de compostos presentes no extrato acetônico e suas frações, foram classificadas em presente (+) e ausente (-).

Tabela 5: Sistemas, reveladores e padrões utilizados na análise qualitativa do *screening* fitoquímico preliminar das cascas de *Stryphnodendron adstringens*.

Classe de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	90:5:5	NEU + PEG	Ácido gálico
Taninos condensados	90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonoides	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina
Derivados Cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ácido Cafeico e Ácido Clorogênico
Terpenos e Esteroides	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β-Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	Lieberman-Burchard+ Δ	Escina
Açúcares redutores	50:20:10:10	Timol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-frutose

Nota: “Δ” representa aquecimento. Fonte: Produção do autor (2018).

4.5 ENSAIO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

4.5.1 Linhagens e cultivo celular

As linhagens de adenocarcinoma mamário humano, MCF-7 e MDA-MB-435, provenientes do Laboratório de Culturas de Células e Ensaio farmacológicos, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, foram cultivadas (2×10^5 células/mL) em frascos (25 cm²/60 mL) para cultura de tecidos contendo o meio para o cultivo

celular, Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (DMEM, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM e incubadas a 37° C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

4.5.2 Ensaio de viabilidade – MTT

A viabilidade celular e a atividade citotóxica dos extratos e frações de cascas de *S. adstringens* em linhagens de células tumorais de mama foram realizadas pelo teste colorimétrico MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)], após 72 horas de incubação. Este é um ensaio quantitativo in vitro desenvolvido por Mosmann et al. (1983) e posteriormente foi adaptado por Alley; Green; Schuchter (2002), para estimar a proliferação e a sobrevivência celular sendo efetivo para evidenciar a citotoxicidade. O teste baseia-se na análise de enzimas celulares que reduzem o corante tetrazólico (MTT) a sua forma insolúvel, o formazan evidenciado pela cor púrpura e que posteriormente é medido pela absorbância em nm. Inicialmente, as células foram cultivadas na concentração de 10⁵ células/mL, conforme preconizado por Bezerra (2008). O controle positivo utilizado foi o quimioterápico padrão doxorrubicina (Dox). As substâncias (teste e controle) foram previamente dissolvidas em DMSO e em seguida, diluídas em série (100 – 6,25 µg/ mL) em meio RPMI 1640 e transferidas para placas de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e incubadas por mais 3 horas. Após a dissolução do precipitado com DMSO (0,2 µg/mL), foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro de placas a 595 nm e em seguida, mensurados a CL₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 7.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO EBA E SUAS FRAÇÕES DE *Stryphnodendron adstringens*

O EBA e frações obtidas, das cascas de *S. adstringens*, considerando-se as respectivas massas e rendimentos, resultaram nos seguintes dados: EBA (13g; 21,66%); FAE (1,6g; 32%) e FAQ (1,9g; 38%).

A partir da determinação da constituição química das amostras pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), sugere-se a presença de polifenóis (taninos hidrolisáveis), taninos condensados, derivados cinâmicos, saponinas e açúcares redutores para o EBA e FAE (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados da análise qualitativa do *screening* fitoquímico com as cascas de *Stryphnodendron adstringens*.

Classe química	EBA	FAE	FAQ
Polifenóis (taninos hidrolisáveis)	+	+	+
Taninos condensados	-	-	-
Flavonoides	+	+	-
Derivados cinâmicos	-	-	-
Terpenos e Esteroides	-	-	-
Cumarinas	+	+	+
Saponinas	+	+	+
Açúcares redutores			

Nota: “EBA”: Extrato Bruto Acetônico; “FAQ”: Fração aquosa; “FAE”: Fração Acetato de Etila; “+”: Representa uma classe de metabólito presente no extrato ou fração, de acordo com os testes realizados; “-”: Representa uma classe de metabólito ausente no extrato ou fração, de acordo com os testes realizados. Fonte: Produção do autor (2018).

A FAQ apresentou resultado positivo para a presença de polifenóis (taninos hidrolisáveis), saponinas, bem como a presença de açúcares redutores condizentes com os resultados encontrados para o EBA e FAE, exceto para taninos condensados e derivados cinâmicos, cujo resultado foi negativo para esses compostos (Tabela 6).

5.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO EBE: UHPLC-PDA-TOF-MS

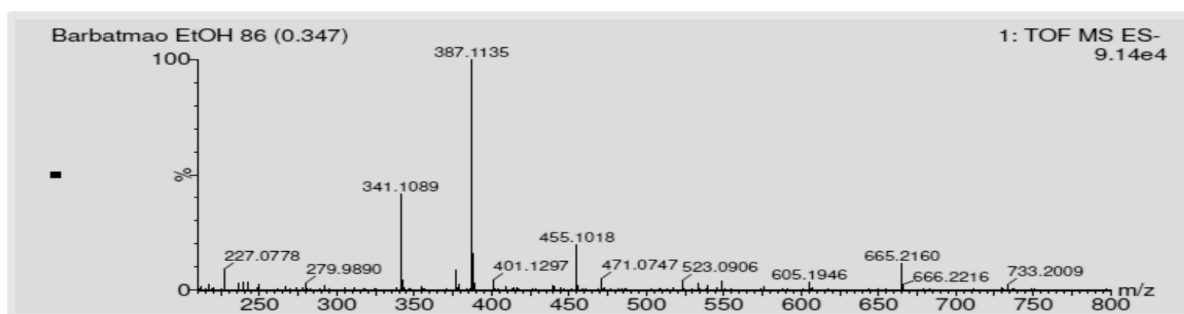
Ao ser realizada a extração do material vegetal obteve-se uma massa total de 10,58 g de EBE, o que corresponde a um rendimento de 12,38%.

A composição química do EBE foi analisada por UHPLC-PDA-TOF-MS, modo negativo. As informações obtidas pelos espectros no UV das análises de LC-ESI-MS/MS, possibilitaram a sugestão de algumas classes de metabólitos presentes no EBE, evidenciando-se a predominância de compostos fenólicos (Tabela 7).

Para os picos cromatográficos que apresentaram o íon de m/z 387 como pico base nos espectros de massas no modo negativo, sugere-se a presença de um dímero de proantocianidina (P1), enquanto que o íon de m/z 377 indica a presença de flavonoide e/ou flavanona (MM: 378 u) (P2). A seguir são apresentados os espectros de massa dos picos mencionados.

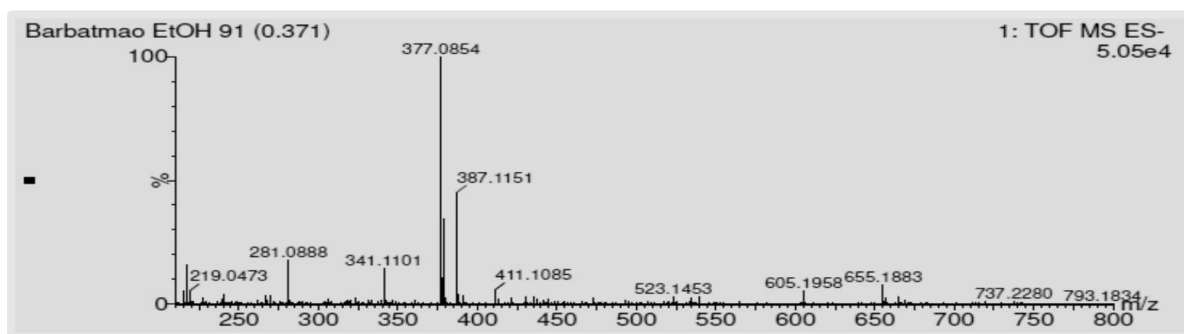
- P1 - Dímero de proantocianidina (MM: 388)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 387.1135



- P2 - Flavonoide e/ou flavanona (MM: 378)

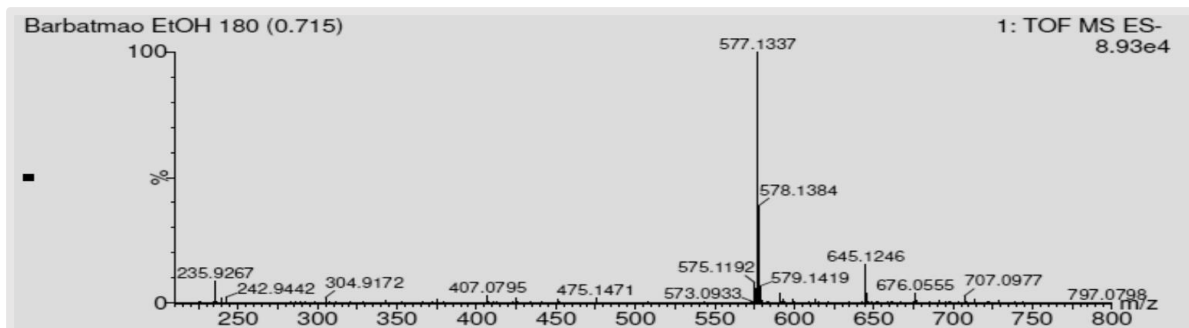
Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 377.0854



Já os picos cromatográficos que apresentaram os íons de m/z 577 como pico base nos espectros de massa, atribui-se a presença de isômeros de catequinas e/ou derivado de epicatequina (P3, P4 e P9), e os íons de m/z 289, indicam a presença de dois isômeros de catequina e/ou epicatequina (P5 e P7); da mesma forma o íon de m/z 435 indica a presença de catequina e/ou epicatequina (P6). Logo abaixo, são mostrados os espectros de massa dos picos das substâncias identificadas:

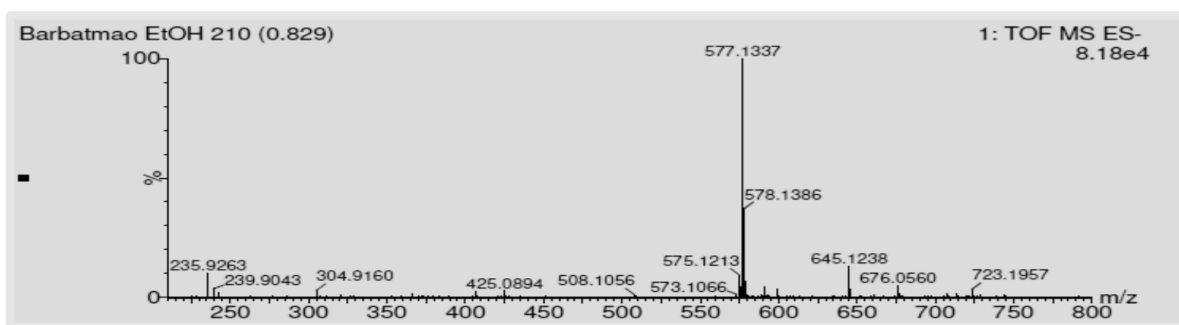
- P3 – Catequina e/ou derivado de epicatequina (MM: 578)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 577.1337



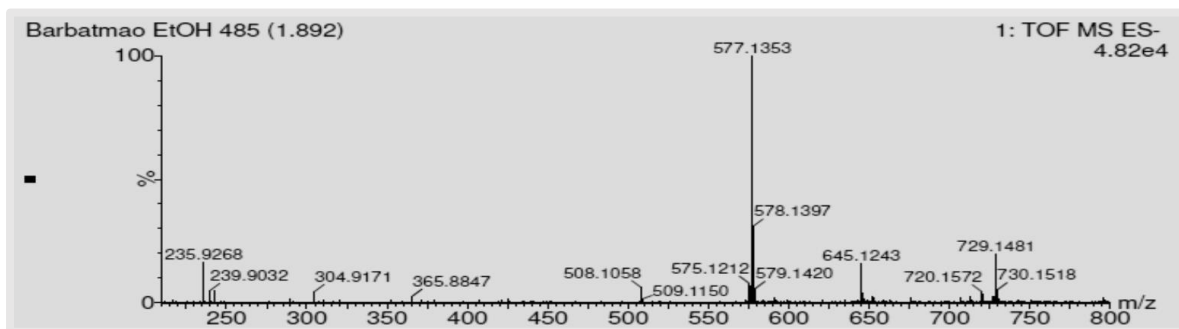
- P4 - Catequina e/ou derivado de epicatequina (MM: 578)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 577.1337



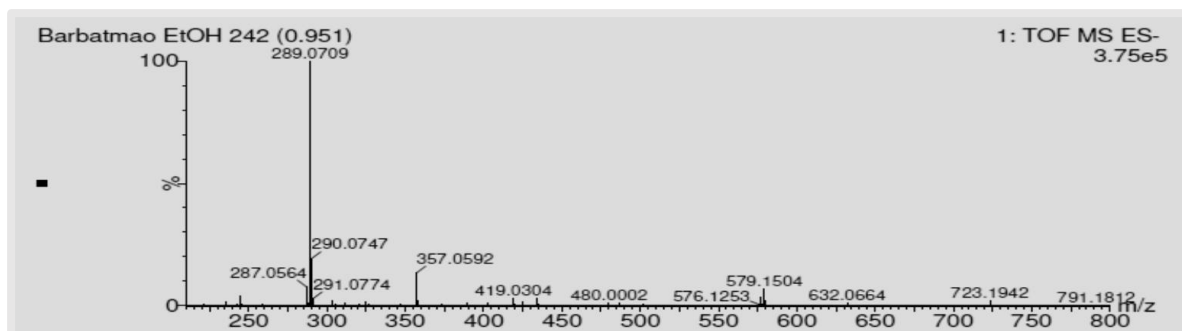
- P9 - Catequina e/ou derivado de epicatequina (MM: 578)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 577.1353



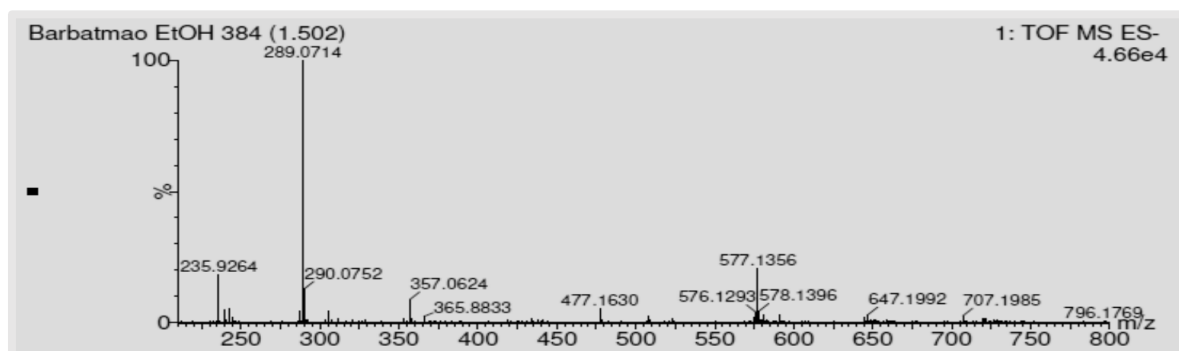
- P5 – Catequina e/ou epicatequina (MM: 290)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 289.0709



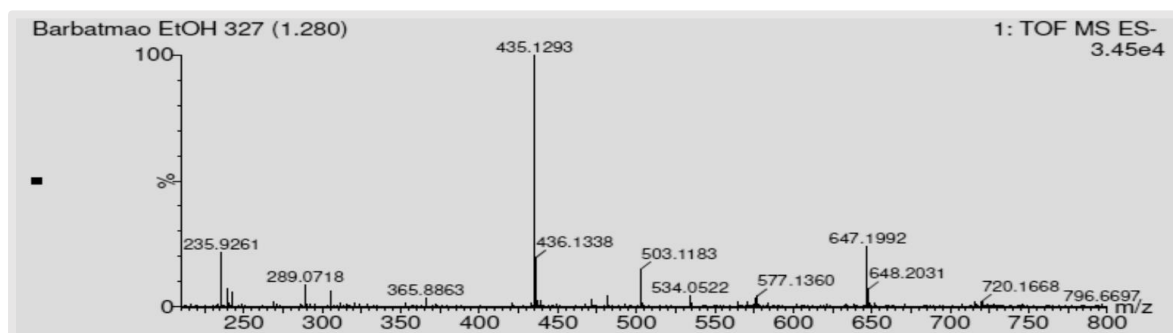
- P7 - Catequina e/ou epicatequina (MM: 290)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 289.0714



- P6 – Catequina e/ou epicatequina (MM: 436)

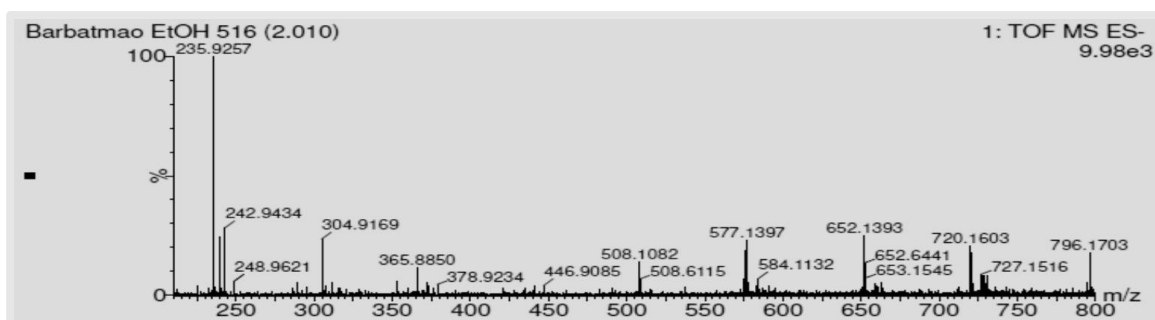
Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 435.1293



Foram identificados ainda dois isômeros para os picos cromatográficos que apresentaram os íons de m/z 235 como pico base nos espectros de massas que seguem abaixo, os quais indicam a presença de diidroxiflavona e/ou isoflavona (P10, P11).

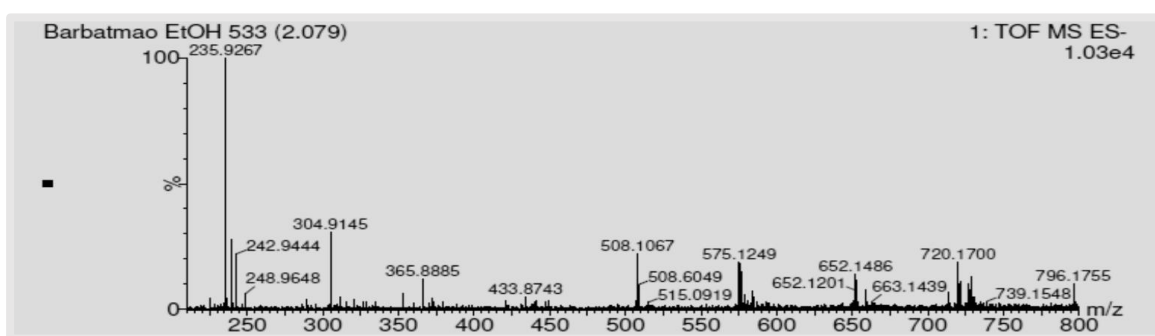
- P10 - Diidroxiflavona e/ou isoflavona (MM: 236)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 235.9257



- P11 - Diidroxiflavona e/ou isoflavona (MM: 236)

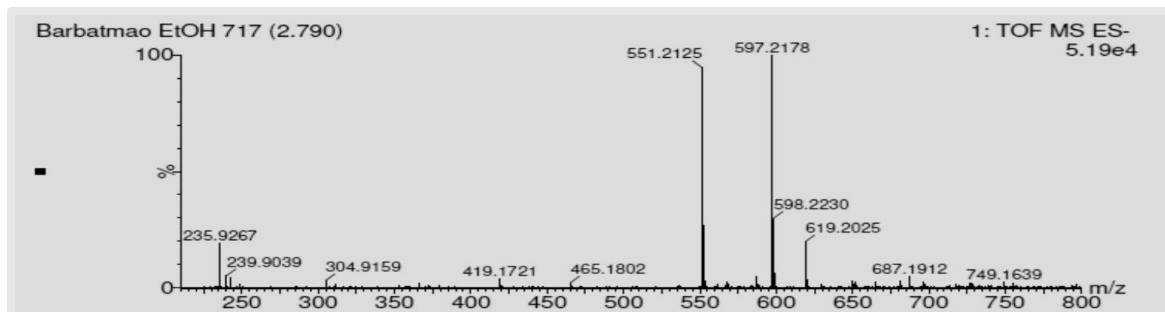
Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 235.9257



Analisando os resultados espectrométricos obtidos através de registros de dados de espectrometria de massas consultados na literatura também foi possível atribuir para a composição química do EBE a presença de 4 ácidos clorogênicos, sendo 2 isômeros do ácido cafeico (P12 e P13), e 1 derivado do ácido cafeoilquínico (P8) e 1 ácido cafeoilglutárico (P14), os quais apresentaram os íons m/z 597, m/z 597, m/z 729 e m/z 371, respectivamente, como pico base nos espectros de massas. A seguir são apresentados os valores de massa dos ácidos clorogênicos identificados e os espectros de massas dos picos identificados.

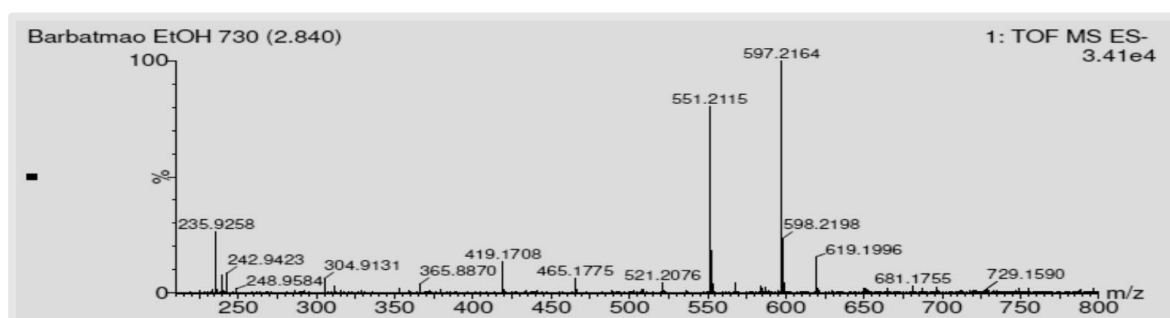
- P12 - Derivado de ácido cafeico (MM: 598)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 597.2178



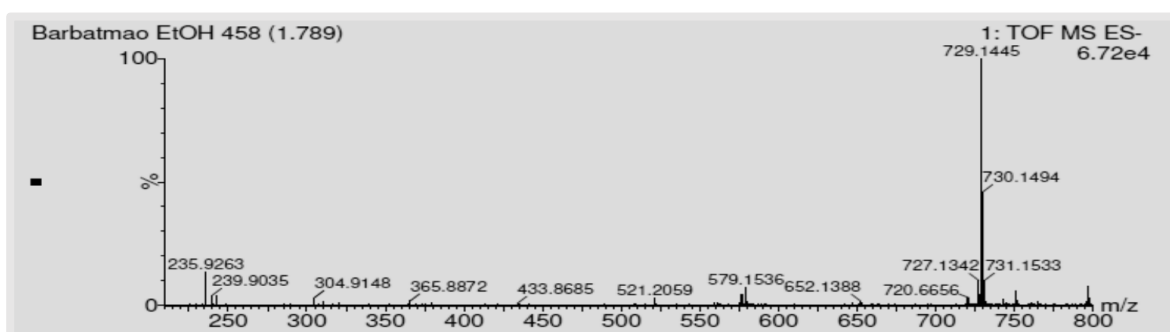
- P13 - Derivado de ácido cafeico (MM: 598)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 597.2164



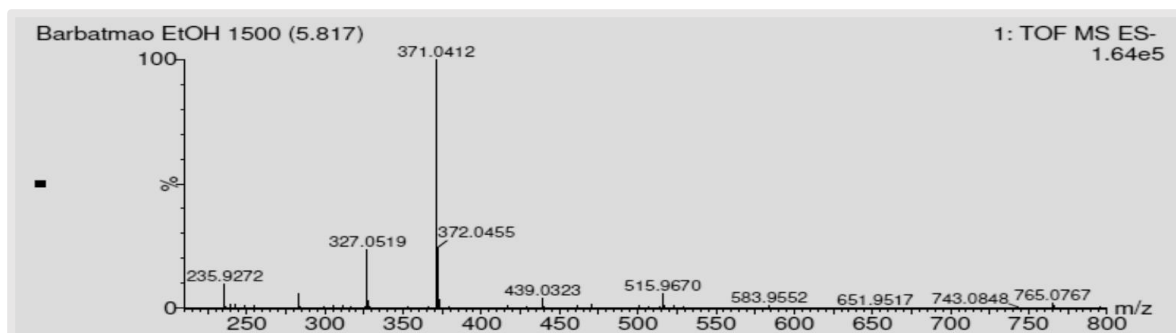
- P8 - Derivado de ácido cafeoilquínico (MM: 730)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 729.1445



- P14 - Ácido cafeoilglutárico (MM: 372)

Detector EM (modo negativo): $[M-H]^-$: 371.0412



Em conclusão aos resultados aqui apresentados da fitoquímica da planta, salientamos que a identificação dos compostos encontrados no EBE analisado foi feita através dos dados de espectrometria de massa obtidos e comparação com dados de fragmentação já publicados na literatura, utilizando os espectros de íons produtos (EPI) no modo de ionização negativa. Desta forma, a Tabela 7 apresenta um resumo dos compostos fenólicos identificados para o EBE, juntamente com as informações características de espectros de ESI⁻, UV e MS/MS destes compostos.

Tabela 7: Resultados da análise química por UHPLC-PDA-TOF-MS do extrato bruto etanólico (EBE) das cascas de *Stryphnodendron adstringens*.

Picos	Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	UV (nm)	[MS/MS]	Composto sugerido
1	0.32	387.1135	273	341.1089, 279.9890, 227.0778	Dímero de proantocianidina
2	0.34	377.0854	275	341.1101, 281.0888, 219.0473	Flavonoide ou flavanona
3	0.63	577.1337	261	573.0933, , 475.1471, 407.0795, 304.9172, 242.9442, 235.9267	Catequina ou derivado de epicatequina
4	0.81	577.1337	279	508.1056, 425.0894, 304.9160, 239.9043, 235.9263	Catequina ou derivado de epicatequina
5	0.90	289.0709	278	287.0564, 289.0709, 576.1253	Catequina ou epicatequina
6	1.23	435.1293	278	235.9261, 289.0718, 365.8863, 435.1293	Catequina, epicatequina
7	1.45	289.0714	277	287.0564, 289.0709, 576.1253	Catequina ou epicatequina
8	1.74	729.1445	277	235.9263, 239.9035, 304.9148, 365.8872, 433.8685, 521.2059, 579.1536, 652.1388, 720.6656, 727.1342	Derivado de ácido cafeoilquínico
9	1.83	577.1353	277	575.1212, 509.1150, 508.1058, 365.8847, 304.9171, 239.9032, 235.9268	Catequina ou derivado de epicatequina
10	2.00	235.9257	276	365.8850, 304.9169, 248.9621, 242.9434	Diidroxiflavona ou isoflavona
11	2.08	235.9257	277	365.8885, 304.9145, 242.9444	Diidroxiflavona ou isoflavona
12	2.73	597.2178	275	551.2125, 465.1802, 419.1721, 304.9159, 239.9039, 235.9267	Derivado de ácido cafeico
13	2.84	597.2164	278	551.2115, 521.2076, 465.1775, 419.1708, 365.8870, 304.9131, 248.9584, 242.942	Derivado de ácido cafeico
14	5.76	371.0412	275	327.0519, 235.9272	Ácido cafeoilglutárico

Fonte: Produção do autor (2018)

5.2.1 Doseamento de fenólicos e testes antioxidantes

Os resultados obtidos na determinação dos fenólicos totais (FT) pelo método Folin–Ciocalteu, expressos como miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) de peso seco da amostra são apresentados na Tabela 8. O valor de FT obtido para o EBE de *S. adstringens* foi de 156,58 mg de ácido gálico por g de extrato.

Tabela 8 – Conteúdo de fenólicos totais (FT), atividade antioxidante (CE₅₀) do extrato bruto etanólico das cascas de *Stryphnodendron adstringens*.

Amostras	FT* (mg de EAG/g do extrato EBE ± D.P)	ABTS* CE ₅₀ ± D.P (µg/mL)	DPPH* CE ₅₀ ± D.P (µg/mL)
<i>S. adstringens</i> (cascas)	156,58±1,87	2,01±0,36	5,88±0,19
Ácido ascórbico	-	-	4,14±0,82
Trolox	-	2,97±0,23	-

Nota: “EBE”: Extrato Bruto Etanólico; EAG = equivalente de ácido gálico; CE₅₀ = concentração eficiente para reduzir a quantidade inicial dos radicais livres em 50%; “*”: os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições (n=3) ± desvio padrão da média (D.P). Aplicou-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Fonte: Produção do autor (2018).

A quantidade de EBE da planta testada necessária para decrescer a concentração inicial de ABTS em 50%, CE₅₀ (Tabela 8), foi de 2,01 ± 0,36 µg/mL, mostrando-se comparável ao controle positivo trolox (CE₅₀ = 2,97 ± 0,23 µg/mL), enquanto que o valor encontrado para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, CE₅₀ (Tabela 8), foi de 5,88 ± 0,19 µg/mL, apresentando o EBE um valor maior que o controle positivo ácido ascórbico (CE₅₀ = 4,14 ± 0,82). O valor de CE₅₀ menor indica uma atividade antioxidante mais elevada, dessa forma, o extrato em questão se mostrou mais eficiente que o padrão trolox em relação ao consumo do radical livre ABTS^{•+}.

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados de atividade antioxidante, aplicando-se ANOVA e teste de Tukey, verificou-se que apresentaram diferenças significativas (P<0,05).

5.2.2 Atividade antifúngica

A linhagem 5840 de *C. krusei* utilizada no presente estudo apresentou formação de halo de inibição com diâmetro semelhante ao observado no controle positivo, miconazol (Tabela 9). No entanto, houve mudança no perfil de suscetibilidade da cepa para a nistatina em comparação ao miconazol, que são antifúngicos comerciais usados frequentemente contra candidíase, sendo a nistatina ineficaz na inibição do crescimento fúngico para ambas as metodologias de difusão em ágar, tanto disco como poço, empregadas neste estudo

Tabela 9 – Comparação entre as médias (mm) $\pm$ desvio padrão (D.P) dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento do fungo *Candida krusei* submetido à exposição do extrato etanólico das cascas de *Stryphnodendron adstringens* *in vitro*, obtidos pela metodologias de disco e poço.

Amostra	Concentrações	Método de difusão em ágar	
		Disco	Poço
Dimetilsulfóxido*	Comercial 2,5%	0,00 $\pm$ 0,00 ^{aA}	0,00 $\pm$ 0,00 ^{aA}
Miconazol*	20mg/g	11,67 $\pm$ 0,58 ^{aB}	15,67 $\pm$ 0,58 ^{bB}
Nistatina*	22,1 mg/mL	0,00 $\pm$ 0,00 ^{aA}	0,00 $\pm$ 0,00 ^{aA}
Barbatimão	25 mg/mL	0,00 $\pm$ 0,00 ^{aA}	11,67 $\pm$ 1,53 ^{bC}
	50mg/mL	0,00 $\pm$ 0,00 ^{aA}	12,67 $\pm$ 0,58 ^{bC}
	100mg/mL	0,00 $\pm$ 0,00 ^{aA}	17,00 $\pm$ 0,00 ^{bB}

Nota: “*” Representa os controles positivos e negativo; Sem atividade antifúngica (HI = 0 mm); Pouca atividade antifúngica (0 mm < HI < 7 mm); Moderada atividade antifúngica (7 mm $\leq$ HI $\leq$ 13 mm); Elevada atividade antifúngica (HI > 13 mm); Letras pequenas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias nas linhas ($p < 0,05$); Letras grandes iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias nas colunas ($p < 0,05$), aplicando-se ANOVA e teste de Tukey. Fonte: Produção do autor (2018).

Dessa forma, os dados apresentados na Tabela 9 permitem inferir que os diâmetros dos halos de inibição (HI) apresentados na cultura de *C. krusei* para as amostras do EBE foram superiores aos encontrados na cultura de *C. krusei* para o fármaco nistatina pelo método de difusão com poços, com um nível de significância entre as médias de 5% ($p < 0,05$), indicando ausência de atividade antifúngica para o fármaco, e portanto, resistência da cepa ao fármaco comercial nistatina.

Nesse mesmo contexto, quando avaliado pela metodologia de disco-difusão, o EBE não foi capaz de provocar inibição do crescimento microbiano, a atividade antifúngica das amostras vegetais com ação similar a antifúngicos convencionais, como o miconazol, mostrando assim seu potencial terapêutico em candidíase, foi observada apenas para o método de difusão em ágar por poço, como pode ser observado na Tabela 9.

Ainda quanto à suscetibilidade da cepa, o EBE demonstrou atividade inibitória em ambas as concentrações testadas, caracterizando dose-dependência, quando utilizado o método de orifício em Ágar, com impregnação de 50 μ L da amostra. A concentração do EBE com halo inibitório significativamente menor ($p < 0,05$) que o controle positivo miconazol (HI igual a 15,67 mm) foi a de 25 mg/mL (HI igual a 11,67 mm), seguida pela concentração de 50 mg/mL (HI igual a 11,67 mm). No entanto, não houve diferença significativamente menor ($p < 0,05$) para a maior concentração do EBE, 100 mg/mL, pois a mesma apresentou 17,00 mm de halo de inibição do crescimento do fungo *C. krusei*, em relação ao halo de inibição apresentado pelo miconazol (HI igual a 15,67 mm), difusão em poço, Tabela 9. Além disso, o EBE não apresentou diferença estatística significativamente menor ($p < 0,05$) na concentração de 25

mg/mL (HI igual a 11,67 mm) equiparado ao halo de inibição apresentado pelo miconazol (HI igual a 11,67 mm) nas metodologias de difusão com poços e discos, respectivamente (Tabela 9).

As análises dos efeitos das três concentrações do EBE entre si, ensaiadas no estudo, mostraram diferença no potencial inibitório sobre *C. krusei*. Contudo, foram constatadas diferenças significativas, menores que 5% ($p < 0,05$), apenas para as amostras nas concentrações de 25 mg/mL e 100 mg/mL, e nas concentrações de 50 mg/mL e 100 mg/mL, simultaneamente. Para o controle negativo, representado pelo dimetilsulfóxido, verificou-se que não ocorreu atividade inibitória, descartando-se possível interferência nas propriedades antimicrobianas do EBE. É possível concluir que os resultados obtidos demonstram que as amostras do EBE das cascas de *S. adstringens* apresentaram ação antimicrobiana sobre o isolado clínico avaliado, e ainda, que não apresentaram potencial inibitório sobre *C. krusei* pelo método de difusão em discos aqui empregado, havendo uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas empregadas, como apresentado na Tabela 9.

5.3 ENSAIO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Procedeu-se a avaliação da citotoxicidade dos extratos e frações empregando-se cinco diferentes concentrações sendo elas de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e calculou-se o IC_{50} . O padrão de comparação utilizado foi a doxorrubicina.

A citotoxicidade do padrão apresentou um valor de IC_{50} de 1,28 $\mu\text{g/mL}$ e 3,44 $\mu\text{g/mL}$ para as duas linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-435, respectivamente, enquanto que os extratos e frações atingiram valores de IC_{50} mais elevados para essas duas linhagens, sendo os extratos EBE (IC_{50} de 11,89 $\mu\text{g/mL}$ e 20,33 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e EBA (IC_{50} de 25,54 $\mu\text{g/mL}$ e 33,17 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), e as frações FAE (IC_{50} de 31,76 $\mu\text{g/mL}$ e 36,23 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e FAQ (IC_{50} de 43,98 $\mu\text{g/mL}$ e 48,02 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Tabela 10).

Tabela 10 – Valor de IC₅₀ para a citotoxicidade dos extratos e frações de cascas de *Stryphnodendron adstringens* frente as linhagens de células tumorais de mama.

Linhagem celular	Drogas IC ₅₀ (µg /mL)				
	EBE	EBA	FAE	FAQ	Dox
MCF-7	11,89	25,54	31,76	43,98	1,28
MDA-MB-435	20,33	33, 17	36,23	48,02	3,44

Nota: “EBE”: Extrato Bruto Etanólico; “EBA”: Extrato Bruto Acetônico; “FAE”: Fração Acetato de Etila; “FAQ”: Fração Aquosa; “Dox”: Doxorrubicina; “IC₅₀”: (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular). Calculou-se intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear. Fonte: Produção do autor (2018).

Dessa forma, observa-se que as amostras dos extratos e as respectivas frações foram mais citotóxica para as células MCF-7 do que para a MDA-MB-435, evidenciada pela menor viabilidade celular da dose citotóxica (IC₅₀).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram realizados dois tipos de estudos: a caracterização fitoquímica da planta *S. adstringens*, verificando a presença de algumas classes de metabólitos secundários em seus extratos e seu fracionamento a fim de se chegar a amostras semipurificadas. A caracterização biológica foi realizada a partir de dois extratos vegetais de *S. adstringens*, advindos de uma mesma parte da planta (cascas), assim como suas respectivas frações (frente linhagens tumorais de mama). Portanto, totalizando 4 amostras (dois extratos e duas frações) a serem caracterizadas quanto as suas atividades antioxidantes, antifúngica e citotóxicas. Em referência ao ensaio citotóxico, é digno de nota que este estudo é o primeiro trabalho até o presente momento no qual é relatado os efeitos da citotoxicidade de extratos e respectivas frações de cascas de barbatimão para as duas linhagens celulares de mama, MCF7 e MDA-MB-435, ensaiadas.

A análise fitoquímica do extrato bruto acetônico EBA e suas respectivas frações acetato de etila e aquosa, FAE/FAQ, e do extrato bruto etanólico EBE permitiu verificar a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: taninos hidrolisáveis e condensados, derivados cinâmicos, saponinas e açúcares redutores, proantocianidinas, flavonoides, flavonas, isoflavonas, catequinas, epicatequinas, derivados de epicatequinas e ácidos fenólicos. Tais classes de metabólitos foram verificadas quanto à sua presença devido a consultas prévias na literatura para estes compostos (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; VASCONCELOS et al., 2004) e no que se refere ao EBE a identificação dos metabólitos foi confirmada a partir de informações obtidas por análise adicional MS/MS com o UHPLC-ESI(-)-sistema TOF MS/MS, e a comparação com os dados na literatura desses compostos (REED, 2009; CALDERÓN et al., 2010; BONTA, 2017; CHEN et al., 2011), dos picos gerados pelas respectivas substâncias que caracterizam o seu perfil cromatográfico. Assim sendo, o conhecimento prévio dos componentes químicos encontrados nos vegetais é importante, pois fornece a relação dos seus principais metabólitos, podendo também auxiliar na identificação e/ou confirmação da presença de determinados grupos químicos tendo como suporte as informações de caracterização estrutural reunidas em estudos anteriores sobre estes compostos na literatura.

O resultado do perfil fitoquímico de extratos das cascas de *S. adstringens* corrobora com os relatos descritos em revisão recente por Lima e colaboradores (2016), os quais afirmam que em extratos aquosos e orgânicos de partes de barbatimão já foram detectados as presenças de

importantes substâncias ativas, tais como: taninos, flavonoides, saponinas, catequinas, terpenos, estilbenos, esteroides e inibidores de proteases (como a tripsina).

Dentre os grupos de metabólitos secundários identificados em extratos das cascas de *S. adstringens*, os taninos condensados são constituídos por monômeros do tipo catequina, conhecidos por flavonoides (PIZZI, 1993), e que segundo Azevêdo et al. (2017) estão presente, basicamente, na casca das árvores, em concordância com os resultados da análise química das cascas em nosso estudo, o qual identificou a predominância de catequinas para o EBE. Desta forma, o perfil fitoquímico de substâncias tânicas de *S. adstringens* está de acordo com o esperado para a espécie, já que conforme nos afirma Lima (2010), somente na casca desta planta estima-se a presença de pelo menos 20% de taninos, sendo portanto o seu componente majoritário, e que por sua vez, são ricos em polímeros de proantocianidinas, substância também identificada neste estudo, que inclui vários flavonóis como prodelfinidinas e prorobinetinidinas (LIMA et al., 2016).

Alguns trabalhos confirmam a presença de proantocianidinas nos extratos das cascas de *S. adstringens*, como o de Lopes et al. (2009), que isolaram e caracterizaram este composto, por meio de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), nessa espécie e em outras duas espécies do mesmo gênero (*S. polyphyllum* e *S. obovatum*). Esta substância ainda foi identificada(isolada) anteriormente para *S. adstringens* em frações de extratos produzidos a partir das folhas desta espécie por Santos (2009).

A identificação de compostos por CCD e CLAE em outros trabalhos incluem as seguintes substâncias químicas para extratos de *S. adstringens*: ácido gálico (NASCIMENTO, 2008; SANTOS et al., 2002), catequina (SOUZA et al., 2007b; NASCIMENTO, 2008; SANTOS et al., 2002), galocatequina (NASCIMENTO, 2008; SANTOS et al., 2002; AUDI et al., 2004), epigalocatequina (NASCIMENTO, 2008; AUDI et al., 2004), proantocianidina B2 (NASCIMENTO, 2008), galato de epigalocatequina (NASCIMENTO, 2008), epicatequina-(4 β →8)-catequina (SANTOS et al., 2002), galocatequina-(4 α →8)-galocatequina (SANTOS et al., 2002), 4'-O-metil-galocatequina (AUDI et al., 2004), 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (AUDI et al., 2004) e quercetina (NASCIMENTO, 2008). Estes dados, mais uma vez, corroboram os resultados obtidos quanto a presença de substâncias da classe dos flavonoides e taninos nas análises realizadas com as amostras de *S. adstringens*.

Na presente análise fitoquímica, o extrato investigado também foi o extrato acetônico das cascas, porém há dois fatores a se considerar: entre diferentes coletas há sempre a possibilidade de mudança na composição (qualitativa e/ou quantitativa) de metabólitos secundários, devido os fatores físico-químicos, como pH do solo, quantidade de nutrientes,

radiação ultravioleta, temperatura, concentração de água no solo, sazonalidade; além de fatores biológicos, como ataque de herbívoros e infecções que podem influenciar nas mudanças neste perfil de metabólitos na planta, em resposta a um algum estresse ambiental ao qual esta foi exposta (GOBBO; LOPES, 2007; PAVARINI et al., 2012b). O extrato bruto acetônico deste trabalho foi obtido a partir de extração turbo, e não etanol, podendo extrair um perfil de substâncias ligeiramente diferente devido à mudança de solventes. Isso faz com que às vezes as classes de substâncias encontradas não sejam as mesmas, conforme ressalta Passarini (2017). Curiosamente, a análise de cromatografia em camada delgada foi negativa para a presença de flavonoides no EBA, bem como em suas respectivas frações (FAE, FAQ), enquanto que a análise por UHPLC-PDA-TOF-MS do EBE identificou vários flavonoides como sendo os constituintes do extrato. Essa diferença se deve provavelmente, segundo Pavarini et al. (2012b), a coletas em localidades diferentes (apesar das duas amostras serem coletadas em região de agreste), e em datas diferentes, fatores que possivelmente alteraram o conteúdo de metabólitos secundários, reduzindo a quantidade de flavonoides no caso da segunda amostra coletada para a produção do EBA, por exemplo.

Ainda em relação a discordância com o achado do presente estudo, quanto a verificação da presença de flavonoides na composição das cascas desta planta, esse fato pode ser resultante provavelmente, além da baixa concentração destes no EBA, a deficiências intrínsecas do método em detectar esta classe de metabólitos. Para o extrato das cascas, já foi descrito o isolamento de flavonoides a partir de extratos etanólicos de *S. adstringens* pelo grupo de Pereira; Andrade e Piló-Veloso (2002), e também através de detecção da presença da classe desses metabólitos (método qualitativo) pela reação na mudança de coloração dos reagentes Shinoda e Hidróxido de sódio, em extratos das cascas, folhas e caule desta espécie (MACEDO et al., 2007), estando ambos os trabalhos citados compatíveis com a análise da composição química realizada neste trabalho, que identificou a presença dessa classe de metabólito por UHPLC-PDA-TOF-MS. Souza (2016) esclarece que a combinação de medição de massa precisa para determinar a composição elementar e a capacidade da cromatografia líquida para separar compostos isoméricos, é uma ferramenta poderosa para a identificação inequívoca da diversidade polifenólica de espécies, destacando dessa forma a superioridade da técnica de LC-ESI-MS/MS em relação a triagem fitoquímica de caráter qualitativo por CCD.

Por fim, a análise fitoquímica de *S. adstringens* revela uma abundância de inúmeros compostos com propriedades farmacológicas, que justificam estudos sobre o uso da planta em diferentes patologias, bem como o seu extensivo uso medicinal por populares. Nesse intuito, é indubitavelmente indiscutível os efeitos farmacológicos potenciais de *S. adstringens* de acordo

com a sua composição química apoiados em registros na literatura. Notadamente através de respaldo bibliográfico, verifica-se que esta é uma espécie amplamente explorada no que diz respeito ao seu potencial bioativo. Ainda assim, poucos pesquisadores avaliaram sua atividade antimicrobiana sobre espécies resistentes (SOARES et al., 2008; ALVES et al., 2016), principalmente micro-organismos resistentes relacionados a doenças fúngicas (SANTOS et al., 2009a; CAVALCANTI et al., 2012), além do que são escassas pesquisas que investiguem os efeitos citotóxicos dessa planta (SOUZA, 2007; SANTOS, 2009), fato que motivou a realização do presente estudo.

Os dados de atividade antioxidante do EBE, permitem verificar que a atividade antirradicalar apresentada pelo extrato ($CE_{50} = 2,01 \mu\text{g/mL}$ e $CE_{50} = 5,88 \mu\text{g/mL}$) e os controles trolox e ácido ascórbico ($CE_{50} = 2,97 \mu\text{g/mL}$ e $CE_{50} = 4,14 \mu\text{g/mL}$) não possui diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Nessa perspectiva, conforme destaca Reynertson e colaboradores (2005), a classificação da atividade antioxidante de extratos está relacionada a resultados inferiores de CE_{50} os quais indicam maior atividade antioxidante do extrato avaliado. Desta forma, seguindo os critérios adotados por estes autores o EBE de *S. adstringens* apresenta ação antioxidante muito alta, tanto em relação ao consumo de radicais livres $ABTS^{++}$ ($CE_{50} = 2,01 \mu\text{g/mL}$), quanto de radicais livres $DPPH^{\bullet}$ ($CE_{50} = 5,88 \mu\text{g/mL}$).

Outros extratos obtidos de espécies de *Stryphnodendron* spp em diferentes estudos demonstraram possuir atividade antioxidante promissora (MACHADO, 2005; LOPES et al., 2005; SANCHES et al., 2005). Contudo, foi encontrado um único relato na literatura reportando atividade antioxidante, e pelo método DPPH, para extratos das cascas da espécie em estudo (SOUZA et al., 2007a), sendo portanto ainda pouco explorada, no que concerne ao potencial antioxidante de suas cascas.

Santos (2009) avaliou o efeito antioxidante de proantocianidinas isoladas de folhas de barbatimão e estas apresentaram atividade antioxidante utilizando o método DPPH, com IC_{50} de $12 \mu\text{g/mL}$, concentração bem superior à do EBE utilizado no presente trabalho, indicando que as cascas, no que diz respeito ao seu potencial antioxidante é mais eficiente que as folhas desta espécie vegetal, provavelmente devido a sua alta concentração de substâncias tânicas em relação as folhas, dentre elas as proantocianadinas (LIMA et al., 2016).

O grupo de Diaz e colaboradores (2012) enfatizam que a presença de compostos fenólicos na constituição de plantas medicinais contribui para sua atividade antioxidante, dessa forma o elevado efeito antioxidante observado para o EBE das cascas de *S. adstringens*, pode ser atribuído a presença de compostos fenólicos, dada a ampla variedade desses metabólitos em

sua constituição, principalmente à presença de taninos condensados, devido a sua maior ocorrência no EBE, constata pela presença de catequinas, epicatequinas e proantocianidinas, flavonoides com capacidade de formar taninos condensados (SHAD et al., 2012). Sendo assim, verifica-se que estes metabólitos secundários são potentes agentes antioxidantes, pois possuem a capacidade de atuar como sequestradores de radicais livres (GIOXARI et al., 2016), o que pode contribuir para a prevenção de afecções que estejam associadas ao estresse oxidativo.

Feng e colaboradores (2015) através de ensaios in vitro e in vivo, avaliaram a atividade antioxidante do extrato etanólico, rico em flavonoides, de *Morus nigra*. Os resultados do ensaio in vitro mostrou que ocorreu um aumento dose-dependente de flavonoides extraídos desta planta, em relação a taxa de depuração dos radicais hidroxílicos e da taxa de depuração do ânion radical superóxido. O ensaio in vivo, indicou diminuição no conteúdo de malonaldeído (MDA), produto tóxico proveniente do processo de peroxidação lipídica, e um aumento de atividade das enzimas antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-PX). As pesquisas acima apresentadas sugerem que a ingestão adequada de alimentos que contem compostos vegetais com efeito antioxidante pode resultar em benefícios quanto a diminuição do risco de certas enfermidades associadas a eventos mediados pela ação de radicais livres.

De acordo com Paiva e colaboradores (2002), os taninos possuem um forte potencial antioxidante, detendo a capacidade de atuar no processo de estabilização de radicais livres. Nessa mesma abordagem autores afirmam que estes metabólitos previnem a peroxidação de lipídios e degradação de nucleotídeos (LOPES; SCHUMAN; HERMES-LIMA, 1999; PIETTA, 2000), sugerindo desta forma que estes compostos, que de acordo com a triagem fitoquímica estão presentes no extrato de *S. adstringens*, sejam os grandes responsáveis pelas atividades antioxidantes apresentadas pelo extrato etanólico EBE. Corroborando a essa assertiva, em outro estudo realizado por Monteiro; Albuquerque e Araújo (2005), demonstrou-se que vários taninos presentes no barbatimão atuam como captadores de radicais livres, sequestrando oxigênio ativo, formando radicais estáveis, prevenindo assim o câncer. Nesse sentido, os resultados de atividade antioxidante de extratos das cascas de *S. adstringens* obtidos pelo grupo de Souza e colaboradores (2007a) demonstraram que, a cromatografia revelada com DPPH revelou atividade antioxidante na região onde foram identificadas as manchas referentes aos derivados de taninos.

Calderón et al. (2009), avaliaram amostras de extratos de cacau antes e após o tratamento com espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, e radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O uso de peróxido de hidrogênio e o tratamento com o radical DPPH[•]

para investigação de antioxidantes em cacau em pó pelas técnicas LC-MS e LC-MS-MS, indicaram que os principais constituintes antioxidantes são compostos fenólicos incluindo flavon-3-ol (catequina e epicatequina), procianidinas diméricas (procianidina B1, procianidina B2; 3T-O- β -D- galactopiranosil-epicatequina-(2 α $\rightarrow$ 7,4 α $\rightarrow$ 8)-epicatequina), e proantocianidinas triméricas (procianidina C1). O mecanismo de ação antioxidante das proantocianidinas inclui a atividade sequestrante de radicais livres e a inibição enzimática (COS et al., 2004). À vista disso, observa-se que vários desses compostos também foram detectados no EBE em nosso estudo, com destaque para as catequinas, epicatequinas e proantocianidinas. De acordo com o estudo citado, catequinas e epicatequinas foram os antioxidantes mais abundantes, seguidos pelos seus dímeros e trímeros, desta maneira, a presença de tais compostos no EBE sugerem que são capazes de prevenir efeitos deletérios a biomoléculas, como enzimas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos, impedindo o dano oxidativo induzido pelas formas reativas do metabolismo do oxigênio, e consequentemente o surgimento de patologias ligadas ao estresse oxidativo, tais como doenças cardiovasculares e o câncer.

A expressiva atividade antioxidante encontrada para o EBE avaliado, também pode ser atribuída a presença de ácidos fenólicos identificados no extrato. Em estudo de atividade antioxidante, Villaño (2005) demonstrou que ácidos fenólicos presentes em vinhos apresentaram elevada atividade antioxidante, com valores similares aos padrões fenólicos ácido gálico, ácido caféico, epicatequina e procianidina B2, demonstrando dessa forma que os ácidos fenólicos presentes nos vinhos eram comparáveis a padrões de ácidos fenólicos puros.

Em outro estudo, desenvolvido por Sitarek et al. (2016), foi demonstrado que os extratos hidroalcóolicos (80% V/V H₂O/ MeOH), das partes áreas e raízes de *Leonurus sibiricus* possuem ação protetora sobre células de ovário de hamster chinês contra o dano oxidativo induzido ao DNA por H₂O₂. Os autores associaram este efeito a presença de ácidos fenólicos e flavonoides identificados nos extratos da espécie vegetal ensaiada. Além disso, a pré-incubação das células com 0,5 mg / mL de extratos da planta mostrou aumento no nível de expressão de genes antioxidantes (SOD2, CAT e GPx), que regulam a atividade antioxidante intracelular. Estes resultados sugerem que os fenólicos, flavonoides e principalmente os taninos condensados identificados em EBE de *S. adstrigens* eram os responsáveis pela atividade sequestradora de radicais livres verificada neste estudo.

Em relação a quantificação de fenólicos totais (FT) das cascas de *S. adstrigens*, o EBE avaliado apresentou alto teor de compostos fenólicos (156,58 mg EAG/g), quando comparado a dados de outras espécies descritos na literatura (SOUSA et al., 2007; SOUZA, 2012). Em estudo de Santos e colaboradores (2002), o teor de fenóis totais em extrato acetônico seco de

cascas de *S. adstringens* correspondeu a 158,7 mg EAG/g, estando em concordância com o valor encontrado em nosso estudo para o EBE. De acordo com o relatado no estudo desenvolvido por Saha e Verma (2015), quanto maiores os teores de compostos fenólicos, maior será o potencial antioxidante. Nesse sentido, estudos realizados por outros autores determinaram os coeficientes de correlação entre o conteúdo de fenóis totais e a capacidade antioxidante de extratos, constando uma correlação positiva entre os fenóis totais e a concentração eficiente de extratos ricos em substâncias fenólicas (BRAGA et al., 2014; CASTRO et al., 2014; FERNANDES et al., 2014; MORENO et al., 2014; SEO et al., 2014; THAKUR; ARYA, 2014).

Nessa mesma perspectiva, no estudo desenvolvido por Souza e colaboradores (2007b), ao avaliar-se a capacidade sequestrante de radical livre dos extratos das cascas de *S. adstringens*, aplicando método DPPH, observou-se que o extrato clorofórmico, que mostrou ter o menor teor de fenóis totais, apresentou menor capacidade sequestrante, mas que os extratos polares, que mostraram ter elevado teor de fenóis totais, apresentaram também elevada capacidade antioxidante.

Adicionalmente, em estudo conduzido por Santos-Filho; Ferreira e Gouvêa (2011), os autores relataram que o potencial antioxidante apresentado por extratos de folhas de *S. adstringens* in vitro, protegendo células de genotoxicidade induzida por ciclofosfamida em células da medula óssea de ratos in vitro, estava relacionado ao elevado teor de compostos fenólicos, flavonoides e proantocianidinas destes extratos. Da mesma maneira, os compostos anteriormente citados e o alto teor de compostos fenólicos, também foi verificado neste estudo para o extrato EBE das cascas desta espécie, sinalizando que a atividade antioxidante registrada neste trabalho pode estar correlacionada a presença de tais compostos, bem como ao alto conteúdo de fenólicos totais do respectivo extrato. Em concordância a discussão que ora se apresenta, em estudo de Souza (2016), demonstrou-se que as frações de extratos que continham níveis mais elevados de compostos fenólicos, apresentaram menor valor de CE₅₀ indicando uma maior atividade antioxidante.

Similarmente, em estudo realizado por Sousa e colaboradores (2007), observou-se uma correlação positiva entre os fenóis totais e a CE₅₀ dos extratos de *Terminalia brasiliensis* (casca e folha), *Cenostigma macrophyllum* (folha) e *Copernicia prunifera* (raiz). Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos envolvendo o estresse oxidativo, os resultados descritos e discutidos neste trabalho estimulam a continuidade do estudo para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas da espécie *S. adstringens* in vivo, visto que autores chamam a atenção a

respeito de limitações conceituais relacionadas aos métodos *in vitro* no que se refere ao êxito da correlação *in vitro in vivo*, como por exemplo: alvos molecular e químico, concentração dos antioxidantes utilizados nos ensaios e o tempo de reação (HENRIGUES; DANIELLI; APEL, 2016).

Em respeito à atividade antifúngica verificada no presente trabalho, dados na literatura reportam que plantas contendo a presença de saponinas (MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017), taninos (CALLOU et al., 2012), fenóis e flavonoides (ALMEIDA et al., 2014), flavanonas (PINHO et al., 2012), bem como compostos fenólicos (FALCÃO et al., 2002), podem conferir atividade antimicrobiana a um extrato, o que nos leva à justificativa desta ação antifúngica do extrato etanólico das cascas de *S. adstringens* contra a linhagem 5840 do fungo *C. krusei*, pela presença de classes de metabólitos secundários apresentadas. Dessa forma, a emergência disseminada de cepas microbianas, sejam bacterianas ou fúngicas, resistentes aos antimicrobianos constitui um grave problema de saúde pública mundial. Visto que, o uso indiscriminado destes fármacos tem selecionado populações de micro-organismos resistentes, as plantas de utilização popular constituem uma excelente alternativa para o controle destes micro-organismos.

Os dados aqui observados para avaliação do efeito antifúngico do EBE das cascas de *S. adstringens* pela técnica de perfuração em ágar são considerados importantes, pois assim como assinalam Oliveira et al. (2011), extratos vegetais que apresentam halos de inibição do crescimento microbiano entre 7 e 13 mm, e maiores que 13 mm são considerados extratos promissores com moderada e elevada atividade antifúngica, respectivamente.

Trabalho semelhante ao nosso foi realizado por Cavalcanti e colaboradores (2011). Tais autores registraram inibição do crescimento de cepa de *C. albicans* pela tintura a 20% das cascas de *S. adstringens*. A utilização da metodologia de disco-difusão no estudo citado demonstrou a manutenção da atividade antifúngica sobre espécies do gênero *Candida*, reforçando a atividade biológica dessa planta já comprovada por inúmeros autores, anteriormente citados. Entretanto, no mesmo estudo é relatado que a tintura analisada não provocou inibição do crescimento fúngico sobre *C. krusei*, corroborando com os nossos achados.

Orlando (2005) observou pela metodologia de difusão em discos que o extrato hidroalcoólico da espécie vegetal em questão, nas concentrações de 100mg/mL, 200mg/mL e 300mg/mL possui atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *C. krusei*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kocuria rhizophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexneri*. Em contraste, este estudo não evidenciou formação de halo inibitório para *C. krusei* para a mesma metodologia

provavelmente, isto se deve a variação de método extrativo, distinto do empregado neste trabalho, influenciando nos teores de metabólitos secundários ou a utilização de diluições menores. Nesse contexto, conforme Busato et al. (2014) a composição química de uma planta pode apresentar notável variação dependendo do método de extração empregado, o que pode ser entendido considerando a diferença de arraste por solventes de polaridades distintas em conformidade com a polaridade de cada composto secundário.

Outras variáveis, no entanto, devem ser consideradas para explicar a discrepância encontrada entre resultados de cunho antimicrobiano envolvendo amostras vegetais. Além da composição química, variações nos efeitos biológicos de extratos podem estar relacionadas a outros fatores, tais como origem, condições ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta quando da coleta (GOUVEA et al., 2016); o período de incubação do micro-organismo ensaiado à exposição da substância teste, dada a não padronização desta variante entre os pesquisadores, pode influenciar em relação a variação do tamanho do halo de inibição, conforme verifica-se em estudo conduzido por Oliveira e Lima (2017), que de acordo com a progressão do tempo em exposição, nota-se aumento na média de crescimento das colônias dos fungos. De acordo com Morio et al. (2010), a variabilidade genética entre isolados da mesma espécie também tem sido apontada como um dos fatores determinantes para a suscetibilidade do isolado em ensaios. Em conclusão, Miranda e seu grupo (2013) destacam diversos fatores que ainda podem dificultar a difusão do composto através do meio, como a composição deste, densidade do inóculo, enzimas microbianas e peso molecular.

Em referência a ausência de inibição de crescimento microbiano constada para o EBE quando avaliado o seu potencial antimicrobiano pela metodologia de difusão em discos, autores recomendam que o método de difusão em poços é o mais indicado para avaliar a difusão de substâncias presentes em extratos etanólicos de plantas, além de apresentar eficiência para substâncias solúveis a água, facilitando a difusão destas pelo meio de cultura (VANDEN; VLIETINCK, 1991; MIRANDA et al., 2013). E outros apontam sobre as desvantagens na relação papel filtro e natureza da substância vegetal quanto a superioridade da variante técnica de poço difusão em relação à técnica disco difusão, esclarecendo que em função da composição dos discos, basicamente celulose ligado a glicose monomérico, grupos hidroxílicos livres presentes em cada resíduo de glicose, podem adsorver substâncias de natureza catiônica da amostra na superfície do disco, dificultando a sua difusibilidade no meio (BURGESS et al., 1999). Silveira et al. (2009) acrescentam que o método de difusão com poços apresenta uma melhor difusão no ágar das substâncias em teste, devido a difusão radial destas propiciada pela técnica.

Adicionalmente, outra particularidade foi notada para a técnica de discos em nosso estudo. Durante a execução dos ensaios, os discos são depositados sobre o ágar em placas de Petri e o extrato adicionado ao disco logo em seguida, mantendo-se as placas em estufa para incubação. No entanto, após o período de incubação das placas, foi percebido que vestígios da massa do extrato ficam retidos nos discos de papel, havendo uma perda do volume inicialmente dispensado no disco, o que também pode superestimar a concentração utilizada no experimento. Quanto às duas técnicas avaliadas, Maia-Araújo e colaboradores (2011) discorrem que em termos operacionais a técnica de difusão em poço apresenta maior garantia da concentração de extrato utilizada, por possibilitar que a quantidade de amostra que interage com o micro-organismo durante o teste de sensibilidade seja igual ao volume pipetado em cada poço inicialmente nas condições metodológicas testadas.

Assim, os fatores supracitados podem auxiliar na justificativa da variação de halos inibitórios observada para os dois métodos aplicados neste trabalho. Ainda, corroborando à afirmativa levantada por autores referenciados, é possível notar que o antifúngico comercial miconazol mostrou-se mais efetivo no método de poço difusão que o método de disco difusão, HI igual a 15,67 mm e HI igual a 11,67 mm, respectivamente, com uma diferença estatística significativamente menor que 5% ($p < 0,05$), sugerindo que a técnica de difusão em poços apresenta melhor difusão e portanto, maior confiabilidade nos resultados apresentados neste estudo.

Nesta perspectiva, o estudo de Guimarães et al. (2017) também demonstrou variação no perfil de suscetibilidade para uma mesma cepa, empregando essas duas metodologias. O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) demonstrou atividade inibitória sobre ambas as cepas testadas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, quando utilizado o método de orifício em Ágar, mas não pelo método de difusão em disco, quando avaliadas as culturas de *S. aureus*. Outro trabalho realizado por Vital e colaboradores (2004), avaliaram que tanto a técnica de difusão em disco como a de difusão em poços usando cilindros inoxidáveis são confiáveis para avaliação antimicrobiana de diferentes fármacos e que a técnica de difusão em disco pode substituir a de poços nas análises microbiológicas.

Dessa maneira, as divergências apresentadas entre os resultados observados em estudos já existentes com os obtidos neste trabalho demonstram a complexidade de comparação com pesquisas anteriores, pois, mesmo utilizando-se de metodologias semelhantes, a sensibilidade de estirpes distintas de determinado micro-organismo pode ser diferente para um mesmo produto antimicrobiano vegetal. A ausência de valores pré-determinados para a positividade ou

negatividade também dificulta relacionar os resultados obtidos com os estudos relatados na literatura.

Por fim, diante da discussão acima levantada, é importante ressaltar que a técnica de disco-difusão é uma técnica preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards– NCCLS e está normatizada como parâmetro de análise antimicrobiana na Farmacopéia Brasileira (MAIA-ARAÚJO et al., 2011). Entretanto, considerando a avaliação realizada neste estudo, pode-se sugerir que dentre as duas técnicas utilizadas, com uma diferença estatística significativa menor que 5% ($p < 0,05$), a de difusão em poços pode ser considerada de maior confiabilidade e potencial de reprodutibilidade de resultados.

A ação antifúngica in vitro observada para o EBE das cascas de *S. adstringens*, sugere que a atividade encontrada pode estar associada a presença de determinados metabólitos secundários como é o caso das saponinas, terpenos, alcaloides, cumarinas, catequinas, flavonoides e taninos, compostos registrados na literatura com efeitos antimicrobianos (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012). E que no presente trabalho, foram encontrados vários desses compostos para o EBE, como derivados fenólicos acima descritos, especificamente os taninos, composto majoritário das cascas desta espécie, componentes que apresentam propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (SILVA et al., 2010), evidenciando uma possível interação entre os metabólitos secundários e a inibição do crescimento fúngico.

Há um interesse crescente no uso de taninos como agentes antimicrobianos. A atividade de taninos contra micro-organismos patogênicos pode ser medida por sua ação sobre as membranas, já que estes podem atravessar a parede celular, composto por vários polissacáridos e proteínas, e se ligarem à sua superfície (VASCONCELOS et al., 2006). Em DJIPA; DELMEE e QUENTIN-LECLERCQ (2000) observamos que a atividade antimicrobiana verificada para *Syzygium cumini* estava relacionada com a sua alta quantidade de taninos, já que a eliminação destes suprimiu esta propriedade. Visto que os taninos são tóxicos para fungos e bactérias, conforme ressalta Scalbert (1991), devido as suas propriedades em inibir a ação de enzimas extracelulares e a fosforilação oxidativa, além de mecanismos que envolvem a privação de substrato e de ferro, que são necessários à sobrevivência destes micro-organismos, esse autor atribuiu a ação antimicrobiana do barbatimão verificada em seu estudo também aos taninos que o compõem. Por outro lado, a ação antimicrobiana de *S. adstringens* também pode estar associada a outros compostos já conhecidos, presentes na planta.

Em outro estudo, Luiz e colaboradores (2015), observaram in vitro que as frações ricas em polímeros de proantocianidinas de *S. adstringens*, compostos também identificados para o

extrato da espécie neste estudo, inibiram com sucesso o crescimento de *C. albicans* e o desenvolvimento de biofilmes. Da mesma forma, em estudo conduzido por Ishida e colaboradores (2006), foi demonstrado que o barbatimão interferiu no crescimento e fatores de virulência de *C. albicans*. Os autores sugeriram que a ação antifúngica do barbatimão foi promovida pela subfração F2 (fração rica em proantocianidina).

Nessa incursão, devido à alta manifestação e a gravidade das infecções fúngicas, tem se buscado novas drogas, dada a condição, de que muitas vezes estas, são administradas baseadas no empirismo, promovendo o aumento da resistência fúngica principalmente à fármacos azólicos (Miconazol e Fluconazol, por exemplo) que são alguns dos antifúngicos mais utilizados no controle de leveduras patogênicas (SANTOS et al., 2009b; GABARDI et al., 2016; MOREIRA et al., 2017). Fato este constatado em recente estudo conduzido pelo grupo de Moreira e colaboradores (2017), onde os resultados do perfil de resistência dos isolados das amostras de *Candida* spp, frente aos antifúngicos testados como o Miconazol (66,67%), Fluconazol (88,89%) e Nistatina (55,56%), foram os mais altos. Entretanto, os resultados de sensibilidade frente aos demais antifúngicos testados no estudo também demonstraram um alto índice em algumas amostras, reforçando dessa forma, o alerta na atualidade para a ineficácia de fármacos convencionais em consequência da resistência microbiana crescente.

No tocante a resistência da cepa *C. krusei* apresentada para o antifúngico nistatina, outros pesquisadores têm relatado uma menor eficiência terapêutica para este fármaco. Um estudo realizado em 15 hospitais terciários da Coreia demonstrou que cinco isolados de espécies de *Candida* foram resistentes, e outros sete isolados demonstraram uma resistência intermediária à nistatina (JUNG et al, 2012), consolidando as tendências no desenvolvimento da descoberta de drogas anticandidas em todo o mundo. Da mesma forma, no estudo conduzido por Ferrazza e colaboradores (2005) com 227 mulheres em duas localidades no sul do Brasil para avaliar a distribuição de espécies de leveduras isoladas da vagina e o perfil de susceptibilidade in vitro das mesmas aos antifúngicos habituais, encontrou-se uma maior tendência de resistência à nistatina, sendo que praticamente metade das cepas apresentaram susceptibilidade dose-dependente (intermediária) a este antifúngico.

Desse modo, evidenciou-se que a partir do desenvolvimento da presente pesquisa pode-se obter resultados bastante satisfatórios em relação à atividade antimicrobiana de extratos vegetais, e que as substâncias naturais são uma alternativa viável para solucionar a grande emergência de cepas fúngicas resistentes aos fármacos sintéticos, podendo assim ser utilizadas como matéria prima para síntese de novos antifúngicos.

Neste estudo foi avaliada a atividade citotóxica de amostras de extratos e frações de cascas de *S. adstringens* em linhagens de células de carcinoma mamário humano. Os resultados da exposição celular in vitro após 72 horas, demonstraram que o tratamento com os extratos e suas frações de cascas de *S. adstringens* resultou em efeitos citotóxicos em ambas as linhagens ensaiadas, sendo que as células MCF-7 foram mais sensíveis que a MDA-MB-435, uma vez que a IC₅₀ foi menor para as primeiras células e este efeito variou conforme a amostra em teste, sugerindo resistência da linhagem MDA-MB-435 as respectivas amostras (Tabela 10). Nesse contexto, as células de tumor mamário humano em cultura, MCF-7 e MDA-MB-435, são células geneticamente distintas e que apresentam potencial proliferativo diferentes (SANTOS, 2009), o que poderia resultar na resposta diferencial ao tratamento com as diferentes amostras de barbatimão em estudo.

Em comparação ao potencial citotóxico das amostras de *S. adstringens* em teste, a linhagem MCF-7 demonstrou ser bastante sensível ao EBE, sendo observado uma IC₅₀ baixa o que potencializa a ação citotóxica deste extrato para estas células (Tabela 10).

Os extratos EBE e EBA de *S. adstringens*, apresentaram IC₅₀ inferior para ambas as linhagens celulares, MCF-7 (IC₅₀ de 11,89 e 25,54 µg/mL, respectivamente) e MDA-MB-435 (IC₅₀ de 20,33 e 33,17 µg/mL, respectivamente) se comparados as frações, FAE e FAQ, com IC₅₀ de 36,23 e 48,02 µg/mL para a linhagem MCF-7, respectivamente e IC₅₀ de 31,76 e 43,98 µg/mL para a linhagem MDA-MB-435, respectivamente, sendo assim os extratos se mostraram mais efetivos que as frações neste estudo.

De acordo com os critérios estabelecidos pelo Instituto Nacional Americano de Câncer (INAC), a citotoxicidade de extratos brutos em ensaios preliminares deve apresentar o limite máximo de IC₅₀ de 30 µg/mL para ser considerado promissor para purificação e emprego como antineoplásico (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990; ITHARATA et al., 2004; ALZEER et al., 2014). Desta forma, os extratos EBE e EBA de *S. adstringens* apresentaram citotoxicidade muito interessante e promissora, pois a IC₅₀ encontrada para ambos os extratos para a linhagem MCF-7 (IC₅₀ de 11,89 e 25,54 µg/mL, respectivamente) e linhagem MDA-MB-435 (IC₅₀ de 20,33 e 33,17 µg/mL, respectivamente) esteve próximo ao estabelecido para o emprego como antineoplásico.

Neste trabalho foi demonstrado que o EBE de cascas de barbatimão é composto principalmente por catequinas e epicatequinas, e proantocianidinas, flavonoides, flavanonas, diidroxiflavonas, isoflavonas e ácidos fenólicos em menor proporção. Enquanto que a análise fitoquímica por CCD indicou a presença de polifenóis (taninos hidrolisáveis), taninos condensados, derivados cinâmicos, saponinas e açúcares redutores para o EBA e FAE, e

polifenóis (taninos hidrolisáveis) saponinas e açúcares redutores para a FAQ. Assim, os resultados obtidos neste estudo podem ser atribuídos à composição das respectivas amostras. Diversos dos compostos anteriormente mencionados apresentam vários efeitos biológicos e alvos moleculares *in vitro* e *in vivo*, que podem potencialmente ser úteis na prevenção e tratamento de câncer de vários órgãos (RAMLJAK, 2005; HSIEH; WU, 2008; CERELLA et al., 2013).

Dentro desse contexto, inúmeras pesquisas têm demonstrado que as células de carcinoma mamário humano são seletivamente susceptíveis aos efeitos citotóxicos de compostos fenólicos, como no estudo conduzido por Zhang et al. (2008), onde taninos condensados isolados da espécie vegetal *Acacia catechu* (cacau) inibiram o crescimento de células MCF-7, em baixa concentração, por inibição da biossíntese de lipídeos. Além disso, proantocianidinas de extratos de uva foram também citotóxicas para outras linhagens de células de tumor mamário, tais como 4T1 e MDA-MB-468, induzindo diminuição da proliferação e viabilidade celular, bem como induziu apoptose das células 4T1 (MANTENA; BALIGA; KATIYAR, 2006). Em outro estudo, Farabegoli e colaboradores (2007) demonstraram que os flavonoides epicatequina galato e epigallocatequina galato, apresentaram atividade antitumoral através de ação moduladora sobre o ciclo celular, além de potencializarem o efeito de quimioterápicos.

Vários outros flavonoides têm se mostrado importantes aliados na prevenção de determinado tipos de câncer. A genisteína e a daizeína, isoflavonas presentes em soja e seus derivados, tem sido relacionada a uma menor incidência de cânceres de cólon, mama e próstata, em populações com ingestão de soja e seus derivados, quando comparada a populações que não fazem consumo desses alimentos (LIU et al., 2007). Leite (2008), argumenta que as isoflavonas, substâncias identificadas no EBE neste trabalho, atuam similarmente ao principal hormônio feminino, o estradiol, devido a estrutura química desses compostos bioativos e não nutricionais, encaixando-se nos receptores de estrógeno. Dessa maneira, podem imitar os estrógenos, propriedade a qual é atribuída seus benefícios à saúde e na reposição hormonal.

Outro estudo também evidenciou a ação anticancerígena de flavonoides *in vitro*, em células de carcinoma hepatocelular humano SMMC-7721 e em tumores H22 murinos transplantados *in vivo*. O ensaio de MTT conduzido por Yang e colaboradores (2013) revelou que o óleo essencial e os flavonoides, denominados EEOF e FOF, isolados de *Oxytropis falcata* inibiram a proliferação de células SMMC-7721 de forma dependente da dose. O valor de IC₅₀ de EEOF e FOF foi de 0,115 e 0,097 mg • mL⁻¹, simultaneamente. Ocorrendo interrupção do ciclo celular na fase G1 e morte celular por indução de apoptose após a exposição das células

SMMC-7721 ao flavonoide FOF. A inibição do crescimento em ratos transplantados com tumores sólidos H22 foi significativamente pronunciada após o tratamento com FOF e a taxa de inibição foi de 56,1% e 70,8% na concentração de 30 e 60 mg kg⁻¹.

Em estudo, Sabino (2010), demonstra o efeito citotóxico de fração aquosa obtida do extrato acetônico das folhas de *S. adstringens* e verificou que a mesma continha os seguintes compostos: procianidina dimérica B1, epigallocatequina-3-*O*-galato e ácido gálico, os quais estavam relacionados a ação citotóxica e indução de morte celular de linhagens MCF7 e MDA-MB-435 de carcinoma mamário humano. Desta maneira, o tratamento das células com a fração aquosa contendo proantocianidinas induziu redução da viabilidade celular e causou alterações morfológicas nas duas linhagens, incluindo perda da morfologia celular típica, condensação da cromatina e diminuição da área das colônias e das células. A IC₅₀ para as células MCF-7 foi de 12,35 µg/mL e para as células MDA-MB-435 foi de 34,43 µg/ mL, sendo as células MCF-7 mais sensíveis ao tratamento, como foi observado no presente trabalho. Estes dados corroboram com os obtidos em nosso trabalho onde foram achados valores de IC₅₀ inferiores a 43,98 µg/mL e 48,02 µg/mL para essas linhagens, respectivamente. Verificou-se ainda no estudo que o tratamento com a fração aquosa de *S. adstringens* induziu apoptose, caracterizada por aumento na expressão da caspase-9, caspase-3-ativa e caspase-8, e diminuição da expressão da caspase-3 e pró-caspase-8. Também foi observado aumento de proteínas marcadoras da autofagia. Em conclusão, os resultados obtido pelo autor indicaram que a fração de barbatimão testada pode induzir morte por apoptose com autofagia nas células MCF-7 e MDA-MB-435, corroborando quanto ao potencial citotóxico desta espécie medicinal frente as respectivas linhagens celulares em estudo.

Sabino (2010) argumenta que a resposta diferencial das células MCF-7 e MDA-MB-435 pode ser provavelmente atribuída à presença do receptor de estrógeno α nas células MCF-7 (ER+), mas não nas células MDA-MB-435 (ER-). Este autor sugere que, a diferente resposta ao tratamento com a fração isolada pelas células MCF-7 e MDA-MB-435 pode ser, pelo menos em parte atribuída à atividade da procianidina B1, devido a sua função inibidora da aromatase. Esta enzima catalisa três reações consecutivas de hidroxilação, para conversão de andrógeno C-19 em estrógeno C-18, que é a etapa final e crítica para a síntese de estrógeno. O estrógeno, por sua vez, desempenha a função de liga-se ao receptor de estrógeno α das células ER+, induzindo a dimerização do receptor, que se liga aos elementos responsivos ao estrógeno no DNA ou a fatores de transcrição ligados ao DNA, ativando a transcrição de genes-alvo e proliferação tumoral. Assim, a expressão da aromatase está aumentada no tecido tumoral mamário, bem como no estroma circundante, em comparação ao tecido mamário normal

(ROSENGREN, 2003). Dessa forma, cabe salientar que o autor atribuiu o efeito citotóxico encontrado no estudo ao componente químico majoritário da fração, as proantocianidinas.

As proantocianidinas, e os demais flavonoides especificamente, as catequinas e epicatequinas, apresentam vários efeitos biológicos e alvos moleculares *in vitro* e *in vivo*, que podem potencialmente ser úteis na prevenção e tratamento de câncer de vários órgãos (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; LAMARÃO; FIALHO, 2009; SENER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010). De acordo com Sabino (2010), as proantocianidinas representadas pelas procianidinas diméricas B, os monômeros de catequinas e epicatequinas livres ou condensados ao ácido gálico são os compostos com mais atividades biológicas descritas.

Dentro desse contexto, tem sido demonstrado que as catequinas reduzem a proliferação de células de tumor mamário *in vitro* e diminuem o crescimento do tumor em roedores. Valcic et al. (1996) isolaram 6 diferentes catequinas do chá verde e verificaram que a epicatequina galato apresentou atividade antiproliferativa para células MCF-7, com IC_{50} de 154,8 $\mu\text{g/mL}$, concentração bem superior à do EBE utilizado no presente trabalho. Da mesma forma, Chisholm, Bray e Rosengren (2004) estudaram o efeito citotóxico de várias catequinas para células MCF-7 e MDA-MB-231 e determinaram que dentre os compostos testados a epicatequina galato a 20 μM mostrou-se citotóxica para células MDA-MB-231 e induziu morte celular por apoptose. Desta maneira, os menores valores de IC_{50} 11,89 $\mu\text{g/mL}$ e 20,33 $\mu\text{g/mL}$ encontrados neste trabalho para as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-435, respectivamente pode ser atribuído a presença predominante desses constituintes químicos no EBE.

Santos (2009) analisou o efeito citotóxico de proantocianidinas isoladas da fração aquosa obtida das folhas do barbatimão sobre as células de tumor mamário humano, MCF-7 (ER+) e MDA-MB-435 (ER-). O tratamento das células com a fração contendo proantocianidinas aumentou a atividade redutora de MTT, o que indica aumento da viabilidade celular. Entretanto, a análise morfológica revelou intensa vacuolização citoplasmática dependente da concentração da fração. Os vacúolos acumularam MTT, indicando tratarem-se de vacúolos autofágicos. Outras alterações morfológicas observadas pelo autor com o tratamento foram a perda da morfologia celular típica, condensação da cromatina (principalmente formação de núcleo picnótico), alterações na membrana plasmática e após 48 h de tratamento houve marcante diminuição do tamanho das células. Não foi observado o padrão de DNA escada característico de apoptose nos diversos tratamentos, afirma o autor. Conforme conclui Santos (2009), os resultados obtidos no estudo parecem indicar que a fração isolada pode induzir autofagia nos dois tipos celulares estudados. Tendo em vista que a

autofagia pode potencializar os efeitos antitumorais de quimioterápicos, o que pode ser útil na terapia contra o câncer, as folhas de barbatimão também parecem ser uma valiosa fonte de substâncias bioativas.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo avaliando-se a citotoxicidade de extratos e frações de *S. adstringens* frente as linhagens tumorais MCF7 e MDA-MB-435 estão em consonância com o apresentado em outros estudos para esta espécie.

Por último, é importante ressaltar que o nosso estudo mostra, através de análise fitoquímica por CCD, que não foram detectadas a presença de taninos condensados e derivados cinâmicos para a FAQ, que foi a amostra de barbatimão em ensaio que demonstrou o menor efeito citotóxico para ambas as linhagens celulares em estudo. Dessa forma, a variação da atividade citotóxica entre as diferentes frações e os extratos era esperada. Os solventes utilizados na preparação dos extratos e suas frações determinam a extração de diferentes substâncias bioativas das plantas (ROHDE et al., 2013). Além disso, como exposto na discussão anteriormente, as linhagens celulares de carcinoma mamário humano, MCF-7 e MDA-MB-435, apresentam potencial proliferativo diferente, bem como diferentes respostas a agentes quimioterápicos e antitumorais potenciais obtidos de plantas, devido à suas características genéticas.

Ainda, destaca-se que em diversos dos estudos registrados na literatura os extratos brutos apresentam atividade de interesse biológico mais promissora quando comparada aos extratos fracionados ou que empregaram solventes com polaridades distintas, como nos resultados obtidos pelo grupo de Simonetti e colaboradores (2016), sendo que tal atividade pode estar relacionada ao sinergismo entre os constituintes fitoquímicos das plantas. Portanto, extratos brutos de espécies vegetais podem muitas vezes apresentar ação biológica mais pronunciada (efetiva) devido ao sinergismo entre os constituintes bioativos que são extraídos pelo solvente ou método de extração empregado, uma vez que substâncias isoladas podem alterar suas propriedades na presença de outras substâncias, conforme esclarecem autores (LEE; LEE, 2010; DELGADO-ADÁMEZ et al., 2012; ROHDE et al., 2013).

Nessa abordagem, a combinação da trifolirizina, flavonoide com efeitos inibitórios in vitro sobre o crescimento de células de câncer de pulmão A2780 e de ovário H23 humano, juntamente com maackiain, um outro flavonoide isolado de *Trifolium pratense*, capaz de induzir apoptose em células de HL-60 de leucemia humana, resultou na degradação do DNA em fragmentos de tamanho de oligonucleossoma de maneira dependente do tempo e da dose, validando desta forma a eficácia terapêutica da mistura e portanto, o seu potencial sinérgico (ARATANECHMUGE et al., 2004; ZHOU et al., 2016).

Os resultados aqui discurridos representam uma contribuição na bioprospecção de compostos obtidos de plantas medicinais comumente utilizadas no Brasil que apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica. Estudos posteriores visando o isolamento dos compostos bioativos dos extratos ou frações com o intuito de chegar às moléculas ativas da planta investigada, deverão ser realizados.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- as cascas de *S. adstrigens* são uma fonte rica de compostos fenólicos com potencial antioxidante e atividade antifúngico;
- a atividade antioxidante está relacionada com o teor de fenólicos totais;
- quanto às duas técnicas de ágar difusão avaliadas, houve diferença significativa de resultados, demonstrando-se que em termos operacionais a técnica de difusão em poço apresenta maior garantia da concentração de extrato utilizada, por possibilitar que a quantidade de amostra que interage com o microrganismo durante o teste de sensibilidade seja igual ao volume pipetado em cada poço inicialmente nas condições metodológicas testadas;
- as amostras testadas apresentaram citotoxicidade para as células MCF-7 e MDA-MB-435, sendo mais ativas contra as primeiras células;
- o EBE apresenta promissor potencial antitumoral;
- A espécie medicinal em questão demonstra efeitos biológicos que motivam a continuidade dos estudos, sugerindo-se para futuros ensaios a utilização de métodos sistemáticos de investigação fitoquímica voltados para o isolamento dos seus princípios ativos e a sua eficácia clínica, visto que estudos clínicos são indispensáveis para verificar a eficiência terapêutica de produtos fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos antioxidantes e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- AGUIAR, C. **Botânica para ciências agrárias e do ambiente**. In: Fabaceae. Bragança: Instituto Politécnico, cap 48, p 59-61, 2013.
- ALFAIA, D. P. S.; ALMEIDA, S. S. M. S. Avaliação fitoquímica, análise citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas de *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Biota Amazônia**, v. 6, n. 1, p. 26-30, 2016.
- ALLEY, E.; GREEN, R.; SCHUCHTER, L. Cutaneous toxicities of cancer therapy. **Current opinion in Oncology**, v. 14, n. 2, p. 212-216, 2002.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C. O.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264. 2014.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA, J. M. F.; CABRAL, A. G. S.; AGRA, M. DE F.; CUNHA, E. V. L. DA; SILVA, M. S. DA; NASCIMENTO, S. C. DO; BRAZ-FILHO, R. Diploflavone, a new flavonoid from *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1454-1457, 2005.
- ALMEIDA, S. M. V. **Síntese, elucidação estrutural, avaliação da interação com o DNA, atividades antiproliferativa e anti-topoisomerase de novos derivados de Acridina**. 2015. 227 f. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde). Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE.
- ALMEIDA, S. P. DE; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Embrapa, Planaltina**, p 464, ISBN: 8586764027, 1998.
- ALVES, J. E.; SOUZA, T. A. DE; LACERDA, G. A.; PRINCE, P. M. A. DE. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Revista Bionorte**, v. 5, n. 1, 2016.
- ALVES, L. F.; SANTOS, P. F. Brazilian biodiversity as source of new medicines (A biodiversidade brasileira como fonte de novos medicamentos). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 307-20, 2013.
- ALVES, S. F. **Estudo da composição química, de atividades biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel - Fabaceae ("sucupira")**. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- ALZEER, J.; VUMMIDI, B. R.; ARAFEH, R.; RIMAWI, W.; SALEEM, H.; LUEDTKE, N. W. The influence of extraction solvents on the anticancer activities of Palestinian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, n.8, p.408-415, 2014.

AMORIM, M. M. R. de; SANTOS, L. C. Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Rigo**, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-86, 2010.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G; BATISTA, L. R; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**. v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ARATANECEHEMUGE, Y.; HIBASAMI, H.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; KOMIYA, T. Induction of apoptosis by maackiain and trifolirhizin (maackiain glycoside) isolated from sanzukon (*Sophora Subprostrate* Chen et T. Chen) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. **Oncology Reports**, v. 12, p. 1183–1188, 2004.

ASARE, G. A.; BUGYEI, K.; SITTIE, A.; YAHAYA, E. S.; GYAN, B.; ADJEL, S.; NYARKO, A. K. Genotoxicity, cytotoxicity and toxicological evaluation of whole plant extracts of the medicinal plant *Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 11, p. 100-1, 2008.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.

AUDI, E. A.; TOLEDO, C. E. M.; SANTOS, F. S.; BELLANDA, P. R.; ALVES-DO-PRADO, W.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; SAKURAGUI, C. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; MELLO, J. C. P. DE. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 328-33, 2004.

AUNG, T. N.; QU, Z.; KORTSCHAK, R. D.; ADELSON, D. L. Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 656, n. 18, 2017.

AZEVEDO, T. K. B. DE; PAES, J. B.; CALEGARI, L.; SANTANA, G. M. Teor de Taninos Condensados Presente na Casca de Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora*) em Função das Fenofases. **Floresta e Ambiente**, v. 24, e00026613, 2017.

BARBEDO, L. S; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis - DST/UFF**, v. 22, n.1, p. 22-38. 2010.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. DE; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARREIROS, A. L. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BATEMAN, A. C. Breast pathology. **Surgery (Oxford)**, v. 25, n. 6, p. 245-250, 2007.

BATTISTI, C.; GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 338-348, 2013.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª Edição, p. 545, 2008.

BEZERRA, R. J. S. **Avaliação da modulação das atividades da óxido nítrico sintase (NOS)/arginase como participantes do sistema de defesa de Leishmania amazonensis frente a derivados de compostos mesoiônicos** (Doctoral dissertation, Instituto Oswaldo Cruz), 2008.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p.1-30, 2010.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOLOGNESI, M. L. Polipharmacology in a single drug: Multitarget drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1639-1647, 2013.

BOLZANI, V. S.; JÚNIOR, O. F.; VALLI, M. **Biodiversidade brasileira: uma fonte potencial de agentes terapêuticos ainda inexplorada**. In: Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. (Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V. Editores), Itajaí: Ed: Univali, 5ª. Edição, p. 185-214, 2016.

BONTA, R. K. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 349-364, 2017.

BOTELHO, S. F.; MARTINS, M. A. P.; REIS, A. M. M. Análise de medicamentos novos registrados no Brasil na perspectiva do Sistema Único de Saúde e da carga de doença. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 1, p. 215-228, 2018.

BRAGA, T. V.; DORES, R. G. R. DAS; RAMOS, C. S.; EVANGELISTA, F. C. G.; TINOCO, L. M. DA S.; VAROTTI, F. DE P.; CARVALHO, M. DAS G.; SABINO, A. DE P. Antioxidant, Antibacterial and Antitumor Activity of Ethanolic Extract of the *Psidium guajava* Leaves. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.3492-3500, 2014.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTEMÓR, R. L. Brazilian plants described by European naturalists in 19th century and in Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 141–148, 2008.

BRAQUEHAIS, I. D.; VASCONCELOS, F. R.; RIBEIRO, A. R. C.; DA SILVA, A. R. A.; FRANCA, M. G. A.; DE LIMA, D. R.; DE PAIVA, C. F.; GUEDES, M. I. F.; MAGALHÃES, F. E. A. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.2, supl. I, p.582-587, 2016.

BRASIL, Governo do Estado do Ceará. **Informe Epidemiológico Doenças Crônicas Não Transmissíveis**. Coordenadoria de Promoção e Proteção à Saúde, 2013. Disponível em: <http://docplayer.com.br/20609521-Informe-epidemiologico-doencascronicasnaotransmissiveis.html>. Acessado em: 06 de janeiro de 2018.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Flora do Brasil 2020**. 2018a. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acessado em 24 de janeiro de 2018.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Biodiversidade Brasileira**. 2018b. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acessado em 23 de janeiro de 2018.

BREASTCANCER.ORG, 2016. U.S. Breast Cancer Statistics. Disponível em: http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics. Acessado em: 10 de janeiro de 2018.

BREASTCANCER.ORG, 2018. U.S. Breast Cancer Statistics. Disponível em: http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics. Acessado em: 10 de fevereiro de 2018.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 53-67, 1993.

BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Prognostic factors in breast cancer. **Ciências Saúde**, v.22, n.1, p.69-82, 2011.

BURGESS, J. G.; JORDAN, E. M.; BREGU, M.; MEARNES-SPRAGG, A.; BOYD, K. G. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 27-32, 1999.

BURSTEIN, H. J.; POLYAK, K.; WONG, J. S.; LESTER, S. C.; KAELIN, C. M. Ductal carcinoma in situ of the breast. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1430-1441, 2004.

BUSATO, N. V.; SILVEIRA, J. C.; COSTA, A. O. S. DA; JUNIOR, E. F. DA C. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v.44, n.9, p.1574-1582, 2014.

CABRAL, C.; POÇAS, J.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; CRUZA, M.T.; SALGUEIRO, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 56–61, 2015.

CÁCERES, A.; SARAIVA-OTTEN, P. **Importancia de la etnofarmacología em la búsqueda de productos naturales con actividad anticâncer em américa latina**. In: San Feliciano, A.; Cechinel Filho, V. Descoberta, desenho e desenvolvimento de novos agentes anticâncer no âmbito do Programa Iberoamericano – CYTED; Itajaí: Univali, p. 207-218, 2014.

CALDERÓN, A. I.; WRIGHT, B. J.; HURST, W. J.; BREEMEN, R. B. V. Screening Antioxidants Using LC-MS: A Case Study with Cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5693–5699, 2009.

CALLEJA, M. A.; VIEITES, J. M.; MONTERO-METERDEZ, T.; TORRES, M. I.; FAUS, M. J.; GIL, A.; SUÁREZ, A. The antioxidant effect of beta-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 1, p. 1-8, 2013.

CALLOU, M. J. A.; MIRANDA, R. C. M.; FEITOSA, T. R.; ARRUDA, F. V. F.; NASCIMENTO, M. S.; GUSMÃO, N. B. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth (Sabiá). **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, 2012.

CAMPOS, A.; MALHEIROS, A.; NIERO, R.; FILHO, V. C. **Biodiversidade brasileira (terrestre e marinha): uma vasta fonte de agentes anti-câncer**. In: San Feliciano, A.; Cechinel Filho, V. Descoberta, desenho e desenvolvimento de novos agentes anticâncer no âmbito do Programa Iberoamericano – CYTED; Itajaí: Univali, p. 193-218, 2014.

CAMPOS, F. L.; VALENTE, P.; ETHUR, E. M.; AVANCINI, C. A. M. Atividade desinfetante do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) sobre *Candida* spp. isoladas em situações-problema de mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.10, n.4, p.327-333, 2016.

CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, v.12, n.1, p.1-8, 2017.

CARNEIRO, M.; FERRAZ, T.; BUENO, M.; KOCH, B. E.; FORESTI, C.; LENA, V. F.; MACHADO, J. A.; RAUBER, J. M.; KRUMMENAUER, E. C.; LAZAROTO, D. M. O uso de antimicrobianos em um hospital de ensino: uma breve avaliação. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 421-424, 2011.

CARVALHO, I. H. G. DE. **Ação antimicrobiana do extrato de *Lycium barbarum* frente a microrganismos superinfetantes do ambiente bucal**. 2017. 28f. Monografia (Graduação em Odontologia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Natal.

CASTANHO, F. L.; FUNKE, M. G.; FRANÇA, L. P. de. *Ginkgo biloba* e câncer. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1, p. 63-69, 2007.

CASTRO, M. R.; VICTORIA, F. N; OLIVEIRA, D. H.; JACOB, R. G.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, p.1–9, 2014.

CAVALCANTE, V. L. N; MIRANDA, A. T.; PORTUGAL, G. M. P. Rastreamento de candidose vaginal durante a prevencao do cancer cervico-uterino. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 17, n. 1, p. 44-48, 2005.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de tintura de produtos naturais sobre *Candida* ssp. **International Journal of Dentistry**, v. 10, n.1, p. 15-19, 2011.

CAVALCANTI, Y. W.; PÉREZ; A. L. A. L.; XAVIER, G. D. R.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 1, p. 43-48, 2012.

CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E.; DUARTE, M. G.; MOREIRA, C. P.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 975-981, 2012.

CERELLA, C.; RADOGNA, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Natural Compounds as Regulators of the Cancer Cell Metabolism. **International Journal of Cell Biology**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

CHEN, H.; ZHANG, Q.; WANG, X.; YANG, J.; WANG, Q. Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC/DAD and ESI/MSn. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 247–257, 2011.

CHIANG, C.-T.; WAY, T.-D.; TSAI, S.-J.; LIN, J.-K. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. **FEBS Lett**, v. 581, p. 5735–5742, 2007.

CHISHOLM, K.; BRAY, B. J.; ROSENGREN, R. J. Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 15, p. 889-897, 2004.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p.809-816, 2005.

CIRQUEIRA, M. B.; MOREIRA, M. A. R.; SOARES, L. R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, J. D. **Biodiversidade, um componente essencial na descoberta de fármacos**. In: Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. (Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V. Editores), Itajaí: Ed: Univali, 5ª. Edição, p. 57-86, 2016.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, v. 111, p. 918-31, 1989.

COLOMBO, A. L.; GIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

CORREIA, S. D. S.; SILVA, N. F.; GOMES, D. D. M.; FALCÃO, R. A. Investigação etnofarmacológica de plantas medicinais nas comunidades quilombolas de Garanhuns-PE. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 4, p. 285-305, 2017.

COS, P.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; APERS, S.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1345-1359, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C., ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F., PESSOA, C.; MORAES, M. E. A., MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COSTELLOE, C. M; METCALFE, C.; AMANTE, A.; MANT, D.; HAY, A. D. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, London, v. 340, p. c2096, 2010.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, 3ª Edição, p. 1200, 2009.

CUNHA, L. C. S; MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; CHANG, R.; OLIVEIRA, A. DE; MARTINS, M. M.; MARTINS, C. H. G.; SOUSA, L. C. F.; BARROS, T. T.; SILVA, C. V. DA; NASCIMENTO, E. A. DO. Bioassay-guided fractionation and antimicrobial and cytotoxic activities of *Cassia bakeriana* extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n.1, p. 91-98, 2017.

CURTIS, A. O. de. **Parâmetro de estresse oxidativo em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

DEL FIOL, F. DE S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I. DE; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43 n. 1, p. 68-72, 2010.

DELGADO-ADÁMEZ, J.; FERNÁNDEZ-LEÓN, M. F.; VELARDO-MICHARET, B.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. In vitro assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.2481–2486, 2012.

DESCALZO, A. M.; SANCHO, A. M. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 423-436, 2008.

- DESHPANDE, S.S.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Chemistry and safety of plant polyphenols. **In Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety**; Plenum Press: New York, NY, USA, p. 457–495, 1984.
- DIAS, L. S.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 610-618, 2013.
- DIAZ, P.; JEONG, S. C.; LEE, S.; KHOO, C.; KOYYALAMUDI, S. R. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. **Chinese Medicine**, v. 7, p. 2-9, 2012.
- DINIZ, D. N.; MACÊDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, M. DO S. V.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 3, p.151-156, 2010.
- DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 307-313, 2000.
- DONG, M.; HONG, T.; LIU, S.; ZHAO, J.; MENG, Y.; MU, J. Hepatoprotective effect of the flavonoid fraction isolated from the flower of *Inula britannica* against D-Galactosamine-induced hepatic injury. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 6, p. 1919-23, 2013.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH[•]. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, DOI: 10.1016/j.phrs.2016.01.021, 2016.
- EHEMAN, C. R.; SHAW, K. M.; RYERSON, A. B.; MILLER, J. W.; AJANI, U. A.; WHITE, M. C. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 6, p. 1763-1769, 2009.
- EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, v. 4, p. 377-88, 2001.
- EMERY, F. S.; SANTOS, G. B.; BIANCHI, R. C. **A química na natureza**. 7 ed. São Paulo: Design LTDA, 2010.
- FAÇANHA, T. P.; LAMEIRA, O. A.; RIBEIRO, F. N. S.; COSTA, T. C. DA. Avaliação fenológica e screening fitoquímico de duas espécies da família Fabaceae. 16º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, **Embrapa Amazônia Oriental**, Belém-PA. Ago. 2012. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao>. Acesso em: 30 de janeiro de 2018.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen Heterodermia leucomela (L.) Poelt. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, 2002.

FARABEGOLI, F.; BARBI, C.; LAMBERTINI, E.; PIVA, R. (-) - Epigallocatechin-3-gallate downregulates estrogen receptor alpha unction in MCF-7 breast carcinoma cells. **Cancer Detection and Prevention**, v. 31, p. 499-504, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v. 2, p. 2546, 2010.

FEDERICO, M. P. **Avaliação das prescrições médicas de antibióticos para pacientes pediátricos em um hospital público na Bahia**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva). Universidade Estadual de Feira de Santana Feira de Santana, Feira de Santana Feira de Santana-BA.

FELICIANO, A. S.; FILHO, V. C. **Descoberta, desenho e desenvolvimento de novos agentes anticâncer no âmbito do Programa Iberoamericano – CYTED**. Itajaí: Univali, 495 p., 2014.

FELIPE, A. M.; RINCÃO, V. P.; BENATI, F. J.; LINHARES, R. E.; GALINA, K. J.; DE TOLEDO, C. E.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine hHerpesvirus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p.1092-1095, 2006.

FENG, R. Z, WANG, Q.; TONG, W. Z; XIONG, J.; WEI, Q.; ZHOU, W.; YIN, Z.; YIN, X.; WANG, L.; CHEN, Y.; LAI, Y.; HUANG, H.; LUO, Q.; WANG, L.; JIA, R.; SONG, X.; ZOU, Y.; LI, L. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 22328-22336, 2015.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. **GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide**. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2018.

FERNANDES, M. R. V.; AZZOLINI, A. E.; MARTINEZ, M. L.; SOUZA, C. R.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; OLIVEIRA, W. P. Assessment of Antioxidant Activity of Spray Dried Extracts of *Psidium guajava* Leaves by DPPH and Chemiluminescence Inhibition in Human Neutrophils. **BioMed Research International**, p.10, 2014.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* E *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34 n.2, p.113-122, 2005.

FERRAZZA, M. H. S. H; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 1, p. 32-39, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERRERES, F.; GROSSO, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Phenolic compounds from Jacaranda caroba (Vell.) A. DC.: Approaches to neurodegenerative disorders. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 91–98, 2013.

FILHO, H. C. B.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Sociedade de Investigações Florestais**, v. 27, n. 5, p.735 - 745, 2003.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FILHO, V. C. Principais perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, p. 680-685, 2000.

FILHO, V. C. **Principais agentes terapêuticos de origem natural (plantas): histórico, recentes avanços e perspectivas**. In: Medicamentos de Origem Vegetal: atualidades, desafios, perspectivas. (Cechinel Filho, V. Editor). 1.ed.-Itajaí: UNIVALI, 2015a.

FILHO, V. C. **Estratégias para a obtenção de princípios ativos naturais e seus derivados ou análogos sintéticos**. Medicamentos de Origem Vegetal: atualidades, desafios, perspectivas. (Cechinel Filho, V. Editor). 1.ed.-Itajaí: UNIVALI, 2015b.

FILIZOLA, B. C.; SAMPAIO, M. B. **Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascas**. Brasília: Instituto; Sociedade, População e Natureza; ISBN 978-85-63288-17-2, 2015.

FLAUSINO, O. JR.; SANTOS, L. DE A.; VERLI, H.; PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. DA S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiolytic Effects of Erythrinian Alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 48–53, 2007.

GABARDI, S.; MARTIN, S.; SUR, M.; MOHAMMED, A.; GOLAN, Y. Micafungin treatment and eradication of candiduria among hospitalized patients. **International urology and nephrology**, v. 48, n. 11, p. 1881–1885, 2016.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvídica Contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual Química**, v.5, n. 3, p. 363-393.

GARCIA-MIGURA, L.; HENDRIKSEN, R. S.; FRAILE, L.; AARESTRUP, F. M. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 1-9, 2014.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GIL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GIOXARI, A.; KALOGEROPOULOS, N.; KOGIANNOU, D. A. A.; KALIORA, A.C. Phenolic compounds: bioavailability and health effects. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 339-345, 2016.

GIULIANI, C., BUCCI, I.; SANTO, S. D.; ROSSI, C.; GRASSADONIA, A.; PIANTELLI, M.; NAPOLITANO, G. The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 23-9, 2014.

GOMPERTZ, O. F. **Micoses Superficiais e Cutaneas: Pitiríais Versicolor, Tinea nigra, Piedras, Dermatofitoses, Cadidíases Mucocutaneas, Dermatomicoses por Fungos Filamentosos Não Dermatofitos, Dermatomicoses por Leveduras Não Candida**. In: TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. 6a ed. Sao Paulo: Atheneu, 2015.

GOBBO, N. L., LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GOULART, S. L. **Características anatômicas, químicas e densidade do barbatimão**. 2010. 118 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG.

GOUVÊA, C. M. C. P. Oxidações biológicas. In: José Carlos Tavares Carvalho. (Org.). **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 101-124, 2004.

GOUVEA, D. R.; PAVARINI, D. P.; CAROLLO, C. A.; LOPES, N. P. **Variações do metabolismo secundário vegetal: exemplos com plantas nativas do Brasil**. In: Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. (Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V. Editores), Itajaí: Ed: Univali, 5ª. Edição, p. 399-420, 2016.

GREEN, K.; BRAND, M. D; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 110-8, 2004.

GRILLO, V. T. R. S.; GONÇALVES, T. G.; JÚNIOR, J. C.; PANIÁGUA, N. C.; TELES, C. B. G.

Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 117-123, 2013.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 13-28.

GUIMARÃES, C. C.; FERREIRA, T. C.; OLIVEIRA, R. C. F.; SIMIONI, P. U.; UGRINOVICH, L. A. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.)

frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n.2, p. 83-89, 2017.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179–80, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. ed.; **Oxford University Press**, Oxford, 2007.

HARRINGTON, K. J. Cancer biology and imaging. **Medicine**, v. 39, n. 12, p. 689-692, 2011.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215,1996.

HENRIGUES, A. T.; DANIELLI, L. J.; APEL, M. A. **Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas**. In: Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. (Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V. Editores), Itajaí: Ed: Univali, 5ª. Edição, p. 266-322, 2016.

HOLETZ, F. B; NAKAMURA, T. U; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. **Acta scientiarum**, v. 24, n. 3, p. 657-62, 2002.

HSIEH, T. C.; WU, J. M. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptorpositive MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 33, p. 851-889, 2008.

ILDIS, International Legume Database e Information Service. **Catalogue of Life: 30th January 2018**. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/database/id/15>. Acessado em 04 de fevereiro de 2018.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa – 2008 – incidência de câncer no Brasil**.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**.

ISHIDA, K.; ROZENTAL, S.; NAKAMURA, C.V. Activity of tannins from *Strypnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. **Annals of Clinical Microbiology And antimicrobials**, BioMed Central, v.8, p.29, 2009.

ITHARATA, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.33–38, 2004.

IUCN, União Internacional para a Conservação da Natureza. **The IUNC Red List of Threatened Species**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/search>. Acessado em 04 de fevereiro de 2018.

JOHNSON, A.; RAFF, L.; WALTER, R. **Biologia Molecular da célula**. Artmed, 4º Edição, 1313-1362, 2004.

JUNG, S. I.; SHIN, J. H.; CHOI, H. J.; JU, M. Y.; KIM, S. H.; LEE, W. G.; PARK, Y. J.; LEE, K. Antifungal susceptibility to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and flucytosine in *Candida* bloodstream isolates from 15 tertiary hospitals in Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 32, n. 6, p. 426-428, 2012.

JUNIOR, A. G.; GRIGOLETO, A. R. L.; FREGONEZI, P. A. G. Candidíase vaginal: uma questão de educação em saúde. **Brazilian Journal of Health**, v. 2, p. 89-96, 2011.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KÄFER, P. S.; REX, F. E.; SANTOS, M.; SEBEM, E. Caracterização espectral e NDVI de espécies florestais das famílias Fabaceae, Myrtaceae, Rutaceae e Salicaceae. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13, n.23; p. 262-275, 2016.

KARAMAN, I. SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; OGÜTÇÜ, H.; SENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and metanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KILKUSKIE, R. E.; KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; BODNER, A. J.; CHENG, Y.; LEE, K. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 1529-1534, 1992.

KOUROU, K.; EXARCHOS, T. P.; EXARCHOS, K. P.; KARAMOUZIS, M. V.; FOTIADIS, D. I. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. **ComputStruct Biotechnology J.**, v.15, n.13, p.8-17, 2015.

KUMAR, S. V.; SARAVANAN, D.; KUMAR, B.; JAYAKUMAR, A. An update on prodrugs from natural products. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 7 (Suppl. 1): S54-S59, 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, C. J. **Robbins Patologia Básica**. Tradução de: Robbins basic pathology, Rio de Janeiro: Elsevier, 9th Edição, 2013.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARILLA, M. C.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.4, p. 691-693, 2004.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LAMARÃO, R. DA C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, v.22, n.2, 2009.

- LAZARY, V. M. D. **Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama**. 2010. 20f. Monografia (Especialização em Educação e Promoção da Saúde). Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM, Brasília.
- LEE, O. H.; LEE, B. Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, n.101, p.3751–3754, 2010.
- LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 1º Edição, p. 344, 2008.
- LEWINSONHN, T. M.; PRADO, P. I. **Biodiversidade Brasileira** – Síntese do estado atual do conhecimento. 1 ed. São Paulo, 2002.
- LIMA, A. B. **Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão)**. 2010. 68f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu-SP.
- LIMA, H. C. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. 151p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- LIMA, R.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, M. A.; GUIMARÃES, P. L.; BATISTA, L. R.; NELSON, D. L. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 3, p 523–528, 2012.
- LIMA, T. C. D; CARDOSO, M. V.; MODESTO, T.; OLIVEIRA, A. L. DE B.; SILVA, M. N. DA; MONTEIRO, M. C. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. **Revista Fitos**, v. 10, n. 3), p. 220-372, 2016.
- LIU, J.; HENKEL, T. Traditional Chinese medicine (TCM): Are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1483–1485. 2002.
- LIU, R.; HU, Y.; LI, J.; LIN, Z. Production of soybean isoflavonegenistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway. **Metabolic Engineering**, v. 9, p. 1-7, 2007.
- LIU, Y.; XU, Y.; JI, W.; LI, X.; SUN, B.; GAO, Q.; SU, C. Anti-tumor activities of matrine and oxymatrine: Literature review. **Tumor Biology**, v. 35, p. 5111–5119, 2014.
- LIVERMORE, D. M. Minimising antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 5, p. 450-459, 2005.
- LOMBARDO, M.; IKUNO, A.A; FERREIRA, V. C. A.; KIYOTA, S. Cytotoxicity and antiviral activities of protein or peptide toxins present in the purification products of active

protein fraction from *Senna occidentalis* seeds extracts. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 466-9, 2004.

LOPES, G. K. B.; SCHUMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction complexing ferrous ions. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1472, p. 142-152, 1999.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; TOLEDO, C. E. M.; ISLER, A. C.; DE MELLO, J. C. P. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n.1, p. 135-143, 2009.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, p. 189, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. **Plantarum, Nova Odessa**, p. 512, ISBN: 85-86714-28-3, 2002.

LOURO, E.; LIEBER, N. S. R; RIBEIRO, E. Eventos adversos a antimicrobianos em pacientes internados em um hospital universitário. **Revista Saúde Pública**, v. 41, n. 6, p. 1042-48, 2007.

LUIZ, R.L.F; VILA, T.V.M.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; ROZENTAL, S.; ISHIDA, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 68, 2015.

LUIZE, P. S; TIUMAN, T. S; MORELLO, L. G.; PALOMA KOREHIZA MAZA; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P. DE; NAKAMURA, C. V. Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento de *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MACEDO, F. M. DE; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. DE. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1166-1168, 2007.

MACGOWAN, A. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 62, s. 2, p. 105-114, 2008.

MACHADO, F. A. V. **Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Leguminosae, barbatimão.** 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Araraquara-SP.

MACHADO, R. M.; CARVALHO, D. V.; OLIVEIRA, A. C. Aspectos epidemiológicos das infecções hospitalares no centro de terapia intensiva de um hospital universitário. **Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**, v. 1, n. 1, p. 9-16, 2011.

MACIEL, M. J.; SILVA, M. A. S.; ETHUR, E.; AVANCINI, C. A. M. Indicadores fitoquímicos e atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides* ("macela") frente *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos isoladas em produtos de origem animal (suínos e aves). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.11, n.3, p. 273 – 287, 2017.

MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C.; ARAUJO, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, p. 1-4, 2011.

MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; NIERO, R.; FILHO, C. V. **Considerações gerais sobre aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais**. In: Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar (BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, C. V.; Editores, Ed. Santos, São Paulo-SP, p. 1717-44, 2010.

MANTENA, S. K.; BALIGA, M. S.; KATIYAR, S. K. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1682-1691, 2006.

MARTINS, D. T.; LIMA, J. C.; RAO, V. S. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. Wiley. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 427-431, 2002.

MATHERS, C. D.; BERNARD, C.; IBURG, K. M.; INOUE, M.; FAT, D. M.; SHIBUYA, K.; STEIN, C.; TOMIJIMA, N.; XU, H. **Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results**. Geneva: WHO, 2003. (Global programme on evidence for health policy discussion paper, v. 54).

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 401-407, 2006.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC Edições, 1997.

MELO, J. O.; ENDO, T. H.; AMADO, L. E. B.; SVIDZINSKI, A. E.; BARONI, S.; MELLO, J. C. P. DE; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. SciELO. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.3, p. 465-469, 2007.

MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, New York, v.41, p.807-813, 1996.

MESQUITA, M. O. M.; PINTO, T. M. F.; MOREIRA, R. F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, v. 11, n. 2, p. 119-249, 2017.

MESSIAS, M. C. T. B.; MENEGATTO, M. F.; PRADO, A. C. C.; SANTOS, B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 76-104, 2015.

MINATEL, D. G.; PEREIRA, A. M. S.; CHIARATTI, T. M.; PASQUALIN, L.; OLIVEIRA, J. C. N.; COUTO, L. B.; LIA, R. C. C.; CINTRA, J. M.; BEZZON, M. F. A.; FRANCA, S. C. Estudo clínico para validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) na cicatrização de úlceras de decúbito. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, v. 7, p. 250-6, 2010.

MIRANDA, G. S.; SANTANA, G. S.; MACHADO B. B.; COELHO, F. P.; CARVALHO, C. A. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 1, p. 104-111, 2013.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOODY, J. O; ADEBIYI, O. A; ADENIYI, B. A. Do Aloe vera and Ageratum conyzoides enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 57-60, 2004.

MOREIRA, L. S.; DORIA, A. C. O. C.; SANTOS, T. B.; FIGUEIRA, F. R.; SORGE, C. D. P. C.; SILVA, A. M. DA; KHOURI, S. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. **Revista Univap**, v. 23, n. 43, dez. 2017.

MORENO, M. A.; ZAMPINI, I. C.; COSTAMAGNA, M.; SAYAGO, J. E.; ORDOÑEZ, R. M.; ISLA, M. I. Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Psidium guajava Fresh Fruits and Flour. **Food and Nutrition Sciences**, v.5, p.725-732, 2014.

MORIO, F.; LOGE, C.; BESSE, B.; HENNEQUIN, C.; LE, P. P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azolesusceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 66, n. 4, p. 373-384, 2010.

MOSMANN, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **The Journal of Immunological Methods**, v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.

MOTILVA, V.; TALERO, E.; MAURIÑO, S. G.; ALCAIDE, A. **Interés de los polifenoles en inflamación crónica y cáncer**. In: San Feliciano, A.; Cechinel Filho, V. Descoberta, desenho e desenvolvimento de novos agentes anticâncer no âmbito do Programa Iberoamericano – CYTED; Itajaí: Univali, p. 419-464, 2014.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NASCIMENTO, A. M. **Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville**. 2008. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

NETA, C. M.; CAMPOS, M. N. F.; RODRIGUES, M. J. F.; FEITOSA, E. DE A.; LIMA, A. A. DE; GARCIA, C. DE L. Infecções por bactérias multirresistentes em hospitais brasileiros: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Saúde - UNG-SER**, v. 11, n. 1, 2017.

NEWMAN, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics área. **Nature Reviews**, v. 14, p. 111-129, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos, 2002

NUNES, E. O. R.; MACHADO, E. L.; PAULA, G. B. S. DE, BRUM, H. C. C. **O uso da própolis como antibiótico natural**. 2017. 28f. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Faculdade de Pindamonhangaba – FUNVIC, Pindamonhangaba-SP.

OCDE, Better Policies For Better Lives. **Cancer Care: Assuring Quality to Improve Survival**. 2013. Disponível em: <http://www.oecd.org/health/cancer-care-9789264181052-en.htm>. Acessado em 20 de janeiro de 2018.

ODA, M.; SAITO, Y.; MORIMUNE, Y.; NAGAHAMA, M.; SAKURAI, J. Induction of neurite-outgrowth in PC12 cells by alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 411, n. 2, p. 241-6, 2011.

OLIVEIRA, B. H. de. **Obtenção de novos fármacos através da biotransformação de produtos naturais**. In: San Feliciano, A.; Cechinel Filho, V. Descoberta, desenho e desenvolvimento de novos agentes anticâncer no âmbito do Programa Iberoamericano – CYTED; Itajaí: Univali, p. 207-218, 2014.

OLIVEIRA, R.L. DE; MARQUES, M. M. M.; SILVA, A. R. A. DA; SANTOS, S. C. C.; JUNIOR, S. Q.; GUEDES, M. I. F. Bioprospecção da atividade antimicrobiana e antioxidante, in vitro, do extrato hidroalcoólico de *Piptadenia pterosperma* Benth. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.92, n.4, p.362-366, 2011.

OLIVEIRA, R. M.; LIMA, R. A. Prospeção fitoquímica do extrato etanólico de *Bauhinia forficata* L. e seu potencial candidacida. **South American Jorنال of Basic Education and Technological**, v. 4, n.1, p. 54-65, 2017.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da atividade antibacteriana do extrato hidro-alcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) - Curso de Pós-graduação em Promoção da Saúde, Universidade de Franca, SP.

PACHOLEC, M.; BLEASDALE, J. E.; CHRUNYK, B.; CUNNINGHAM, D.; FLYNN, D.; GAROFALO, R. S.; GRIFFITH, D.; GRIFFOR, M.; LOULAKIS, P.; PABST, B.; QIU, X.;

STOCKMAN, B.; THANABAL, V.; VARGHESE, A.; WARD, J.; WITHKA, J.; AHN, K. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 8340-8351, 2010.

PAIVA, S. R.; HERINGER, A. P.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae. **Floresta e Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 153-157, 2002.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SOUZA E SILVA, R. A. P. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vell.) Martius: teor de taninos na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 10, p.101-106, 1988.

PASSARINI, G. M. **Avaliação da atividade antiplasmodial e leishmanicida in vitro compostos de cascas e flores de *Combretum leprosum***. 2017. 93f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rodônia, Porto Velho – RO.

PAVARINI, D. P.; DA SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; PORTELLA, A. P.; LATANSIO-AIDAR, S. R.; CAVALIN, P. O.; OLIVEIRA, V. C.; ROSADO, B. H.; AIDAR, M. P.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; JOLY, C. A. Application of MALDI-MS analysis of Rainforest chemodiversity: a keystone for biodiversity conservation and sustainable use. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 11, p. 1482–1485, 2012a.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012b.

PRATES, M.V.; BOLCH, J.C. Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.17, n.1, p.30-36, 2000.

PEINTINGER, F.; BUZDAR, A. U.; KUERER, H. M.; MEJIA, J. A.; HATZIS, C.; GONZALEZ-ANGULO, A. M.; PUSZTAI, L.; ESTEVA, F. J.; DAWOOD, S. S.; GREEN, M. C.; HORTOBAGYI, G. N.; SYMMANS, W. F. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. **Annals of Oncology**, v. 19, p. 2020-2025, 2008.

PELIELO, J. C. A ação dos radicais livres e o processo fisiológico de envelhecimento. **Revista Eletrônica do Vestibular UERJ**, v. 12, n. 4, 2012.

PEREIRA, M. N. S.; ANDRADE, A. C. U.; PILÓ-VELOSO, D. **Isolamento e identificação de metabólitos secundários das cacas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17. Cuiabá. Resumos. Cuiabá: UFMT, 2002.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP p. 01 – 26, 2004.

PESSOA, E. C.; RODRIGUES, J. R. P.; MICHELIN, O.; LUCA, H. V. DE; KAMIYA, C. P.; TRAIMAN, P.; UEMURA, G. Avaliação da resposta à quimioterapia primária em amostra de mulheres brasileiras com tumores de mama localmente avançados. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 18-26, 2007.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n.1, p. 133-63, 2007.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINHO, L. DE; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C. DE; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v.42, n.2, p.326-331, 2012.

PIRIE, A. D.; DAVIES, N. W.; AHUJA, K. D.; ADAMS, M. J.; SHING, C. M.; NARKOWICZ, C. Jacobson GA1, Geraghty DP4 Hypolipidaemic effect of crude extract from *Carpobrotus rossii* (pigface) in healthy rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 134-9, 2014.

PIZZI, A. **Tanin-based adhesives**. In: Pizzi A, editor. Wood adhesives: chemistry and technology. New York: Marcell Dekker; p. 177-246, 1993.

PONTES, M. A. N. DE; LIMA, D. S. DE; GOMES, S. M.; SANTOS, B. H. C.; LIMA, I. O. Efeito Inibitório De Monoterpenos Frente A *Klebsiella Pneumoniae* Produtoras de ESBL. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 1, p. 51-56, 2018.

PORTO, L.C.; SILVA, J.; FERRAZ, A. B.; CORREA, D. S.; SANTOS, M. S.; PORTO, C. D.; PICADA, J. N. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 579-85, 2013.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.; BAILLEUL, F.; TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 35-42, 2000.

RABANAL, R. M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C. C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 287-292, 2002.

RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, M. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy - status quo. **Mycoses**, v.55, n.1, p.60-73, 2012.

RAMLJAK, D.; ROMANCZYK, L. J.; METHENY-BARLOW, L. J.; THOMPSON, N.; KNEZEVIC, V.; GALPERIN, M.; RAMESH, A.; DICKSON, R. B. Pentameric procyanidin

from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, p. 537-546, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7^a ed., Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.

REBECCA, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R. K. N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; MELLO, J. C. P. DE; BERSANI-AMADO, C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 101-104, 2002.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26 (9/10), p. 1231-1237, 1999.

REED, K. A. **Identification of Phenolic Compounds from Peanut Skin using HPLC-MSn**. 2009. 390 f. Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy In Food Science and Technology. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment. Blacksburg, Virginia.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 25-36, 2005.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. Introdução. In: **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 13-23, 2012.

ROHDE, C.; JÚNIOR, A. M.; SILVA, P. K.; RAMALHO, K. R. DE O. Efeito de extratos vegetais aquosos sobre amosca-dasfrutas *Ceratitits capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 4, p. 407-415, 2013.

ROSENGREN, R. J. Catechins and the treatment of breast cancer: Possible utility and mechanistic targets. **IDrugs**, v. 6, p. 1073-1178, 2003.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 127, p. 1-4, 2007.

RUSSO, C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Oxidative stress in dogs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p. 1431-1440, 2016.

SABINO, A. P. L. **Indução de morte em células MCF-7 e MDA-MB-435 tratadas com fração isolada do extrato de folhas de barbatimão**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. Alfenas/MG.

SAEKI, T. TAKASHIMA, S.; OGITA, M.; TABEL, T.; ADACHI, I.; TAMURA, K.; TAKATSUKA, Y.; KANDA, K. Efficacy and toxicity of vinorelbine with doxorubicin/cyclophosphamide combination chemotherapy in a phase I-II study for advanced or recurrent breast cancer patients. **Breast Cancer**, v. 13, p. 159-165, 2006.

SAHA, S.; VERMA, R. J. Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Terminalia chebula* Retzius fruits. **Journal of Taibah University for Science**, 2015.

SALES, G. W. P.; BATISTA, A. H. M.; ROCHA, L. Q.; NOGUEIRA, N. A. P. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 709-715, 2014.

SALGADO, J. M. **Guia dos funcionais: dieta alimentar para manter a saúde e evitar doenças**. Rio de Janeiro: Ediouro, p. 192, 2009.

SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; TOLEDO, C.E.M.; SACRAMENTO, L.V.S.; SAKURAGUI, C.M.; MELLO, J.C.P. Estudo morfológico comparativo das cascas e folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* - leguminosae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.3, n.26, p.362-368, 2007.

SANCHES, A. C. C; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 101-107, 2005.

SANTANA, R. S.; VIANA, A. DE C.; SANTIAGO, J. DA S.; MENEZES, M.; LOBO, I. M. F.; MARCELLINI, P. S. Consequências do uso excessivo de antimicrobianos no pós-operatório: o contexto de um hospital público. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 41, n. 3, p. 149-154, 2014.

SANTOS-FILHO, P. R.; FERREIRA, L. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n.6, p.1000-1005, 2011.

SANTOS, L. M. **Obtenção de proantocianidinas do barbatimão e avaliação da toxicidade sobre células de tumor mamário humano MDA-MB-435 e MCF-7**. 2009. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. Alfenas/MG.

SANTOS, L. S.; BERNARDES, R. C.; MAGALHÃES, L. M.; SIQUEIRA, F. S.; KHOURI, S. **Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionas**. Anais do XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos: UNIVAP, p. 1–5, 2009b.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; BATISTA, F.; SANTOS, L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 552-556, 2006.

SANTOS, S. C; COSTA, W. F; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; Seraphin, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 292-9, 2002.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010.

SANTOS, V. R.; GOMES, R. T.; OLIVEIRA, R. R.; CORTÉS, M. E.; BRANDÃO, M. G. L. Suscetibilidade de microorganismos patogênicos orais a extratos aquosos e etanólicos de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **International Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2009a.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. Elsevier. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3875-3883, USA. 1991.

SCALON, V. R. **Revisão taxonômica do gênero *Stryphnodendron* Mart. (leguminosae-mimosoideae)**. 2007. 273 f. Tese (Doutorado em Ciências, na Área de Botânica). Universidade de São Paulo, USP, São Paulo.

SCHNEIDER, C. D; OLIVEIRA, A. R; Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v. 10, n. 10, p. 308-13, 2004.

SCHREUDER, T. H.; EIJSVOGELS, T. M.; GREYLING, A.; DRAIJER, R.; HOPMAN, M. T. E.; DICK, H. J. Thijssen Effect of black tea consumption on brachial artery flow-mediated dilation and ischaemia- reperfusion in humans. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 145-51, 2014.

SEFFRIN, J. R.; ADAMS, C.; WILD, C. Apresentação. In: Jemal A, Vineis P, Bray F, Torre L, Forman D (Eds). **The Cancer Atlas**. Second Ed. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2014.

SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.

SEO, J.; LEE, S.; ELAM, M. L.; JOHNSON, S. A.; KANG, J.; ARJMANDI, B. H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. **Food Science & Nutrition**, v.2, n.2, p.174– 180, 2014.

SHAD, M. A.; NAWAZ, H.; REHMAN, T.; AHMAD, H. B.; HUSSAIN, M. Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: application of response surface methodology. **Journal Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 4467-4474, 2012.

SHARMA, S. B.; GUPTA, R. Drug development from natural resource: a systematic approach. Mini- **Medicinal Chemistry Reviews**, v. 15, p. 52-57, 2015.

SILVA, C. H. T. P. **Validação de metodologia analítica para matéria-prima e produto acabado contendo *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville**. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, p. 38-42, 2014.

SILVA, F. A. A.; TRAJANO, L. P. B.; NOGUEIRA, N. C.; SOUSA, K. S.; COÊLHO, M. L.; NUNES, M. R. C. M. Análise do consumo e custo de antifúngicos em um hospital universitário. **JCS HU-UFPI**, v. 1, n. 1, p. 61-8, 2018.

SILVA, J. N.; DRUMOND, R. R.; MONÇÃO, N. B. N.; PERON, A. P.; SOUSA, J. M. DE C.; CITÓ, A. M. DAS G. L.; FERREIRA, P. M. P. Estudo prospectivo sobre propriedades antineoplásicas de plantas da família Fabaceae: ênfase em *Mimosa caesalpinifolia*. **Revista GEINTEC**, v. 6, n. 3, p.3304-3318, 2016.

SILVA, L. A. F.; SILVA, J. A.; LIMA, C. R. O.; DAMBROS, C. E.; CARDOSO, V. S. **Uso popular do barbatimão**. In: SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I. Manual do barbatimão. Goiânia: Kelps, p. 79-85, 2010.

SILVA, L. R.; MARTINS, L. V.; BANTIM, I. F. C. DEUS, M. S. M.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. Flavonoids: Chemical composition, medical actions and toxicity. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SILVA, T. M. S.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G.; AGRA, M. F. Flavonoids and an alkalamide from *Solanum paludosum* Moric. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 479, 2002.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; FILHO, J. M. B.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507–511, 2006.

SIMÕES, J. A. Sobre o diagnóstico da candidíase vaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n.5, p. 233-4, 2005.

SIMONETTI, E.; ETHUR, M.E.; CASTRO, L.C.; KAUFFMANN, C.; GIACOMIN, A.C.; LEDUR, A.; AROSSI, K.; PACHECO, L.A.; GOETTERT, M.I.; FALEIRO, D.; FREITAS, E.M. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.2, supl. I, p.582-587, 2016.

SIMPSON, P. T.; GALE, T.; FULFORD, L. G.; REIS-FILHO, J. S.; LAKHANI, S. R. Pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ. **Breast cancer research**, v. 5, n. 5, p. 258-262, 2003.

SIQUEIRA, A. DE S. E.; GONÇALVES, J. G.; BALARO, M. L.; MENDONÇA, P. E. X. DE; MERHY, E. E.; LAND, M. G. P. Impacto econômico das internações, quimioterapias e afastamentos por Neoplasia Maligna de Mama no Brasil. **Revista de saúde coletiva e bioética - DIVERSITATES International Journal**, v. 8, n. 1, p. 69-87, 2016.

SITAREK P., SKAŁA E., WYSOKIŃSKA H.; WIELANEK, M.; SZEMRAJ, J.; TOMA, M.; ŚLIWIŃSKI, T. The effect of *Leonurus sibiricus* plant extracts on stimulating repair and protective activity against oxidative dna damage in CHO cells and content of phenolic compounds. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

SILVEIRA, L. M. S. OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N. DA; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p.124-128, 2009.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology Viticulture**, v. 28, p. 49–55, 1977.

SOARES, S. P.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Straphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. **Revista Odonto Ciência**, v. 2, n. 23, p. 141-144, mar. 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOBRINHO, T. J. S. P., CARDOSO, K.C.M., GOMES, T. L.B.; CARDOSO, K. C. DE M.; AMORIM, E. L. C. DE; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia chelantha*. **Química Nova**, v.33, n. 2, p.288-291, 2010.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.

SOUSA, C. M. M; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. DA; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. DE M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, R. M. **Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Plantas da Caatinga**. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE.

SOUZA, C. M. P; BRANDÃO, D. O.; SILVA, M. S. P.; PALMEIRA, A. C.; SIMÕES, M. O. S.; MEDEIROS, A. C. D. Utilização de Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande - Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.2, p.188-193, 2013.

SOUZA-MOREIRA, T. M; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOUZA, S. A. DE. **Estudo químico e avaliação da atividade antixidante da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química de Compostos Bioativos). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.

SOUZA, S. A. DE. **Estudo químico, atividade antinociceptiva, antifúngica e potencial antioxidante da geoprópolis produzida pela jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)**. 2016.

130 f. Tese (Doutorado em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE.

SOUZA, T. M. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae).** 2007. 181 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p.221-226, 2007a.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade antisséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparaçãocosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, v. 1, p. 71-5, 2007b.

SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias e fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2.ed. 2008.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014.** Lyon: IARC, 2014.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. **Assays related to câncer drug discovery.** In: Hostettmann K, (ed.). *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity.* London: Academic Press, p.71-133, 1990.

SUN, M.; CAO, H.; SUN, L.; DONG, S.; BIAN, Y.; HAN, J.; ZHANG, L.; REN, S.; HU, Y.; LIU, C. Antitumor activities of kushen: Literature review. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2012.

VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. *Phenolic compound biochemistry*, Springer, The Netherlands, 2006.

SVETAZ, L.; ZULJAN, F.; DERITA, M.; PETENATTI, E.; TAMAYO, G. *et al.* Value of the ethnomedicinal information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 137-158, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

THAKUR, N.; ARYA, V. Preliminary Phytochemical Analysis of the Extracts of Psidium Leaves. **Journal of Scientific Research**, v.19, n.11, p.1421-1424, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Doenças Fúngicas do Sistema Reprodutor.** In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VALCIC, S.; TIMMERMAN, B. N.; ALBERTS, D. S.; WÄCHTER, G. A.; KRUTZSCH, M.; WYMER, J.; GUILLÉN, J. M. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on

the growth of four selected human tumor cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 7, p. 461-468, 1996.

VANDEN, B. D. A; VLIETINCK, A. J. **Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants**. In: DEY, P.M. & HARBONE, J.D. (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, p.47.69, 1991.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGES, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.11, p.4608-15, 2005.

VANIN, A. B. **Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*)**. 2014. 139f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – UR, Erechim.

VASCONCELOS, L.C.S.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; PEIXOTO, M. H. P. Minimum Inhibitory Concentration of Adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) Gel Against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. **Brazilian Dental Journal**, v.17, n. 3, p. 223-7, 2006.

VASCONCELOS, M. C. A.; RODOVALHO, N. C. M.; POTT, A.; POTT, V. J.; FERREIRA, A. M. T.; ARRUDA, A. L. A.; MARQUES, M. C. S.; CASTILHO, R. O.; BUENO, N. R. Avaliação de atividade biológicas das cacas de *Stryphnodendron adstringens* Benth (leguminosae). **Revista Brasileira Farmacogogia**, v.14, n.2, p.121-127, 2004.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. DA S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VENCATO, S. B.; MARIA, L. B. L.; CAMPELO, D. S.; CORRÊA, D. S.; FERRAZ, A. DE B. F. Avaliação do perfil fitoquímico e potencial antioxidante do extrato aquoso de *Hymenaea courbaril*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n.14, p.55-66, 2016.

VERMA, M.; AMRESH, G.; SAHU, P. K.; MISHRA, N.; RAO, C.V.; SINGH, A. P. Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 1, p. 65-72, 2013.

VIEIRA, P. N.; VIEIRA, S. L. V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 21, n. 3, p. 209-212, 2017.

VILLAÑO, D. V. **Comparación de diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante del vino y su relación con el contenido polifenólico**. 2005. 257f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmacia, Universidade de Sevilla, Sevilla.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L; QUEVEDO, A. E. P. **Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais**. In: *Química de produtos naturais: novos fármacos e a*

moderna farmacognosia. (Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V. Editores), Itajaí: Ed: Univali, 5^a. Edição, p. 185-214, 2016.

VITAL, T. M.; REIS, C.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A.; CUNHA, L. C. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, n. 2, 2004.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023**. Organización Mundial de la Salud, 2013a. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/95008>. Acessado em 20 de janeiro de 2018.

WHO, World Health Organization. Global Health Observatory data repository. **Health Expenditure per Capita, all countries, selected years**. World Health Organization, 2013b. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.78?lang=en>. Acessado em: 8 de janeiro de 2018.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial Resistance due to Non-Human Antimicrobial Use**. Report of the Second WHO Expert Meeting Copenhagen, p. 29-31, 2007. Disponível em: http://www.who.int/foodborne_disease/resistanc. Acessado em 22 de janeiro de 2018.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 838-849, 2004.

YAMASHIRO, H.; TOI, M. Update of evidence in chemotherapy for breast cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 13, p. 3-7, 2008.

YAN, X.T.; LI, W.; SUN, Y.N.; YANG, S.; LEE, S.; CHEN, J.; JANG, H.; KIM, Y. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 5, p. 1397-402, 2014.

YANG, G.M.; YAN, R.; WANG, Z.X.; ZHANG, F.; PAN, Y.; CAI, B. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 5, p. 519-24, 2013.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed: Univali, 5^a. Edição, 527 p., 2016.

YU, P.; LIU, Q.; LIU, K.; YAGASAKI, K.; WU, E.; ZHANG, G. Matrine suppresses breast cancer cell proliferation and invasion via VEGF-Akt-NF- κ B signaling. **Cytotechnology**, v. 59, p. 219-229, 2009.

ZHANG, S.Y.; ZHENG, C. G.; YAN, X. Y.; TIAN, W. X. Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, 654-658, 2008.

ZIMERMAN, R. A. **Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana**. In: BRASIL. Ministério da Saúde. *Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados*. Brasília: Ministério da Saúde, p. 21-30, 2012.

ZHOU, X.; SETO, S.W; CHANG, D.; HOSEN, K.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V., CHAN, K.; BENSOUSSAN, A. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: A comprehensive review of methodology and current research. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 201, 2016.