



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente (PGCIAMB)
Mestrado em Ciências do Ambiente
Campus Universitário de Palmas

BIOPROSPECÇÃO PARA COMPOSTOS ANTIMICOBACTERIANOS

FRANCIANO DIAS PEREIRA CARDOSO



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente (PGCIAMB)
Mestrado em Ciências do Ambiente
Campus Universitário de Palmas

FRANCIANO DIAS PEREIRA CARDOSO

BIOPROSPECÇÃO PARA COMPOSTOS ANTIMICOBACTERIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente da Fundação Universidade Federal do Tocantins, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Galdino dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- C268b Cardoso, Franciano Dias Pereira.
 Bioprospecção para compostos antimicobacterianos. / Franciano Dias
 Pereira Cardoso. – Palmas, TO, 2017.
 102 f.
 Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
 – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
 Ciências do Ambiente, 2017.
 Orientador: Márcio Galdino dos Santos
 Coorientador: Aparecido Osdimir Bertolin
1. Ciências Ambientais. 2. Interdisciplinar. 3. Tuberculose. 4. Cerrado. I.
Título

CDD 628

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

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

TERMOS DE APROVAÇÃO

FRANCIANO DIAS PEREIRA CARDOSO

BIOPROSPECÇÃO PARA COMPOSTOS ANTIMICOBACTERIANOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente, da Universidade Federal do Tocantins.

Aprovada em: 18 / 09 / 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcio Galdino dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Tocantins (UFT)



Profa. Dra. Carla Simone Seibert
Universidade Federal do Tocantins (UFT)



Prof. Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento
Universidade Federal do Tocantins (UFT)

A minha família em especial esposa Márcia,
filha Beatriz, pais Ernane e Betania e a minha
avó Laura Prata (*in memoriam*). Amo todos
vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela conquista!

A minha Família, esposa Márcia Natalie e filha Beatriz pelo amor, paciência, incentivo, carinho, atenção, convivência, disposição, afeto e dedicação.

Aos meus pais Ernane e Betania pela educação, carinho, cuidados, atenção e amor.

A minha avó Laura Prata (*in memoriam*) pela grande ajuda nos momentos de dificuldade. Pelo apoio e gentileza, dedicação, cuidado e amor.

Aos meus irmãos Luiz Felipe e Tatiane pela convivência e carinho.

Ao prof. Dr. Márcio Galdino pela orientação, paciência, suporte e oportunidade e grande ajuda na realização deste estudo. Essencial para execução desta pesquisa, por permitir em trabalhar no laboratório de fitoquímica e cessão dos extratos para as análises laboratoriais.

Ao prof. Dr. Bertolin pela co-orientação, colaboração, ensinamentos na sala de aula e a atenção ao estudo.

A prof^a. Dr^a. Carla Seibert pelo suporte, disposição e atenção.

A prof^a. Dr^a. Liliana pela boa vontade, colaboração, atenção e apoio.

Aos todos os companheiros de pós-graduação, pela convivência, colaboração, aprendizado e incentivo.

Aos técnicos do Laboratório de Fitoquímica da UFT *campus* de Porto Nacional, pela disposição e boa vontade em providenciar os requisitos necessários para os ensaios.

Ao servidor Eclésio pela paciência e auxílio nos esclarecimentos quanto aos prazos e processos administrativos referentes ao programa do mestrado da UFT.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (LACEN), em especial a Diretora Márcia, e Coordenadoras Karla e Fátima, pela cooperação, acessibilidade da estrutura laboratorial e flexibilidade no horário de trabalho para que pudesse frequentar as aulas.

A companheira de trabalho Maria Helena, pelos ensinamentos, paciência e treinamento na área laboratorial envolvendo cultivo e manipulação da tuberculose.

Ao Centro de Referência Professor Hélio Fraga, em especial Dr^a. Fandinho pela capacitação técnica e fornecimento de cepas padronizadas.

Ao companheiro de trabalho Rafael pela amizade, boa vontade, paciência, pelas ideias e contribuições.

Aos professores e amigos Dr. Hebert Batista e Dr. Bruno Medrado pela base técnica e científica oportunizada na graduação e expressivos ensinamentos da vida.

Ao prof. Dr. Sergio de Albuquerque e Dra. Zulmira Aparecida, pela colaboração e estimada contribuição em algumas etapas do estudo.

Ao programa de Mestrado em Ciências do Ambiente da UFT pela oportunidade que foi dado para concretização deste curso.

A todos manifesto meu profundo apreço!

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras
respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi dividida em dois capítulos e um artigo que está anexado, submetido à publicação em revista científica na área de Ciências Ambientais.

A introdução apresentada foi produzida no contexto geral de todas as perspectivas abordadas neste trabalho.

O capítulo 1 reporta os aspectos epidemiológicos da tuberculose; os impactos desta doença sobre sistema de saúde nos diferentes níveis e a resistência aos fármacos disponíveis.

No capítulo 2, descreveu a importância do cerrado e os espécimes oriundas deste bioma que serviram de objeto de estudo laboratorial quanto as atividades farmacológicas antituberculose. As discussões foram baseadas em ensaios realizados por outros estudos.

RESUMO

A tuberculose representa um sério problema de saúde pública, com alta taxa de incidência, surgimento de formas multirresistentes e difícil tratamento. Torna-se necessário o desenvolvimento de novos compostos e as plantas são fontes destes recursos. O cerrado é possuidor de uma grande biodiversidade e detém potencial em conter espécimes com alguma atividade biológica. Neste estudo objetivou-se a execução de ensaios laboratoriais, a fim de determinar a atividade antimicobacteriana envolvendo dez extratos brutos de plantas presentes neste bioma: *Plathymentia reticulata*, *Ouratea spectabilis*, *Galactia glaucescens*, *Apuleia molaris*, *Dipteryx alata*, *Brosimum gaudichaudii*, *Tabebuia caraíba*, *Pterodon emarginatus*, *Terminalia fagifolia* e *Stachytarpheta sp.* Os resultados da pesquisa demonstraram que os extratos hidroalcoólicos de *O. spectabilis* e *A. molaris* tiveram expressivas concentrações inibitórias para *Mycobacterium tuberculosis* e demonstraram baixa toxicidade frente as células LLC-MK₂ e Vero. O fracionamento dessas duas amostras, relevou uma fração hexânica da *A. molaris* com significativa ação farmacológica frente a cepas H₃₇Rv, sendo caracterizada como possuidora de compostos promissores para futuros ensaios envolvendo atividade antituberculose.

Palavras-chave: *Apuleia molaris*; cerrado; H₃₇Rv; *Ouratea spectabilis*; tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis represents a serious public health problem, with a high incidence rate, the emergence of multiresistant forms and difficult treatment. It is necessary to develop new compounds and plants are sources of these resources. The Brazilian savanna vegetation has a great biodiversity and holds the potential to contain specimens with some biological activity. The objective of this study was determined the antimycobacterial activity involving ten crude extracts of plants present in this biome: *Plathymenia reticulata*, *Ouratea spectabilis*, *Galactia glaucescens*, *Apuleia molaris*, *Dipteryx alata*, *Brosimum gaudichaudii*, *Tabebuia caraíba*, *Pterodon Emarginatus*, *Terminalia fagifolia* and *Stachytarpheta* sp. The results of the research demonstrated that the hydroalcoholic extracts of *O. spectabilis* and *A. molaris* had significant inhibitory concentrations for *Mycobacterium tuberculosis* and showed low toxicity against LLC-MK₂ and Vero cells. The fractionation of these two samples revealed a hexanic fraction of *A. molaris* with significant pharmacological action against H₃₇Rv, being characterized as having promising compounds for future trials involving antituberculosis activity.

Keywords: *Apuleia molaris*; Brazilian savanna; H₃₇Rv; *Ouratea spectabilis*; tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visualização microscópica de micobactérias coradas em vermelho para ensaio de baciloscopia pela coloração de Zihel-Neelsen em amostra de escarro.....	18
Figura 2 – Distribuição da incidência de tuberculose estimada por 100.000 habitantes nas Américas no ano de 2014.....	22
Figura 3 – Mapa de distribuição de casos confirmados para Tuberculose, notificados ao SINAN, por município no Estado do Tocantins, nos anos de 2015 e 2016.	26
Figura 4 – Distribuição do bioma Cerrado no Brasil.....	30
Figura 5 – Mapa de distribuição de desmatamento do Cerrado ocorrido entre o período de 2010-2011.	33
Figura 6 – Ilustração da espécie <i>Plathymenia reticulata</i> Benth	34
Figura 7 - Ilustração da espécie <i>Ouratea spectabilis</i> (Mart.) Engl.	36
Figura 8 - Ilustração da espécie <i>Galactia glaucescens</i> Kunth	37
Figura 9 – Ilustração da espécie <i>Apuleia molaris</i> Spruce ex Benth (sinonímia <i>A. leiocarpa</i>) A) Espécie arbórea B) Fruto com três sementes.....	38
Figura 10 - Ilustração da espécie <i>Dipteryx alata</i> Vogel.....	39
Figura 11 – Ilustração da espécie <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.	40
Figura 12 – Ilustração da espécie <i>Tabebuia caraíba</i> (Mart.) Bureau	42
Figura 13 – Ilustração da espécie <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.....	43
Figura 14 – Ilustração da espécie <i>Terminalia fagifolia</i> Mart.	44
Figura 15 – Ilustração da espécie <i>Stachytarpheta</i> sp.....	45
Figura 16 - Crescimento após 28 dias de incubação com numerosas colônias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> – H37Rv (ATCC 27294) em meio Lowenstein Jensen. ..	50
Figura 17– Representação do modelo para execução do <i>screening</i> para atividade antimicobacteriana.....	52
Figura 18 – Para análise utilizando método colorimétrico, a manutenção da cor azul da resazurina é um indicativo de que não ocorreu o crescimento microbiano (A). Uma mudança na coloração para rosa ou avermelhada significa que houve crescimento microbiano (B).....	53
Figura 19 – Estruturas resazurina e resorufina.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 20 – Modelo padronizado para procedimento de diluição seriada das amostras e controles, no intuito de determinar a Concentração Inibitória Mínima frente a cepa H ₃₇ Rv (<i>M. tuberculosis</i>).	55
Figura 21 – Representação da metodologia utilizada na partição dos extratos.	57
Figura 22 – Imagem microscópica de células cultivadas em garrafas a 5% de CO ₂ a 37° C de temperatura. (A) Confluência de células de linhagem LLC-MK2. (B) Confluência de células de linhagem Vero.....	60
Figura 23 - Fluxograma de todas etapas executadas na pesquisa.....	61
Figura 24 – Microplaca de 96 poços com os extratos: <i>Ouratea spectabilis</i> (2A-12A); <i>Apuleia molaris</i> (2B-12B); <i>Dipteryx alata</i> (2C-12C); <i>Brosimum gaudichaudii</i> (2D-12D); <i>Tabebuia caraiba</i> (2E-12E); <i>Stachytarpheta</i> sp. (2F-12F), para definição de suas concentrações inibitórias mínimas.....	63
Figura 25 – Gráfico de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos selecionados nos ensaios de triagem.	64
Figura 26 – Determinação de CIM para as frações Hexânica (Hex), Diclorometânica (DMC) e Aquosa (H ₂ O) dos extratos de <i>O. spectabilis</i> (Ext2) e <i>A. molaris</i> (Ext 4) frente a cepa <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.....	66
Figura 27 - Citotoxicidade (IC ₅₀) dos extratos brutos de <i>O. spectabilis</i> e <i>A. molaris</i> em células Vero (1,0x 10 ⁵ células/mL).	67
Figura 28 - Citotoxicidade (IC ₅₀) dos extratos brutos de <i>O. spectabilis</i> e <i>A. molaris</i> com células LLC-MK ₂ (1,0x 10 ⁵ células/mL).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resistência gênica associada aos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.....	20
Tabela 2 – Posicionamento dos países na região das Américas com maior número de casos estimados para TB em 2014.....	21
Tabela 3 – Relação dos dozes países com maiores estimativas para MDR-TB, na região das Américas, 2014.	23
Tabela 4 - Relação dos 10 países com número estimado de HIV-positivo associado aos casos de Tuberculose na região das Américas, 2014.....	24
Tabela 5 – Relação de extratos brutos de plantas do cerrado utilizados no processo de triagem, com suas respectivas identificações	48
Tabela 6 – Ensaio de detecção preliminar qualitativa de alguns grupos metabólicos secundários	56
Tabela 7 – Relação dos extratos que foram avaliados quanto à atividade antimicobacteriana, frente à cepa <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv (ATCC 27294), na concentração de 250 µg/mL	62
Tabela 8 – Testes de identificação fitoquímica preliminar qualitativa para extratos hidroalcoólicos liofilizados de <i>Ouratea spectabilis</i> e <i>Apuleia molaris</i> , duas espécies vegetais nativas do cerrado tocantinense.....	65
Tabela 9 – Rendimento e CIM em diferentes frações obtidas dos extratos brutos de <i>Ouratea spectabilis</i> e <i>Apuleia molaris</i> contra <i>M. tuberculosis</i>	67
Tabela 10 – Relação das plantas do cerrado que foram utilizadas nos ensaios, com a descrições de uso popular e atividades biológicas associada a presença de substâncias bioativas segundo a literatura	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AcOEt	Acetato de etila
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMI	Concentração mínima inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
EtOH	Etanol
H ₂ O	Água
hab.	Habitantes
LACEN-TO	...	Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins
LJ	Löweinstein Jensen
LLC-MK ₂	Linhagem epitelial de tecido renal de mamacos <i>rhesus</i> (Macaca mulatta)
MABA	<i>Microplate Alamar Blue Assay</i>
MDR	Multidroga Resistente (<i>Multidrug Resistant</i>)
MetOH	Metanol
MS	Ministério da Saúde
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide]
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
P.A.	Puro para análise
PAHO	Pan American Health Organization
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
RMP	Rifampicina
SR	Sintomático Respiratório
TB	Tuberculose
TO	Tocantins
UFT	Fundação Universidade Federal do Tocantins
XDR	Extensivamente Resistente às Drogas (<i>Extensively drug-resistant</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Graus Celsius
%	Percentual
mbar	Milésimos de bar
g	Gramas
mg	Miligramas
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
<	Menor que
>	Maior que
nm	Nanômetros
m	Metros
cm	Centímetros
cm ³	Centímetro cúbico
km ²	Quilômetro quadrado
US\$	Dólares americanos
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CL ₅₀	Concentração Letal de 50%

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIV
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA TUBERCULOSE.....	18
3.1 TUBERCULOSE	18
3.2 EPIDEMIOLOGIA	21
3.2.1 Contexto Mundial	21
3.2.2 Contexto Nacional	24
3.2.3 Contexto Estadual.....	25
4 CAPITULO 2 - BIOPROSPECÇÃO	27
4.1 PLANTAS COMO FONTE DE NOVOS COMPOSTOS ATIVOS	27
4.2 CERRADO	30
4.3 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES SELECIONADAS	34
4.3.1 <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	34
4.3.2 <i>Ouratea spectabilis</i> (Mart. ex Engl.) Engl.....	35
4.3.3 <i>Galactia glaucescens</i> Kunth	36
4.3.4 <i>Apuleia molaris</i> Spruce ex Benth.....	37
4.3.5 <i>Dipteryx alata</i> Vogel.....	39
4.3.6 <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.....	40
4.3.7 <i>Tabebuia caraiba</i> (Mart.) Bureau.....	41
4.3.8 <i>Pterodon emarginatus</i> (Vogel).....	42
4.3.9 <i>Terminalia fagifolia</i> Mart.	44
4.3.10 <i>Stachytarpheta</i> sp.....	45
5 JUSTIFICATIVA	47
6 METODOLOGIA.....	48
6.1 MATERIAL BOTÂNICO	48
6.2 PREPARO DA MICOBACTÉRIA	49

6.3 PREPARO DOS EXTRATOS E DO ANTIBIÓTICO PADRÃO	50
6.4 SCREENING	51
6.5 PRINCÍPIO DO MÉTODO POR RESAZURINA (I.E. ALAMAR BLUE)	53
6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E CIM	54
6.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA	55
6.8 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	57
6.9 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	58
6.10 PRINCÍPIO DO MÉTODO FORMAZAN	59
6.11 LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS	60
7 RESULTADOS	62
8 DISCUSSÃO	70
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	80
ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Tuberculose (TB) é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), ao qual repercute mundialmente sobre questões de saúde pública. Apesar dos avanços para quimioterapia e no desenvolvimento da vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), esta enfermidade apresenta a maior mortalidade mundial para doenças infecciosas, superando o HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) e malária juntos (WHO, 2016).

A tuberculose é considerada uma doença negligenciada, com pouco investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas drogas (OLIVEIRA et al., 2011). Seu tratamento é complexo e extensivo, isto contribui para o surgimento de novas cepas resistentes (FALZARI et al., 2005).

A progressão da TB é principalmente definida pela integridade de resposta imune do hospedeiro, para que possa ser eficaz no controle microbiano, através de ações com macrófagos, linfócitos CD4, *interferon gama* e fator de necrose tumoral (OLIVEIRA et al., 2011).

No cenário nacional, a epidemiologia da tuberculose segue a tendência mundial, sendo a principal causa de morte entre pacientes com HIV, ocupa também a quarta causa de morte por doenças infecciosas (MS, 2014). Entretanto há uma distribuição geoespacial heterogênea de casos para TB em diferentes regiões do Brasil, fortemente associada às condições socioeconômicas (OLIVEIRA et al., 2011).

O termo Multidroga Resistente (MDR) refere-se a toda cepa de *M. tuberculosis* cuja resistência seja simultânea aos antibióticos: Rifampicina e Isoniazida. Já o termo Extensivamente Resistente às Drogas (XDR) se refere à resistência aos dois de antibióticos anteriormente citados, mais uma Fluoroquinolona e um dos três fármacos injetáveis (Amicacina, Kanamicina e/ou Capreomicina) utilizados na segunda linha de tratamento para TB (BROSSIER et al., 2010).

Os casos de TB-MDR e XDR são importantes objetos de monitoramento para saúde pública; comumente estão associadas as altas taxas de mortalidade, com comorbidade nos casos de indivíduos HIV-positivo (WHO, 2003).

Entre os anos de 2000 a 2007, ocorreu uma elevação mundial de 65% de casos de tuberculose multirresistente – TB-MDR (KRITSKI, 2010). Já em 2013 foram 480 mil casos para TB-MDR e cerca de 210 mil indivíduos foram a óbitos (WHO, 2014).

A elevação na última década dos casos para MDR\XDR, preocupa, visto que esses portadores não respondem adequadamente a primeira linha de medicamentos composto por: Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB), Pirazinamida (Z) e Estreptomicina (SM). Normalmente requer longo período de tratamento, associado a elevados custos, múltiplos efeitos colaterais e baixa taxa de cura (KHALIFA et al., 2013).

Há uma dificuldade de tratamento para cepas multirresistentes, em parte está relacionada a falta de novos antibióticos para tuberculose (KAUSHIK et al., 2017). A elucidação de novas drogas representa um desafio, com necessidade de reduzir o tempo de tratamento e uma melhora efetiva frente às cepas *M. tuberculosis* multidrogas resistentes (ORME, 2001).

Neste contexto os produtos naturais constituem fontes promissoras para a bioprospecção de novas moléculas e/ou modelos com potencialidades para desenvolvimento de novos fármacos (ABUZEID et al., 2014; PHILLIPSON, 2007). O sistema baseado nas plantas continua a desempenhar um papel essencial nos cuidados de saúde e sua utilização ocorre por diferentes culturas e amplamente documentado (CHARIANDY et al., 1999; CRAGG; HOLETZ et al., 2002; NEWMAN, 2013; SOUZA et al. 2004).

Há estudos com extratos vegetais cada vez mais frequentes nas pesquisas de bioprospecção, a fim de elucidar novos compostos com atividade antimicobacteriana (i.e. antituberculose) em especial para controle de cepas MDR e XDR (ABUZEID et al., 2014; 20AGARWAL; CHAUHAN, 2015; AKIHISA et al., 2005; MOREIRA et al., 2013; PAVAN et al., 2009; RAMOS et al., 2008)

A utilização de plantas através do conhecimento de populações tradicionais para tratamento de enfermidades – estudo etnofarmacológico, é útil na investigação científica de agentes biologicamente ativos (COELHO et al., 2005; MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

O Cerrado é considerado um “ *hotspot* “, ou seja, uma área com concentrações excepcionais de espécies endêmicas e que está sofrendo grande perda de áreas naturais (MYERS et al., 2000). De acordo com o IBAMA, a flora dessa região possui cerca de 4 a 7 mil espécies de plantas diferentes, sendo 4.400 endêmicas e muitas delas são utilizadas pela população local como alimentos e medicamentos (CHAVES, 2011).

Contrapondo este cenário promissor, está o avanço do agronegócio sobre o bioma Cerrado. A segunda maior formação vegetal brasileira, superado apenas pela

Floresta Amazônica. São cerca de 1.783 milhões de km² espalhados por 10 estados, ocupando 22% do território brasileiro (JEPSON, 2005).

No entanto, segundo o estudo de Machado et al. (2004), 880.000 Km² de Cerrado já foram destruídos. Atividades como a agropecuária, produção de carvão vegetal, especulação imobiliária e construção de hidroelétricas tem levado a supressão da biodiversidade.

Segundo Tansey et al. (2004) estimou-se que 67% das áreas queimadas no Brasil em 2000 estavam no Cerrado. Em 1998, 49% da bacia do rio Tocantins tinha sido convertida em áreas de plantio e pastagens, aumentando a descarga de adubo químico e resíduos orgânicos no rio em 24% (COSTA; BOTTA; CARDILLE, 2003).

Diante desse cenário de urgência e com estimado potencial farmacológico, o presente trabalho teve como objetivo a realização de triagem (*i.e. screening*) em extratos vegetais do cerrado, a fim determinar seu potencial para atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinação da atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, de extratos vegetais nativos do cerrado.

2.2 Objetivos Específicos

Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos com potencial farmacológico sobre *Mycobacterium tuberculosis*;

Obter as frações ativas de extratos e suas respectivas CIMs;

Analisar a citotoxicidade (IC₅₀) dos extratos sobre células de mamíferos (LLC-MK₂ e VERO).

3. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA TUBERCULOSE

3.1 Tuberculose

Mycobacterium tuberculosis é uma micobactéria aeróbica, gram-positiva, não móveis, em forma de bastão, pertencente à ordem Actinomycetales da Família Mycobacteriaceae (COPP, 2003). São bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), corados pelo método de Zihel-Neelsen, microrganismos intracelulares, o que dificulta seu tratamento (Figura 1).

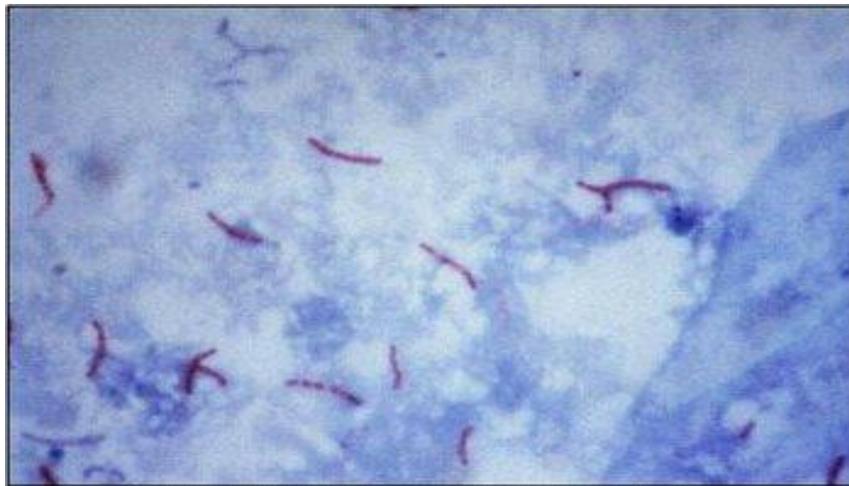


Figura 1 – Visualização microscópica de micobactérias coradas em vermelho para ensaio de baciloscopia pela coloração de Zihel-Neelsen em amostra de escarro.

Fonte: CDC, 2017¹.

Entre os principais obstáculos para o sucesso na prevenção e tratamento da TB estão: na dificuldade da identificação de indivíduos com infecção latente; incapacidade dos sistemas de saúde em realizar rápido diagnóstico para todos os casos; longa duração no tratamento e disseminação mundial de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a maioria dos fármacos disponíveis (ZIGNOL et al., 2016).

Segundo Dalcolmo et al. (1999) a deterioração do sistema de saúde pública no Brasil, associada à piora das condições socioeconômicas, as crescentes taxas de

¹ Center for Disease Control and Prevention- CDC. Bacteriological Examination – Examination of AFB Smears. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tb/webcourses/tb101/page3294.html>>. Acesso em: 15 de Jun de 2017.

abandono e pelo baixo potencial dos esquemas de retratamento têm proporcionado elevação nos casos de resistências às drogas anti-TB.

O aumento dos custos envolvidos na assistência e controle da TB deve-se, também ao crescimento de casos resistentes a diferentes tipos de quimioterápicos (COSTA et al., 2005).

Uma análise sistemática realizada por Laurence; Griffiths; Vassall (2015) envolvendo custos de diversos serviços de saúde e usuários no tratamento para TB, resultou que de forma geral há uma elevação expressiva de até 3.532% de gastos no fornecimento de medicamentos aos indivíduos com TB-MDR (US\$ 11.623), em relação aos usuários com TB sensível as drogas (US\$ 329).

Costa et al. (2005) avaliou que o custo médio do tratamento no serviço público da Bahia no âmbito ambulatorial, por paciente para os casos novos de TB representam US\$ 103, enquanto que um indivíduo com cepa multirresistente contribui para elevação de 27 vezes em relação as cepas sensíveis ao tratamento.

As características intrínsecas da micobactéria como crescimento lento e alta capacidade de contágio também desestimulam os esforços na tentativa de elucidar novas drogas anti-TB (CANTRELL; FRANZBLAU; FISHER, 2001).

O tratamento da tuberculose é extenso (6 a 12 meses), com alta possibilidade de falência e/ou abandono do esquema terapêutico contribui para o surgimento de cepas multirresistentes (RAMOS et al., 2008).

Para o tratamento, far-se-á uso de quatro drogas de primeira linha: rifampicina (RMP), isoniazida (INH), etambutol (EM), pirazinamida (PZA) e com uso da estreptomicina quando há falha no esquema terapêutico inicial (PHELAN et al., 2016).

O regime padrão de 9 a 12 meses é recomendado pela Organização Mundial de Saúde – OMS para todos os pacientes com MDR pulmonar não resistentes a drogas de segunda linha de tratamento (WHO, 2016).

A TB é considerada uma das principais causas de morte no mundo (RAMOS et al., 2008). Os dados epidemiológicos deste agravo são motivos de preocupação, fato que a OMS reconhece como importante problema de saúde pública e incentiva a investigação e desenvolvimento de novas drogas antimicobacterianas, mais eficazes com menores custos e efeitos adversos.

O acesso ao tratamento da TB apresenta dificuldades, principalmente nos países com baixos rendimentos, cujo financiamento na maior parte (90%) é obtido através de doações internacionais, geralmente insuficientes, como o ano de 2016, que

foram necessários US\$ 8,3 bilhões de dólares, entretanto apenas US\$ 2 bilhões foram investidos para o programa de controle de TB (WHO, 2016).

A resistência do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) às drogas está associada ao acúmulo de mutações nos genes que codificam o alvo das drogas e/ou na sua conversão enzimática. A baixa adesão ao tratamento contribui para o desenvolvimento de formas MDR/XDR (SANTHOSH; SURIYANARAYANAN, 2014). Segundo Phelan et al. (2016) nem toda mutação resultará algum grau de resistência, considerando essencial a realização de testes de sensibilidade/resistência.

Algumas destas mutações já estão bem caracterizadas, principalmente aquelas associadas às drogas de primeira linha empregadas no tratamento de TB, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resistência gênica associada aos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.

Fármaco/droga	Principal mutação no(s) Gene(s)	% de Resistência Fenotípica
Rifampicina	<i>rpoB</i> *	96*
Etambutol	<i>embB</i> *	57 a 92***
Isoniazida	<i>katG</i> * <i>inhA</i>	60 a 80*
Pirazinamida	<i>pncA</i> ** (Rv2043c) <i>rpsL</i> *	85-90*
Estreptomicina	<i>rrs</i> <i>gidB</i>	54*

* PHELAN et al. (2016); ** ZIGNOL et al. (2016); *** BROSSIER et al. (2010)

Há um avanço quanto a disponibilidade de ferramentas para diagnóstico, como a recente implantação no sistema público de saúde do Brasil, do teste rápido molecular à rotina laboratorial, capaz de detectar o bacilo do complexo *M. tuberculosis*, bem como avaliar sua resistência genotípica (*rpoB*) à rifampicina (LIMA et al., 2017).

A Rifampicina (RMP) é um antibiótico semissintético que se liga a RNA β polimerase e inibe a sua transcrição, ao qual *rpoB* é responsável pela sua codificação, quando presente a mutação poderá causar resistência a RMP (MACHADO et al., 2015). Enquanto que a Isoniazida (INH) é uma pró-droga que inibe a biossíntese do ácido micólico através da ligação do carreador de proteína redutase enoyl-acyl que é

codificada pelo gene de *inhA*. Esta pró-droga necessita de ser ativada pela enzima catalase-peroxidase que é codificada pelo gene *katG* (GAUTÉRIO et al., 2008).

A resistência aos antibióticos pirazinamida e ofloxacina quando presente, muito provável que ocorra também para rifampicina, tal situação compromete o protocolo terapêutico e eleva os custos do tratamento (ZIGNOL et al., 2016).

Os estudos epidemiológicos de resistência aos fármacos anti-TB, são importantes e necessários, pois são capazes de fornecer indicadores que avaliam a qualidade do tratamento e a eficiência do programa de controle da tuberculose (RIBEIRO et al., 2004).

3.2 Epidemiologia

3.2.1 Contexto Mundial

Em 2015 foram estimados 10,4 milhões de casos novos para TB no mundo, sendo que 5,9 milhões (56%) incidiram em homens, seguidos das mulheres com 3,5 milhões (34%) e crianças com 1,0 milhões (10%). Os indivíduos portadores do HIV representaram 1,2 milhões (11%) de todos os novos casos de TB (WHO, 2016).

No ano de 2014 o Brasil esteve em 1º lugar das Américas, com maior nº absoluto de casos para TB (n= 90.000 casos), conforme disposto na Tabela 2.

Tabela 2 – Posicionamento dos países na região das Américas com maior número de casos estimados para TB em 2014

Nº	País	Nº casos estimados para Tb	%
1	Brasil	90.000	32,5
2	Peru	37.000	13,3
3	México	26.000	9,4
4	Haiti	21.000	7,6
5	Colômbia	16.000	5,8
6	Bolívia	13.000	4,7
7	Argentina	10.000	3,6
8	Estados Unidos da América	9.900	3,6
9	Guatemala	9.200	3,3
10	Equador	8.600	3,1
11	Venezuela	7.300	2,6
12	República Dominicana	6.200	2,2
	Outros	23,041	8,3

Fonte: PAHO, 2015.

Sobre a incidência de TB, o país ocupou o 10º lugar (46 casos/100.000 hab.), com destaque para Haiti que apresentou 200 casos por 100.000 hab., cuja taxa foi a mais alta entre todos os países das Américas (PAHO, 2015).

Segundo a estimativa da Organização Mundial de Saúde – OMS, no ano de 2015, 1,4 milhões de pessoas foram a óbito por Tuberculose, e 0,4 milhões de mortes por TB em portadores de HIV. Neste período, apenas 55% de indivíduos notificados com tuberculose obtiveram acesso aos exames de HIV (WHO, 2016).

A Figura 2 possibilita uma visão macro sobre o cenário dos casos de tuberculose nas Américas no ano de 2014. Neste período houve uma estimativa de 23.000 óbitos, o que representa uma incidência de 2,3 mortes a cada 100.000 hab. para todas as formas da doença e 26% (5.900) mortes associadas a indivíduos HIV-positivo. O Brasil (7.770) e Haiti (2870) representaram 46% de todos esses óbitos do continente Americano (PAHO, 2015).

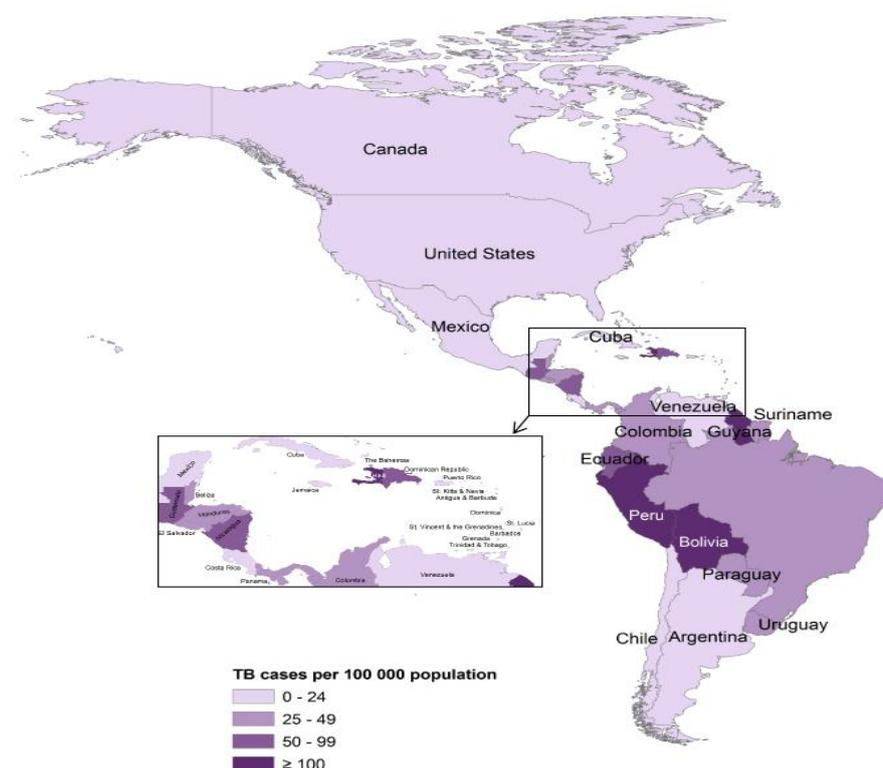


Figura 2 – Distribuição da incidência de tuberculose estimada por 100.000 habitantes nas Américas no ano de 2014.

Fonte: PAHO, 2015.

No contexto mundial os casos de MDR-TB, em 2015 foram cerca de 480.000 novos casos, destes 100.000 foram resistentes a rifampicina (WHO, 2016).

No continente americano cerca de 6.900 casos de TB pulmonar foram notificados em 2014 como MDR, cuja maioria (55%) proveniente das regiões do Peru e Brasil, cujas notificações representam 2,3% dos casos novos e 11% para situações de retratamento (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação dos dozes países com maiores estimativas para MDR-TB, na região das Américas, 2014.

Nº	País	Nº casos estimados para Tb	%
1	Peru	2.000	29,0
2	Brasil	1.800	26,0
3	México	500	7,3
4	Haiti	450	6,6
5	Argentina	360	5,2
6	Colômbia	360	5,2
7	Equador	310	4,5
8	Bolívia	210	3,1
9	Venezuela	150	2,2
10	República Dominicana	150	2,2
11	Guatemala	130	1,9
12	Estados Unidos da América	110	1,6
	Outros	329	4,8

Fonte: PAHO, 2015.

Apesar de existir uma tendência na redução no quadro associativo de HIV-positivo com tuberculose nos últimos anos, ainda há um expressivo quantitativo (36.000) na região das Américas, com destaque para o Brasil e Haiti (Tabela 4), visto que a Tb é uma das infecções oportunistas mais comuns em indivíduos HIV-positivo (CHAIMOWICZ, 2001).

Um indivíduo co-infectado (*M. tuberculosis* e HIV) apresenta um risco entre 6 a 100 vezes maior em adoecer de tuberculose em relação a um infectado por apenas com *M. tuberculosis*, cuja letalidade da Tb em infectado pelo HIV pode ser 2,4 a 19 vezes maiores que aqueles não infectados (BOLLELA et al., 1999).

Tabela 4 - Relação dos 10 países com número estimado de HIV-positivo associado aos casos de Tuberculose na região das Américas, 2014

Nº	País	Nº casos de HIV-TB	%
1	Brasil	13.000	36,0
2	Haiti	4.400	12,0
3	México	2.300	6,4
4	Peru	2.300	6,4
5	República Dominicana	1.600	4,4
6	Colômbia	1.500	4,2
7	Equador	1.200	3,3
8	Venezuela	1.100	3,1
9	Guatemala	910	2,5
10	Estados Unidos	710	2,0
11	Honduras	450	1,2
12	Bolívia	390	1,1
	Outros	6.176	17,1

Fonte: PAHO, 2015.

3.2.2 Contexto Nacional

Os indicadores epidemiológicos para TB no Brasil, referente ao ano de 2014, publicado pelo Ministério da Saúde - MS (BRASIL, 2016), registraram um elevado percentual (82,2%) de detecção de casos novos. Apesar de que há uma redução na incidência de 36,7 (BRASIL, 2014) para 34,1 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2016).

A incidência maior recai sobre gênero masculino, o que representa mais que o dobro (46,2 casos/100.000 habitantes) em relação ao feminino (22,3 casos/100.000 hab.), com pouca diferenciação entre faixas etárias de 15 a 59 anos (43,1 casos/100.00 hab.) e 60 anos e mais (43,4 casos/100.000 hab.) (BRASIL, 2016).

A prevalência de TB recaía sobre os homens na maioria dos estados do país, cuja forma pulmonar é a mais frequente (SELIG et al., 2004). A mudança na proporção de casos diagnosticados para TB em idosos (< 60 anos), assemelha-se a transição ocorrida nos países da Europa na década de 90 (CHAIMOWICZ, 2001).

Existe uma tendência na redução da mortalidade por TB no país, cuja incidência representava 2,8/100.000 hab. no ano de 2004 para 2,2/100.000 hab. em 2014. Entretanto, o risco de morte é diferenciado entre cada unidade federativa, as vezes

superior à média nacional, cujos coeficientes concentraram-se sobre regiões Nordeste (2,5), Norte (2,4) e Sudeste (2,3) do país (BRASIL, 2016).

Em relação ao período de 2005 a 2014 (BRASIL, 2016), a mortalidade por TB pulmonar foi a mais frequente em todos os anos do estudo, com média anual de 3.600 óbitos e coeficiente de mortalidade em 1,7 casos por 100.000 habitantes. Somente no ano de 2014, esta forma representou 76,5% do total de óbitos (n = 4.374 casos).

No ano de 2014, das 2.729 mortes por causas básicas diversas onde a TB aparece como causa associada, a maior parte (65%) representa óbitos por AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*) associado a TB (BRASIL, 2016). O óbito por TB representa a dificuldade de acesso ao diagnóstico e ao tratamento, pois é considerada uma causa evitável (SELIG et al., 2004).

A confirmação de resistência micobacteriana (MDR, XDR) representa um risco a saúde pública. De acordo com dados do MS (2016), apenas no ano de 2014, foram notificados 1.171 casos com algum tipo de resistência (Monorresistente, Multirresistente, Polirresistente e/ou Extensivamente resistente).

Um estudo multicêntrico conduzido por Dalcolmo et al. (1999), demonstrou que o perfil etário de multirresistência estaria mais associado a um grupo indivíduos não incluso na cadeia produtiva do país.

Estabelecida pelo Ministério da Saúde, como uma doença de notificação compulsória (BRASIL, 2016b), a tuberculose possui um significativo percentual de subnotificação, passível de verificação através do cruzamento de dados do SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação e o SIM – Sistema de Informação sobre Mortalidade. Em 2014 dos 39,0% (n = 1.848) óbitos de Tb por causa básica e 38,3% (n = 1.044) por causa associada, ambos notificados no SIM e nenhum destes constavam no banco de dados do SINAN.

3.2.3 Contexto Estadual

O Estado do Tocantins possui uma incidência de TB menor que a média nacional (10,7 casos / 100.000 hab.) (BRASIL, 2017). A diferença entre os gêneros se mantém, com os homens (15,3/100.000 hab.) em maior proporção em relação às mulheres (6,9/100.000 hab.). A faixa etária com mais de 60 anos representa o grupo mais impactado (30,5/100.000 hab.) (BRASIL, 2016).

Entre as capitais do país, Palmas possui uma das menores taxas de incidência, para TB, com 11,8 casos por 100.000 hab. (BRASIL, 2017). Contudo, não se pode afirmar que tais indicadores sejam sustentáveis, visto que, há regiões do Estado no qual não há notificações de casos e/ou muito abaixo da expectativa, o que sugere subnotificações e/ou falha no serviço de saúde para o diagnóstico de sintomáticos respiratórios (SR).

Os coeficientes de incidência de TB tanto para o Estado do Tocantins, quanto da Capital Palmas, apresentam certa similaridade e estão próximos a nova meta estabelecida pela OMS, que até o ano de 2035, seja alcançada uma incidência de 10/100 mil hab. (WHO, 2015).

A OMS preconiza que a proporção de abandono do tratamento para Tb seja inferior a 5%. Entretanto, o Brasil, em 2016, alcançou um alto percentual (10,4%), como também no Estado do Tocantins (5,9%) e sua capital Palmas (5,8%) (BRASIL, 2017).

Sobre o quadro de subnotificação para TB no Tocantins é perceptível quando analisado o mapa de distribuição dos casos confirmados e notificados ao SINAN (Figura 3).

Em ambos os períodos analisados (Figura 3), há similaridade quanto aos representantes com maiores registros de notificações para casos para Tb: Palmas (2015, n = 51; 2016, n = 12) Araguaína (2015, n = 41; 2016, n = 13), e Porto Nacional (2015; n = 9; 2016, n= 7).

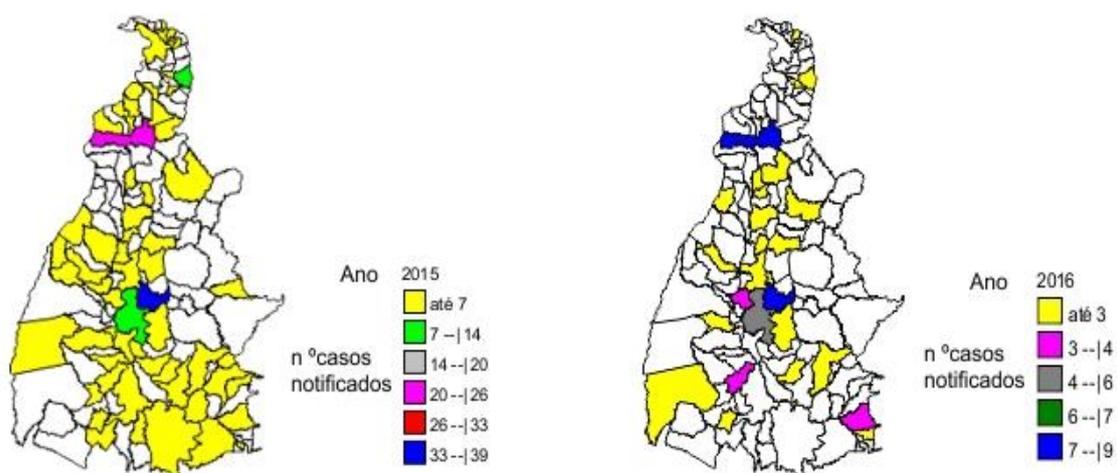


Figura 3 – Mapa de distribuição de casos confirmados para Tuberculose, notificados ao SINAN, por município no Estado do Tocantins, nos anos de 2015 e 2016.

Nota: Os dados estão sujeitos à revisão.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017) através dos dados obtidos do Ministério da Saúde/SVS - SINAN (2017).

Há uma redução no percentual (55,56%) de municípios notificantes entre 2015 (n = 45) e 2016 (n = 20), uma elevação no quantitativo (2015, n = 94; 2016, n = 119) de municípios que não registraram nenhum caso de tuberculose, redução no número de casos notificados (2015, n = 186; 2016, n = 59), tudo isso gera preocupação no âmbito da saúde pública (Figura 3).

A detecção de novos casos em TB implica na busca ativa de indivíduos sintomáticos respiratórios (SR). Está estabelecido aos agentes comunitários de saúde e o programa saúde da família a sua execução, entretanto, isto não significa que de fato será incorporado no cotidiano de trabalho (MUNIZ et al., 2005).

Os indivíduos SR são caracterizados pelo Ministério da Saúde por demonstrarem sinais de tosse e expectoração persistentes com mais três semanas. Existe uma estimativa que 1% da população geral seria portadora de TB, por isso recomenda a realização de diagnóstico laboratorial (i.e. baciloscopia) em algum momento do ano (BRASIL, 2011).

O baixo percentual de casos novos de tuberculose pulmonar com diagnóstico laboratorial, representa um indicador de baixa qualidade para vigilância epidemiológica e assistência em saúde (BRASIL, 2017).

Em 2016 o Tocantins alcançou um percentual de 76,4% e Palmas 80,8%, para casos novos de TB pulmonar confirmados por critério laboratorial. Estes valores foram superiores à média nacional (71,6%). Quanto ao teste de sensibilidade, neste período, apenas 14,3% foram realizadas no Estado, já a Capital obteve 100% de execução, cuja média nacional tenha sido de 50,2% (BRASIL, 2017).

Os casos de multirresistências (MDR e XDR) são raros no Estado, corroborado com a notificação de apenas um caso em 2014 (BRASIL, 2016). A mortalidade segue reduzida (0,7/100.000 hab.), porém subnotificada como o restante do país, cuja forma pulmonar a principal causa de óbito (0,5/100.000 hab.).

4 CAPITULO 2 - BIOPROSPECÇÃO

4.1 Plantas como fonte de novos compostos ativos

As plantas são uma fonte de recursos para substâncias bioativas, pois produzem moléculas estruturais altamente complexas (LI; VEDERAS, 2009). A pesquisa por

moléculas bioativas em plantas usadas na medicina popular tem-se elevado nos últimos anos (NAZATO et al., 2010).

Cerca de 25% dos fármacos prescritos no mundo são provenientes de plantas; das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente originárias de plantas e um número significativo de fármacos sintéticos são obtidos destes precursores naturais (RATES, 2001).

Entre os anos de 1983 a 1994 surgiram 529 novos fármacos, dos quais 39% foram a partir de produtos naturais e/ou derivados semissintéticos (PINTO et al., 2002).

Uma grande parcela da população mundial não dispõe de acesso aos serviços de saúde e de tratamento farmacológico convencional. Portanto, as plantas acabam sendo utilizadas para os cuidados primários em saúde e auxiliam no tratamento das enfermidades (PASA; SOARES; NETO, 2005).

O uso plantas medicinais no mundo e especialmente na América do Sul, contribui significativamente para atenção básica de saúde (HOLETZ et al., 2002). No Brasil, a adoção de plantas no tratamento de doenças possui influências das culturas: indígena, africana e europeia. Alguns fatores que contribuem para sua ampla utilização: diversificação e disponibilidade (BORBA; MACEDO, 2004).

Isto porque a indústria farmacêutica tende a se concentrar em doenças que afetam principalmente populações de países desenvolvidos como câncer e doenças cardiovasculares, a fim de recuperar os elevados custos envolvidos no desenvolvimento de novos medicamentos para o mercado (PHILLIPSON, 2007).

Percebe-se que esta situação provoca um desequilíbrio quanto a prioridade no desenvolvimento de medicamentos, que indiretamente prejudica a saúde pública quanto a oferta de tratamento mais eficaz, menor efeito adverso e de baixo custo.

As condições sociais e econômicas, especialmente nos países de terceiro mundo, induzem as classes mais carentes a procurarem alternativas terapêuticas de baixo custo e relativamente seguras, como as plantas medicinais (CUNHA et al., 2008).

Para esta população, as plantas medicinais são componentes de importância social e cultural, às vezes é a única alternativa disponível para tratamento dos problemas de saúde (TOLEDO et al., 2011).

Na perspectiva histórica, os produtos naturais demonstram resultados significativos para serem fontes de obtenção e exploração de novas drogas como a digoxina (1785) a partir da *digitalis*, a morfina (1806) da papoula, o ácido salicílico (1897) do salgueiro e penicilina (1928) do mofo (RISHTON, 2008).

Segundo Rates (2001) o uso das plantas como recurso para novos fármacos ainda é pouco explorado, visto que de 250.000 a 500.000 espécies, somente 5.000 plantas foram bem estudadas para uso medicinal. Diante desse cenário, as plantas constituem a principal esperança no tratamento de doenças, cujas causas são desconhecidas e que muitas vezes permanecem sem tratamento (CUNHA et al., 2008).

Para Rishton (2008) os compostos bioativos que surgem a partir de estudos envolvendo etnobotânica e/ou etnofarmacologia, tornam-se importantes ferramentas para a elucidação dos mecanismos da doença. A etnofarmacologia apresenta caráter interdisciplinar, possibilita direcionar a seleção de plantas mediante informação de medicina tradicional e conduzir estudos que promovam a descoberta de moléculas biologicamente ativas.

O conhecimento popular é extremamente útil e válido para nortear a seleção de espécimes com potencial para tratamento de alguma enfermidade (TOLEDO et al., 2011). Uma correlação entre uso popular de plantas e a atividade experimental farmacológica para antimicrobiana, demonstrou um percentual de sucesso para 55,2% (BRITO; BRITO, 1993).

Souza et al. (2004) ao analisar as propriedades antimicrobianas de extratos de plantas disponíveis localmente, também constatou uma significativa correlação entre as propriedades antimicrobianas e uso na medicina tradicional.

No Brasil a medicina popular é influenciada por uma combinação de diferentes conhecimentos que envolvem a cultura indígena, conhecimento trazido pelos portugueses, espanhóis e africanos (BUENO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011),

As plantas produzem compostos conhecidos como fitoquímicos ou metabólitos secundários, que sofrem variação conforme cada tipo de espécie. Estas substâncias fornecem proteção à planta e têm sido usadas no tratamento para curar diversas doenças e são ativos a diversos microrganismos (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ; VELOZA; SEPÚLVEDA-ARIAS, 2013).

Os extratos de plantas podem conter substâncias como: flavonoides, peptídeos, alcanos, ligninas, terpenos, fenóis que podem ser utilizados no tratamento de diferentes enfermidades inclusive para tuberculose (SANTHOSH; SURIYANARAYANAN, 2014).

Em virtude do crescimento de formas multirresistentes torna-se necessário a busca por compostos com atividade antimicrobiana, cujas as plantas são fontes de recursos para tal elucidação (MOREIRA et al., 2013; PAVAN et al., 2009).

4.2 Cerrado

O cerrado apresenta formação do tipo savana tropical, com destacada sazonalidade, com chuvas de verão e inverno seco (MIRANDA et al., 2014), com uma precipitação média anual de 1.500 mm, cujos os meses de outubro a março apresentem 90% desta umidade e temperatura média anual em torno de 22°C a 27°C (MALHEIROS, 2016; KLINK; MACHADO, 2005). Entretanto há alguns estudos recentes que têm registrado temperaturas elevadas, que ultrapassam os 30 °C, como algumas regiões do Tocantins e Piauí (SANTOS, 2010; SANTOS; JÚNIOR; FERREIRA, 2011; SOUZA, 2016).

O cerrado é o segundo maior bioma* no Brasil, ocupa cerca de 22% do território com 1.783 milhões km² (Figura 4) e está predominantemente localizado no planalto central, possui uma topografia ondulada com interflúvios largos interrompidos por afluentes dos rios Amazonas, Paraná-Paraguai e São Francisco (JEPSON, 2005).

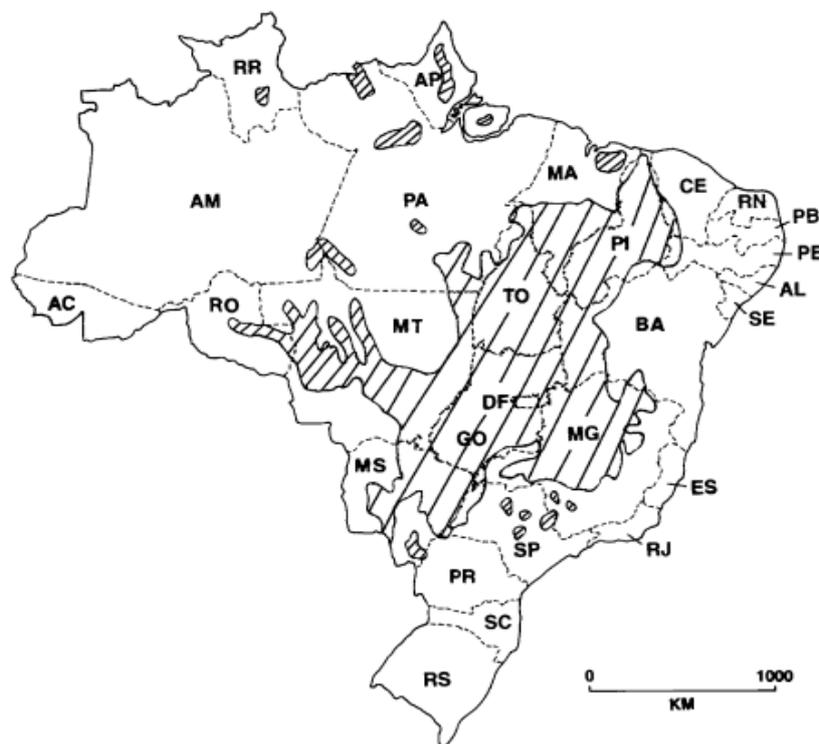


Figura 4 – Distribuição do bioma Cerrado no Brasil.

Fonte: Novaes et al. (2013).

* Bioma – (do grego Bio = vida + Oma = grupo ou massa). Trata-se de um conjunto de vida, vegetal e animal, especificado pelo agrupamento de tipos de vegetação (*i.e.* fitofisionomia) e identificável em escala regional, com condições geográficas e de clima similares, cujas características lhe conferem uma diversidade ecológica própria (COUTINHO, 2006).

Encontra-se distribuído nos seguintes estados brasileiros: Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rondônia, São Paulo, Distrito Federal e Tocantins (MALHEIROS, 2016; SANO, 2007). Além de encraves nos Estados do Amapá, Roraima e Amazonas (BRASIL, 2015).

O cerrado é constituído de uma vegetação xeromorfa, que ocorre sobre diferentes tipos de clima, altura e densidade (IBGE, 2012). É composta por uma mistura de gramíneas, plantas lenhosas, árvores retorcidas, cuja casca é espessa, resistente ao fogo e folhas esclerófilas (JEPSON, 2005). Possui uma elevada biodiversidade, é a mais diversificada savana tropical do mundo com mais de 12 mil espécies de plantas (NOVAES et al., 2013).

A paisagem do Cerrado apresenta a descrição de onze fitofisionomias (i.e. tipos de vegetação), enquadrados em três categorias: a campestre (campo limpo, campo sujo e campo rupestre), florestal (mata ciliar, mata de galeria, mata seca e cerradão) e a savânica (cerrado *stricto sensu*, savana amazônica, palmeiral e vereda), cuja fisionomia ocupante de maior área com 67%. (COUTINHO, 2006).

Nas diversas fitofisionomias do cerrado, seus solos, geralmente são profundos, com baixa fertilidade natural, uma acidez acentuada devido a presença de sílica e relevo plano e/ou suavemente ondulado, cuja a drenagem é perene (BASTOS; FERREIRA, 2010).

Possuidor de uma expressiva heterogeneidade fitofisionômica, o cerrado é caracterizado como promissor em conter espécimes com elevado potencial farmacológico. Neto e Moraes (2003) esclarecem que a diversidade taxonômica presente no Cerrado é relativa aos táxons mais elevados (gênero, família e ordem), isto lhe proporciona um maior distanciamento filogenético entre as espécies e conseqüentemente há uma diferença e diversidade química entre elas, com potencial de compostos bioativos produzidos, o que poderia ser maior que aqueles presentes na floresta amazônica.

Estas características presentes no Cerrado deveriam ser consideradas como áreas prioritárias para pesquisa e conservação de recursos naturais, porém, as taxas de desmatamento são acentuadas no país, com a conversão da vegetação natural em áreas agropastoris (KLINK; MACHADO, 2005; ROCHA et al., 2012).

O novo código florestal brasileiro autoriza que proprietários de terras no Cerrado, a reservarem um mínimo de 20% de sua propriedade como reserva legal, caso

o imóvel esteja localizado na Amazônia Legal este percentual de reserva se eleva para 35% (BRASIL, 2012).

Cerca da metade das terras com destino a agropecuária no Brasil são cultivadas no Cerrado. Foram altas as taxas de desmatamento nos últimos anos, principalmente na região MATOPIBA*, que compõem a “nova fronteira agrícola”, com 337 municípios, cuja vegetação é representada por 90% de Cerrado (SPERA et al., 2016).

Entre os anos de 2003 a 2013, mais de 2,3 milhões de hectares (ha) de terras foram cultivadas na região do MATOPIBA, o que representa o dobro de expansão neste período sobre a vegetação nativa de Cerrado, que foi removida para dar espaço preferencialmente às plantações de monocultivo de soja. Situação que afetou significativamente no balanço hídrico da região (SPERA et al, 2016).

É perceptível o reduzido esforço governamental quanto a sua preservação, aliado a regulamentos ambientais menos rigorosos e estímulos a expansão agropecuária sobre este bioma, contribuem para que apenas 2,2% (cerca de 33.000km²) da área estejam legalmente protegidos (KLINK; MACHADO, 2005).

O Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2015) através de um relatório técnico, reconhece que o Cerrado foi o bioma que mais sofreu alterações com a ocupação humana, depois da Mata Atlântica, sendo 8,6% de sua área protegida por unidades de conservação, destes apenas 3,1% como forma de proteção integral através de parques nacionais.

Análise sobre uma série histórica de 2002 a 2011, evidenciou um contínuo desmatamento do Cerrado no país, cuja área total de perda correspondeu a 997.063 km² (48,89%) (BRASIL, 2015). Estes dados corroboram com que segundo Chaves (2011) teria estimado com a perda de 50% da cobertura original do cerrado para conversão em pastos, plantações de soja ou formas degradadas de solos abandonados.

Conforme SPERA et al. (2016) à medida que a vegetação do Cerrado é destruída, fragmentada e/ou substituída por plantações, o equilíbrio hídrico sofre modificações, e tal desmatamento em larga escala tem potencial para reduzir a quantidade de água da chuva que incide na Amazônia.

A figura 5 retrata o mapeamento de áreas desmatadas do Cerrado ocorridas entre 2010-2011 (7.246,67 km²), com Piauí (1,38%; 1.292,23 km²/93.424 km²), Bahia

* MATOPITBA – um acrônimo formado com as iniciais dos Estados de Maranhão (MA), Tocantins (TO), Piauí (PI) e Bahia (BA). Uma região que recobre parcialmente os territórios destes quatro Estados citados anteriormente (SPERA et al., 2016).

(0,66%; 1.002,97 km²/ 151.348 km²), Maranhão (0,61%; 1.310,62 km²/212.092 km²) e Tocantins (0,45%; 1.160,61 km²/252.799), os estados respectivamente, com maiores percentuais para desmatamento em relação a área de cobertura pelo bioma sobre seu território (BRASIL, 2015).

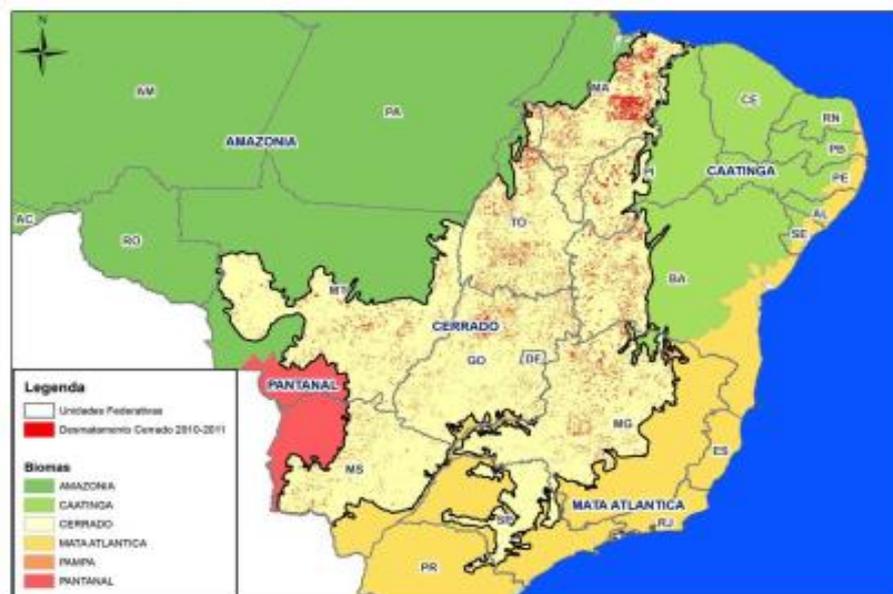


Figura 5 – Mapa de distribuição de desmatamento do Cerrado ocorrido entre o período de 2010-2011.

Fonte: Brasil (2015).

Para Klink e Machado (2005) as principais ameaças à biodiversidade deste bioma estão relacionadas à degradação do solo (uso de fertilizantes), dos ecossistemas nativos (práticas agrícolas, queimadas) e a dispersão de espécies exóticas (amplo uso de gramíneas africanas).

A estimativa de perda da cobertura vegetal do cerrado no país é variável em função da sua dinâmica e/ou método de análise, conforme os diversos estudos descritos (BRASIL, 2015; CHAVES, 2011; MACHADO et al., 2004; SPERA et al., 2016; RATTER; RIBEIRO; BRIDGEATER, 1997). Entretanto, há um consenso no discurso de que a perda da biodiversidade é significativa e está fortemente associada às atividades antrópicas, o que torna necessário celeridade para sua preservação.

As plantas do cerrado são de grande valor terapêutico para uma grande parcela da população, especialmente aquelas que vivem afastadas das áreas urbanas (TOLEDO et al., 2011).

Diversos são os estudos que demonstram atividades biológicas a partir de extratos ou compostos isolados de plantas do cerrado (ARANTES et al., 2005; BELO et

al., 2008; CUNHA et al., 2008; ESTEVAM et al., 2005; FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005; PAVAN et al., 2009; MOURA et al., 2016; NAZATO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014; SILVA et al., 2012; TOLEDO et al., 2011), corroborando com a necessidade de sua preservação, visto que atualmente encontra-se em situação de risco.

4.3 Descrição das espécies selecionadas

4.3.1 *Plathymenia reticulata* Benth

Pertencente à família da Fabaceae (Leguminosae), a *Plathymenia reticulata* Benth (Figura 6) é uma árvore popularmente conhecida como vinhático, ao qual é muito apreciada pela sua fonte de madeira de alta qualidade (DELLA TORRE et al., 2011).

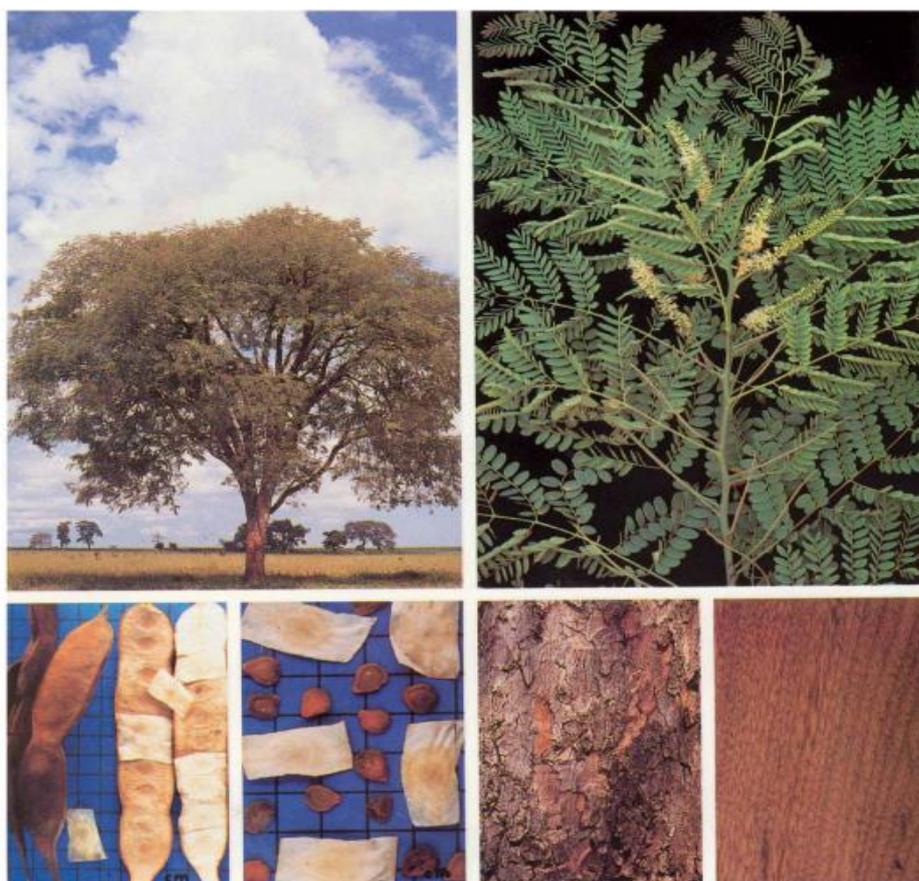


Figura 6 – Ilustração da espécie *Plathymenia reticulata* Benth

Vernáculo: Vinhático

Fonte: Lorenzi (1992).

Esta espécie é usualmente empregada na recuperação de áreas do cerrado devastadas, utilizada na medicina tradicional para tratamento de inflamação, diarreia e disenteria (DELLA TORRE et al., 2011), infecções e envenenamento por serpentes (MOURA et al., 2016).

Trata-se de uma planta decídua, heliófita, com uma altura média de 15 a 30 m, com tronco áspero e descamante. Folhas compostas e bipinadas, com 4 a 14 pares de pinas e flores pequenas dispostas em espigas cilíndricas, frutos em vagens e sementes aladas (LORENZI, 1992).

4.3.2 *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl.

A família Ochnaceae, uma das maiores famílias de plantas com flores, ao qual compreende 27 gêneros e cerca de 500 espécies, distribuídas nas zonas tropicais e subtropicais do mundo (FERES, 2006).

Ouratea é o maior gênero desta família e compreende cerca de 300 espécies que estão localizadas principalmente nas regiões da América do Sul e na África tropical (FEDILIS et al., 2014). Normalmente utilizadas na medicina popular como adstringentes, tônicos, vermífugos, no tratamento de distúrbios gástricos e reumatismo (ESTEVAM et al., 2005; VALADARES et al., 2003).

Algumas espécies do gênero têm se mostrado biologicamente ativas para atividade antiviral (*O. lucens*), antimicrobiana (*O. parviflora*), analgésica (*O. reticulata*) (CARVALHO; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2000) e antimalárica (*O. nitida*) (ESTEVAM et al., 2005).

A espécie *Ouratea spectabilis* (Figura 7), possui sinonímia para *Gomphia spectabilis*, é popularmente conhecida como “cabeça de negro”, está presente nos biomas cerrado e campos cerrados (FERES, 2006). Trata-se de uma planta decídua, heliófita, com crescimento de 4 a 5 metros, tronco tortuoso, casca suberosa, folhas simples, cuja floração ocorre entre os meses de agosto a setembro e frutos do tipo drupa ovóide (LORENZI, 1998).

O. spectabilis tem sido utilizada na medicina tradicional para reumatismo e doenças gástricas (CARVALHO; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2000). Apesar da dimensão deste gênero ser representativa, sua caracterização química é pouco explorada e/ou conhecida para a espécie *O. spectabilis*. Existem poucos estudos químico e/ou biológico relatados sobre esta espécie na literatura científica.

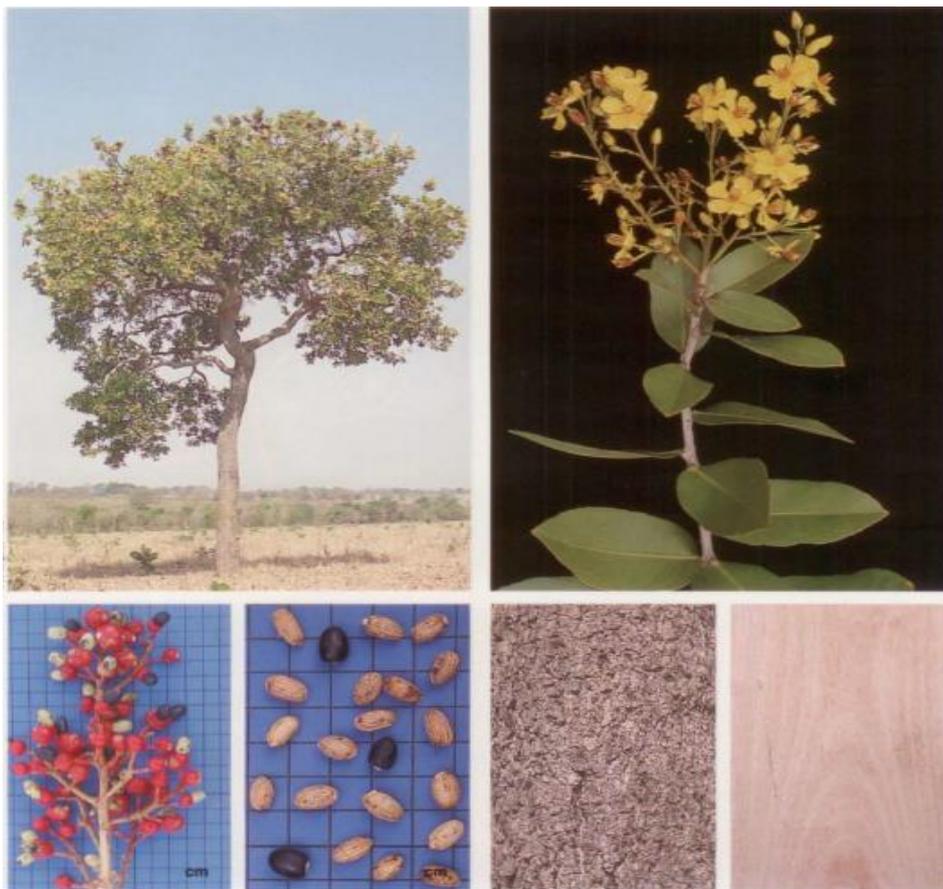


Figura 7 - Ilustração da espécie *Ouratea spectabilis* (Mart.) Engl.
 Vernáculo: Cabeça de Negro
 Fonte: Lorenzi (1998).

4.3.3 *Galactia glaucescens* Kunth

A *Galactia glaucescens*, é uma planta característica do cerrado, denominada popularmente por “três folhas” (Figura 8). Usualmente é empregada na medicina tradicional para neutralização do veneno de cobra (BELO et al., 2008).

Morfológicamente arbustiva, com folhas trifolioladas alternas, cuja distribuição ocorre principalmente em área ecotonal, entretanto há pouco dados sobre a sua densidade populacional (BARROS et al., 2014).

Trata-se de uma espécie pertence à família Fabaceae, sendo que esta é a terceira maior família de angiospermas, possuidora de grande diversidade no cerrado, com mais de 630 gêneros e cerca de 18.000 espécies (BARROS et al., 2014).



Figura 8 - Ilustração da espécie *Galactia glaucescens* Kunth
Vernáculo: Três folhas
Fonte: Tropicos (2017)*.

4.3.4 *Apuleia molaris* Spruce ex Benth

O gênero *Apuleia*, cujas espécies são nativas da América do Sul, dentre elas a *Apuleia molaris* (SOUSA; LEWIS; HAWKINS, 2010), conhecida como “grapia”, com dificuldades para distinção de táxon (REIS et al., 2016), está amplamente distribuída no Brasil (SILVA et al., 2015) e possui sinonímia para *Apuleia leiocarpa*.

Pertencente à família das leguminosas (Fabaceae) e subfamília Caesalpinioideae é comumente encontrada na região Amazônica como também em outros países como Venezuela, Uruguai e Argentina (REIS et al., 2016), em solos arenosos, argilosos, matas de terras firmes, várzea alta e raro em solos inundáveis (SOUZA; VARELA; BATALHA, 1994).

Trata-se de uma espécie arbórea decidual (i.e. perda de folhas em determinadas épocas do ano), heliófita (i.e. melhor crescimento em locais bem iluminados), com alcance de 40 m de altura e 100 cm de diâmetro e folhas pinadas com média de 12 cm de comprimento, flores brancas (SOUSA; LEWIS; HAWKINS, 2010).

* TROPICOS. *Galactia glaucescens* Kunth. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Image/100171915>>. Acesso em: 20 Ago 2017.

Dotada de fruto seco (Figura 9), indeiscente, elipsoide, coriáceo, polispérmico, com gineceu monocarpelar, ápice acentuada, coloração externa de bege escuro à negro, com indumento aveludado, mesocarpo esponjoso contendo algumas sementes por fruto (REIS *et al.*, 2016), que são duras com baixo poder germinativo devido a impermeabilidade do seu tegumento (SOUZA; VARELA; BATALHA, 1994).

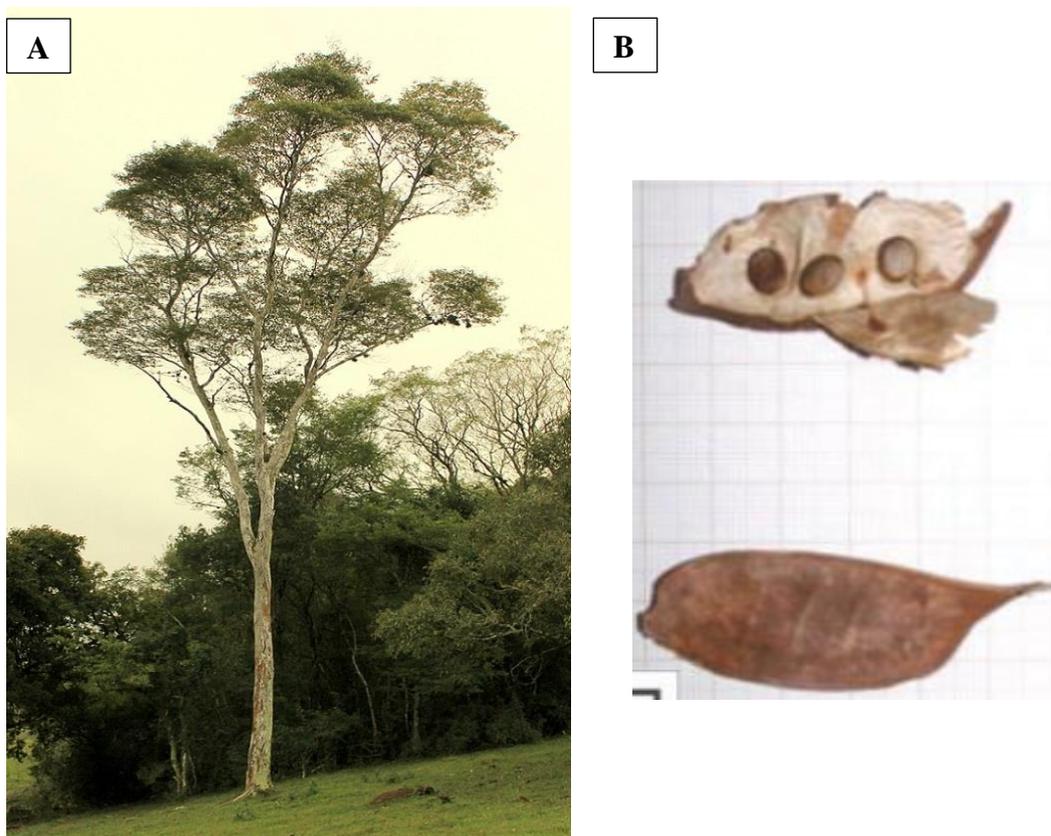


Figura 9 – Ilustração da espécie *Apuleia molaris* Spruce ex Benth (sinonímia *A. leiocarpa*) **A)** Espécie arbórea **B)** Fruto com três sementes

Vernáculo: Grapia.

Fonte: Flora Digital (2017)*; Reis et al. (2016).

Utilizada principalmente na construção civil e marcenaria (SOUZA; VARELA; BATALHA, 1994), apresenta rápido crescimento, com potencial para ser utilizada em áreas de reflorestamento (REIS et al., 2016).

* Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=12483>. Acesso em: 10 Ago 2017.

4.3.5 *Dipteryx alata* Vogel

A *Dipteryx alata* é uma espécie vegetal nativa do cerrado brasileiro, pertencente à família Fabaceae e popularmente conhecida como “baru” (FERNANDES et al., 2010; MARQUES et al., 2015; MARTINS et al., 2013).

É uma planta perenifólia, heliófita, seletiva xerófila, característica de terrenos secos do cerrado e da floresta latifoliada semidecídua, capaz de atingir uma altura média de 15 a 25 metros (Figura 10). Possui um tronco de 40 a 70 cm de diâmetro, cujas folhas são glabras, compostas e alado-pecioladas (LORENZI, 1992).

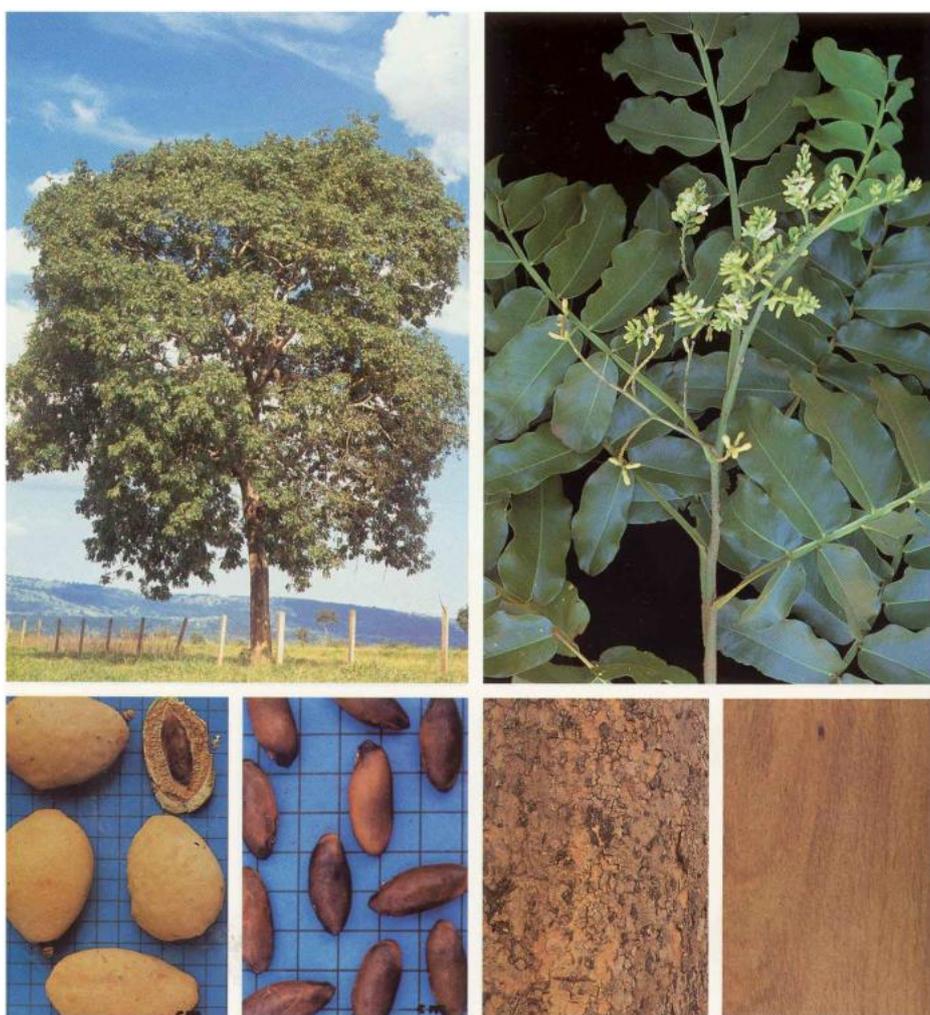


Figura 10 - Ilustração da espécie *Dipteryx alata* Vogel

Vernáculo: Baru

Fonte: LORENZI, 1992.

Para cada fruto abriga-se uma única semente, comestível com alto valor nutritivo e com propriedades medicinais (MARQUES et al., 2015). A amêndoa representa uma boa fonte de aminoácidos, com níveis apreciáveis para cálcio, ferro,

zinco e teores elevados de lipídeos (250-300g/kg) e proteínas (~ 400g/kg) (FERNANDES et al., 2010).

O óleo extraído a partir da polpa e semente é rico em ácidos graxos insaturados, principalmente por ácidos oleico, linoléico e linolênico; necessários à manutenção da integridade da membrana celular, participação da transferência atmosférica de oxigênio, síntese de hemoglobina e divisão celular (MARTINS et al., 2013).

4.3.6 *Brosimum gaudichaudii* Trécul.

Brosimum gaudichaudii é uma árvore, pertencente à família Moraceae, popularmente conhecida como “Inharé” (Figura 11). É utilizada no tratamento do vitiligo (LORENZI, 1998), há inclusive no mercado um produto farmacêutico (Viticromin®), obtido através das partes inferiores do tronco e raízes desta espécie (CUNHA et al., 2008).



Figura 11 – Ilustração da espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul.

Vernáculo: Inharé

Fonte: Lorenzi (1998).

O gênero *Brosimum* é tradicionalmente empregado na fotoquimioterapia da psoríase, e outros problemas relacionados a pigmentação de pele, cuja ação se deve a presença de derivados furanocumarinas (MONTEIRO et al., 2002; POZETTI, 2005).

Descrita como uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófita, lactescente de 4 a 10 m de altura, cuja copa é ovalada e tronco retilíneo com uma média de 20-40 cm de diâmetro (Figura 11). Possuidora de casca rugosa e descamante, folhas subcoriáceas, inflorescências bissexuais, infrutescências globosas de coloração alaranjada quando maduras (LORENZI, 1998).

O fruto de *B. gaudichaudii*, apresenta coloração amarelo-alaranjado, sendo mastigável como goma, devido a presença de látex (CUNHA et al., 2008).

Este espécime encontra-se distribuído entre os Estados do Amazonas até o Paraná, presentes nos cerrados, campos de cerrados e cerradões. A árvore empregada nos processos de reflorestamentos mistos para recuperação e enriquecimento da vegetação, bem como nas atividades de marcenaria, construção civil, lenha e carvão (LORENZI, 1998).

4.3.7 *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau

O gênero *Tabebuia* compreende cerca de 100 espécies estritamente lenhosas, pertencente à família Bignoniaceae, cuja dispersão ocorre em grandes regiões tropicais e subtropicais do continente americano (OSPINA et al., 2013).

As espécies deste gênero são de difícil classificação taxonômica, em razão a semelhança dos vegetais nele compreendido (SOARES, 2006). Uma destas é a *Tabebuia caraiba* (sinonímia: *Tabebuia aurea*), conhecida popularmente como “Paratudo” ou “Ipê- amarelo”, utilizada na medicina tradicional como antiinflamatório, contra influenza (BARBOSA-FILHO et al., 2004) e antiofídico (REIS et al., 2014).

A *T. caraiba* (Figura 12) possui um tronco tortuoso e revestido por casca grossa, suas folhas são compostas de 3 a 7 folioladas, glabras, subcoriáceas com média de 18 a 28 cm de comprimento e 4 a 6 cm de largura. As flores são amarelas e frutos encapsulados lanceolados de pigmentação acinzentado-ferrugínea (LORENZI, 1992).

É um espécime arbórea, com altura média de 12 a 20 metros que está distribuída por todo território brasileiro (BLATT; SALATINO; SALATINO, 1996), embora quando presente no cerrado consiga desenvolver uma altura de 4 a 6 metros. É

caracterizada por ser uma planta decídua, heliófita e seletiva xerófila, útil nos reflorestamentos mistos de áreas degradadas e empregada na arborização e paisagismo (LORENZI, 1992).

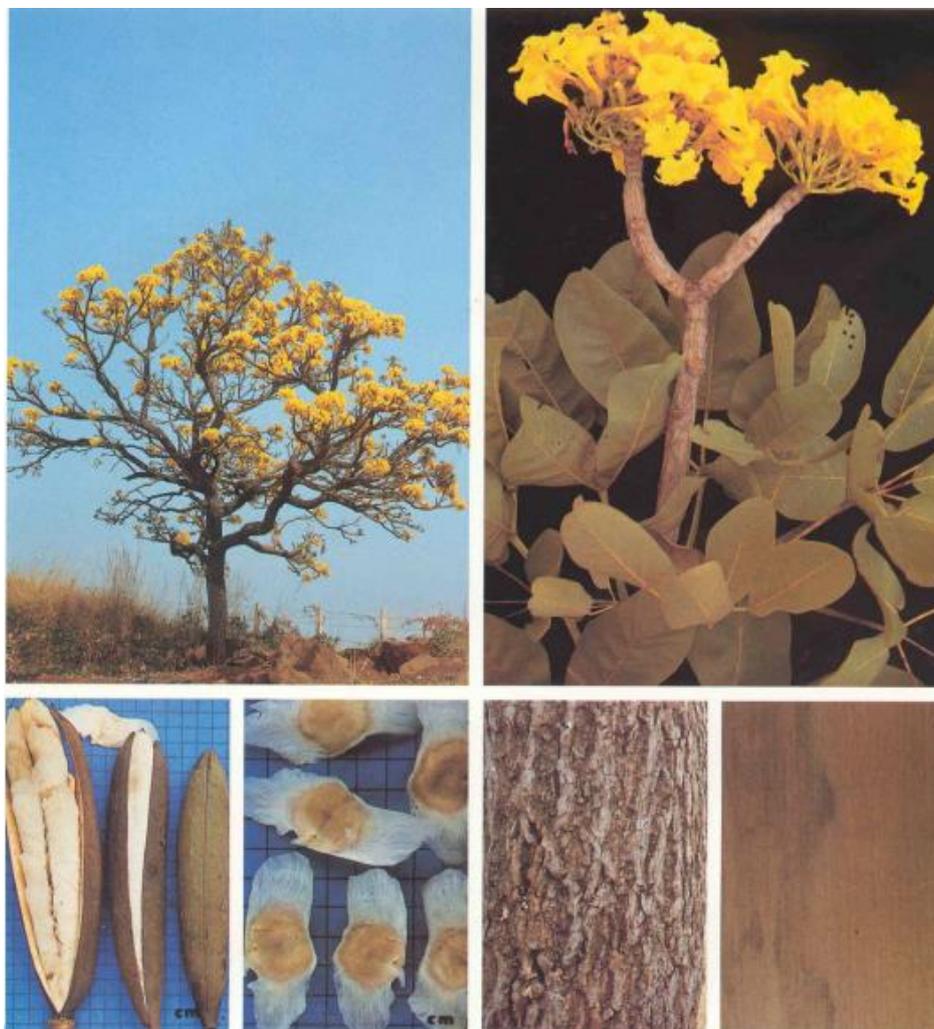


Figura 12 – Ilustração da espécie *Tabebuia caraíba* (Mart.) Bureau

Vernáculos: Paratudo, Ipê-amarelo

Fonte: Lorenzi (1992).

4.3.8 *Pterodon emarginatus* (Vogel)

O gênero *Pterodon* (Leguminosae), consiste em quatro espécies distribuídas no Brasil: *Pterodon abruptus* Benth, *P. apparicioi* Pedersoli, *P. pubescens* Benth e *P. emarginatus* Vogel (sinonímia *P. polygalaeflorus* Benth) (ALVES et al., 2013).

A *P. emarginatus* encontra-se dispersa principalmente no cerrado e áreas de transição para floresta semidecídua, com tolerância à luz direta e útil nos processos de reflorestamentos mistos (LORENZI, 1992).

É conhecida popularmente como “sucupira-branca” ou “faveiro”, que está amplamente incorporada à medicina tradicional brasileira como efeito antiinflamatório, (BUSTAMANTE et al., 2010; CARVALHO et al., 1999).

Trata-se de uma árvore (Figura 13) decídua, heliófita, seletiva xerófila, com altura média de 8 a 16 m, um tronco entre 30 a 40 cm de diâmetro e detentora de madeira com alta densidade (0,94 g/cm³). Suas folhas são compostas pinadas, com 20 a 36 folíolos de 3 a 4 cm. Capaz de produzir anualmente uma grande quantidade de sementes viáveis (LORENZI, 1992), cuja extração obtêm-se óleos essenciais de variabilidade química conforme os fatores ambientais de cada região (ALVES et al., 2013).

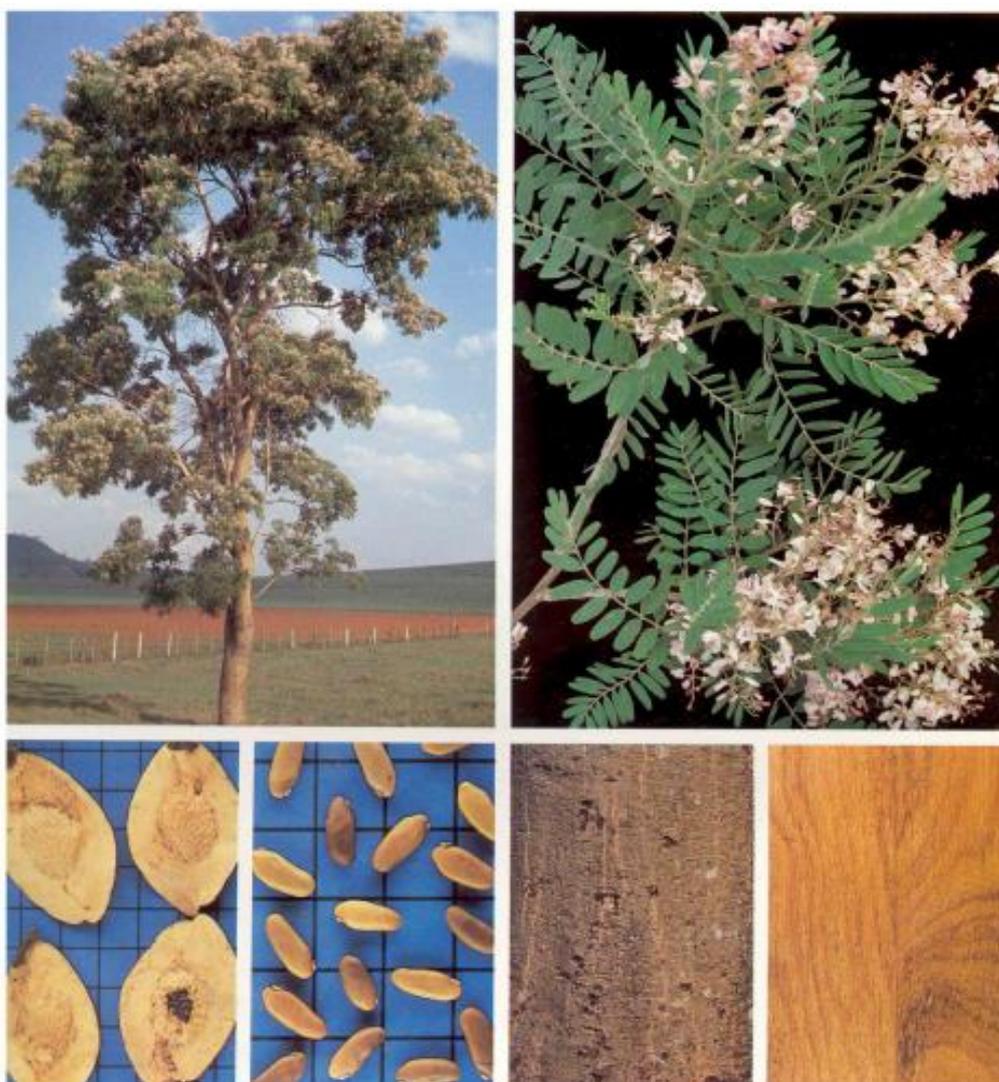


Figura 13 – Ilustração da espécie *Pterodon emarginatus* Vogel
Vernáculos: “Sucupira-branca” ou “Faveiro”
Fonte: LORENZI, 1992.

4.3.9 *Terminalia fagifolia* Mart.

Terminalia fagifolia (Figura 14), popularmente conhecida como “Camaçari”, pertencente à família Combretaceae, é uma planta semidecídua, heliófita, seletiva xerófila, com ocorrência preferencialmente em formações secundárias de várzeas não inundáveis de solos argilosos férteis e profundos. Altura de 5-10 m, tronco curto de 30-50cm diâmetro, com casca rugosa e fissurada longitudinalmente (LORENZI, 1998).



Figura 14 – Ilustração da espécie *Terminalia fagifolia* Mart.

Vernáculo: Camaçari

Fonte: LORENZI, 1998.

Árvore que está distribuída nos cerrados e cerradões do planalto do Brasil central e pantanal Matogrossense e na caatinga arbórea do vale do São Francisco de Minas Gerais até Pernambuco (LORENZI, 1998).

Possui folhas simples e membranáceas, inflorescências em espigas capituliformes, com flores cremes ou amarelo-esverdeadas, cujo fruto (sâmara) é indeiscente, tomentosa, com duas asas transversalmente estriadas, contendo em seu interior uma única semente alongada (LORENZI, 1998).

4.3.10 *Stachytarpheta* sp.

O espécime coletado não foi possível sua devida identificação, obtido apenas seu gênero *Stachytarpheta*, pertencente à família *Verbenaceae*. Conhecida regionalmente como Gervão branco (Figura 15), esta planta foi coletada no mês de março de 2016, em área de cerrado antropizado, no município de Palmas-TO, sob coordenadas 10° 13' 22.1''S e 48° 20' 05.8''W.



Figura 15 – Ilustração da espécie *Stachytarpheta* sp.

Vernáculo: Gervão branco.

Fonte: Próprio autor (2016).

O gênero *Stachytarpheta* possui 133 espécies amplamente distribuídas no mundo, sendo o Brasil, o país com maior ocorrência, representado por 79 espécimes, concentrado principalmente nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia (ATKINS, 2005). As espécies *S. angustifolia*, *S. canyennensis*, *S. jamaicensis*, *S. jamaicensis*, *S. paraguariensis*, *S. polyura* e *S. sprucei* são as aquelas com maior presença no território

nacional. No Estado do Tocantins a espécie *S. macedoi* possui maior endemicidade (ATKINS, 2005).

As espécies *Stachytarpheta* sp. são conhecidas popularmente como Gervão, normalmente encontradas nos campos rupestres e raramente em áreas do cerrado (ATKINS, 2005). São empregadas na medicina tradicional para diversas finalidades como: tosse, diarreia, analgésico, antipirético, lesões de pele, distúrbios gástricos (MOREIRA et al., 2007), cortes e feridas (ABE; OHTANI, 2013), antiinflamatório (MAQUIAVELI et al., 2016).

A forma mais comum no gênero é do tipo arbusto ou subarbusto ramificados com altura média de 1 a 1,5 metros. Suas flores ficam arranjadas em forma espiralada ao longo do eixo da inflorescência e corolas diversificadas quanto a pigmentação conforme a espécie, sendo azul comumente encontrada (ATKINS, 2005).

5 JUSTIFICATIVA

A tuberculose (TB) está presente a algum tempo em nossa sociedade e fatores como: dificuldade de adesão, abandono de tratamento e resistência micobacteriana favorecem sua persistência no contexto mundial e representa um sério problema de saúde pública.

São altas as taxas de mortalidade associada ao HIV, em certas regiões do mundo as taxas de abandono são elevadas e favorecem o surgimento de formas multirresistentes e dificultam o seu tratamento.

Desde a década de 60, após a introdução da Rifampicina ao esquema terapêutico da TB não se obtêm um avanço expressivo quanto ao seu arsenal terapêutico. O tratamento continua extensivo e são vários efeitos adversos. Para os indivíduos portadores de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes existe um agravante que é a elevação expressiva no custeio do tratamento.

A indisponibilidade de medicamentos mais eficazes compromete as ações de controle do agravo. Torna-se necessário a busca de novas drogas eficazes principalmente as formas multirresistentes e que contemplem um menor tempo de tratamento e efeitos adversos, sendo as plantas uma fonte de recursos para auxiliar na pesquisa de novos compostos ativos contra cepa de *M. tuberculosis*.

6 METODOLOGIA

6.1 Material botânico

No intuito de elevar as chances de sucesso na elucidação de alguma planta com atividade antimicobacteriana, foi selecionado um *pool* de extratos brutos liofilizados que estavam previamente armazenados a -20°C , no Laboratório de Fitoquímica, coordenado pelo Prof. Dr. Marcio Galdino dos Santos, da Universidade Federal do Tocantins (UFT) – *campus* de Porto Nacional, conforme destacada na Tabela 5.

Tabela 5 – Relação de extratos brutos de plantas do cerrado utilizados no processo de triagem, com suas respectivas identificações

Nº	Vernáculo	Nome Científico	Família	Parte da Planta utilizada	Registro Herbário UFT
1	Vinhático	<i>Plathymentia reticulata</i> Benth.	Fabaceae**	entrecasca	10.072
2	Cabeça de negro	<i>Ouratea spectabilis</i> (Mart.) Engl.	Ochnaceae	entrecasca	9.547
3	Três Folhas	<i>Galactia glaucescens</i> Kunth	Fabaceae	ramos e folhas	10.070
4	Grapia	<i>Apuleia molaris</i> Spruce ex Benth	Fabaceae	ramos e folhas	9.614
5	Baru	<i>Dipteryx alata</i> Vogel	Fabaceae	entrecasca	9.687
6	Inharé	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.	Moraceae	entrecasca	10.068
7	Para-Tudo	<i>Tabebuia caraíba</i> (Mart.) Bureau	Bignoniaceae	entrecasca	9.680
8	Sucupira	<i>Pterodon emarginatus</i> (Vogel)	Fabaceae	entrecasca	10.026
9	Camaçari	<i>Terminalia fagifolia</i> Mart.	Combretaceae	entrecasca	10.842
10	Gervão	<i>Stachytarpheta</i> sp.*	Verbenaceae	ramos e folhas	11.157

* Obtida a identificação somente pelo Gênero. ** sinonímia Leguminosae.

Decidiu-se também a coleta de amostras vegetais quanto ao aspecto etnofarmacológico, com indicação terapêutica para tosse e demais doenças respiratórias (MACIEL *et al.*, 2002). Os métodos etnodirecionados, tendem a oferecer chances maiores na obtenção de resultados satisfatórios ao contrário dos aleatórios (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As amostras representativas foram selecionadas e produzidas exsiccadas e enviadas ao Herbário do Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB) da UFT – *campus* de Porto Nacional, para obtenção do registro e identificação (TABELA 5).

Todos os extratos foram submetidos a um processo inicial de triagem (*i.e. screening*), para definição daqueles que teriam alguma atividade antimicobacteriana significativa.

O material botânico coletado foi submetido ao processo de secagem em estufa à temperatura de 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por dois dias. Após secagem, as folhas foram trituradas em moinho de faca e posteriormente acondicionadas em frascos do tipo âmbar (*i.e.* método de extração a frio), ao qual estiveram percolando em etanol a 70% (v/v) por um período de 72 horas a 25°C, protegidos da luz solar (FIDALGO; BONONI, 1989).

As soluções heterogêneas foram submetidas a filtração simples e posteriormente evaporação do solvente sob pressão reduzida a 45°C, através do aparelho Evaporador Rotativo (MARCONI, Modelo MA120-TH), ao qual obteve-se a concentração dos extratos brutos.

Para remoção de água e excessos de solventes dos extratos brutos, foram congelados a -20°C e submetidos ao processo de liofilização (LIOTOP, Modelo L101), obtendo o extrato bruto em pó. Os extratos secos foram transferidos para frascos de vidros e armazenados sob temperatura a -20°C , até sua utilização nos experimentos.

6.2 Preparo da micobactéria

As atividades antimicobacterianas dos extratos foram avaliadas frente as cepas padronizadas de *Mycobacterium tuberculosis* - H₃₇Rv, ATCC 27294 (*American Type Culture Collection*), fornecida pelo Centro de Referência Professor Hélio Fraga/Fiocruz-RJ, e mantidas em solução estoque no freezer do Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (LACEN-TO), sob temperatura de -70°C .

Todos os ensaios microbiológicos foram executados dentro da cabine de segurança biológica (CBS) classe II, Tipo A2 (THERMO SCIENTIFIC, Modelo 1300 Sereis A2).

As cepas foram semeadas em meio Lowenstein Jensen (LJ) e incubadas em câmara climatizada (ELETROSPITALAR – Modelo EL0850) sob temperatura constante de 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

Aguardou-se os 28 dias para ocorrer o devido crescimento das cepas, ao qual foram submetidas ao novo processo de repique em meio LJ, a fim de melhorar sua viabilidade bacilar (Figura 16).



Figura 16 - Crescimento após 28 dias de incubação com numerosas colônias de *Mycobacterium tuberculosis* – H37Rv (ATCC 27294) em meio Lowenstein Jensen.

Fonte: Próprio Autor (2016).

Preparou-se uma suspensão micobacteriana a partir do crescimento em meio sólido (LJ) em tubos estéreis contendo água destilada estéril e perolas de vidro de 3 mm.

Os tubos foram agitados em aparelho de Vortex (WARMNEST, Modelo VX-28) e ajustado em escala padrão de turvação de um (01) McFarland ($3,2 \times 10^6$ UFC/mL) com auxílio de um densitômetro (BIOMERIEUX, Modelo DensiChek plus).

O inóculo na escala de um (01) McFarland foi novamente diluindo na proporção de 1:25 em meio 7H9 (4.7g de Middlebrook 7H9 broth base – Difco®) enriquecido com 10% de ADC (albumina, dextrose e catalase). Utilizou-se esta suspensão H₃₇Rv (1:25) em todos os ensaios microbiológicos deste estudo (FRANZBLAU et al., 1998).

6.3 Preparo dos Extratos e do antibiótico padrão

A rifampicina – RMP (Sigma-Aldrich®) foi escolhida para ser o antibiótico padrão em todos os ensaios. A solução estoque foi preparada dissolvendo o antibiótico

em solução aquosa de etilenoglicol a 1%. A concentração de estoque para RMP foi de 1000 μ g/mL e a de uso ficou em 128 μ g/mL.

Adotou-se a rifampicina como antibiótico padrão para execução de todos os ensaios deste trabalho, visto que possui uma significativa correlação de CIM entre outras drogas de primeira linha (PHELAN et al., 2016), e uma alta sensibilidade (91,5%) e especificidade (100%) (RIBEIRO et al., 2004).

Os extratos foram pesados em balança analítica (BEL ENGINEERING) diluídos em água destilada com 1% de DMSO (Dimetilsulfóxido) para uma concentração de estoque de 1000 μ g/mL e armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) até o momento de sua utilização.

6.4 Screening

Para o processo de triagem, os dez extratos foram pesados e diluídos em água destilada estéril com DMSO a 1% até obtenção da concentração de 500 μ g/mL. Posteriormente filtrados por membranas com poros de 0,22 μ m e diâmetro de 47mm (Millipore®).

Para cada microtubo estéril de 1,5 mL, pipetou alíquotas de 100 μ L: da solução do extrato a 500 μ g/mL; do meio 7H9 + ADC e cepa H₃₇Rv (1:25), totalizando um volume de 300 μ L. O microtubo contendo o antibiótico padrão seguiu-se este modelo, com substituição do extrato para pipetagem de 100 μ L de rifampicina na concentração de 128 μ g/mL (Figura 17).

O controle positivo recebeu o meio 7H9 + ADC e H₃₇Rv (1:25), ambas alíquotas de 100 μ L. O controle negativo pipetou apenas 100 μ L de 7H9 + ADC A (Figura 17).

Os microtubos foram incubados em estufa a 37°C por sete (07) dias. Após este período, acrescentou-se 30 μ L de resazurina a 0,01% (p/v) em todos microtubos e reincubados por 24 horas, e posteriormente realizada leitura dos resultados (PALOMINO et al., 2002).

Os ensaios microbiológicos foram realizados em triplicata. Aqueles extratos que apresentaram atividade antimicobacteriana na concentração de 250 μ g/mL foram considerados promissores (ARANTES et al., 2005) e selecionados para serem submetidos aos ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

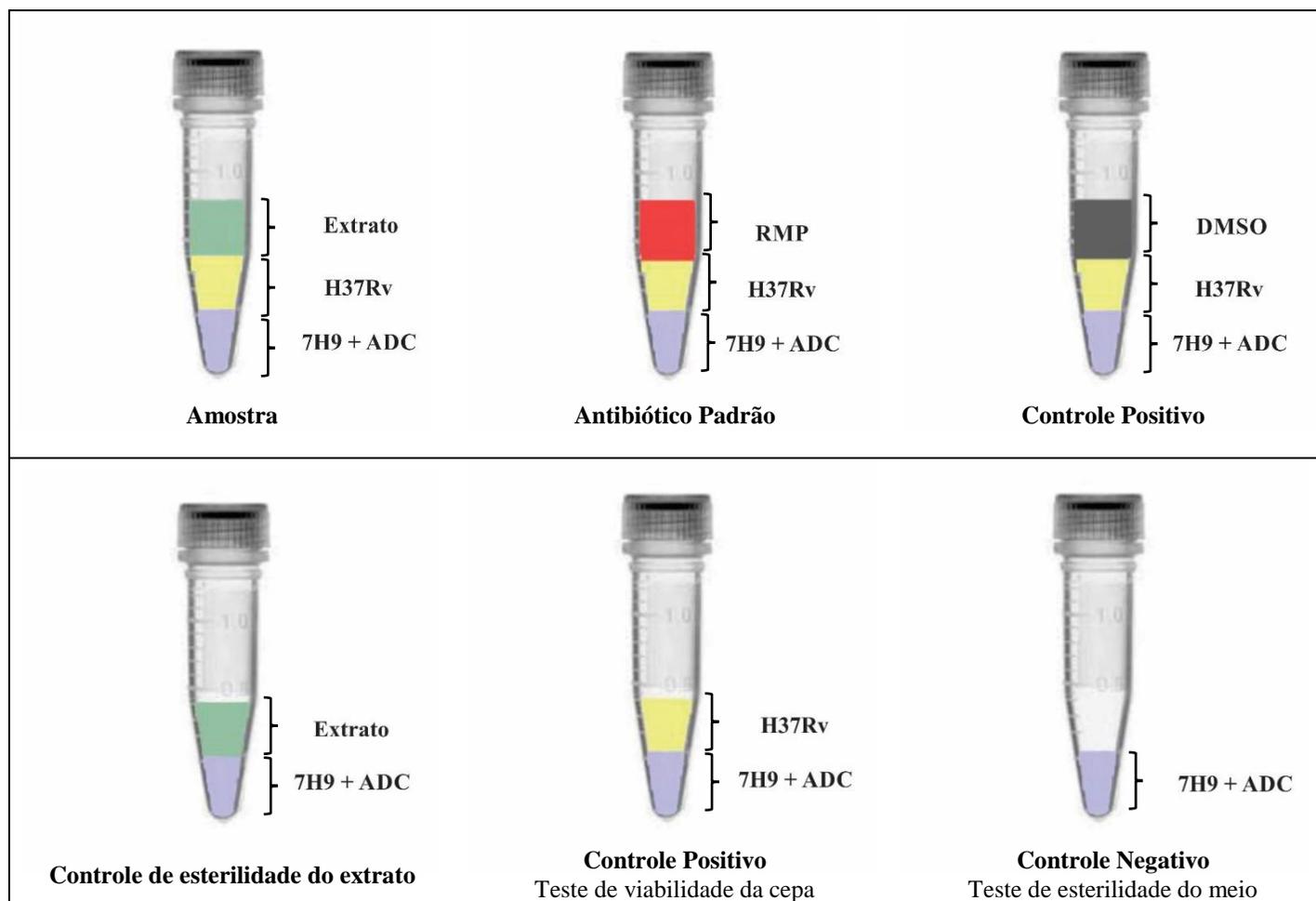


Figura 17– Representação do modelo para execução do *screening* para atividade antimicobacteriana.
 Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

6.5 Princípio do método por Resazurina (*i.e.* Alamar blue)

A resazurina, detém a nomenclatura 7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one, segundo a IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Possui solubilidade em água e estável no meio de cultura, ausência de toxicidade e permeável a membrana celular (RAMBERSAD, 2012).

Trata-se de um indicador fluorogênico/colorimétrico sensível a oxidação-redução (Figura 18) que têm alterações na coloração quando as células estão vivas - *i.e.* viabilidade celular (HAMID et al., 2004; O'BRIEN et al., 2000; RIBEIRO et al., 2004).

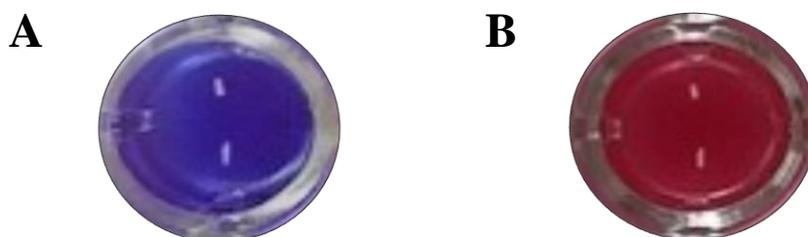


Figura 18 – Para análise utilizando método colorimétrico, a manutenção da cor azul da resazurina é um indicativo de que não ocorreu o crescimento microbiano (A). Uma mudança na coloração para rosa ou avermelhada significa que houve crescimento microbiano (B).
Fonte: Próprio autor (2017).

A forma oxidada do *alamar blue* possui cor azul e ausência de fluorescência. No interior das células, a atividade metabólica através de enzimas mitocondriais, este indicador sofre redução na estrutura de resazurina ($C_{12}H_7NO_4$) para resorufina (Figura 19), com mudança na coloração para avermelhada/rósea e capacidade de emitir fluorescência (NAKAYAMA et al., 1997; O'BRIEN et al., 2000).

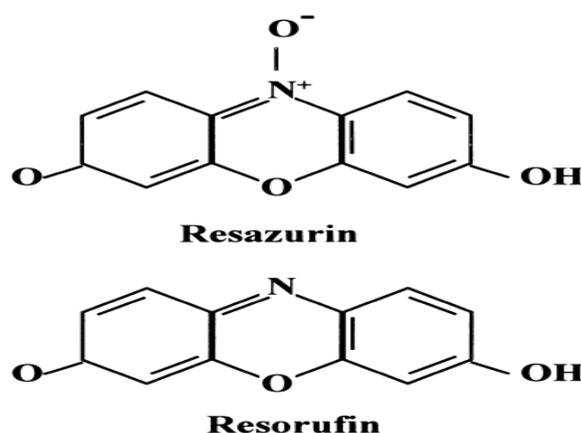


Figura 19 – Estruturas resazurina e resorufina.
Fonte: O'BRIEN *et al.*, 2000.

Os ensaios que envolvem resazurina ou *alamar blue*, possibilitam a mensuração da viabilidade celular, através da atividade metabólica (GLOECKNER; JONULEIT; LEMKE, 2001).

A mensuração pode ser aplicada pelos métodos de colorimetria, absorvância (oxidação – 600nm; redução – 570nm) e fluorescência (comprimento de excitação = 530-570 nm; emissão = 590-620 nm) (O'BRIEN et al., 2000; RAMPERSAD, 2012).

6.6 Avaliação da atividade antimicrobacteriana e CIM

Os extratos selecionados mediante o processo de triagem, foram submetidos ao processo de diluições seriadas em microplacas estéreis com 96 poços com fundo chato (Figura 20), pelo método de MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*) descrito por Franzblau et al. (1998) a fim de determinar a menor concentração do extrato capaz, de prevenir a alteração de cor do indicador (resazurina) de azul para rosa (ARANTES et al., 2005).

Pipetou-se 200 µL de água estéril tipo I em cada poço da microplaca na coluna 1 entre as linhas A e H, no intuito de minimizar a evaporação do meio durante a incubação. Os demais poços receberam 100 µL do meio 7H9+ADC.

Para os extratos usou-se uma concentração inicial de 250 µg/mL, após diluições seriadas as concentrações finais foram: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95; 0,97; 0,49µg/mL. A concentração final de RMP (antibiótico padrão) nos poços 3G-12G ficou 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625µg/mL (Figura 20).

Uma alíquota de 100 µL da suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* - H₃₇Rv (1:25) foi pipetada nos poços entre 3A-12G (extratos e antibiótico); 2H-4H (controle positivo) e 10H-12H (com DMSO); o que resultou no volume final de 200µL em cada orifício da microplaca.

As placas foram seladas com parafilme e incubadas em câmara úmida a 37°C por sete (07) dias. Após este período foram pipetadas 20 µL de solução de resazurina a 0,01% (p/v). As placas foram novamente reincubadas a 37°C por 24 h (FRANZBLAU et al., 1998).

A manutenção da coloração azul nos poços é interpretada como não houve crescimento, enquanto a rósea indica crescimento bacteriano. A CIM (Concentração inibitória mínima) é definida como a menor concentração do extrato/droga capaz de evitar a mudança na coloração de azul para rósea (FRANZBLAU et al., 1998).

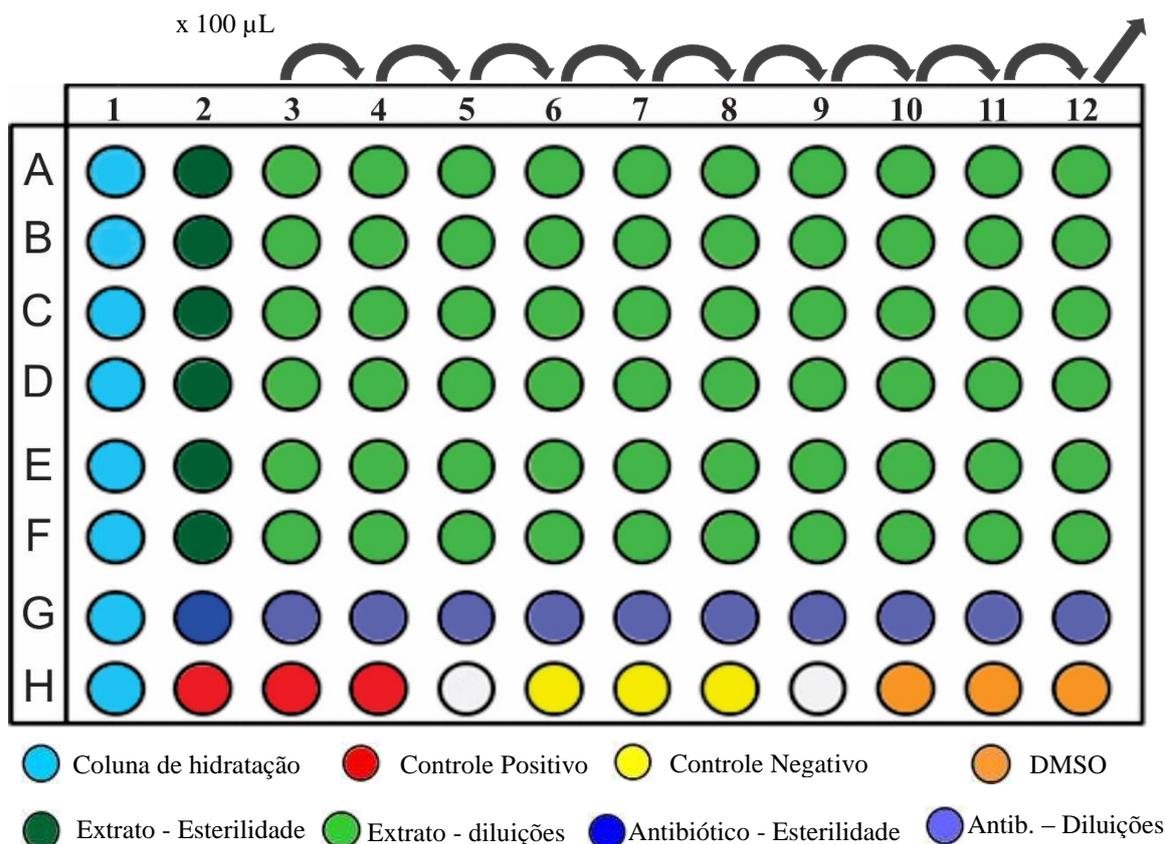


Figura 20 – Modelo padronizado para procedimento de diluição seriada das amostras e controles, no intuito de determinar a Concentração Inibitória Mínima frente a cepa H₃₇Rv (*M. tuberculosis*).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

6.7 Análise Fitoquímica Qualitativa

Os extratos que apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM) menor que 100 μ g mL⁻¹, foram selecionados, em razão do valor ser promissor para a atividade antimicobacteriana (KUETE, 2010).

Na análise fitoquímica, seguiu-se metodologia de prospecção preliminar qualitativa baseada na detecção de alguns constituintes importantes dos grupos metabólicos secundários (SIMÕES et al., 2007; MIRANDA et al., 2013).

O formato de seleção (CIM < 100 μ g mL⁻¹) e análise fitoquímica preliminar possibilitaram a execução de triagens, farmacológicas e fitoquímica iniciais, de baixo custo e para algumas espécies que tenham um escasso estudo científico. Os grupos

metabólicos investigados foram: saponinas, fenóis, taninos, esteroides, triterpenóides, antraquinonas, flavonoides e cumarinas.

Os testes foram considerados positivos (*i.e.* presença) através de análise visual realizadas pela modificação de características físicas, tais como: reações de precipitação, mudança na coloração, formação de espumas e manchas coloridas (Tabela 6) conforme técnicas de análise fitoquímica por Simões *et al.* (2007) e Miranda *et al.* (2013).

Tabela 6 – Ensaio de detecção preliminar qualitativa de alguns grupos metabólicos secundários

Grupos	Método*	Indicador
Saponina	Teste de espuma-agitação	Formação e persistência de espuma por mais de 30 segundos.
Fenóis/Taninos	Reação com cloreto férrico (FeCl ₃)	Mudança na coloração, cor azul (taninos hidrolisáveis) ou verde (taninos condensados); com formação de precipitado (ppt).
Esteroides e Triterpenóides	Extração com clorofórmio, anidrido acético e ácido sulfúrico. (Reação de Liebermann-Burchard)	Surgimento de uma coloração azul evanescente ou seguida de verde.
Flavonóides	Reação de Magnésio granulado com ácido clorídrico (Teste de Shinoda)	Surgimento de coloração róseo a vermelho.
Alcalóides	Reativos de Dragendorff	Formação de ppt laranja ou turvação da solução (sç)
	Reativos de Mayer	Formação de ppt laranja ou turvação da sç.
	Reativos de Bouchardat	Formação de ppt vermelho ou turvação da sç.

* Simões *et al.* (2007); Miranda *et al.* (2013)

6.8 Fracionamento dos extratos

Alíquotas de 5,0 g do extrato de seco de cada planta foram solubilizados em 100 mL de solução hidroalcoólica (MetOH:H₂O) na proporção de 4:1 (v/v/). A solução obtida foi transferida para um funil de separação e submetida a partições sucessivas utilizando solventes de ordem crescente de polaridade: n-hexano (5 x 30 mL) e diclorometano (5 x 30 mL).

Após o fracionamento, os solventes foram removidos sob pressão reduzida através do aparelho evaporador rotativo, à temperatura máxima de 40°C ±2°C, que originou as frações hexânicas, diclorometânicas e hidroalcoólicas, conforme representado na Figura 21.

Os extratos foram liofilizados e seus os resíduos obtidos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, ao abrigo da luz e posteriormente conduzidos para os ensaios biológicos.

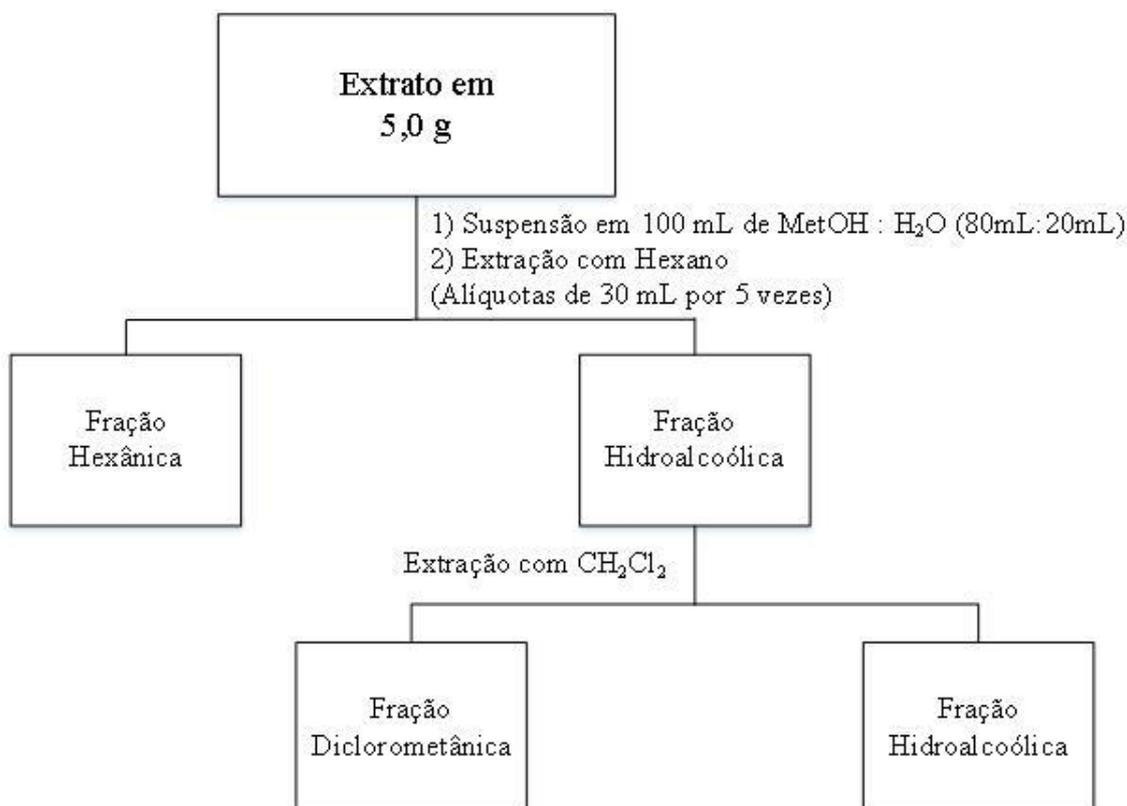


Figura 21 – Representação da metodologia utilizada na partição dos extratos.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

6.9 Ensaios de Citotoxicidade

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos foi utilizado o teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil Brometo de Tetrazólio). O princípio deste método descrito por Mosmann (1983), consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática de oxirredutase das células vivas.

Os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos no Laboratório de Parasitologia, sob coordenação do Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque. Está localizado no Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas, vinculado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto.

As células foram cultivadas em garrafas de 25cm² utilizando como meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% (v/v) soro bovino fetal (SBF), 100 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 25µg/mL de anfotericina B, incubadas em estufa de CO₂ a 5% sobre atmosfera úmida (> 90%) e 37 °C de temperatura.

Para o teste, uma alíquota de 200µL foi depositada em cada poço da microplaca com suspensão celular de 1,0 x 10⁵ células/mL da linhagem LLC-MK₂ e/ou Vero. A microplaca de 96 poços, foi incubada a 37°C com 5% de CO₂, por 48 horas para formação do tapete celular. Retirou-se 100 µL da cultura de todos os poços.

Os compostos foram diluídos em série de base dois (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,9 µg mL⁻¹) e pipetados 100 µL de cada concentração na microplaca contendo o tapete celular. Incubou novamente a microplaca em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas.

Após este tempo, foram adicionados aos poços de cultivo celular 50 µL da solução de MTT (2,5mg/mL) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) dissolvidos em PBS (Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*) e filtrados para esterilização e remoção de pequena quantidade de resíduos.

Após 3 horas de incubação com o MTT ao abrigo da luz, foram acrescentados 50 µL DMSO (dimetilsufóxido) para dissolver os cristais de azul de formazan. A placa foi agitada levemente para solubilização do formazan e submetida a leitura sob absorvância a 570 nm usando espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA).

Pipetou-se 100 µL de solução salina estéril no lugar do extrato nos poços que continham DMEM + LLC-MK₂/Vero para que representasse 100% de viabilidade

celular (Branco). Para o controle positivo usou-se 100 μ L de sç. de Triton X-100 a 20% em poços com DMEM + LLC-MK₂/Vero.

Quanto ao controle negativo foi pipetado apenas 200 μ L de DMEM; e controles para avaliar o potencial do DMSO em interferir no formazan (200 μ L de DMEM + DMSO a 1,0%) ou afetar as células (200 μ L DMEM + DMSO 1,0% + VERO).

O percentual de viabilidade celular foi determinado a partir da seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = (Absorbância do poço tratado) / (Absorbância do branco) x 100.

O valor de IC₅₀ (*Inhibitory Concentration* - Concentração (μ M) capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi determinada por meio da curva dose-resposta no formato sigmoide, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Conforme critérios da ISO (2009), um extrato capaz de lisar não mais que 20% das células será classificado como ligeiramente citotóxico; entre 21 e 50% apresenta uma ação leve; de 51 a 70% efeito moderado e mais que 70% uma ação citotóxica severa. A ausência de lise celular é considerada como não citotóxico.

Para análise estatística da atividade de citotoxicidade *in vitro* empregou-se a média de duas repetições \pm desvio padrão. Os ensaios foram feitos em triplicata em dias alternados. A análise entre grupos diferentes foi avaliada pelo método de t-test *Student's* (valor $p \leq 0.05$)

6.10 Princípio do método Formazan

O reagente MTT é um substrato amarelo pálido hidrossolúvel que sofre redução (clivagem mitocondrial pelas desidrogenases) para um composto azul-escuro (insolúvel em água), denominado *formazan*, quando incubado com células vivas (MOSMANN, 1983). O ensaio é capaz de detectar um número mínimo de células vivas (*i.e.* 200), cuja formação de *formazan* é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

6.11 Linhagens de células utilizadas nos ensaios

Neste estudo trabalhou-se com dois tipos de células: LLC-MK₂ e Vero (Figura 22). As células de linhagem LLC-MK₂ são células epiteliais de tecido renal de macacos *rhesus* (*Macaca mulatta*), ATTC® CCL-7™. Enquanto que as células Vero (FIGURA 22-B) são originárias do rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*), ATCC® CCL-81™.

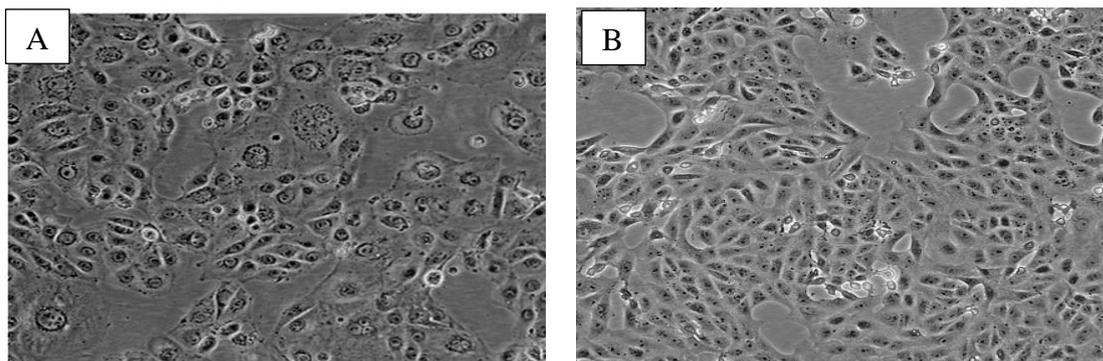


Figura 22 – Imagem microscópica de células cultivadas em garrafas a 5% de CO₂ a 37° C de temperatura. (A) Confluência de células de linhagem LLC-MK₂. (B) Confluência de células de linhagem Vero.

Fonte: ATCC (2017)[†]

As duas linhagens células (LLC-MK₂ e Vero) foram cultivadas em garrafas pequenas de cultura celular (25cm²), utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*), suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF), 100µg/mL estreptomicina, 100 UI/mL penicilina e 25µg/mL anfotericina B. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% sobre atmosfera úmida a 37 °C de temperatura.

Ao atingir 80% de confluência de células nas garrafas, retirou o meio e pipetou 1 mL de solução estéril de tripsina a 0,20% (m/v) e EDTA a 0,02% (m/v) dissolvidos em PBS, por 1 minuto. Acrescentou 4 mL de meio DMEM com 5% SBF e retirou todo conteúdo da garrafa para tubo tipo Falcon e centrifugou a 1000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi aspirado e o precipitado contendo as células (LLC-MK₂ e/ou Vero) foi ressuspenso em 1 mL de DMEM. Uma alíquota (10µL) desta suspensão foi pipetada em câmara de Neubauer e com auxílio de um microscópio realizou-se a contagem de células, a fim de ajustar o valor da suspensão para concentração de trabalho em 1 x 10⁶ células/mL.

[†] Disponível em: < <https://www.atcc.org/> >. Acesso em 11 Jul. de 2017.

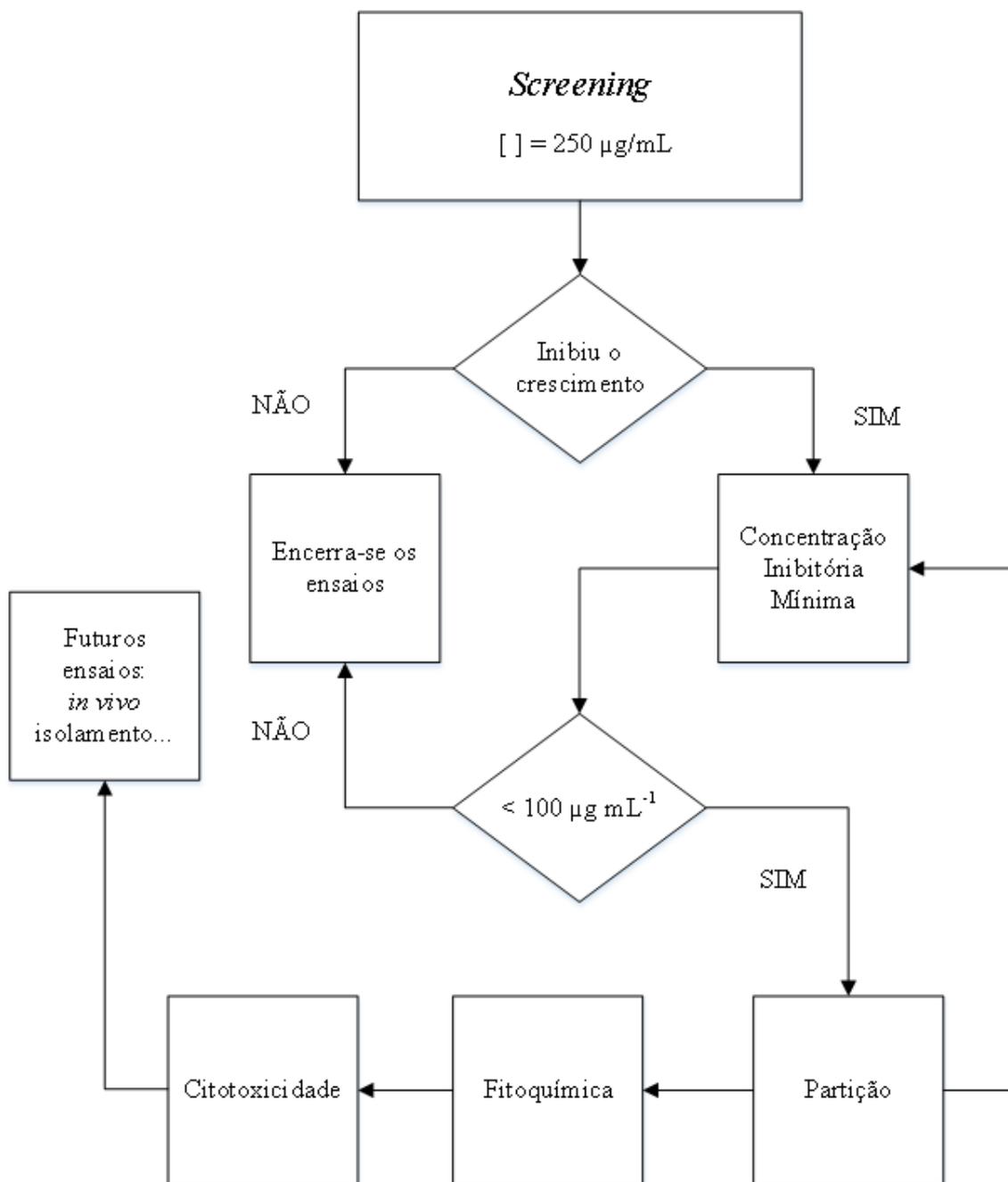


Figura 23 - Fluxograma de todas etapas executadas na pesquisa.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2016).

7 RESULTADOS

Os extratos brutos hidroalcoólicos na concentração de 250 µg/mL, foram submetidos ao processo de triagem frente à cepa H₃₇Rv (ATCC 27294) e apresentaram diferentes resultados conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Relação dos extratos que foram avaliados quanto à atividade antimicobacteriana, frente à cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), na concentração de 250 µg/mL

Extratos	Abreviação	Atividade Antimicobacteriana
<i>Plathymenia reticulata</i>	Ext1	Sem atividade
<i>Ouratea spectabilis</i>	Ext2	Inibiu crescimento
<i>Galactia glaucescens</i>	Ext3	Sem atividade
<i>Apuleia molaris</i>	Ext4	Inibiu crescimento
<i>Dipteryx alata</i>	Ext5	Inibiu crescimento
<i>Brosimum gaudichaudii</i>	Ext6	Inibiu crescimento
<i>Tabebuia coraíba</i>	Ext7	Inibiu crescimento
<i>Pterodon emarginatus</i>	Ext8	Sem atividade
<i>Terminalia fagifolia</i>	Ext9	Sem atividade
<i>Stachytarpheta</i> sp.	Ext10 ^{***}	Inibiu crescimento

A maioria dos extratos brutos (60%) obtiveram alguma atividade antimicobacteriana, correspondendo aos extratos: Ext2, Ext4, Ext5, Ext6, Ext7 e Ext10, para definição de suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs), através das diluições em microplacas de 96 poços (Figura 24).

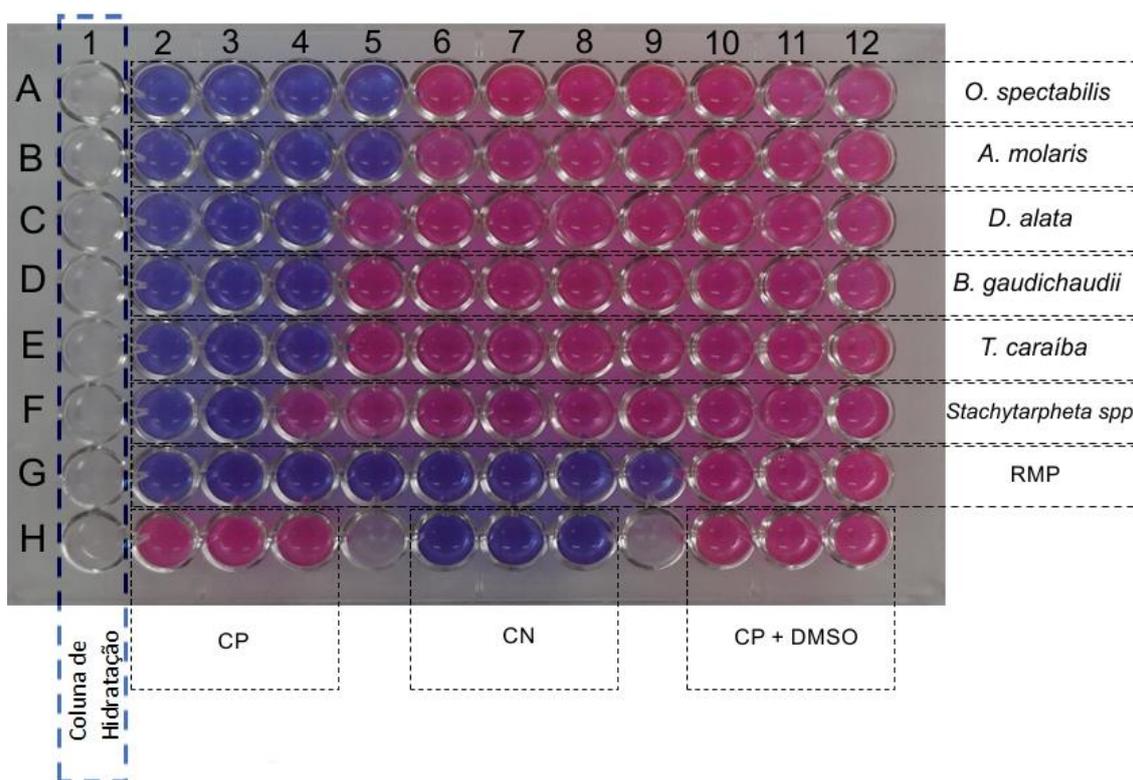


Figura 24 – Microplaca de 96 poços com os extratos: *Ouratea spectabilis* (2A-12A); *Apuleia molaris* (2B-12B); *Dipteryx alata* (2C-12C); *Brosimum gaudichaudii* (2D-12D); *Tabebuia caraiba* (2E-12E); *Stachytarpheta* sp. (2F-12F), para definição de suas concentrações inibitórias mínimas.

Nota: Toda coluna 1 (A-H) representa poços de hidratação, no intuito de evitar desidratação da microplaca. A Rifampicina (Antibiótico Padrão) foi utilizada entre os poços 2G-12G (CIM = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os controles Positivos (CP) são representados entre os poços 2H-4H. Os controles Negativos (CN) estão entre os poços 6H-8H. E controles positivo com DMSO nos poços 10H-12H. A persistência da coloração azul nos poços indica que não ocorreu crescimento micobacteriano. A mudança de coloração para rosa nos poços indica que ocorreu crescimento micobacteriano.

Fonte: Autor (2016).

A Figura 25 expõem os seis extratos brutos hidroalcoólicos com os valores das CIMs entre $250 - 62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* (ATCC 27294). Os extratos *Ouratea spectabilis* e *Apuleia molaris* obtiveram as concentrações mais significativas (CIM < $100 \mu\text{g/mL}$), com potencial antimicrobiano promissor (boa inibição), conforme o critério de classificação adotado por Kuete (2010). Os demais extratos desempenharam uma atividade moderada ($100 < \text{CIM} \leq 625 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Para o processo de partição e identificação fitoquímica, foram escolhidos os extratos com CIM menores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, *i.e.* ponto de corte (KUETE, 2010), conforme apresentado na Figura 25. Neste critério, os únicos que atenderam o requisito foram: *O. spectabilis* (Ext2) e *A. molaris* (Ext4), ambos com concentrações de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, capazes de inibir o crescimento da cepa H₃₇Rv.

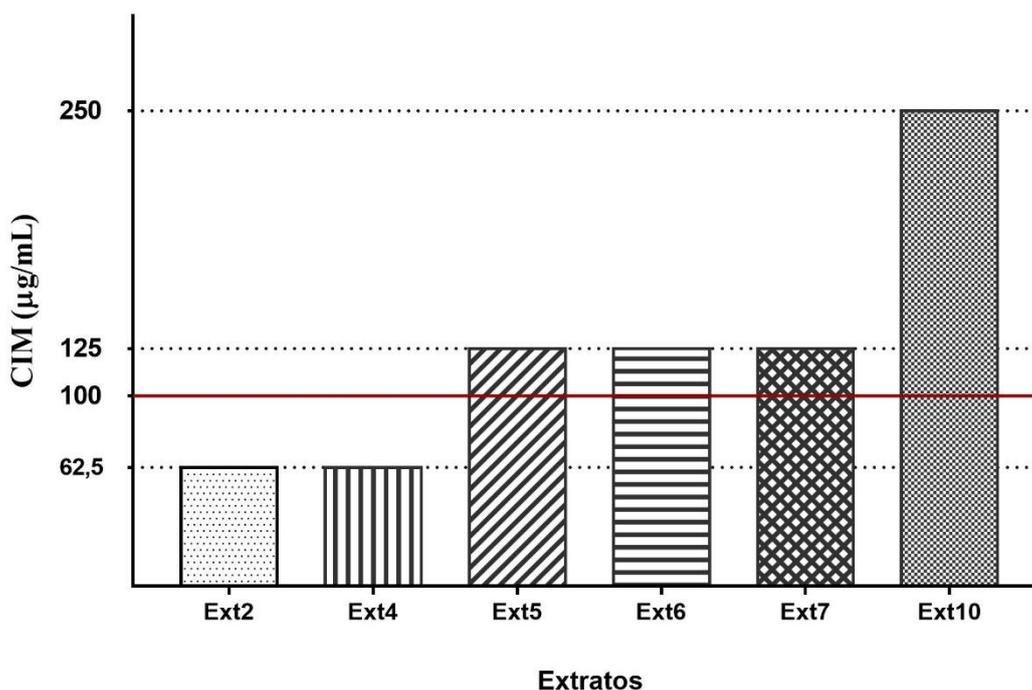


Figura 25 – Gráfico de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos selecionados nos ensaios de triagem.

Nota: *Ouratea spectabilis* (Ext2); *Apuleia molaris* (Ext4); *Dipteryx alata* (Ext5); *Brosimum gaudichaudii* (Ext6); *Tabebuia coraíba* (Ext7); *Stachytarpheta* sp.(Ext10). A Rifampicina (Antibiótico Padrão) apresentou CIM = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ponto de corte (CIM < $100 \mu\text{g mL}^{-1}$)

As espécies *O. spectabilis* e *A. molaris*, demonstraram potencialidades quanto a atividade antimicobacteriana. Seus resultados foram relevantes, portanto, foram avaliados quanto a presença de alguns grupos metabólicos secundários através de ensaios fitoquímicos preliminares qualitativos (Tabela 8).

Tabela 8 – Testes de identificação fitoquímica preliminar qualitativa para extratos hidroalcoólicos liofilizados de *Ouratea spectabilis* e *Apuleia molaris*, duas espécies vegetais nativas do cerrado tocantinense.

Grupo de metabólico secundário	Extratos Etanólico Bruto	
	<i>O. spectabilis</i>	<i>A. molaris</i>
Saponina	(+)	(+)
Taninos	(+)	(+)
Fenóis	(+)	(+)
Alcalóides**		
RB	(-)	(-)
Flavonóides	(+)	(+)
Esteróides/Triterpenoides	(+)	(+)

(-) Ausente; (+) Presente; * presença de taninos catéquicos (coloração esverdeada).

** Reagente de Bouchardat - RB.

As análises (Tabela 8) revelaram presença de compostos com características antimicrobianas intrínsecas em ambos extratos analisados. É perceptível que há similaridade quanto a presença dos principais grupos metabólicos secundários. Situação que provavelmente esteja associado ao expressivo desempenho dos dois extratos frente à cepa micobacteriana H37Rv.

Quanto ao processo de particionamento resultou em três frações: hexânica (Hex); diclorometânica (DMC) e hidroalcoólica (MetOH) para cada amostra (Ext2 e Ext4). Estas partições foram novamente avaliadas quanto a atividade antimicrobacteriana e determinação da CIM, conforme exposto na Figura 26.

O fracionamento do extrato de *O. spectabilis*, resultou na elevação das CIMs para suas frações. Isto sugere o envolvimento de diversos compostos com capacidade de agirem sinergicamente como ação antimicrobacteriana, visto que o extrato bruto tenha sido o mais eficaz (Tabela 9).

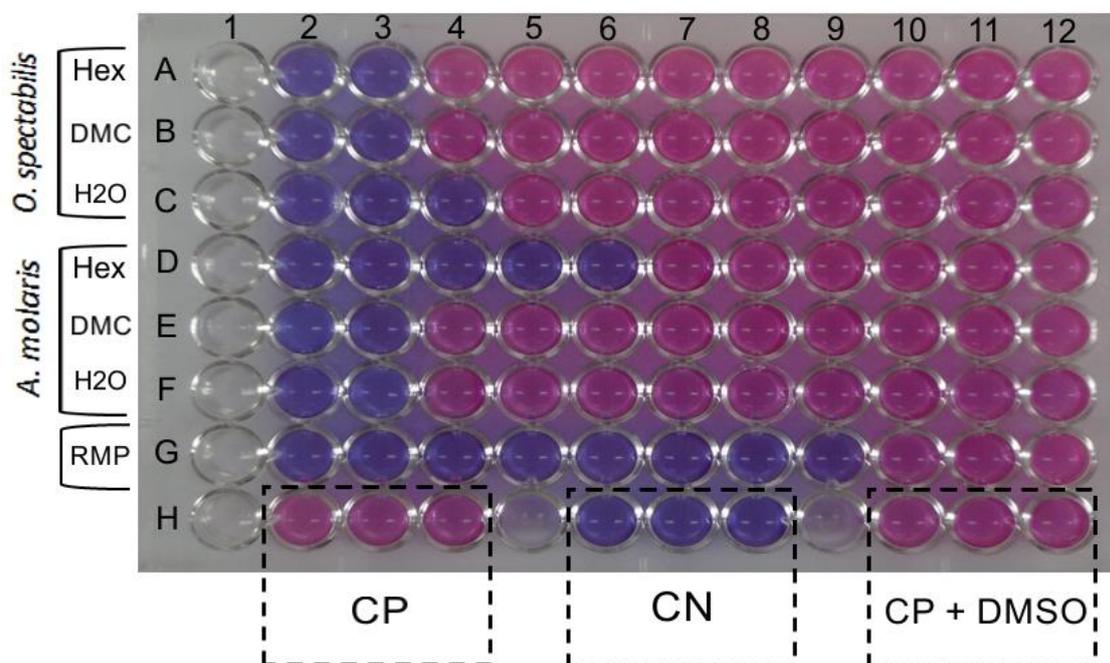


Figura 26 – Determinação de CIM para as frações Hexânica (Hex), Diclorometânica (DMC) e Aquosa (H₂O) dos extratos de *O. spectabilis* (Ext2) e *A. molaris* (Ext 4) frente a cepa *M. tuberculosis* H37Rv.

Nota: Toda coluna 1 (A-H) representa poços de hidratação, no intuito de evitar desidratação da microplaca. A Rifampicina (RMP), Antibiótico Padrão, foi utilizada entre os poços 2G a 12G. Os controles positivos (CP) são representados entre os poços 2H a 4H. Os controles negativos (CN) estão entre os poços 6H a 8H. E CP com DMSO nos poços 10H a 12H. A persistência da coloração azul nos poços indica que não ocorreu crescimento micobacteriano. A mudança de coloração para rosa nos poços indica que ocorreu crescimento micobacteriano.

Fonte: Autor (2016).

A partição hexânica de *A. molaris*, foi a que demonstrou os resultados mais expressivos de todo o estudo, capaz de inibir crescimento da cepa H₃₇Rv com a menor concentração de 31,25 µg/mL (Tabela 9).

Tabela 9 – Rendimento e CIM em diferentes frações obtidas dos extratos brutos de *Ouratea spectabilis* e *Apuleia molaris* contra *M. tuberculosis*.

Extratos	Frações*	Rendimento (%)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)**
<i>Ouratea spectabilis</i>	Hex	10,3	250
	DMC	14,5	250
	MetOH	22,7	125
<i>Apuleia molaris</i>	Hex	16,2	31,25
	DMC	22,8	250
	MetOH	30,4	250

* Frações: Hex – Hexânica; DMC – Diclorometânica e MetOH – hidroalcoólica; ** A Rifampicina (Antibiótico Padrão) apresentou valor de CIM = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Sobre os experimentos de citotoxicidade envolvendo as células Vero (Figura 27), o gráfico em escala logarítmica apresenta uma curva de crescimento de morte celular conforme há uma elevação nas concentrações dos respectivos extratos *A. molaris* e *O. spectabilis*.

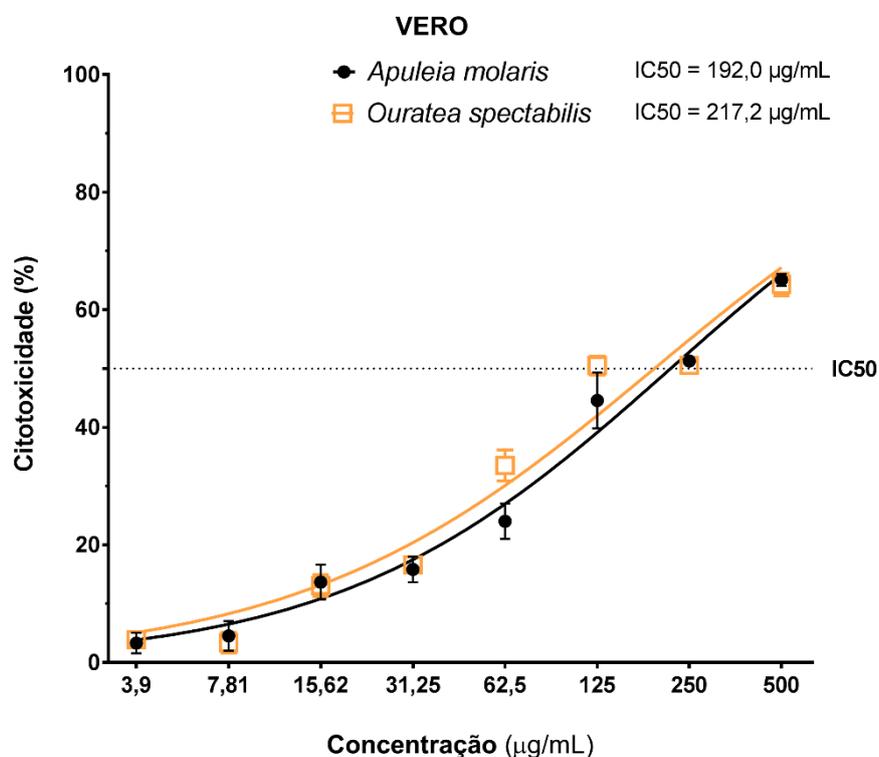


Figura 27 - Citotoxicidade (IC₅₀) dos extratos brutos de *O. spectabilis* e *A. molaris* em células Vero ($1,0 \times 10^5$ células/mL).

Foi obtido uma IC_{50} de $192,0\mu\text{g/mL}$ e $217,20\mu\text{g/mL}$ respectivamente para os extratos *A. molaris* e *O. spectabilis*. Não ocorreu diferença estatística entre os dados pareados pelo teste t-student ($t = 1,23$; $p = 0,26$) e suas curvas (*A. molaris*, $r = 0,977$; *O. spectabilis*, $r = 0,958$) detêm uma performance semelhante (Figura 27).

Os extratos de *A. molaris* e *O. spectabilis* obtiveram CIMs iguais ($62,5\mu\text{g/mL}$) frente a cepa H37R_v. Nesta concentração os extratos foram capazes de reduzir respectivamente 24% (± 2) e 33% (± 2) da viabilidade celular para linhagem Vero. Conforme os critérios da ISO (2009), ambos os extratos demonstraram citotoxicidade leve frente as células Vero.

Ao submeter as células LLC-MK₂ nos testes de citotoxicidade envolvendo novamente os extratos *A. molaris* e *O. spectabilis* (Figura 28), ficou demonstrado um efeito citotóxico maior em relação as células Vero, conforme os valores de IC_{50} : $95,2\mu\text{L}$ e $49,8\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

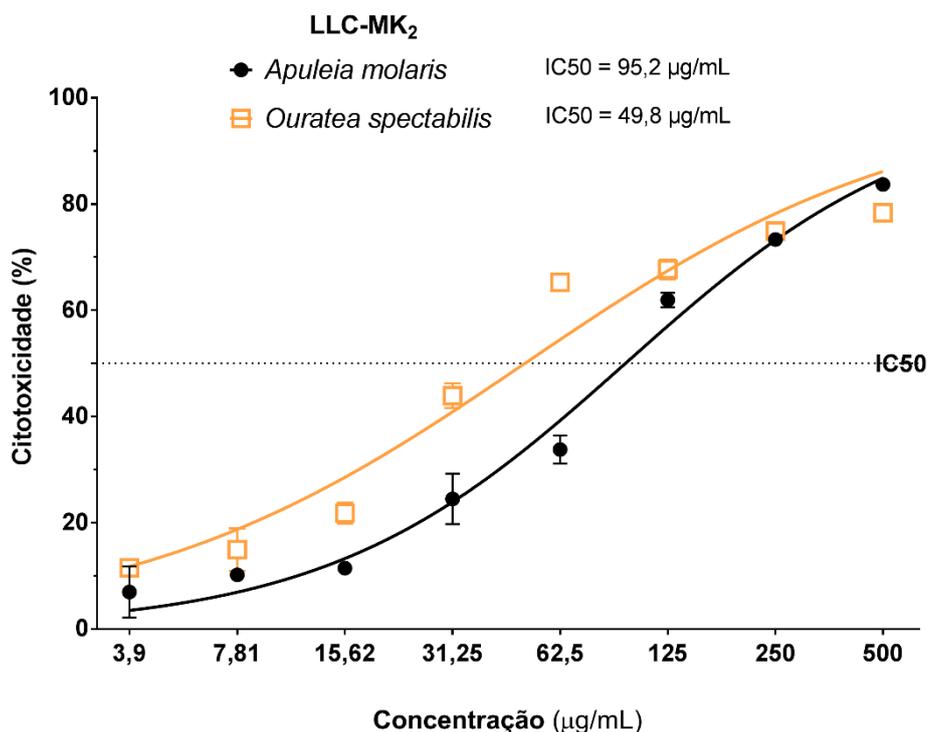


Figura 28 - Citotoxicidade (IC_{50}) dos extratos brutos de *O. spectabilis* e *A. molaris* com células LLC-MK₂ ($1,0 \times 10^5$ células/mL).

Apesar de ocorrer um certo distanciamento entre alguns pontos da curva (*A. molaris*, $r = 0,983$; *O. spectabilis*, $r = 0,949$), quanto a análise estatística de t-student não há diferença entre os ensaios ($t = 2,23$; $p = 0,06$) (Figura 28).

Sob o critério ISO (2009), o extrato *A. molaris* apresentou efeito citotóxico leve (CIM = 62,50µg/mL com perda celular de 34% ±2) e *O. spectabilis* uma ação citotóxica moderada (CIM = 62,50µg/mL com perda celular de 65% ±1), para linhagem LLC-MK₂.

8 DISCUSSÃO

Para *Plathymenia reticulata*, há descrição de ensaios que comprovem alguma atividade antimicrobiana significativa frente a bactérias Gram-Positivas (FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005), entretanto há casos de experimentos que apresentam conclusões contraditórias como Toledo et al. (2011) que afirma ser uma atividade reduzida, com uma melhor efetividade para leveduras (*Candida* sp.) e uma baixa citotoxicidade.

A presença de taninos na entrecasca desta espécie é capaz de inibir os efeitos tóxicos ocasionados pelo veneno da *Brothrops atrox* e *B. jararacussu*. Esta capacidade de reverter o bloqueio neuromuscular e efeitos miotóxicos, decorre da precipitação de proteínas contidas no veneno (MOURA et al., 2016)

Para Ruppelt *et al.* (1991) espécies que geralmente tem indicação popular para antiofidismo possuem uma capacidade antiinflamatória, que esteja relacionada a presença de flavonoides. A *P. reticulata* apresenta estes efeitos conforme descrito nos estudos por Fernandes (2002) e Moura et al. (2016).

O extrato desta planta também obteve expressiva atividade leishmanicida (*Leishmania amazonensis*), cuja ação biológica possa ser associada a presença de taninos e flavonoides em sua composição química (LIMA *et al.*, 2015).

Neste estudo, apesar de possuir capacidade em agir contra certos microrganismos, o extrato bruto da *P. reticulata* não demonstrou efetividade para inibir o crescimento de cepa *M. tuberculosis*.

A *Ouratea spectabilis*, tem a capacidade de inibir a germinação e o crescimento de outras espécies sob seu dossel, através da síntese de compostos fitotóxicos (atividade alelopática), entre eles a predominância de flavonóides dos grupos das isoflavonas e catequinas, ambos detectados nas folhas do extrato hidroalcoólico da fração de acetato de etila (MECINA et al., 2014).

Valadares et al. (2003) ao comparar perfis cromatográficos entre três tipos diferentes de extratos hidroalcoólicos das espécies da *Ouratea* spp. (*O. semiserrata*, *O. castanaefolia* e *O. spectabilis*), demonstrou a presença de composições complexas em todas as amostras analisadas, com maior percentual no caule em relação as suas folhas.

Entretanto sua atividade vasodilatadora significativa só foi confirmada na espécie *O. semiserrata*. Ação biológica fortemente associada a presença de proantocianidinas distintas as outras espécies (VALADARES et al., 2003).

Para Suzart *et al.* (2007) a presença de proantocianidinas nos gêneros de *Ouratea*, permite que sirvam de marcadores quimiotaxonômicos, bem como desempenhar algum potencial farmacológico.

Nesta pesquisa, os ensaios envolvendo o extrato bruto hidroalcolóico de *O. spectabilis* apresentaram uma atividade antimicobacteriana expressiva (CIM = 62,5µg/mL). Sobre esta ação antimicobacteriana é provável que seja atribuída a presença de taninos, triterpenoides, flavonoides e/ou saponinas, pois estes são metabólitos secundários conhecidos pelo seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (CANTRELL; FRANZBLAU; FISHER, 2001).

Contudo, as frações (Hex, DMC, MetOH) de *O. spectabilis*, não obtiveram melhores resultados (CIM \geq 125 µg/mL), que seu extrato bruto. Tal fenômeno possa ter explicação quanto a ação sinérgica de substâncias presentes em sua composição e/ou a formação de complexos que promovam a intensidade de suas atividades terapêuticas.

As ações terapêuticas antiofídicas a partir de extratos vegetais, geralmente estão vinculadas a presença de compostos como: rutinas, taninos e cumarinas. Cintra-Francischinelli et al. (2008), evidenciaram uma redução desta atividade quando estas substâncias foram isoladas do extrato de *Casearia sylvestris* e concluiu que o poder de ação está associado a capacidade de estabelecer sinergismo entre esses compostos.

Para Delaquis et al. (2002), as frações podem apresentar sinergismo e/ou antagonismo, capazes de influenciar nos efeitos microbiológicos.

Didry, Dubreuil e Pinkas (1994), avaliaram combinações de substâncias bioativas que propiciaram diferentes respostas através do quantitativo de CIM, dentre elas, a capacidade de sinergismo entre timol e carvacrol, contrários aos microrganismos presentes na cavidade oral.

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* conduzidos por Kaushik et al. (2017), confirmaram o sinergismo entre rifampicina e biapenem contrários *M. tuberculosis*. Estes antibióticos exerciam efeito bacteriostático quando utilizados isoladamente, mas quando coadministrados obtiverem um alto e ágil efeito bactericida sobre H₃₇Rv.

A fração hidroalcolóica do extrato *O. spectabilis*, embora não tenha superado os resultados alcançados pelo extrato bruto, dentre as frações, foi a que apresentou os melhores resultados.

Trata-se de uma fração com alta polaridade, com chances maiores no isolamento de compostos do tipo flavonóides, visto que estes foram detectados nos ensaios das amostras do extrato bruto de *O. spectabilis*.

Os compostos biflavonóides como 6,6''-bigenkawanin e 7,7''-dimetoxi-agasthisflavona, foram isolados das folhas de *O. spectabilis*. Ambos detêm a capacidade de inibir a enzima aldose redutase (FELICIO et al., 1995), além de inativar aflatoxinas (substâncias toxigênicas) produzida por *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ; FELICIO; PINTO, 2001) possuem baixa citotoxicidade para células de córnea de coelho (SIMONI et al., 2002).

As análises de Simoni et al. (2002) corroboram com os resultados apresentados neste trabalho para uma baixa citotoxicidade de *O. spectabilis* sobre as linhagens de células Vero.

Moraes et al. (2012), testaram o extrato etanólico da casca de *Pterodon emarginatus* e suas frações quanto o efeito antiinflamatório em camundongos. As frações: hexânica (rica em lupeol) e diclorometânica (com betulina), ambos triterpenoides, exibiram tal atividade, cujas doses foram proporcionalmente maiores que o extrato bruto (i.e. mais eficaz), o que sugere que suas atividades ocorram de maneira sinérgica.

A espécie *Galactia glaucescens* demonstrou poucos estudos científicos. Destes, foram descritas atividades biológicas como ação: leishmanicida moderada (LIMA et al., 2015) e inibição de paralisia neuromuscular induzida por veneno *Crotalus durissus terrificus* (BELO et al., 2008).

Suas atividades biológicas podem ser associadas a intensa presença de alcaloides em sua constituição (BARROS; SILVA; PORTO, 2014), que são capazes de lisar as membranas de protozoários e/ou inibir as proteínas do veneno.

A presença de taninos no extrato de *G. glaucescens* (LIMA et al., 2015) permitiram que ocorresse a inibição dos efeitos do veneno. Estes compostos detêm propriedades físico-químicas capazes de precipitar proteínas e de promover a perda da toxicidade, o que sugere um fator protetivo em plantas ricas em taninos (NAZATO et al., 2010).

São escassos os estudos sobre *Apuleia molaris*, a maioria está associada a caracterização morfológica da espécie (SOUZA; VARELA; BATALHA, 1994, REIS et al., 2016).

Alguns ensaios na literatura foram conduzidos com extratos da casca e revelaram a presença de algumas flavonas (FILHO; GOTTLIEB, 1971), taninos, flavonoides (RUPPELT et al., 1991) e triterpenos (MUÑOZ et al., 2000), com expressivas atividades biológicas confirmadas para analgesia, antiinflamatória (RUPPELT et al., 1991) e antimalárica (MUÑOZ et al., 2000).

Um estudo etnofarmacológico envolvendo a etnia Chacobo - indígenas da Amazônia Boliviana, confirmou que extrato etanólico da casca de *A. leiocarpa* apresentava boa atividade antimalárica “*in vivo*” (250mg/kg) contra *Plasmodium berghei*, capaz de inibir 53% destes parasitas em camundongos. Sua atividade provavelmente esteja associada a presença de β -amirina (MUÑOZ et al., 2000), um triterpenoide com propriedades anti-inflamatórias e sedativas (PINTO et al., 2007).

Neste estudo a fração hexânica da *A. moralis*, apresentou os melhores resultados (CIM = 31,25 μ g/mL) em inibir a cepa H37Rv, inclusive em relação ao seu extrato bruto. Situação, que possa estar associada a um maior isolamento de compostos apolares do tipo terpenos, demonstrando serem mais eficazes contra as cepas de *M. tuberculosis*.

Há ensaios que descrevem compostos naturais com expressivo efeito de inibição quando estes estão isolados (DELAQUIS et al., 2002, DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994), como o caso de se utilizar apenas cinamaldeído em resposta a presença de microrganismo característico da cavidade oral (DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994).

Tal fato se assemelha aos experimentos com plantas do cerrado conduzidos por Pavan et al. (2009), no qual obteve extratos com atividades promissoras para *M. tuberculosis*. Os extratos foram submetidos a extração de compostos apolares através de clorofórmico, cuja característica lipofílica possibilitou sua penetração na parede celular da micobactéria.

A parede de uma micobactéria contém alta quantidade de lipídeos, como o ácido micólico, portanto substâncias lipofílicas são susceptíveis a penetração com maior facilidade sobre a célula (PALOMINO et al., 2002).

Segundo Cantrel, Franzblau e Fisher (2001), os compostos isolados em que se tenham um CIM no valor de 64 μ g/mL ou menor são considerados promissores.

Os extratos hidroalcoólicos da casca de *Dipteryx alata* foram capazes de inibir os efeitos neurotóxicos e miotóxicos em ratos a partir do veneno de *Bothrops*

jararacuçu. Sua ação farmacológica está vinculada, principalmente, quanto a presença de taninos nestes extratos (NAZATO et al., 2010).

Enquanto o extrato hexânico das folhas *D. alata*, apresentou grande potencial contra *Leishmania amazonenses* ($IC_{50} = 0,08\mu\text{g/mL}$) e uma baixa citotoxicidade para células de mamíferos (RIBEIRO et al., 2014).

Quanto a atividade antimicrobiana avaliada neste trabalho, seus extratos hidroalcoólicos a partir da entrecasca de *D. alata*, demonstraram uma ação moderada ($CIM = 125\mu\text{g/mL}$), com provável associação de substâncias com propriedade antimicrobianas como: flavonoides e triterpenos (TABELA 12).

Um estudo conduzido por Cunha *et al.* (2008) com raízes de *Brosimum gaudichaudii* em camundongos, comprovou que o extrato possuía baixa toxicidade ($DL_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$), cuja média de dose letal correspondeu aproximadamente 351 vezes maior que a dose terapêutica.

Sobre atividade antimicrobiana há poucos estudos deste espécime. Uma avaliação de extratos alcoólicos da casca e folhas de *B. gaudichaudii* indicaram efetividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* (BORGES, 2016).

Evidenciou-se que as substâncias isoladas psoreleno e bergapteno, presentes no córtex da raiz desta árvore, além de conter ação fotossensibilizante responsável em promover pigmentação dérmica, também inibem o desenvolvimento larval para *Strongyloides stercoralis* e *Ancilostomideos* – *i.e.* atividade anti-helmíntica (POZETTI, 2005).

Segundo Martins et al. (2011) a proporção de álcool 70% (v/v) é capaz de extrair a maior quantidade de psoreleno e bergapteno. Este tipo de concentração foi adotado neste estudo para extrair os bioativos.

Nesta pesquisa, os extratos alcoólicos da entrecasca de *B. gaudichaudii* apresentaram atividade intermediária ($CIM = 125 \mu\text{g/mL}$) contra os bacilos de Koch. Os compostos furanocumarinas (psoreleno e bergapteno) podem ser co-responsáveis por esta inibição de crescimento no meio de cultura.

Tabebuia caraiba é pertence à família das Bignoniáceas, que por sua vez detêm uma enorme diversidade em espécies e variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobianas (AGARWAL; CHAUHAN, 2015). As espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina tradicional e possuem um forte potencial terapêutico (SANTOS et al., 2015; OSPINA et al., 2013)

Alguns destes estudos (TABELA 12), possibilitaram a identificação de compostos como: flavonoides (BLATT; SALATINO; SALATINO, 1996), triterpenos, esteroides, iridóides (SOARES, 2006) e naftoquinonas.

Em experimentos que envolveram a análise de citotoxicidade com *T. aurea* (sinonímia *T. caraiba*), seus resultados indicaram que os extratos etanólicos da casca e folha não continham efeito tóxico significativo sobre a viabilidade celular, exceto as flores ($CL_{50} = 0,5 \text{ mg/mL}$) (SANTOS et al., 2015).

Foi confirmado sua capacidade com ação antiinflamatória em extratos etanólicos da flor e folha, cuja presença de compostos terpenóides possa ser o seu efeito farmacológico (SANTOS et al., 2015). Tal atividade também foi constatada para as demais espécies do gênero como na *T. rosea* e *T. ochracea* (OSPINA et al., 2013).

O uso tradicional como antiofídico a partir do extrato da casca de *T. aurea* foi confirmado por Reis et al. (2014), através da inibição do infiltrado leucocitário, a produção de peróxido de hidrogênio, ação anti-inflamatória e redução hemorrágica, miotoxicidade induzida por veneno de *Bothrops neuwiedi*.

Nos ensaios microbiológicos envolvendo *T. caraiba* (sinonímia *T. aurea*), oito compostos isolados de extratos da casca por Barbosa-Filho et al. (2004) demonstraram ação antimicrobiana, com destaque para substância ethyl *p*-hidroxicinamato, capaz de inibir: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Monilia sitophila* e *Mycobacterium smegmatis*.

Santos et al. (2015) só confirmaram esta atividade antibacteriana significativa para *S. aureus* em ambas as partes vegetais, flor e folha, a partir de extrato bruto de *T. caraiba*, enquanto Ospina et al. (2013), também confirmou esta ação, porém em extratos etanólicos da casca de *T. ochracea* e *T. rósea*.

Diante deste potencial antimicrobiano para *T. aurea* (sinonímia *T. caraiba*), os pesquisadores Agarwal e Chauhan (2015) procuram avaliar os extratos etanólico e aquoso da casca e folha, quanto ação antimicobacteriana frente a cepas: *M. tuberculosis* H37Rv, MDR isolados de pacientes e *M. fortuitum*. Seus resultados mostraram que o extrato aquoso da casca foi o que melhor inibiu o crescimento para H37Rv e MDR.

Os ensaios conduzidos por Agarwal e Chauhan (2015), apesar de terem empregado metodologias diferentes deste presente estudo, seus resultados corroboraram, visto que seu potencial antimicobacteriano foi confirmado com uma

efetividade intermediária (CIM = 125µg/mL) perante a capacidade de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv.

A maior parte dos estudos envolvendo a espécie *Pterodon emarginatus* estão direcionados aos extratos e óleos essenciais de seus frutos e sementes (ALVES et al., 2013, CARVALHO et al., 1999). Há alguns estudos envolvendo folhas (NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014) e casca (BUSTAMANTE et al., 2010, MORAES et al., 2012).

Os compostos triterpenos, como lupeol e betulina, são indicados como possíveis responsáveis pelo o efeito antiinflamatório presente na casca de *P. emarginatus* (MORAES et al., 2012).

Diferente dos extratos secos e/ou óleos essenciais obtidos das sementes, ação farmacológica foi atribuída a presença de compostos terpenicos como os derivados furanos diterpenos (CARVALHO et al., 1999).

O extrato bruto etanólico da casca da *P. emarginatus* conseguiu inibir o crescimento de bactérias gram-positivas esporuladas e não esporuladas, gram-negativas, e inclusive leveduras de *C. albicans* (BUSTAMANTE et al., 2010).

Este potencial antimicrobiano não se estendeu aos ensaios desta pesquisa quando submetido o extrato bruto hidroalcoólico da casca de “sucupira” frente as cepas de *M. tuberculosis*, pois não demonstrou efeito capaz de inibir seu crescimento sob a concentração de 250µg/mL.

Terminalia fagifolia apresentou reduzida atividade leishmanicida (LIMA et al. 2015), apesar que seu gênero há descrição de compostos triterpenóides pentacíclicos com altas concentrações (ARAÚJO; CHAVES, 2005).

Indicada na medicina popular no tratamento de tumores, a partir de extratos etanólicos da casca de *T. fagifolia*, foram isolados alguns compostos flavonoides com propriedades citotóxicas significativas para células cancerígenas humanas de linhagem: Hep2 - carcinoma de laringe e H292 - carcinoma mucoepidermóide pulmonar (GARCEZ et al., 2006).

Araújo et al. (2015) e Rodrigues et al. (2017) também confirmaram este efeito citotóxico potencial em outras células tumorais do tipo: MCF7 (câncer de mama humano) PC3 (câncer de próstata humano) e B16F10 (melanoma murinho).

Tribuiani et al. (2017) conseguiu expor sua capacidade em neutralizar a paralisia e miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops jararacuçu* (40µg mL⁻¹),

através dos extratos brutos etanólico da casca de *T. fagifolia* em células neuromusculares de aves ($500\mu\text{g mL}^{-1}$) e de mamíferos ($100\mu\text{g mL}^{-1}$).

Já o efeito antimicrobiano e inibição de biofilme foi confirmado por Araújo et al. (2015) em cepas gram positivas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, ao qual envolveu extrato etanólico da casca *T. fagifolia* e suas frações (MICs entre 25 a $200\mu\text{g/mL}$).

Os compostos como terpenóides, flavonóides e polifenóis são descritos como agentes naturais antimicrobianos, possuem moléculas pequenas e podem inibir muitas espécies bacterianas, especialmente microrganismos gram positivos (ARAÚJO et al. 2015).

Para os testes desta pesquisa envolvendo ação antimicrobacteriana, o extrato hidroalcoólico da entrecasca de *T. fagifolia* não evidenciou tal atividade farmacológica, apesar de conter compostos químicos em potencial como: flavonoides, triterpenos pentacíclicos e saponinas (ARAÚJO et al., 2015; GARCEZ et al., 2006; LIMA et al., 2015;; RODRIGUES et al., 2017).

Para o gênero *Stachytarpheta*, há confirmação de ação antiparasitária (*Giardia lamblia*) (NEIVA et al., 2014), antiinflamatória e antiulcerogênica para *S. cayennensis* (PENIDO et al., 2006), bem como ação leishmanicida principalmente sobre a espécie *Leishmania braziliensis* (MAQUIAVELI et al., 2016; MOREIRA et al., 2007).

Schapoal et al. (1998) conseguiram isolar compostos iridóide ipolamiide e glicosídeo feniletanoide acetosídeo de extratos alcoólico e n-butanólico das folhas de *S. cayennensis*. Estas substâncias foram capazes de inibir os efeitos da histamina e bradicinina, bem como exercer atividade antiinflamatória em ratos.

Chariandy et al. (1999) verificou que *S. jamaicensis* apesar de conter uso popular para doenças infecciosas, tal informação etnofarmacológica não se confirmou. O extrato não obteve o efeito antimicrobiano necessário para inibir bactérias gram positiva e negativa. Entretanto, seu efeito larvicida foi comprovado para *Aedes aegypti*.

Tal situação foi diferente com estudo realizado por Okoye et al. (2010), porém envolveu outro espécime deste gênero (*S. cayennensis*), cujo extrato metanólico e suas frações exibiram efeitos inibitórios significativos para bactérias: *S. aureus*, *P. aeruginosas*, *Salmonella paratyphi* e *Bacillus subtilis*. Também apresentou a capacidade de reduzir as contrações induzidas por acetilcolina e histamina; confirmando seu efeito antibacteriano e antiespasmódico no uso da medicina tradicional.

Sobre a atividade antimicrobiana, neste estudo o extrato alcoólico bruto do Gervão branco (*Stachytarpheta sp.*) demonstrou uma baixa atividade farmacológica (CIM = 250µg/mL) correlacionando ao estudo de Chariandy et al. (1999) sobre sua capacidade microbiológica.

De uma forma geral, tanto o extrato bruto *Apuleia molaris* quanto *Ouratea spectabilis* apresentaram valores de toxicidade relativamente baixos, principalmente para linhagem do tipo Vero. Estes resultados reforçam o caráter promissor destes extratos sendo necessário o prosseguimento de novos experimentos mais aprofundados bem como estudos *in vivo* e determinação e isolamento dos compostos ativos.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa contribuiu para fornecimento de dados científicos quanto a atividade antimicrobiana para os extratos avaliados e reforçar a importância do estudo e na preservação do Cerrado, visto que este bioma tem estado em constante degradação pelas ações antrópicas.

Sobre a epidemiologia da tuberculose no Tocantins, apresenta uma baixa incidência em relação aos outros Estados, inclusive para formas multirresistentes, apesar que há regiões cujas as notificações são reduzidas e/ou ausentes. Fato que gera motivos de preocupação, sobre possíveis subnotificações, falta na busca ativa de indivíduos sintomáticos respiratório e/ou dificuldades no acesso do diagnóstico.

Os resultados adquiridos neste estudo foram promissores, em especial para os extratos de *Ouratea spectabilis* e *Apuleia molaris*, em virtude da expressiva ação sobre cepa de *Mycobacterium tuberculosis* e por demonstrarem baixo efeito citotóxico.

Também constatou a ampla diversidade de classes de metabolitos que podem atuar como bactericidas. Confrontando os resultados para os extratos brutos de *O. spectabilis* e *A. molaris*, além de provavelmente ocorrer uma ação sinérgica, pode-se observar uma variação química de metabólitos secundários que se modifica de polar (flavonóides) a apolares esteróides e triterpenos. Sugerindo também ações fisiológicas diferentes ao ataque da micobactéria.

A fração hexânica de *A. molaris* foi a que obteve o melhor desempenho nas análises, sendo necessário novos ensaios em modelos *in vivo*, bem como a elucidação química dos compostos, no intuito de tornarem-se alternativas futuras no tratamento da tuberculose.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABE, R.; OHTANI, K. An ethnobotanical study of medicinal plant and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 554-565, 2013. doi:10.1016/j.ep.2012.11.029.

ABUZEID N. et al. Antimycobacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Sudan to treat infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 134-139, 2014. doi: 10.1016/j.jep.2014.09.020.

AGARWAL, M.; CHAUHAN, S. Anti-mycobacterial potential of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook (Bignoniaceae). **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 3, n. 6, p. 63-68, 2015.

AKIHISA, A. et al. Antitubercular activity of tripterpenoids from Asteraceae flowers. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n.1, p.158-160, 2005.

AKTINS, S. The Genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) in Brazil. **Kew Bulletin**, v. 60, n. 2, p.161-272, 2005.

ALVES, S. F. et al. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 224-229, 2013. doi:10.1590/S0102-695X2013005000016.

ARANTES, V. P. et al. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 195-198, 2005.

ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química nova**, v. 28, n. 6, p. 996-999, 2005.

ARAÚJO, A. R. et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. Extract and fractions. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, p. 14-25, 2015. doi:10.1186/s12941-015-0084-2

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009. doi: 10.1590/S0100-40422009000600028.

BAPTISTEL, A. C. et al. Plantas medicinais utilizadas na comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 406-425, 2014. Suplemento I. doi:10.1590/1983-084X/12_137.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*. **Phyton**, v. 73, p. 221-228, 2004.

BARROS, A. J. S.; SILVA, K. L. F.; PORTO, J. N. L. Anatomia histoquímica de órgãos vegetativos de *Galactia glaucescens* (Kunth) (Leguminosae). **Desafios**, v. 1, n. 1, p. 247-262, 2014. doi:10.20873/uft.2359-3652.2014v1n1p247.

BASTOS, L. A.; FERREIRA, I. M. Composições fitofisionômica do bioma Cerrado: estudo sobre o subsistema de Vereda. **Espaço em Revista**, v. 12, n. 1, p. 97-108, 2010.

BELO, C. A. et al. Antineurotoxic activity of *Galactia glaucescens* against *Crotalus durissus terrificus* venom. **Fitoterapia**, v. 79, n. 5, p. 378-380, 2008. doi:10.1016/j.fitote.2008.04.003.

BESSA, N. G. F. de et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 41, p. 692-707, 2013. doi:10.1590/S1516-05722013000500010.

BLAT, C. T. T.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Flavonoids of *Tabebuia caraiba* (Bignoniaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 1, p. 89, 1996.

BOLLELA, V. R. et al. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Revista Saúde Pública**, v. 33, n. 3, p. 281-286, 1999. doi:10.1590/S0034-89101999000300009.

BORGES, J. C. **Atividade antimicrobiana de extrato de *Brosimum gaudichaudii* trécul. contra bactérias isoladas de lesões de pés diabéticos**. 2016. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2016.

BRASIL. Lei nº 12.651 de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/L12651compilado.htm>. Acesso: 10 Ago 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Panorama da tuberculose no Brasil: Indicadores epidemiológicos e operacionais**. Brasília: MS, 2014. 92 p.

_____. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: MS, 2011. 284p.

_____. Ministério do Meio Ambiente - MMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite: Cerrado 2010-2011**. Brasília: MMA, 2015. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80120/PPCerrado/Relatorio%20Tecnico_Bioma%20Cerrado_2011vfinal.pdf>. Acesso em: 20 Ago 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Panorama de tuberculose no Brasil: a mortalidade em números**. Brasília: MS, 2016. 126 p.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública

nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html>. Acesso em: 04 fev 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Panorama de tuberculose no Brasil: a mortalidade em números**. Brasília: MS, 2016. 126 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: MS, v. 48, n. 8, p.1-11, 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. DATASUS. SINAN. **Tuberculose – casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Tocantins**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tubercTO.def>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

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. doi: 10.1016/0378-8741(93)90050-F.

BROSSIER, F. et al. Detection by GenoType MTBDRs/Test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p.1683-1689, 2010.

BUENO, R. N. et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 39-44, 2005. doi:10.1590/S0102-33062005000100005.

BUSTAMANTE, K. G. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 12, n. 3, p. 341-345, 2010.

CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Medica**, v. 67, n. 8, p. 685-694, 2001. doi:10.1055/s-2001-18365.

CARVALHO, J. C. T. et al. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 127-133, 1999.

CARVALHO, M. G.; CARVALHO, G. J. A.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of Atranorin and its new acetyl derivate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 2, p. 143-147, 2000. doi:10.1590/S0103-50532000000200007.

CHAIMOWICZ, F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p. 81-87, 2001. doi:10.1590/S0034-89102001000100012.

CHARIANDY, C. M. et al. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 265-270, 1999. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00130-5.

CHAVES, M. R. UFCER – Uma Universidade no Cerrado e para o Cerrado. **Revista Ciência e Cultura**, v. 63, n. 3, p. 44-47, 2011.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Antibiothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytotherapy research**, v. 22, n. 6, p. 784-790, 2008. doi: 10.1002/ptr.2365.

COELHO, F. B. R. et al. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COPP, B. R. Antimycobacterial natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 6, p. 535-557, 2003. doi:10.1039/b212154a.

COSTA, M. H.; BOTTA, A.; CARDILLE, J. A. Effects of large-scale changes in land cover on the discharge of the Tocantins River, Southeastern Amazonia. **Journal of Hydrology**, v. 283, p. 206-217, 2003. doi:10.1016/S0022-1694(03)00267-1.

COSTA, J. G. et al. Tuberculose em Salvador: custos para o sistema de saúde e para as famílias. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p.122-128, 2005. doi: 10.1590/S0034-89102005000100016.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 13-23, 2006. doi:10.1590/S0102-33062006000100002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

CUNHA, L. C. et al. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. root extract in mice: determination of both approximate and median lethal doses. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 532-538, 2008. doi:10.1590/S0102-695X2008000400006.

DALCOLMO, M. P. et al. Estudo de efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 25, n. 2, p. 70-77, 1999.

DELAQUIS, P. J. et al.. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander, and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p.101-109, 2002. doi:10.1016/S0168-1605(01)00734-6.

DELLA TORRE, A. et al. Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. **Journal of Venomous Animals and**

Toxins including Tropical Diseases, v. 17, n. 2, p.190-198, 2011. doi: 10.1590/S1678-91992011000200010.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 69, p. 25-28, 1994.

ESTEVAM, C. S. et al. Constituintes químicos e avaliação preliminar *in vivo* da atividade antimalárica de *Ouratea nitida* Aubl (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 195-198, 2005. doi:10.1590/S0102-695X2005000300005.

ESTEVEZ-PEDRO, N. M. et al. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-9, 2012. doi:10.1186/1472-6882-12-9.

FALZARI, K. et al. *In vitro* and *in vivo* activities of Macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1447-1454, 2005. doi:10.1128/AAC.49.4.1447-1454.2005.

FELICIO, J. D. et al. Biflavonoids from *Ouratea multiflora*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 453-455, 2001. doi:10.1016/S0367-326X(00)00286-0.

FELICIO, J. D. et al. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 217-220, 1995.

FERES, F. Estudos taxonômicos em *Philacra Dwyer* (Ochnaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 183-187, 2006. doi:10.4025/actascibiolsci.v28i3.191.

FERNANDES, A. T. **Atividade farmacológica dos extratos obtidos da *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae)**. 2002. 169 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FERNANDES, D. C. et al. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1650-1655, 2010. doi:10.1002/jsfa.3997.

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.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. **Técnicas de coleta, preservação herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1989.

FIDELIS, Q. C. et al. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 1-19, 2014. doi:10.1590/0102-695X20142413361.

FILHO, R. B.; GOTTLIEB, O. R. The flavones of *Apuleia leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 10, p. 2433-2450, 1971. doi:10.1016/S0031-9422(00)89891-X.

FRANZBLAU, S. G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362-366, 1998.

GARCEZ, F. R. et al. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1223-1228, 2006. doi:10.1590/S0103-50532006000700005.

GAUTÉRIO, D. P. et al. Perfil de sensibilidade ao Triclosan de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniazida. **VITTALLE**, v. 20, p. 99-105, 2008.

GLOECKNER, H.; JONULEIT, T.; LEMKE, H. D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, p. 131-138, 2001. doi:10.1016/S0022-1759(01)00347-7.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1453-1456, 2001. doi:10.1590/S0100-879X2001001100013.

GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Distribution of coumarins in Amazonian *Brosimum* species. **Phytochemistry**, v. 11, n. 12, p. 3479-3480, 1972. doi:10.1016/S0031-9422(00)89841-6.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p.561-584, 2003. doi:10.1590/S0102-33062003000400009.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in vitro**, v. 18, p.703-710, 2004. doi:10.1016/j.tiv.2004.03.012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Manual técnicos em geociências**: manual técnico da vegetação brasileira. 2. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 274 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices-part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Whashington: Assoc Adv Med Instrum. 3. ed. 2009.

JEPSON, W. A disappearing biome? Reconsidering land-cover change in the Brazilian savanna. **The Geographical Journal**, v. 171, n. 2, p.99-111, 2005. doi: 10.1111/j.1475-4959.2005.00153.x.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, F. J.; VELOZA, L. A.; SEPÚLVED-ARIAS, J. C. Anti-infectious activity in plants of the genus *Tabebuia*. **Universitas Scientiarum**, v. 18, n. 3, p. 257-267, 2013. doi:10.11144/Javeriana.SC18-3.aapg.

KAUSHIK A. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of biapenem against drug-susceptible and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2320-2325, 2017. doi: 10.1093/jac/dkx152.

KHALIFA, R. A. et al. Rezasurin microtiter assay plate method for detection of susceptibility of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* to second-line anti-tuberculous drugs. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 62, n. 2, p. 241-247, 2013. doi: 10.1016/j.ejcdt.2013.05.008.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KRITSKI, A. L. Emergência de tuberculose resistente: renovado desafio. **Journal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 2, p. 157-158, 2010. doi:10.1590/S1806-37132010000200001.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. doi: 10.1590/S0074-02762002000700017.

KUETE, V. Potential of cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010. doi:10.1055/s-0030-1250027.

LAURENCE, Y. V.; GRIFFITHS, U. K.; VASSAL, A. Costs to health services and the patient of treating tuberculosis: a systematic literature review. **PharmacoEconomics**, v. 33, n. 9, p. 939-955, 2015. doi: 10.1007/s40273-015-0279-6.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009. doi:10.1126/science.1168243.

LIMA, P. C. et al. Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do cerrado. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 45-55, 2015. doi: 10.5216/rpt.v44i1.34800.

LIMA, T. M. et al. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 2, p. 67-78, 2017. doi:10.5123/s2176-62232017000200008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992. 368 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 2, 2 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998. 384 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 3, 1 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 2009. 348 p.

- MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do cerrado brasileiro**. Brasília: Conservação Internacional, 2004.
- MACHADO, R. R. P. et al. Interferometry as a tool for evaluating effects of antimicrobial doses on *Mycobacterium bovis* growth. **Tuberculosis**, v. 95, n. 6, p. 829-838, 2015. doi: 10.1016/j.tube.2015.08.007.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR.; V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. doi:10.1590/S0100-40422002000300016.
- MALHEIROS, R. A influência da sazonalidade na dinâmica da vida no bioma cerrado. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 19, p. 113-128, 2016. doi: 10.5380/abclima.v19i0.48876.
- MAQUIAVELI, C. C. et al. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 108-113, 2016. doi:10.1016/j.jep.2016.07.044.
- MARQUES, F. G. et al. Identification of terpenes and phytosterols in *Dipteryx alata* (baru) oil seeds obtained through pressing. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 522-525, 2015. doi:10.1016/j.bjp.2015.07.019.
- MARTINS, F. S. et al. Impact of different extraction methods on the quality of *Dipteryx alata* extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 521-526, 2013. doi:10.1590/S0102-695X2013005000033.
- MARTINS, F. S. et al. Obtainment and characterization of raw material of *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae). **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 10, p. 3772-3775, 2011.
- MECINA, G. F. et al. Phytotoxicity of extracts and fractions of *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl. (Ochnaceae). **South African Journal of Botany**, v. 95, p.174-180, 2014. doi:10.1016/j.sajb.2014.10.002.
- MEDEIROS, J. D. A biotecnologia e a extinção de espécies. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 6, n. 30, p. 109-113, 2003.
- MIRANDA, G. S. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 104-111, 2013. doi:10.1590/S1516-05722013000100015.
- MIRANDA, S. C. et al. Regional variations in biomass distribution in Brazilian Savanna Woodland. **Biotropica**, v. 46, n. 2, p. 125-138, 2014. doi:10.1111/btp.12095.
- MONTEIRO, V. F. F. et al. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 281-287, 2002. doi: 10.1590/S0103-50532002000200023.

MORAES, W. F. et al. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 202-207, 2012. doi:10.1007/s11418-011-0547-5.

MOREIRA, R. C. R. et al. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarphet cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p.59-63, 2007. doi:10.1590/S0102-695X2007000100013.

MOREIRA, R. R. D. et al. *Paepalanthus* spp: Antimycobacterial activity of extracts, methoxylated flavonoids and naphthopyranone fractions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 268-272, 2013. doi:10.1590/S0102-695X2012005000137.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOURA, V. M. et al. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 136-142, 2016. doi:10.1016/j.jep.2016.02.047.

MUNIZ, J. N. et al. A incorporação da busca ativa de sintomáticos respiratórios para o controle da tuberculose na prática do agente comunitário de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 2, p. 315-321, 2005. doi:10.1590/S1413-81232005000200009.

MUÑOZ, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p.127-137, 2000. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00148-8.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p.853-858, 2000. doi:10.1038/35002501.

NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997. doi:10.1016/S0022-1759(97)00043-4.

NAZATO, V. S. et al. *In vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 5956-5970, 2010. doi:10.3390/molecules15095956.

NEGRI, G.; MATTEI, R.; MENDES, F. R. Antinociceptive activity of the HPLC and MS-standardized hydroethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel leaves. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1062-1069, 2014. doi:10.1016/j.phymed.2014.04.009.

NEIVA, V. A. et al. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and *in vitro* evaluation of anti-Giardia activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 215-224, 2014. doi:10.1016/j.bjp.2014.04.004.

- NOVAES, P. et al. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013. doi:10.1007/s11101-013-9315-3.
- O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal Biochemistry**, v. 267, n. 17, p.5421-5426, 2000. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011. doi:10.1590/S0102-695X2011005000084.
- OKOYE, T. C. et al. Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 3, p. 189-192, 2010. doi: 10.1016/S1995-7645(10)60006-5.
- ONOFRE, S. B. et al. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoids contentes in *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.) Vahl. (Verbenaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 9, n. 17, p. 569-575, 2015.
- ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001. doi:10.1128/AAC.45.7.1943-1946.2001.
- OSPINA, L. A. F. et al. Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 34-46, 2013.
- PALOMINO, J.C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – PAHO. **Tuberculosis in the Americas: Regional Report. Epidemiology, Control, and Financing 2015.** PAHO/WHO: 2015. Disponível em: <www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=&gid=37513&lang=en>. Acesso em: 06 fev.2017.
- PASA, M. C.; SOARES, J. J.; NETO, G. G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p.195-2007, 2005. doi: 10.1590/S0102-33062005000200001.
- PAVAN, F. R. et al. *In vitro anti-Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian “Cerrado” plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 204-206, 2009. doi:10.1590/S0102-695X2009000200004.
- PENIDO, C. et al. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 225-233, 2006. doi: 10.1016/j.jep.2005.09.006.

- PHELAN, J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequencing and protein structure modelling provides insights into anti-tuberculosis drug resistance. **BMC Medicine**, v. 14, n. 1, p.14-31, 2016. doi:10.1186/s12916-016-0575-9.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2960-2972, 2007. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.028.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 46-61, 2002. Suplemento 1. doi: 10.1590/S0100-40422002000800009.
- PINTO, S. A. H. et al. Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**, v. 16, p. 48-52, 2007. doi:10.1007/s10787-007-1609-x.
- POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 6, n. 3, p. 159-166, 2005.
- RAMOS, D. F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008. doi:10.1590/S1516-93322008000400013.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p.12347-12360, 2012. doi:10.3390/s120912347.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, n. 3, p. 223-230, 1997. doi: 10.1006/anbo.1997.0469.
- REIS, A. R. S. et al. Morphological aspects of fruits, seeds, and seedlings, and anatomy of seedlings of *apuleia molaris* spruce ex benth. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 2, p.118-128, 2016. doi:10.1590/2317-1545v38n2158472.
- REIS, F. P. et al. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 352-357, 2014. doi:10.1016/j.jep.2014.10.045.
- RIBEIRO, M. O. et al. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 455-460, 2004. doi:10.1590/S1806-37132004000400011.
- RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v.143, p. 60-68, 2014. doi:10.1016/j.exppara.2014.05.004.

RISHTON, G. M. Natural products as a Robust Source of new drugs and drug leads: past successes and presente day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10, p. 43-49, 2008. doi:10.1016/j.amjcard.2008.02.007.

ROCHA, G. F. et al. Detecção de desmatamento no bioma cerrado entre 2002 e 2009: padrões, tendências e impactos. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 63, n. 3, p. 341-349, 2011.

RODRIGUES, P. S. M. et al. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. sobre células normais e tumorais. **Journal of Health and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p.16-23, 2017.

RUPPELT, B. M. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n.2, p. 203-205, 1991. Suplemento 2. doi: 10.1590/S0074-02761991000600046.

SANO, E. E. **Mapeamento de cobertura vegetal do bioma cerrado: estratégias e resultados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 33 p.

SANTHOSH, R. S.; SURIYANARAYAN, B. Plants: A source for new antimycobacterial drugs. **Planta Medica**, v. 80, n. 1, p. 9-21, 2014. doi: 10.1055/s-0033-1350978.

SANTOS, B. F. S. **Distribuições espaciais e temporais de temperaturas de superfície no bioma cerrado: uma análise integrada a partir de dados orbitais de resolução moderada**. 2010. 94f. Tese (Doutorado em Ciência Ambientais) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SANTOS, R. F. E. P. et al. Avaliação do potencial biológico da *Tabebuia aurea* (Silva Manso) com fonte de moléculas bioativas para atividade antimicrobiana, antiedematogênica e antirradicalar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p.1159-1168, 2015. Suplemento 3. doi:10.1590/1983-084x/14_168.

SCHAPOVAL, E. E. et al. Antiinflammatory and antinoceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 53-59, 1998.

SELIG, L. et al. Óbitos atribuídos à tuberculose no Estado do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 417-423, 2004. doi: 10.1590/S1806-37132004000400006.

SILVA, L. N. et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015. doi:10.3109/13880209.2014.922587.

SILVA, S. M. F. Q. et al. Atividade *in vitro* de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p.1649-1656, 2012. doi:10.1590/S1413-81232012000600028.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1104 p.

SIMONI, I. C. et al. Avaliação da citotoxicidade de biflavonóides isolados de *Ouratea spectabilis* (OCHNACEAE) em células de córnea de coelho SIRC. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 4, p. 95-97, 2002.

SPERA, S. A. et al. Land-use change affects water recycling in Brazil's last agricultural frontier. **Global Change Biology**, v. 22, p. 3405-3413, 2016. doi: 10.1111/gcb.13298.

SOARES, A. O. **Estudo fitoquímico das flores e casca do caule de um espécime de *Tabebuia caraíba* (Bignoniaceae) coletado na região do cerrado em Mato Grosso do Sul**. 2006. 113f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

SOUSA, F. P. S. T.; LEWIS, G. P.; HAWKINS, J. A. A revision of the South American genus *Apuleia* (Leguminosae, Cassieae). **Kew Bulletin**, v. 65, n. 2, p. 225-232, 2010. doi: 10.1007/s12225-010-9213-4.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004. doi: 10.1016/j.jep.2003.09.039.

SOUZA, G. L. A.; VARELA, V. P.; BATALHA, L. F. P. Tratamentos pré-germinativos em sementes florestais da Amazônia: VI – Muirajuba *Apuleia leiocarpa* (VOG.) Macbride var. *moralis* SPR. Ex Benth (Lugminosae). **Acta Amazonica**, v. 24, p. 81-90, 1994.

SOUZA, L. B. Implicações climáticas de um modelo desenvolvimentista: impactos, riscos e injustiças no Estado do Tocantins, Brasil. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 19, p. 129-145, 2016. doi: 10.5380/abclima.v19i0.48877.

SUZART, L. R. et al. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea e Luxemburgia* (OCHNACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007. doi:10.1590/S0100-40422007000400038.

TANSEY, K. et al. Vegetation burning in the year 2000: Global burned area estimates from Spot Vegetation data. **Journal of Geophysical Research**, v. 109, p.1-22, 2004. doi:10.1029/2003JD003598.

TEKWU, E. M. et al. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethno-medically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 374-382, 2012. doi:10.1016/j.jep.2012.05.003.

TOLEDO, C. E. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420-425, 2011. doi:10.1016/j.jep.2010.10.021.

TOSUN, F. et al. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 273-275, 2004. doi:10.1016/j.jep.2004.07.011.

TRIBUIANI, N. et al. Neutralising ability of *Terminalia fagifolia* extract (Combretaceae) against the *in vitro* neuromuscular effects of *Bothrops jararacussu* venom. **Natural Product Research**, p.1-5, 2017.

VALADARES, Y. M. et al. Atividade vasodilatadora *in vitro* de espécies de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea Semiserrata* (Mart.) Eng. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n.1, p. 83-91, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Guidelines for surveillance of drug resistance in Tuberculosis**. 2.ed. Geneva: WHO, 2003. 71 p.

_____. **Global Tuberculosis report 2014**. Geneva: WO, 2014. Disponível: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf>. Acesso em: 20 jan 2017.

_____. **Implementing the end TB strategy: The essentials**. Geneva: WHO, 2015. 115 p. Disponível: <http://who.int/tb/publications/2015/end_tb_essential.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 jul. 2017.

_____. **Global Tuberculosis report 2016**. Geneva: WHO, 2016. 201 p. Disponível: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf#page=1&zoom=auto,-44,840>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

ZIGNOL, M. et al. Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1185-1192, 2016. doi:10.1016/S1473-3099(16)30190-6.

ANEXO

Anexo I

Tabela 10 – Relação das plantas do cerrado que foram utilizadas nos ensaios, com a descrições de uso popular e atividades biológicas associada a presença de substâncias bioativas segundo a literatura

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth	vinhático	Antiinflamatório (MOURA et al., 2016)		Antimicrobiana, principalmente sobre Gram-positivos (FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005)
	vinhático-da-mata		Taninos, fenóis, diterpenos e flavonoides (LIMA et al., 2015; MOURA et al., 2016)	Antifúngica - <i>Candida albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> (TOLEDO et al., 2011)
	vinhático-rajado	Envenenamento por serpente – em particular pela <i>Bothrops atrox</i> (MOURA et al., 2016)	Esteróides, triterpenoides (LIMA et al., 2015)	Antiinflamatória (FERNANDES, 2002; MOURA et al., 2016)
	vinhático-amarelo			Efeito citostático em células tumorais (FERNANDES, 2002)
	pau-de-candeia			

continua

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth				Atividade anti-hemorrágica, antiofídica (MOURA et al., 2016) Leishmanicida (LIMA et al., 2015)
<i>Ouratea spectabilis</i> (Mart.ex Engl.) Engl. Sinonímia: <i>Gomphia spectabilis</i> (Mart.ex Engl).	cabeça de negro	Tratamento gástrico e reumático (VALADARES et al. 2003) e reumático	Flavonóides (MECINA et al., 2014; VALADARES et al., 2003) Biflavonóides: 6,6''-bigenkawanin; 7-7''-dimetoxi-agasthisflavona (FELICIO et al., 2001; SUZART et al., 2007); Polifenóis, triterpenos, esteroides (VALADARES et al., 2003).	Fitotoxicidade (MECINA et al., 2014) Antifúngico (inibe a produção de aflatoxinas de <i>Aspergillus flavus</i>) (GONÇALEZ; FELICIO; PINTO, 2001). Inibidor da Aldose Redutase (FELICIO et al., 1995; SIMONI et al., 2002)

continua

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Galactia glaucescens</i> Kunth	três folhas	Tratamento em envenenamentos ofídicos (BARROS; SILVA; PORTO, 2014)	Flavonóides, triterpenóides, esteroides, saponinas, compostos fenólicos, chalconas (LIMA et al., 2015) Taninos (BARROS; SILVA; PORTO, 2014; LIMA et al., 2015) Alcalóides, terpenos (BARROS; SILVA; PORTO, 2014)	Anti-neurotoxínica (BELO et al., 2008) Leishmanicida (LIMA et al., 2015)
<i>Apuleia molaris</i> Spruce ex Benth. Sinonímia: <i>A. leiocarpa</i> Vogel J. F. Macbr.	grapia, garapeira, garapa, amarelão, paucetim, muirajuba, muiratauí, Juataí	Antiofídico (RUPPELT et al., 1991) Antiulcerativo (SILVA et al., 2015) Febre (MUÑOZ et al., 2000)	Flavonoides (RUPPELT et al., 1991) Triterpeno: β -amirina (MUÑOZ et al., 2000)	Analgesia e Antiinflamatória (RUPPELT et al., 1991) Antimicrobiana (SILVA et al., 2015) Antimalárico (MUÑOZ et al., 2000).

continua

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Dipteryx alata</i> Vogel	baru, baruí, cumbaru, cumuru, barujo, coco-feijão, cumarurana, emburena-brava, feijão-coco, paucumarú	Antireumático, tônico e regulador menstrual (ESTEVES-PEDRO et al., 2012)	Ácido fenólicos (NAZATO et al., 2010)	Leishmanicida (RIBEIRO et al., 2014)
Sinonímia: <i>Coumarouna alata</i> (Vogel) Taub.; <i>Dipteryx pteropus</i> Mart.; <i>Dipteryx pterota</i> Benth.		Cicatrizante (MARTINS et al., 2013)	Flavonoides e taninos (NAZATO et al., 2010, RIBEIRO et al., 2014)	Antiofídico (NAZATO et al., 2010)
			Triterpenos, esteroides, isoflavonas (RIBEIRO et al., 2014)	
<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.	inharé; mamacadela; mamica de cadela, monduru, algodãozinho	Tratamento do Vitiligo e doença de pele (CUNHA et al., 2008)	Fenóis; terpenos (CUNHA et al., 2008)	Antifúngica (SILVA et al., 2012)
		Fortificante; depurativo; inflamações; dor; antialérgico (BAPTISTEL et al., 2014)	Derivados de furocumarinas como psoraleno e bergapteno (CUNHA et al., 2008, GOTTLIEB; SILVA; MAIA, 1972)	Antimicrobiana (BORGES, 2016)
				Anti-helmíntica (POZETTI, 2005)
<i>Tabebuia caraíba</i> (Mart.) Bureau	Paratudo, craibeira, caraibeira, caraúba, caroba-do-campo, cinco-em-ramo, ipê-amarelo-do-cerrado, pau d'arco do campo	Problemas estomacais, fígado, diabetes, febre, contra vermes e malária (SOARES, 2006)	Fenóis; Flavonoides: 6-hidroxluteolina, luteolina-7-O-glucosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo, rutina, e 3-O-diglicosídeo de quercetina (BLATT; SALATINO; SALATINO,	Antibacteriano (BARBOSA-FILHO et al., 2004, SANTOS et al., 2015)
		Antiinflamatório (REIS et al., 2014)		Antiinflamatório (BARBOSA-FILHO et al., 2004, REIS et al.,
		Antigripal (BARBOSA-		

continua

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Tabebuia caraíba</i> (Mart.) Bureau		FILHO et al., 2004, REIS et al., 2014, SANTOS et al., 2015) Antiofídico (SANTOS et al., 2015, REIS et al., 2014)	1996) Ácido verático e Ácido anísico (BARBOSA-FILHO et al. 2004) Triterpenos: Olean-12-en-3-ona, β -Amirina, Ácido Oleanólico, Ácido 3 β -O-E-p-cumaril-Ursólico, Ácido 3 β -6 β -19 α -triidróxi-Ursólico (SOARES, 2006) e Ácido Betulínico (BARBOSA-FILHO et al., 2004) Esteróides: β -Sitosterol (BARBOSA-FILHO et al., 2004), 3-(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)- β -Sitosterol (SOARES, 2006) Naftoquinonas: Lapachol (BARBOSA-FILHO et al., 2004) Iridóides: 6-O-E-p-	2014, SANTOS et al., 2015) Antihemorrágico e Antimiotóxico (REIS et al., 2014) Antifúngico (BARBOSA-FILHO et al., 2004) Antimicobacteriano (AGARWAL; CHAUHAN, 2015) Antiofídico (REIS et al., 2014)

continua

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Tabebuia caraíba</i> (Mart.) Bureau			cumaroil-Catalpol, 6-O-E- <i>p</i> -cumaroil-Jioglutina D, Jioglutina D, 6-O-E- <i>p</i> -cumaroil-1-metil-3etil-Jioglutina D, 6-O-E- <i>p</i> -cumaroil-1-etil-3metil-Jioglutina D, Remaglutina D e 7-O-E- <i>p</i> -cumaroil-Jiofuranal (SOARES, 2006)	
<i>Pterodon emarginatus</i> (Vogel)	faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira, sucupira-lisa	Antirreumático (CARVALHO et al., 1999, MORAES et al., 2012) Antiinflamatório e analgésico (MORAES et al., 2012, NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014) Dores de garganta (CARVALHO et al., 1999), Tônico e depurativo (CARVALHO et al., 1999)	Flavonoides (BUSTAMANTE et al., 2010) Isoflavonas e alcaloides (MORAES et al., 2012) Terpenos: diterpenos, triterpenos como lupeol e betulina (MORAES et al., 2012) Heterosídeos saponínicos (BUSTAMANTE et al., 2010) Derivado de hederagenina	Antimicrobiano (BUSTAMANTE et al., 2010) Antinociceptivo (NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014) Antiinflamatório (MORAES et al., 2012, NEGRI; MATTEI; MENDES, 2014)

continua

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Pterodon emarginatus</i> (Vogel)		Problemas respiratórios,	Esteroides (BUSTAMANTE et al., 2010) β -cariofileno, α -copaeno, α -humeleno (ALVES et al., 2013)	
<i>Terminalia fagifolia</i> Mart.	camaçari, cachaporra-do-gentio, capitão-do-mato, mirindiba, pau-de-bicho	Aftas e tumores (AYRES; CHAVES, 2009)	Antraquinonas, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos (LIMA et al., 2015). Flavonoides e triterpenoides (GARCEZ et al., 2006, LIMA et al. 2015)	Antimicrobiana (Araújo et al., 2015) Antiofídico (TRIBUIANI et al., 2017)
		Digestiva, afecções do estômago e intestino (RODRIGUES et al., 2017)	Ácido gálico e sitosterol (GARCEZ et al., 2006) Triterpenos pentacíclicos (ARAÚJO et al., 2015)	Leishmanicida (LIMA et al., 2015) Antitumoral (GARCEZ et al., 2006; RODRIGUES et al., 2017)

continua

Espécies	Vernáculos	Uso empírico	Substâncias bioativas e/ou grupos metabólicos	Propriedades farmacológicas
<i>Stachytarpheta</i> sp.	Gervão, vassourinha de botão, rinchão	Diarreia e desintéria (NEIVA et al., 2014) Cortes e Feridas (ABE; OHTANI, 2013) Antiinflamatório (MAQUIAVELI et al., 2016)	Alcalóides, flavonoides, taninos, saponinas, quinonas, esteroides, compostos fenólicos (MOREIRA et al., 2007; ONOFRE et al., 2015) Cumarinas e antraquinonas (ONOFRE et al., 2015)	Anti-Giardia (NEIVA et al., 2014) Leishmanicida (MOREIRA et al., 2007; MAQUIAVELI et al., 2016) Antiinflamatório e anti- noceptivo (SCHAPOVAL et al., 1998) Larvicida (CHARIANDY et al., 1999)