



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MÁRIO MACHADO MARTINS

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
ANTIMICROBIANA, ANTIPROTOZOÁRIA E CITOTÓXICA DA ESPÉCIE

*Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates

UBERLÂNDIA – MG  
2018

MÁRIO MACHADO MARTINS

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
ANTIMICROBIANA, ANTIPROTOZOÁRIA E CITOTÓXICA DA ESPÉCIE  
*Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do  
Instituto de Química, da Universidade Federal de  
Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Pivatto

Uberlândia – MG  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M386e  
2018

Martins, Mário Machado, 1988-  
Estudo fitoquímico e atividades antioxidante, antimicrobiana,  
antiprotozoária e citotóxica da espécie *Banisteriopsis oxycyclada* (A. Juss.)  
B. Gates / Mário Machado Martins. - 2018.  
118 f. : il.

Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes.  
Coorientador: Marcos Pivatto.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Química.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.45>  
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. *Banisteriopsis* - Teses. 3. Essências e óleos  
essenciais - Teses. I. Moraes, Sérgio Antônio Lemos de. II. Pivatto,  
Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Química. IV. Título.

---

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro – CRB6/1262



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,  
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 75/PPQUI.

**DATA: 31/01/2018**

**DISCENTE:** Mário Machado Martins

**MATRÍCULA:** 11323QMI005

**TÍTULO DO TRABALHO:** Estudo fitoquímico e atividades antioxidante, antimicrobiana, antiprotozoária e citotóxica da espécie *Banisteriopsis oxycyclada* (A. Juss.) B. Gates.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Química

**LINHA DE PESQUISA:** Química de Produtos Naturais

**PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO:** Prospecção fitoquímica, ensaios biológicos e espectrofotométricos de plantas do cerrado

Às quatorze horas do dia trinta e um de janeiro do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 51 no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Wellington de Oliveira Cruz, da(o) do Instituto de Química da UFU, Alex Domingues Batista, da Universidade Federal de Uberlândia, Carla Regina Amorim dos Anjos Queiroz, do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, David Maikel Fernandes, da Universidade de Uberaba e Sérgio Antônio Lemos de Moraes, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 45 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz

Profª Dra. Carla Regina Amorim dos Anjos Queiroz

Prof. Dr. Alex Domingues Batista

Prof. Dr. David Maikel Fernandes

Orientador(a): Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me dar força, coragem e sabedoria para superar mais uma etapa em minha vida.

A minha esposa Laylaine pelo carinho, compreensão e incentivos constantes.

Aos meus pais pelo grande apoio em mais uma etapa vencida.

Ao Professor Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, pela orientação em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Marcos Pivatto por sua coorientação.

A todos os professores do laboratório (NuPPeN) e do Instituto de Química que de forma diretamente ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Instituto de Genética e Bioquímica – UFU) pelo apoio nas análises de CLAE/EM.

Ao Professor Dr. Ricardo Reis Soares (Faculdade de Engenharia Química – UFU) pelo apoio nas análises de CG/EM.

Ao Professor Dr. Cláudio Vieira da Silva (Instituto de Ciências Biomédicas-UFU) pelo apoio nas análises biológicas.

Ao Professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins (UNIFRAN) pelo apoio nas análises biológicas.

Aos colegas do laboratório de pesquisa (NuPPeN)( Luis, Raquel, Carla, Rose, Bruno, Fabiana, Edmilson, Kelly, Thamires, Marilha, Rafael, Eder, Tiara, Daiane, Erica) pelo companheirismo e apoio em tantos momentos.

As alunas de iniciação científica Hitala, Camila, Cinthya, Paula e Letícia que me ajudaram no trabalho.

A todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

A CAPES pela bolsa concedida.

## Resumo

A utilização de produtos de origem natural no tratamento de doenças é uma tradição milenar que permanece até os dias atuais. Estes conhecimentos são fontes de informações para o desenvolvimento de estudos profundos na busca de compostos bioativos contra microrganismos como, bactérias, fungos e protozoários, agentes estes causadores de diversas doenças e que têm adquirido resistências aos tratamentos já existentes. Neste contexto, o trabalho objetivou avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antileishmania e citotóxica dos extratos e frações das raízes, caules e folhas da *Banisteriopsis oxyclada*, além da atividade antileishmania e citotóxica do óleo essencial das folhas, e caracterizar e/ou determinar a estrutura dos constituintes químicos presentes nas frações e óleo essencial. Para o desenvolvimento do trabalho, o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e identificado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Também foram preparados os extratos etanólicos das folhas, caules e raízes da *B. oxyclada*, que foram particionados com solventes de polaridade crescente, gerando as frações hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e a residual denominada fração água. Todos os extratos e frações foram submetidos à prospecção fitoquímica, determinação de teor de fenóis totais pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu, avaliação do teor de taninos condensados pelo método vanilina sulfúrica, determinação do potencial antioxidante pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), e avaliação das atividades antibacteriana, antifúngica, antileishmania e citotoxicidade pelos métodos de microdiluição em caldo, além da análise dos constituintes presentes nas frações mais ativas por CLAE/EM. O óleo essencial das folhas da *B. oxyclada* demonstrou em sua composição quatro constituintes majoritários: (3 $Z$ )-hex-3-en-1-ol (15,26 %), (2 $Z$ )-hex-2-en-1-ol (13,00%), fitol (10,06%) e o (2 $E$ )-hex-2-en-1-al (9,73%), e atividade antileishmania com  $CI_{50} = 32 \pm 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a qual o fitol foi indicado como um dos principais responsáveis pela atividade. Para os extratos e frações, foram detectadas as presenças de flavonoides, terpenos, saponinas e propilpropanoides, através da prospecção fitoquímica. Também se observou um alto teor de fenóis totais nas frações acetato de etila e *n*-butanol dos extratos, e concentração elevada de taninos condensados para estas mesmas frações, com destaque para *n*-butanol. Os melhores potenciais antioxidantes encontrados foram nas frações *n*-butanol, se destacando entre elas a fração *n*-butanol do caule ( $CE_{50} = 1,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Na atividade antibacteriana, os resultados mais promissores foram para bactérias anaeróbias, em específico para a *Porphyromonas gingivalis* com CIM de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para as frações diclorometano. Na atividade antileishmania o melhor potencial encontrado foi para a fração hexano do extrato do caule ( $CI_{50} = 270 \pm 36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para atividades antifúngicas os melhores resultados foram para as frações *n*-butanol da raiz e do caule com CIM de 23,43  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As frações *n*-butanol e acetato de etila dos extratos foram analisadas por CLAE/EM, apresentando principalmente em suas composições: ácidos orgânicos, flavan-3-ol, flavonóis e taninos condensados. Entre todas as atividades, a fração mais ativa foi a *n*-butanol do caule, a qual foi purificado o composto pentosideo-purasina, que apresentou atividade antifúngica promissora principalmente para a *Candida tropicalis* ( $CIM = 1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), indicando que o mesmo é um candidato para atuar como princípio ativo para o tratamento de doenças causadas por este fungo, sendo que o composto não apresentou citotoxicidade.

**Palavras-chave:** Antifúngica. Cipo-prata. Leishmania. Antibacteriana.

## Abstract

The use of products of natural origin the treatment of diseases is an ancient tradition that remains until the present day. This knowledge is a source of information for the development of deep studies in the search of bioactive compounds against microorganisms such as bacteria, fungi and protozoa, agents that cause several diseases and that have acquired resistance to existing treatments. In this context, the objective of this work was to evaluate the antibacterial, antifungal, antioxidant, antileishmania and cytotoxic activities of the extracts and fractions of roots, stems and leaves of *Banisteriopsis oxyclada*, besides the antileishmania and cytotoxic activity of leaf essential oil, and characterize or determine the structure of the chemical constituents present in the fractions and essential oil. For the development of the work, the essential oil was extracted by hydrodistillation and identified by gas chromatography coupled to the mass spectrometer. It was also prepared the ethanolic extracts of leaves, stems and roots of *B. oxyclada*, which were partitioned with solvents of increasing polarity, generating the fractions hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and the residual denominated water fraction. All extracts and fractions were submitted to phytochemical prospecting, determination of total phenol content by the Folin-Ciocalteu reagent method, evaluation of the tannins condensed by the sulfuric vanillin method, determination of the antioxidant potential by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), and evaluation of antibacterial, antifungal, antileishmania and cytotoxicity by microdilution methods in broth, as well as the analysis of the constituents present in the most active fractions by HPLC / MS. The essential oil of *B. oxyclada* leaves showed in its composition four major constituents: (3Z)-hex-3-en-1-ol (15.26%), (2Z)-hex-2-en-1-ol (13.00%), phytol (10.06%) and (2E)-hex-2-en-1-al (9.73%), the oil had antileishmania activity ( $IC_{50} = 32 \pm 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), to which phytol was indicated as one of the main responsible for the activity. For extracts and fractions the presence of flavonoids, terpenes, saponins and propylpropanoids were detected through phytochemical prospecting. It was also observed high content of total phenols in the ethyl acetate and *n*-butanol fractions of the extracts, and high concentration of condensed tannins for these same fractions, especially *n*-butanol. The best potential antioxidants were found in the *n*-butanol fractions of the extracts, among them the *n*-butanol fraction of the stem ( $EC_{50} = 1.28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). In the antibacterial activity the most promising results were for anaerobic bacteria, specific for *Porphyromonas gingivalis* with MIC of  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for dichloromethane fractions. In the antileishmania activity the best potential was found for the hexane fraction of the stem extract ( $IC_{50} = 270 \pm 36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). For antifungal activities the best results were for root and stem *n*-butanol fractions with MIC of  $23.43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . The *n*-butanol and ethyl acetate fractions of the extracts were analyzed by HPLC / MS, mainly presenting in their compositions: organic acids, flavan-3-ol, flavonols and condensed tannins. Among all activities, the most active fraction was *n*-butanol from the stem, which purified the pentosan-purasin compound, which showed promising antifungal activity mainly for *Candida tropicalis* ( $MIC = 1.56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), indicating that the same is a candidate to act as active principle for the treatment of diseases caused by this fungus, and the compound did not present cytotoxicity.

**Keywords:** Antifungal. Cyclo-silver. Leishmania. Antibacterial.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Origem dos fármacos lançados entre 1981-2014.....	18
<b>Figura 2</b> – Fatores que influenciam os metabólitos secundários em plantas.....	19
<b>Figura 3</b> – Estrutura da Clorexidina.....	21
<b>Figura 4</b> – Estruturas de antibacterianos de origem em Produtos Naturais.....	22
<b>Figura 5</b> – Estrutura de dois medicamentos utilizados no tratamento de infecções fúngicas.....	23
<b>Figura 6</b> – Estrutura dos principais compostos usados no tratamento de Leishmaniose.....	24
<b>Figura 7</b> – Algumas estruturas de moléculas presentes em plantas do gênero <i>Banisteriopsis</i> .....	28
<b>Figura 8</b> – Exemplar de <i>Banisteriopsis oxyclada</i> (Adr. Jussieu) B. Gates.....	29
<b>Figura 9</b> – Ilustração do procedimento partição líquido-líquido.....	32
<b>Figura 10</b> – Estrutura da placa para o teste de antileishmania.....	39
<b>Figura 11</b> – Estrutura da placa para o teste de citotoxicidade.....	41
<b>Figura 12</b> – Fluxograma do fracionamento biodirecionado do caule.....	44
<b>Figura 13</b> – Reação do flavonol com NP.....	49
<b>Figura 14</b> – Reação do colesterol com o reagente de Lieberman-Burchard.....	50
<b>Figura 15</b> – Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu). .....	53
<b>Figura 16</b> – Curva analítica com o padrão de ácido gálico.....	53
<b>Figura 17</b> – Reação da vanilina com o tanino condensado.....	56
<b>Figura 18</b> – Reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéquico.....	56
<b>Figura 19</b> – Curva Analítica da Catequina.....	57
<b>Figura 20</b> – Reação do DPPH com butilidroxitolueno (BHT).....	59
<b>Figura 21</b> – Reação do fenol com o DPPH em metanol.....	60
<b>Figura 22</b> – Exemplo de curva analítica para o calculo do CE <sub>50</sub> .....	60
<b>Figura 23</b> – Reação de redução da resazurina.....	64
<b>Figura 24</b> – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração <i>n</i> -butanol do extrato do caule.....	72
<b>Figura 25</b> – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração acetato de etila do extrato do caule.....	72
<b>Figura 26</b> – Estruturas dos compostos identificados nas frações do caule.....	74
<b>Figura 27</b> – Espectro de EM/EM do íon <i>m/z</i> 191.....	75
<b>Figura 28</b> – Proposta de fragmentação para o ácido quínico.....	75
<b>Figura 29</b> – Espectro de EM/EM do ácido 3-O-cafeoilquínico.....	75
<b>Figura 30</b> – Proposta de fragmentação para o ácido 3-O-cafeoilquínico.....	76
<b>Figura 31</b> – Espectro de EM/EM do ácido 5-O-cafeoilquínico.....	76
<b>Figura 32</b> – Proposta de fragmentação para o ácido 3-O-cafeoilquínico.....	77
<b>Figura 33</b> – Espectro de EM/EM do 4-O- <i>p</i> -coumaroilquínico.....	77
<b>Figura 34</b> – Proposta de fragmentação para o 4-O- <i>p</i> -coumaroilquínico.....	78
<b>Figura 35</b> – Espectro de EM/EM da (epi)catequina.....	78
<b>Figura 36</b> – Proposta de fragmentação para a (epi)catequina.....	79
<b>Figura 37</b> – Espectro de EM/EM o ácido protocatequico.....	79
<b>Figura 38</b> – Proposta de fragmentação para o ácido protocatequico.....	80
<b>Figura 39</b> – Espectro de EM/EM do dímero (epi)catequina-(epi)catequina.....	80
<b>Figura 40</b> – Proposta de fragmentação para o dímero (epi)catequina-(epi)catequina.....	81
<b>Figura 41</b> – Espectro de EM/EM da isoqueracetina.....	81

<b>Figura 42 -</b> Proposta de fragmentação para isoqueracetina.....	82
<b>Figura 43 -</b> Espectro de EM/EM do 3-O-(4"-O-p-coumaroil)-glucosideo-kaempferol.....	82
<b>Figura 44 -</b> Proposta de fragmentação para o 3-O-(4"-O-p-coumaroil)-glicosideo-kaempferol.....	83
<b>Figura 45 -</b> Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração <i>n</i> -butanol do extrato da raiz.....	83
<b>Figura 46 -</b> Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração acetato de etila do extrato da raiz.....	84
<b>Figura 47 -</b> Estrutura do trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina...	85
<b>Figura 48 -</b> Espectro de EM/EM do trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina.....	86
<b>Figura 49 -</b> Proposta de fragmentação para o trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina.....	87
<b>Figura 50 -</b> Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração <i>n</i> -butanol do extrato da folha.....	88
<b>Figura 51 -</b> Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração acetato de etila do extrato da folha.....	89
<b>Figura 52 -</b> Estrutura de compostos presentes nas frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol do extrato da folha.....	90
<b>Figura 53 -</b> Espectro de EM/EM do ácido hexosideo protocatequico.....	91
<b>Figura 54 -</b> Proposta de fragmentação para o ácido hexosideo protocatequico...	91
<b>Figura 55 -</b> Espectro de EM/EM do hexose-pentose-benzenometanol.....	92
<b>Figura 56 -</b> Proposta de fragmentação para o hexose-pentose-bezenometanol	92
<b>Figura 57 -</b> Espectro de EM/EM da roseosideo.....	92
<b>Figura 58 -</b> Proposta de fragmentação para a roseosideo.....	93
<b>Figura 59 -</b> Espectro de EM/EM do 7-O-xylosideo-3-O-rutinosideo-queracetina....	93
<b>Figura 60 -</b> Proposta de fragmentação para o 7-O-xylosideo-3-O-rutinosideo-queracetina.....	93
<b>Figura 61 -</b> Espectro de EM/EM da rutina.....	94
<b>Figura 62 -</b> Proposta de fragmentação para a rutina.....	94
<b>Figura 63 -</b> Espectro de EM/EM do 3-O-rutinosideo-kaempferol.....	94
<b>Figura 64 -</b> Proposta de fragmentação para o 3-O-rutinosideo-kaempferol.....	95
<b>Figura 65 -</b> Espectro de EM/EM do 3-O-ramnosideo-queracetina.....	95
<b>Figura 66 -</b> Proposta de fragmentação para o 3-O-ramnosideo-queracetina.....	96
<b>Figura 67 -</b> Espectro de EM/EM do 3-O-ramnosideo-kaempferol.....	96
<b>Figura 68 -</b> Proposta de fragmentação para o 3-O-ramnosideo-kaempferol.....	96
<b>Figura 69 -</b> Fluxograma do fracionamento extrato caule.....	97
<b>Figura 70 -</b> Cromatograma CLAE/EM da fração FrCBC04.....	99
<b>Figura 71 -</b> Estrutura do composto majoritário da fração FrCBC04.....	100
<b>Figura 72 -</b> Espectro de EM/EM do pentosideo-purasina.....	101
<b>Figura 73 -</b> Proposta de fragmentação para o pentosideo-purasina.....	101
<b>Figura 74 -</b> Cromatograma da fração FrCBC04 CLAE semipreparativa.....	102
<b>Figura 75 -</b> Cromatograma do óleo essencial das folhas da <i>B. oxyclada</i> por CG-EM.....	104
<b>Figura 76 -</b> Compostos majoritários do óleo essencial das folhas da <i>B. oxyclada</i> .	106

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Concentrações das amostras para a determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH .....	33
<b>Tabela 2 –</b>	Concentrações das amostras para a determinação de fenóis totais.....	35
<b>Tabela 3 –</b>	Concentrações das amostras para a determinação do teor de taninos condensados .....	36
<b>Tabela 4 –</b>	Rendimento dos extratos etanólicos da <i>B. oxyclada</i> .....	46
<b>Tabela 5 –</b>	Rendimento da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos caules de <i>B. oxyclada</i> .....	47
<b>Tabela 6 –</b>	Rendimento da partição líquido-líquido do extrato etanólico das raízes de <i>B. oxyclada</i> .....	48
<b>Tabela 7 –</b>	Rendimento da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>B. oxyclada</i> .....	48
<b>Tabela 8 –</b>	Resultados da prospecção fitoquímica das frações e extrato do caule da <i>B. oxyclada</i> .....	51
<b>Tabela 9 –</b>	Resultados da prospecção fitoquímica das frações e extrato da Raiz da <i>B. oxyclada</i> .....	51
<b>Tabela 10 –</b>	Resultados da prospecção fitoquímica das frações e extrato da folha da <i>B. oxyclada</i> .....	52
<b>Tabela 11 –</b>	Teores de fenóis totais dos extratos e das frações da <i>B. oxyclada</i> ...	54
<b>Tabela 12 –</b>	Comparação do teor de fenóis totais dos extratos e das frações das folhas da <i>B. oxyclada</i> com a <i>B. laevifolia</i> e a <i>B. argyrophylla</i> ...	55
<b>Tabela 13 –</b>	Resultados da quantificação de taninos condensados dos extratos e das frações da <i>B. oxyclada</i> .....	57
<b>Tabela 14 –</b>	Comparação dos teores de taninos condensados dos extratos e das frações de folhas de espécies do gênero <i>Banisteriopsis</i> .....	58
<b>Tabela 15 –</b>	Valores de $CE_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) da capacidade antioxidante para o extrato e frações da <i>B. oxyclada</i> .....	61
<b>Tabela 16 –</b>	Classificação dos extratos e frações pela intensidade do potencial antioxidante .....	62
<b>Tabela 17 –</b>	Comparação do potencial antioxidante dos extratos e das frações de folhas de espécies do gênero <i>Banisteriopsis</i> $CE_{50}$ .....	63
<b>Tabela 18 –</b>	Atividades antibacterianas com bactérias aeróbias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os extratos e frações das folhas, caules e raízes da <i>B. oxyclada</i> ....	64
<b>Tabela 19 –</b>	Atividades antibacterianas com bactérias anaeróbias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os extratos e frações das folhas, caules e raízes da <i>B. oxyclada</i> .....	65
<b>Tabela 20 –</b>	Atividade antifúngica para os extratos e frações da <i>B. oxyclada</i> ....	66
<b>Tabela 21 –</b>	Atividade antileishmania dos extratos e frações da <i>B. oxyclada</i> .....	68
<b>Tabela 22 –</b>	Citotoxicidade dos extratos e frações da <i>B. oxyclada</i> .....	69
<b>Tabela 23 –</b>	Índice de seletividade para as atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e antileishmania.....	70
<b>Tabela 24 –</b>	Proposta de composição para a fração <i>n</i> -butanol do extrato do caule.....	72
<b>Tabela 25 –</b>	Proposta de composição para a fração acetato de etila do extrato do caule.....	73
<b>Tabela 26 –</b>	Proposta de composição para a fração <i>n</i> -butanol do extrato da raiz	84
<b>Tabela 27 –</b>	Proposta de composição para a fração acetato de etila do extrato da raiz.....	85

<b>Tabela 28 –</b>	Proposta de composição para a fração <i>n</i> -butanol do extrato da folha.....	88
<b>Tabela 29 –</b>	Proposta de composição para a fração acetato de etila do extrato da folha.....	89
<b>Tabela 30 –</b>	Massas das frações obtidos da coluna com 1,02g de fração <i>n</i> -butanol do caule.....	98
<b>Tabela 31 –</b>	Atividade antifúngica das frações da coluna em C <sub>18</sub> da fração <i>n</i> -butanol do caule.....	98
<b>Tabela 32 –</b>	Potencial antioxidante das frações da coluna em C <sub>18</sub> da fração <i>n</i> -butanol do caule.....	98
<b>Tabela 33 –</b>	Proposta de composição para a fração FrCBC04 .....	100
<b>Tabela 34 –</b>	Rendimento das frações do CLAE semipreparativa da fração FrCBC04.....	102
<b>Tabela 35 –</b>	Atividade antifúngica, antioxidante e citotoxicidade do composto pentosideo-purasina.....	103
<b>Tabela 36 –</b>	Composição do óleo essencial das folhas da <i>B. oxyclada</i> .....	105
<b>Tabela 37 –</b>	Atividade leishmanicida e citotoxicidade do óleo essencial da <i>B. oxyclada</i> .....	106

## **Lista das principais abreviações e símbolos**

a.C. – antes de Cristo

AcOEt – acetato de etila

AcOH – ácido acético

ATCC - (do inglês) *“American Type Culture Collection”*

BHI - (do inglês) Brain Heart Infusion Broth

BHT - Butilidroxitolueno

CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica de 50%

CCD – Cromatografia de camada delgada

CE<sub>50</sub> - Concentração efetiva média

CG - EM- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%

CIM- Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia liquidada de alta eficiência

CLAE/EM – Cromatografia liquidada de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massa

CLSI – (do inglês) *“Clinical and Laboratory Standards Institute”*

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's Medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilidrazila

EAG – equivalentes de ácido gálico

EC - Equivalentes de catequina

EM/EM – massa/massa

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FM – Fase Móvel

FrA – fração acetato de etila

FrAG – fração água

FrBU – fração *n*-butanol

FrD – fração diclorometano

FrH – fração hexano

FrCBC – fração da coluna C<sub>18</sub> da fração *n*-butanol do caule

FrCLAE – fração do Procedimento CLAE semipreparativo da fração FrCBC04

HAT – (do inglês) “*hydrogen atom transfer*”

HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

HUFU - Herbário da Universidade Federal de Uberlândia

IA – Índice aritmético

IES – ionização por electrospray

IS – Índice de seletividade

NAD – (do inglês) “*Nicotinamide adenine dinucleotide*”

NI – não identificado

NIST – (do inglês) “*National Institute of Standards and Technology*”

NP – (do inglês) “*Natural Product Ragent*”

NuPPeN – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais

PA – puro para análise

PBS – (do inglês) “*phosphate buffered saline*”

PEG – polietilenoglicol

QTOF – (do inglês) “*Quadrople Time of Fligth*”

RPMI – (do inglês) “*Roswell Park Memorial Institute Médium*”

SPLET – (do inglês) “*sequential proton loss éléctron transfer*”

TIC – (do inglês) “*Total Ion Chromatogram*”

TR – tempo de retenção

UFC – unidades formadoras de colônias

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UV- Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Fundamentação Teórica.....</b>	<b>17</b>
2.1	Química de Produtos Naturais.....	17
2.2	Bioma cerrado .....	19
2.3	Antioxidantes.....	20
2.4	Atividade antibacteriana.....	21
2.5	Atividade antifúngica .....	22
2.6	Atividade antileishmania.....	23
2.7	Família Malpighiaceae.....	25
2.8	Gênero <i>Banisteriopsis</i> .....	25
2.9	Espécie <i>Banisteriopsis oxyclada</i> (A. Juss) B. Gates .....	29
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>30</b>
4.1	Coleta da amostra.....	30
4.2	Preparo das amostra.....	31
4.3	Extração etanólica.....	31
4.4	Preparo das partições líquido-líquido.....	31
4.5	Prospecção Fitoquímica.....	33
4.6	Avaliação do potencial antioxidante.....	33
4.7	Determinação do teor de fenóis totais .....	34
4.8	Determinação do teor de taninos condensados .....	35
4.9	Determinação da atividade antibacteriana.....	36
4.9.1	<i>Microrganismos utilizados.....</i>	36
4.9.2	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....</i>	36
4.10	Atividade antifúngica.....	37
4.10.1	<i>Preparo do inóculo.....</i>	37
4.10.2	<i>Determinação da concentração inibitória mínima.....</i>	38
4.11	Atividade antileishmania.....	38
4.11.1	<i>Preparo dos meios de cultura.....</i>	38
4.11.2	<i>Cultivo dos protozoários.....</i>	38
4.11.3	<i>Preparo das amostras.....</i>	39
4.11.4	<i>Teste de viabilidade celular.....</i>	39
4.12	Atividade citotóxica.....	40
4.12.1	<i>Preparo do meio de cultura.....</i>	40
4.12.2	<i>Cultura de células .....</i>	40
4.12.3	<i>Preparo das amostras.....</i>	40
4.12.4	<i>Teste de viabilidade celular.....</i>	40
4.12.5	<i>Índice de seletividade.....</i>	42
4.13	Extração óleo essencial.....	42
4.14	Separação e identificação dos constituintes do óleo essencial.....	42
4.15	Análise por CLAE/EM.....	43
4.16	Fracionamento biodirecionado.....	44
4.16.1	<i>CLAE semipreparativa.....</i>	45
4.17	Análise estatística .....	45
<b>5</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>46</b>
5.1	Rendimento extração etanólica.....	46
5.2	Rendimento das partições líquido-líquido.....	47
5.3	Prospecção fitoquímica.....	49
5.4	Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	53

5.5	Determinação de Taninos Condensados.....	55
5.6	Avaliação do potencial antioxidante.....	59
5.7	Atividade antibacteriana.....	63
5.8	Atividade antifúngica.....	66
5.9	Atividade antieishmania.....	67
5.10	Citotoxicidade.....	69
5.11	Análises de CLAE/EM.....	71
5.12	Fracionamento.....	97
5.13	Óleo Essencial.....	104
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>106</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>109</b>
	<b>Apêndice A .....</b>	<b>118</b>

## 1 Introdução

A utilização de produtos de origem natural no tratamento de doenças é uma tradição milenar que está descrita durante todo o processo evolutivo das civilizações Orientais e Ocidentais, destacando-se a Egípcia, Greco-romana e a Chinesa. Elas contribuem até os dias atuais como fontes de informações da utilização de vegetais no tratamento de doenças, sendo um banco de dados para o desenvolvimento de estudos profundos na busca de compostos bioativos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil, por possuir vários biomas, se destaca em relação aos demais países, na diversidade de fontes, as quais possibilitam encontrar novas substâncias com propriedades farmacológicas. Dentre estes, destaca-se o Cerrado, ocupando 24% do território nacional e possuindo uma imensa biodiversidade, das quais muitas são de uso terapêutica e exclusivas deste (VIEIRA; MARTINS, 2000). Mesmo com esta grandiosidade biológica, a degradação deste bioma acontece em ritmo acelerado, estimulado pelas expansões da agricultura e da pecuária. O grande problema gerado neste processo é a perda da riqueza de flora e fauna exclusivas do Cerrado que nunca foram estudadas (KLINK; MACHADO, 2005). Por isso, o desenvolvimento de pesquisas sobre plantas deste bioma é algo essencial, para a valorização do bioma e para que não se percam substâncias exclusivas das plantas do Cerrado.

Uma das plantas pertencente ao Cerrado brasileiro é a *Banisteriopsis oxycluda* (A. Juss.) B. Gates ainda não estudada em relação à composição química, atividades biológicas e toxicidade. Tudo que se encontra na literatura sobre esta espécie até o momento é levantamento etnobotânico, estudo taxonômico e a avaliação de fitotoxicidade dos extratos etanólicos das folhas e frutos, na inibição de crescimento de ervas daninhas (ANESE et al., 2016). O presente trabalho se propôs em estudar esta planta, uma vez que várias espécies do gênero *Banisteriopsis* apresentam atividades biológicas.

Também deve ser levada em consideração, a necessidade da busca de novos princípios ativos que combatam diferentes tipos de microrganismos causadores de enfermidades como as bactérias, geradoras de diferentes tipos de doenças, sendo cada vez mais necessário encontrar novas formas de tratamento, visto que estas se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos existentes (ANDRADE et al., 2010).

Outra enfermidade que carece de novos medicamentos é a Leishmaniose que é uma doença crônica, de manifestação cutânea caracterizada por lesões na pele ou visceral, a qual afeta importantes órgãos internos como fígado. A Leishmaniose é uma doença vista como negligenciável e com pouco desenvolvimento nas formas de tratamento da doença, além dos medicamentos hoje utilizados possuírem um alto custo de produção e serem substâncias tóxicas para o indivíduo em tratamento. Assim, tem-se a necessidade de desenvolvimentos de estudos voltados para a descoberta de novos compostos que possam ser utilizados no tratamento da Leishmaniose (RANGEL, 2010).

Outra classe de microorganismos que se deve destacar são os fungos, pois várias espécies são causadoras de diferentes tipos de processos infecciosos, muitas vezes de difícil tratamento, podendo levar indivíduos até a morte. Anualmente, cerca de 1,5 a 2 milhões de pessoas morrem de alguma infecção fúngica, o que justifica a busca de novos compostos para o tratamento destas infecções, já que os fungos têm adquirido resistências aos tratamentos existentes (DENNING; BROMLEY, 2015).

## 2. Fundamentação Teórica

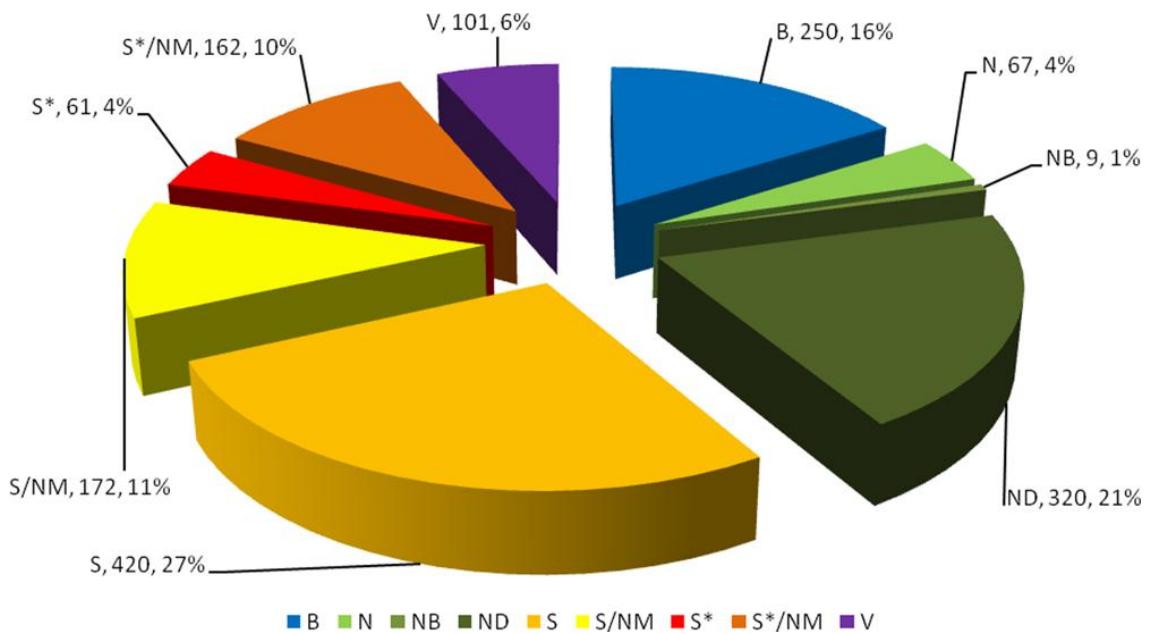
### 2.1 Química de Produtos Naturais

Os produtos naturais têm sido utilizados como fontes de tratamento de enfermidades há milhares de anos, um dos primeiros relatos descritos, foi o de Papyrus de Ebers (2.900 a.C.) no Egito, o qual descreveu 700 medicamentos à base de plantas com diferentes aplicações. Tem-se também a descrição em tábua de argila na Mesopotâmia (2.600 a.C.), como a aplicação do óleo da *Cupressus sempervirens* no tratamento de tosse, resfriados e inflamações. Estas descrições dentre outras muitas da atualidade são fontes de pesquisas para um direcionamento no desenvolvimento de estudos aprofundados na busca de novos metabólitos bioativos presentes nos produtos naturais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Os produtos naturais exercem um papel de destaque na medicina moderna, visto que 73% dos medicamentos lançados de 1981 à 2014 possuem alguma influência dos produtos naturais e somente 27% são totalmente sintéticos (Figura 1).

Isto demonstra claramente o quanto importante é a busca de novos compostos bioativos através de fontes naturais (NEWMAN; GRAGG, 2016).

**Figura 1** – Origem dos fármacos lançados entre 1981-2014.

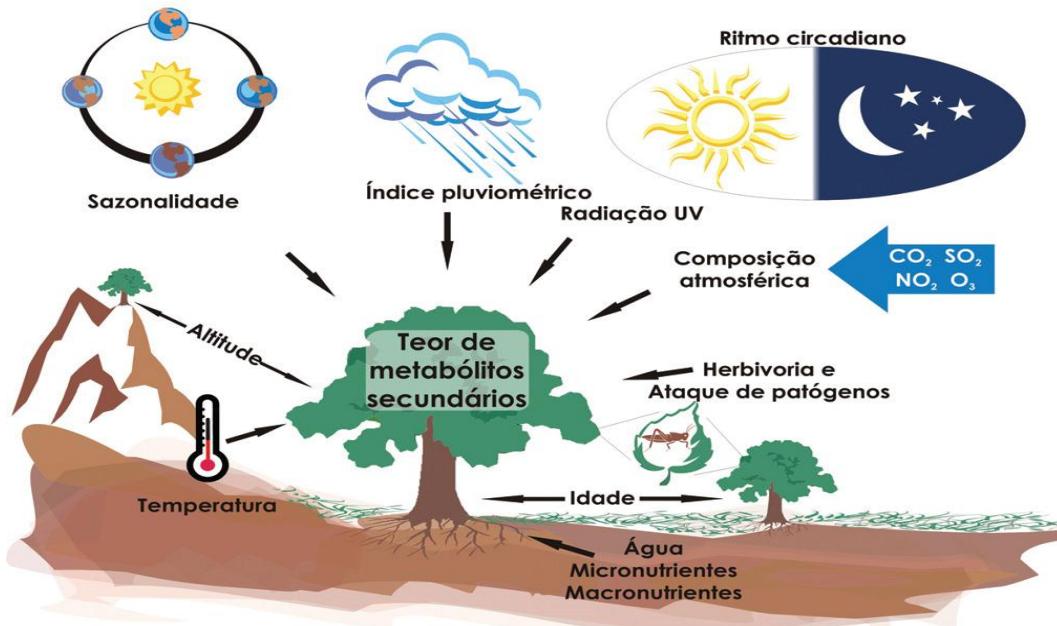


Nota: B – macromoléculas biológicas; N – produto natural; NB – fitoterápico; ND – derivado semissintético de produto natural; S – sintético; S\* - sintético com grupo farmacofórico de produto natural; NM – desenvolvido a partir do conhecimento adquirido de produto natural; V – vacina.  
Sendo apresentado no gráfico o tipo de origem dos fármacos, a quantidade de fármacos e a porcentagem que esta classe representa.

Fonte: NEWMAN; GRAGG, 2016.

As principais fontes de compostos bioativos produzidos pelas plantas são os metabolitos secundários, estes tipos de compostos são produzidos em rotas paralelas a dos metabolitos primários. Os metabolitos primários são substâncias necessárias ao desenvolvimento vital da planta, como o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento, como exemplos, temos os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e polímeros derivados. Os metabólitos secundários possuem funções específicas nas plantas como proteção contra herbívoros, fungos e bactérias, propriedades de atração de insetos polinizadores (ALVES, 2001). A produção dos metabólitos secundários na planta é influenciada por uma lista de variáveis, como apresentado na Figura 2.

**Figura 2 - Fatores que influenciam os metabólitos secundários em plantas.**



Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007.

Alguns destes fatores podem simplesmente alterar a concentração dos compostos, ou promover a produção de novas substâncias em resposta a ataques ao vegetal (ALVES, 2001; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

## 2.2 Bioma Cerrado

O termo Cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas: savanas, matas, campos e matas de galeria. Desta forma este bioma possui um número de plantas vasculares, superior às encontradas na maioria das regiões do mundo: plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies, entre estas 44% são classificadas como endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005).

O Cerrado brasileiro possui características como, clima tropical, com estiagem que se prolonga por aproximadamente cinco meses. É um tipo de unidade ecológica típica da zona tropical, possui relações ecológicas e fisionômicas com outras savanas da América Tropical e de continentes como África e Austrália (IBRAM, 2012).

Este Bioma é o segundo maior bioma do Brasil e possui uma área de aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup>, que corresponde a 25% do território nacional,

sendo encontrado nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Bahia, Minas Gerais, Distrito Federal, Maranhão, Piauí, Rondônia e São Paulo, além de áreas disjuntas na região Nordeste, no território da caatinga, e na região Amazônica, nos estados do Pará e Roraima (REZENDE; GUIMARÃES, 2007).

Mesmo com a preciosa biodiversidade que se encontra no Cerrado, este ecossistema tem sofrido degradação de maneira acelerada. Em 2002, sua área devastada já alcançava 55% do seu território ocupado, sendo que tal processo foi impulsionado principalmente pela expansão agrícola e pecuária. Neste processo de devastação se perdem espécies vegetais endêmicas destas regiões, ou seja, exclusivas deste bioma e que nunca foram estudadas (KLINK; MACHADO, 2005).

## 2.3 Antioxidantes

Substância antioxidante é aquela que mesmo em menor concentração que o substrato oxidável consegue retardar ou mesmo inibir o processo de oxidação do substrato, formando novos radicais mais estáveis, que se neutralizam com outros radicais criando moléculas estáveis (SOUZA et al., 2007).

Os principais radicais livres gerados nos organismos dos animais são as espécies reativas de oxigênio (ERO's), estas são produzidas durante o processo de respiração dos seres vivos, sendo que as moléculas de oxigênio adquiridas podem ser parcialmente reduzidas, dando origem aos ERO's. As ERO's são substâncias muito reativas, sendo capaz agredir diferentes tipos moléculas que constituem funções vitais, levando danos aos seres humanos, como o envelhecimento, câncer, doenças coronarianas, doença de Alzheimer, desordens neurodegenerativas, aterosclerose e inflamações (GASPARRI, 2005; OLIVEIRA et al., 2013).

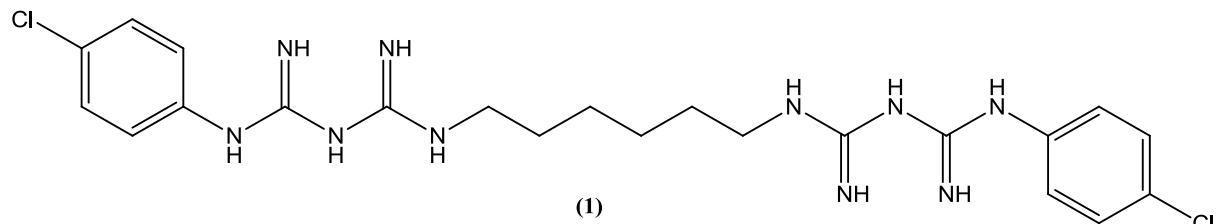
A ingestão de substâncias antioxidantes é a principal forma preventiva para minimizar estes danos causados pelos radicais livres. Além disto, a indústria também utiliza estas substâncias para retardar a oxidação de produtos industrializados, tendo o ganho de tempo de estocagem dos materiais. Analisando estas duas vertentes a procura por novas moléculas de alto poder antioxidant é essencial. Neste contexto vários estudos já revelaram que as plantas são uma das alternativas para esta finalidade. Com esta necessidade de novos compostos com potencial antioxidante,

nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas relacionadas a este tema (PASTORE et al., 2007).

## 2.4 Atividade antibacteriana

As bactérias da cavidade oral humana podem viver em equilíbrio harmonicamente, mas quando há desequilíbrio, estas podem provocar cárie dentária e doenças periodontais. Algumas bactérias como a *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus mutans* se destacam por serem as maiores responsáveis por infecções orais, sendo a *P. gingivalis* envolvida frequentemente em processos inflamatórios crônicos, como periodontite e peri-implantite, e a *S. mutans* como principal agente de cárie dentária e doenças crônicas caracterizadas pela perda irreversível de dentes. No tratamento destes diagnósticos a clorexidina (1) é comumente empregada (Figura 3) (GERITS et al., 2017; CARTAXO-FURTADO et al., 2015).

**Figura 3 – Estrutura da clorexidina.**



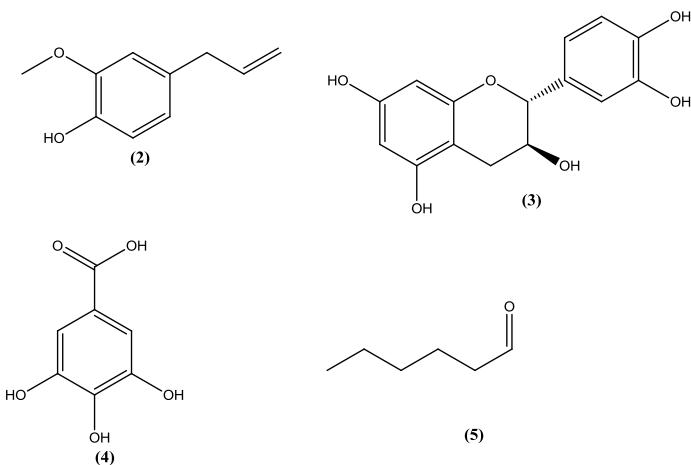
Fonte: Pubchem, 2017.

O uso elevado de antibióticos tem contribuído para maior resistência das bactérias aos tratamentos, sendo de extrema necessidade a busca de novos princípios ativos para a terapia destes processos infeciosos. Uma alternativa adotada é a procura de novas moléculas através de estudos com produtos naturais, como as plantas, buscando em seus extrativos compostos que possuam atividade antimicrobiana (ANDRADE et al., 2010; HOLETZ et al., 2002).

Através de pesquisas desenvolvidas a partir de plantas, várias substâncias foram identificadas e constatadas como antibacterianas, como por exemplo, o eugenol (2), a catequina (3), o ácido gálico (4) e o hexanal (5) (Figura 4). Os óleos

essenciais extraídos dos vegetais são grandes fontes de moléculas que possuem atividade antibacteriana, os quais, sua composição há a prevalência de metabólitos secundários classificados como terpenoides, sendo que tal classe, em diferentes estudos já evidencia este tipo de potencial (COWAN, 1999).

**Figura 4** – Estruturas de antibacterianos de origem em Produtos Naturais.



Fonte: o autor.

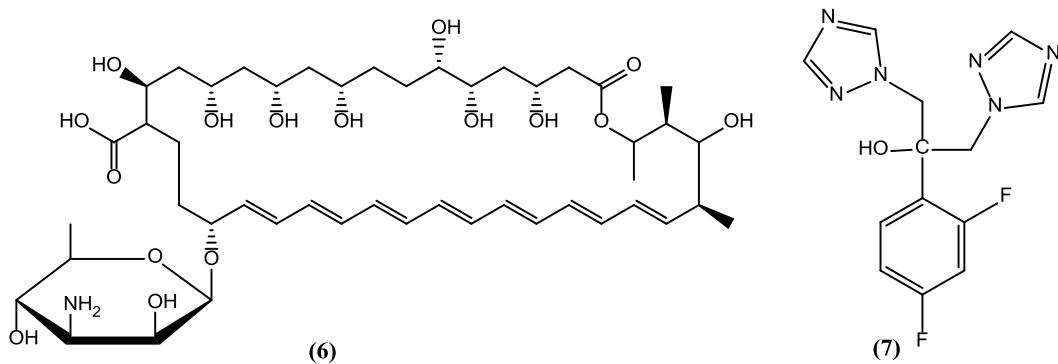
## 2.5 Atividade antifúngica

Estima-se que no mundo 1,2 bilhões de pessoas sofram de alguma infecção causada por fungo, as quais à maioria são de ocorrência na pele ou nas mucosas, sendo de fácil tratamento. Existem infecções invasivas e crônicas, que são de difícil diagnóstico e tratamento, ocasionando a morte de 1,5 a 2 milhões de pessoas anualmente. Os principais gêneros de fungos causadores desta mortalidade, são a *Candida*, a *Aspergillus*, o *Cryptococcus* e o *Pneumocystis* (DENNING; BROMLEY, 2015).

Espécies de *Candida* e *Cryptococcus* chamadas de leveduras, são as causadoras mais comuns de infecções micóticas, sendo a candidíase a infecção fungal mais corriqueira, o agente causador mais frequente a *C. albicans*, também podendo ser causada por outras espécies do gênero, como, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e a *C. tropicalis*. Os quadros clínicos de candidíase mais rotineiros são do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica, sendo que pacientes imunocomprometidos (portadores de leucemia, *diabetes mellitus*, linfoma e síndromes da imunodeficiência adquirida) possuem um maior risco de desenvolver alguma destas infecções fúngicas (LIMA et al., 2006).

O tratamento da candidíase é realizado com medicamentos principalmente a base de Anfotericina B (6), Fluconazol (7) (Figura 5), na maioria de origem sintética. O tratamento com estes medicamentos existentes no mercado nem sempre é eficiente, podendo haver recorrência da doença ou mesmo uma resistência ao tratamento. Nestas circunstâncias, a busca de novas moléculas que possam ser utilizadas no tratamento das infecções fúngicas é iminente e uma das alternativas são as plantas (FENNER et al., 2006; SARDI et al., 2013).

**Figura 5** – Estrutura de dois medicamentos utilizados no tratamento de infecções fúngicas.



Fonte: GHANNOUM; RICE, 1999.

## 2.6 Atividade Antileishmania

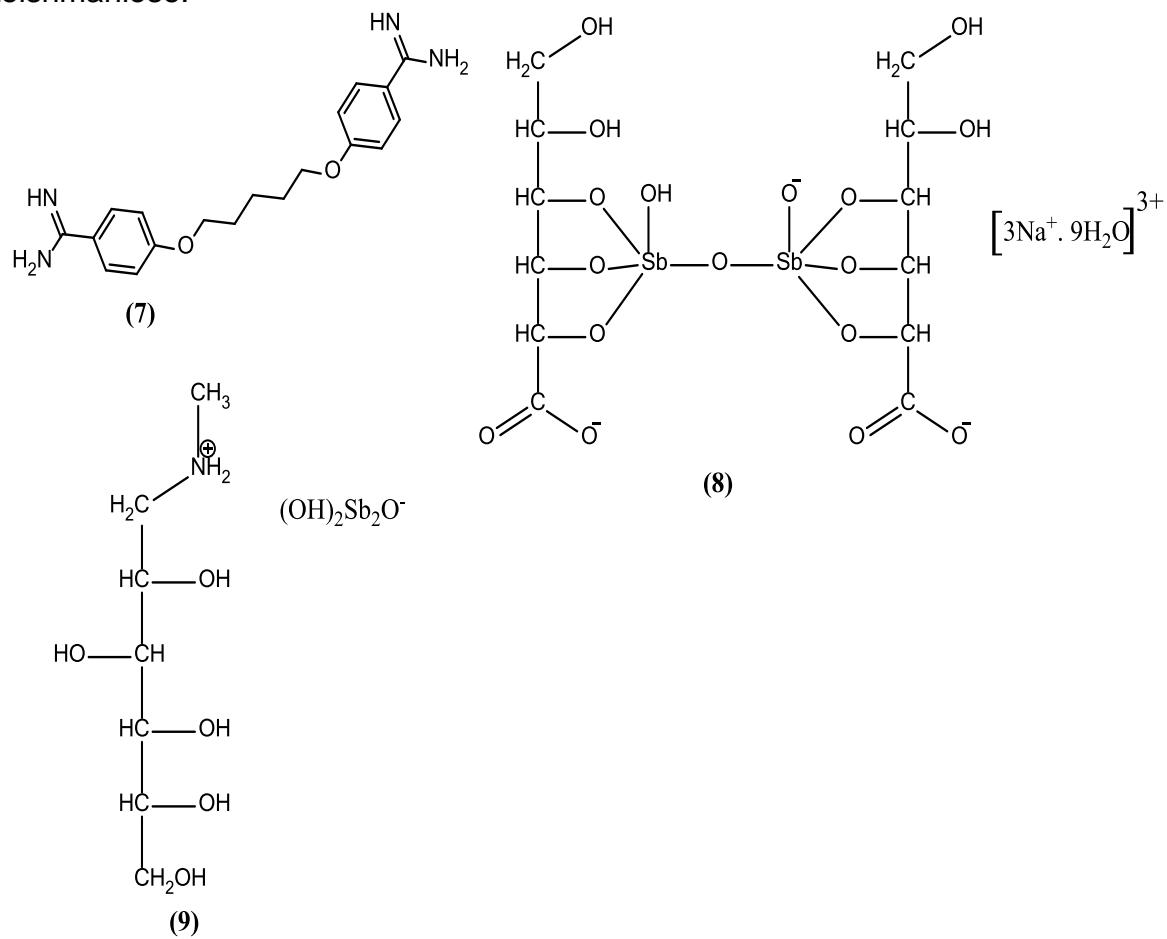
Hoje existem várias doenças causadas por protozoários que são classificadas como negligenciadas ou tropicais, uma delas é a Leishmaniose. Uma doença é classificada como negligenciada por ser uma enfermidade que não possui inovações e pesquisas para a busca de novas formas de tratamento e prevenção da mesma. Isto ocorre por causa da falta de investimentos nas pesquisas por parte das indústrias farmacêuticas, que buscam novos fármacos com fins lucrativos, e como as doenças tituladas como negligenciadas são encontradas principalmente em países subdesenvolvidos, a indústria farmacêutica não demonstra tanto interesse (WERNECK; HASSELMANN; GOUVÉA, 2011).

As Leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies do protozoário *Leishmania*, sendo estes transmitidos para o hospedeiro pelo repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos. A distribuição da doença atinge 350 milhões de pessoas, em 88 países, com dois milhões de infectados anualmente,

destes 500 mil evoluirão para a forma visceral da doença. As Leishmanioses podem ocorrer em três formas clínicas principais: cutânea, muco-cutânea e visceral. Cada uma dessas formas é associada a espécies particulares do gênero *Leishmania* (MURRAY et al., 2005; RANGEL, 2010).

As drogas indicadas para o tratamento da Leishmaniose são o Pentostan® (estibogluconato de sódio (8)), Glucantime® (antimoníato de *N*-metilglucamina (9)), Anfotericina B (6) e Pentamidina (7) (Figura 6), mas estes medicamentos possuem um alto custo, além de serem tóxicos e apresentarem diferentes tipos de efeitos colaterais dependendo diretamente de qual compostos utilizado, e do organismo do indivíduo em tratamento (SANTOS et al., 2006).

**Figura 6** – Estrutura dos principais compostos usados no tratamento de Leishmaniose.



Fonte: RATH et al., 2003.

## 2.7 Família Malpighiaceae

Várias espécies da família Malpighiaceae são utilizadas para fins medicinais pela população de países americanos, principalmente como moduladores do sistema nervoso central (gêneros *Banisteriopsis*, *Diplopterys*, *Galphimia* e *Heteropteris*) e afrodisíacos (gênero *Heteropteris*). Um dos mais importantes representantes desta família são os cipós, do gênero *Banisteriopsis* (QUEIROZ, 2012).

O nome Malpighiaceae é derivado do gênero *Malpighia* em homenagem ao botânico italiano Malpighi. A família Malpighiaceae possui aproximadamente 65 gêneros e 1.250 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. No Brasil são encontrados 32 gêneros com cerca de 300 espécies, distribuídas em diversas formações vegetais (ARAUJO, 2008).

As flores dos indivíduos desta família são bastante uniformes, apresentam sempre cinco pétalas unguiculadas, sendo uma delas diferenciada pela espessura da unha e às vezes pela coloração (STANTON, 2008). Já os frutos são extremamente diversos, fornecem caracteres importantes para o reconhecimento de gêneros e para se agrupar esses gêneros em tribos e subfamílias, é comum nas espécies de Malpighiaceae, a presença de glândulas nos órgãos vegetativos. Essas glândulas são normalmente encontradas nos pecíolos, face abaxial das folhas, em brácteas e bractéolas (ANDERSON, 1990).

Esta família apresenta um grande potencial medicinal comprovado, estudos de espécies desta família apresentam substâncias antioxidantes como, flavonoides, proatoncianidinas, além de atividades biológicas como, anticancerígena, antiviral e antibacteriana (MENDONÇA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013; TAKAHASHI; COSTA; FRIAS, 2011).

## 2.8 Gênero *Banisteriopsis*

O gênero *Banisteriopsis* é um dos maiores e mais difundidos da família Malpighiaceae, este gênero neotropical é representado por 92 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru. Apresenta uma grande representatividade em quase todos os estados brasileiros, em diferentes tipos de vegetação (FRIAS et al., 2012).

O gênero *Banisteriopsis* é considerado um dos mais complexos dentro da família Malpighiaceae. Suas espécies são difíceis de serem distinguidas pelos

caracteres morfológicos comumente utilizados, sendo as características comuns: os frutos com três sâmaras, cada uma com uma ala dorsal bem desenvolvida e espessamento na margem superior, além de estípulas interpeciolares, pedicelos sésseis, dez estames férteis e três estiletes com estigmas terminais e tricomas em forma de T e em forma de Y (GATES, 1982).

Os gêneros *Banisteriopsis* e *Diplopterys* são considerados irmãos, pela similaridade da estrutura floral (GATES, 1982) e estrutural, os dois gêneros são muito significativos dentro da família, em função de possuírem, em conjunto, cerca de 100 espécies (ANDERSON; DAVIS, 2006). No gênero *Banisteriopsis* poucas espécies foram estudadas, no Quadro 1 a seguir, estão apresentadas as moléculas já identificadas neste gênero.

**Quadro 1** – Moléculas identificadas no gênero *Banisteriopsis*.

(continua)

Espécie	Compostos Identificados	Referência
<i>B. argentes</i>	(+)- <i>N</i> -metiltetrahidroharmane; <i>N</i> , <i>N</i> -dimetiltriptamina; <i>N</i> -óxido- <i>N</i> , <i>N</i> -dimetiltriptamina; Harmina; (+)- tetrahidroharmina; Colina; Betaína; (+)-5-metoxitetrahidroharmane; Indol-3-alquilaminas quaternárias;	GHOSAL; MAZUMDER, 1971.
<i>B. anisandra</i>	9,10-tetrahidrofenantrenos; 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-dihidrofenantreno; 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-dihidrofenantreno-1-carbaldeido; 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-dihidrofenantreno-1-carbaldeido; Ácido palmítico; Lupeol; Quercetina-3-O- $\alpha$ -rhamnopiranósido; Oleato de $\beta$ -sitosterilo; Friedeline; $\beta$ -sitosterol; Estigmasterol; 3,4-dihidroxibenzóico; Lupan-20-en-3-ona; Ácido oléico; Gloquidonol (1-hidroxi-lupan-20-en-3-ona)	FREITAS et al., 2015.

**Quadro 1** – Moléculas identificadas no gênero *Banisteriopsis*.

(continuação)

Espécie	Compostos Identificados	Referência
<i>B. inebrians</i>	Harmalina; Harmina; Harmalol;	O'CONNELL; LYNN, 1953.
<i>B. caapi</i>	Harmina; Harmalina; Tetrahidroharmina; Harmol; N-óxido-harmina; Ácido metil-ester-harminco; Ácido harmalínico; Amida harmica; Acetilnortearmina; Cetotetrahidronorharmina; Pirrolidina; Shihumine; (S)-(+)-dihidroshihunina; Estigmasterol; $\beta$ -sitosterol; Ácido ursólico; Ácido oleanólico; Nerolidol; Banistenoside A; Heptacetatobanistenoside A; Banistenoside B; Heptacetatobanistenoside B; (-) - $\beta$ -D-fructofuranosil- (2 $\rightarrow$ 5) - fructopiranose; Octacetato-(-) - $\beta$ -D-fructofuranosil- (2 $\rightarrow$ 5) – fructopiranose; Tetrahidronorharmina; (-) - epicatequina; (-) - procianidina B2; Acetato-(-) - procianidina B2;	WANG et al., 2010; SAMOYLENKO, et al., 2010.
<i>B. argyrophylla</i>	Catequina; Quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicose ou Quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactose; Quercetina-3-O- $\beta$ -L-arabinose ou Quercetina-3-O- $\beta$ -D-xilose; Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-rhamnose; Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnose; Quercetina-3-O-(2"-galoil)- $\alpha$ -L-rhamnose ou Quercetina-3-O-(3"-galoil)- $\alpha$ -L- rhamnose; Kaempferol-3-O-(2"-galoil)- $\alpha$ -L- rhamnose;	OLIVEIRA, 2016.

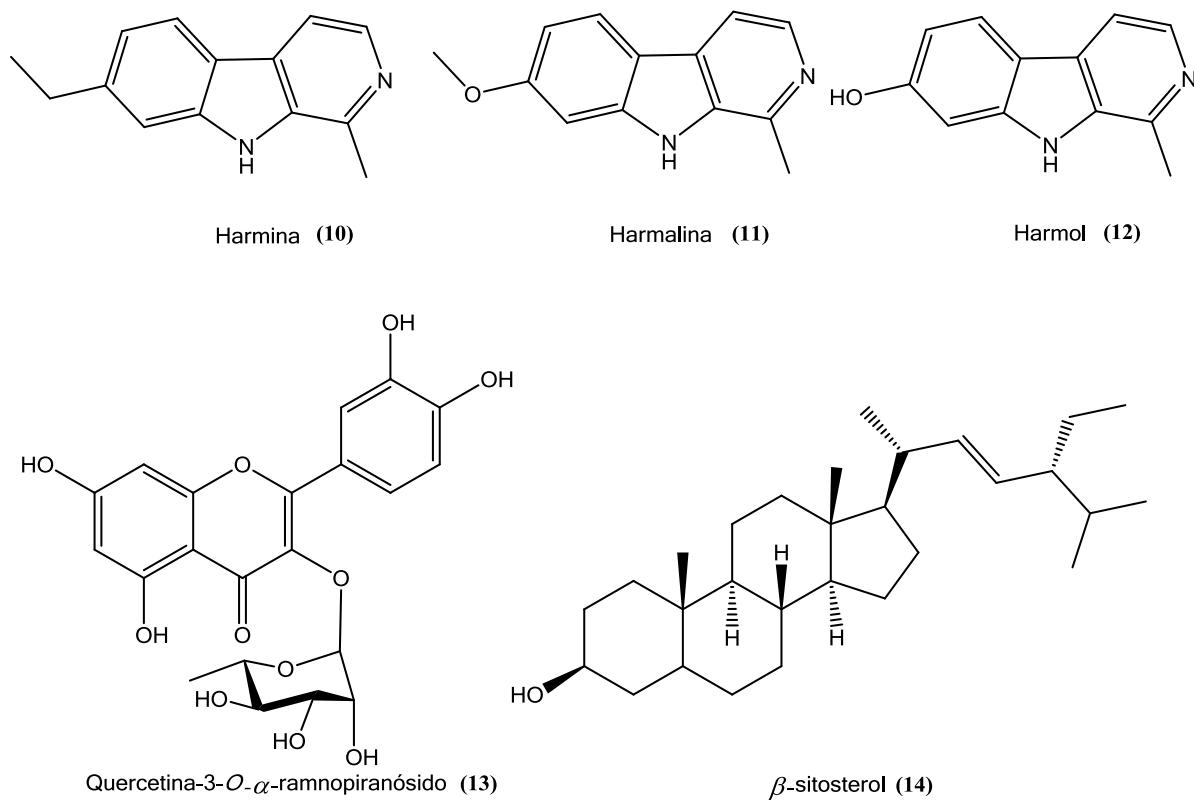
**Quadro 1** – Moléculas identificadas no gênero *Banisteriopsis*.

(conclusão)

Espécie	Compostos Identificados	Referência
<i>B. laevifolia</i>	ácido quínico; ácido 3-O- $\alpha$ -cafeoilquínico; proatoncianidina B1; epicatequina ou catequina; 3-O- $\beta$ -D-apiofuranosil- (1 $\rightarrow$ 2) - galactopiranosil-queracetina; proatoncianidina B2; 3-O-glucurónido-queracetina; rutina; 3-O-L-ramnopiranósideo-queracetina	NUNES, et al., 2016.

No gênero *Banisteriopsis* poucas espécies foram estudadas, no Quadro 1 a seguir, são apresentadas as moléculas já identificadas neste gênero. A seguir estão representadas algumas das estruturas destas moléculas (Figura 7).

**Figura 7** – Algumas estruturas de moléculas presentes em plantas do gênero *Banisteriopsis*.



Fonte: WANG et al., 2010; SAMOYLENKO, et al., 2010; FREITAS et al., 2015.

## 2.9 Espécie *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss) B. Gates

Conhecida popularmente como cipó-folha-de-prata ou cipó-prata, a *Banisteriopsis oxyclada* (Adr. Jussieu) B. Gates (Figura 8) é uma planta predominante do cerrado, pertencente do subgênero *Hemiramma*. Trata-se de uma liana (cipó) com folhas densamente pilosas, apresentando coloração prateada, a qual a floração ocorre de junho a novembro e a frutificação de julho à março (SOUTO, 2007). Até no momento deste estudo não há relatos na literatura sobre a fitoquímica e os potenciais biológicos desta planta. Os únicos estudos encontrados foram em relação a levantamentos etnobotânico, taxonômico e da avaliação de fitotoxicidade dos extratos etanólicos das folhas e frutos, na inibição de crescimento de ervas daninhas (ANESE et al., 2016).

**Figura 8** – Exemplar de *Banisteriopsis oxyclada* (Adr. Jussieu) B. Gates.



Fonte: o autor.

### 3 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antileishmania e citotóxica dos extratos e frações das raízes, caules e folhas da *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates, além da atividade antileishmania e citotóxica do óleo essencial das folhas, e caracterizar e/ou determinar a estrutura dos principais constituintes químicos presentes nas frações e óleo essencial.

### 4 Materiais e Métodos

O preparo e análise química das amostras foram realizadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) do Instituto de Química na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os experimentos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) foram realizados no laboratório da Faculdade de Engenharia Química da UFU. Os ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLAE/EM) foram realizadas no laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU. As análises de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca. Os experimentos de atividade antileishmania e citotóxica foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU.

#### 4.1 Coleta da amostra

O material vegetal de *Banisteriopsis oxyclada* foi coletado na fazenda Passa Três no município de Monte Alegre de Minas (Latitude: -18.581454; Longitude: -49.048390) e uma exsicata foi depositada no Herbário Uberlandense (HUFU 67.077). A identificação botânica foi feita pela Dra. Maria C. H. Mamede do Instituto de Botânica de São Paulo. Posterior a sua identificação, foi solicitado autorização de acesso ao Patrimônio Genético, a qual teve como número de registro 010276/2014-9. Uma amostra do material vegetal foi depositada no Herbário Uberlandense como material fiel depositário.

As amostras de folha, caule e raiz da planta foram coletadas de vários espécimes na mesma região no dia 1 de maio de 2014 e encaminhadas para o Laboratório do NuPPeN da Universidade Federal de Uberlândia, para o preparo dos extratos. Para o preparo do óleo essencial das folhas, o material vegetal foi coletado no mês de dezembro de 2016 no dia da extração.

#### 4.2 Preparo das amostras

Cerca de 3 Kg de material vegetal (folha, caule e raiz) foram secos à temperatura 35 °C em estufa com recirculação de ar, até a umidade menor que 10% (m.m<sup>-1</sup>). Na determinação da umidade utilizou-se uma balança de luz infravermelha. Aproximadamente 1 g de cada amostra foi mantida a uma temperatura de 105 ± 2 °C por quinze minutos até que o teor de umidade se mantivesse constante. Depois da secagem, as amostras foram trituradas em multiprocessador. Em seguida, toda amostra foi armazenada em recipientes de vidro com tampa de polietileno e acondicionada em freezer a -18 ± 5 °C até o momento de realização das extrações.

#### 4.3 Extração etanólica

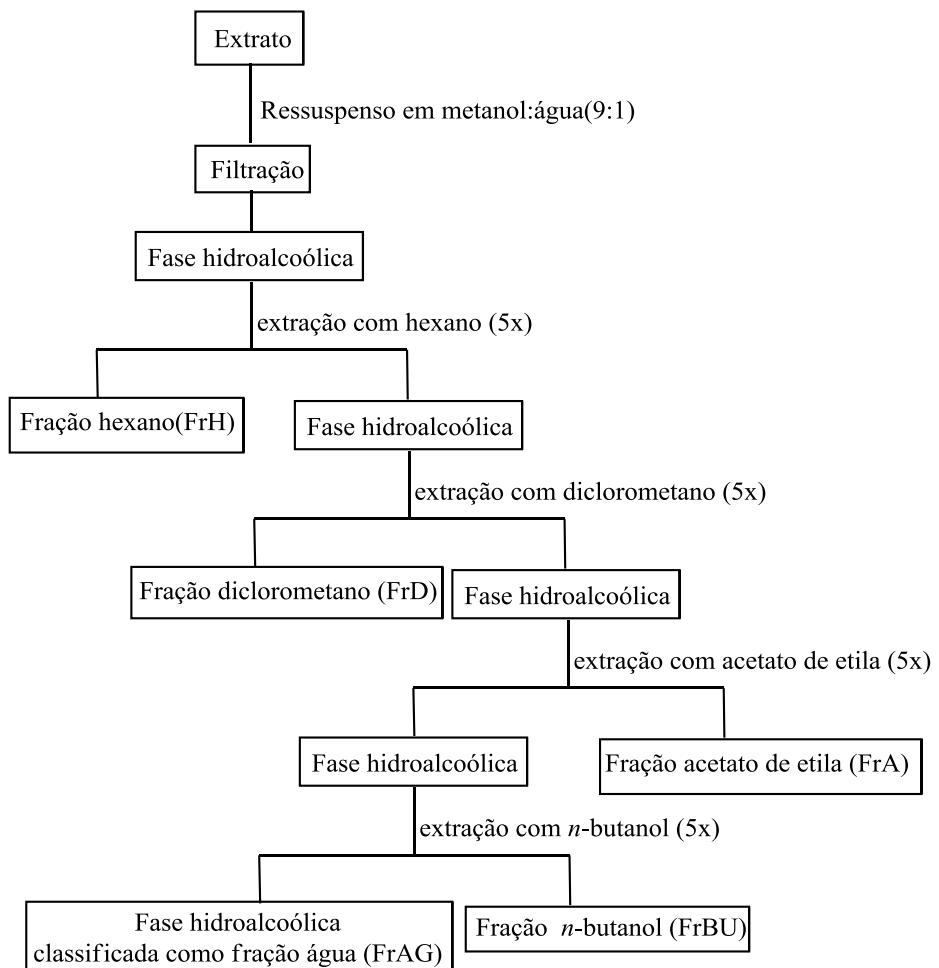
O preparo dos extratos foi realizado por maceração, em que o material seco (folhas, caules e raízes) foi adicionado a erlenmeyer de 4L e acrescentado etanol PA (95%) até cobrir a amostra completamente, deixado em repouso por sete dias. Posteriormente o extrato etanólico foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo (a temperatura máxima de 40 °C) sendo o extrativo concentrado obtido congelado e liofilizado. Repetiu-se este procedimento seis vezes com intervalo de sete dias entre cada extração. Os extratos foram armazenados em um freezer a -18,0 ± 5°C até o momento dos ensaios. O procedimento de extração foi realizado 3 vezes para cada parte da planta.

#### 4.4 Preparo das partições líquido-líquido

Os extratos etanólicos das folhas, caules e raízes, foram submetidos ao processo de partição líquido-líquido, a partir de solventes com polaridades

crescentes. Assim, inicialmente 25 g de extrato foi ressuspenso em metanol-água na proporção 9:1 e filtrado. Em seguida, o filtrado hidroalcoólico foi colocado em um funil de separação e extraído com 250,0 mL de hexano. Após a dispersão dos líquidos e a separação das duas fases da mistura por decantação, a fase em hexano foi recolhida, concentrada em evaporador rotativo e liofilizada, sendo esta etapa realizada 5 vezes. A fase hidroalcoólica residual foi transferida novamente para um funil de separação e extraída com 250,0 mL de diclorometano e esta fase recolhida, concentrada em evaporador rotativo e liofilizada, esta etapa foi realizada 5 vezes. O mesmo procedimento também foi realizado para os solventes acetato de etila e *n*-butanol, sendo a fase hidroalcoólica remanescente classificada como fração água. Durante os processos de partição a água destilada foi adicionada para melhorar as separações das fases para cada etapa de solvente. Na Figura 9 é apresentado um fluxograma do procedimento da partição líquido – líquido.

**Figura 9 – Fluxograma do procedimento de partição líquido-líquido.**



Fonte: o autor.

#### 4.5 Prospecção Fitoquímica

Para a investigação da classe de metabólitos secundários, uma amostra de cada extrato e suas respectivas frações foi inicialmente diluída em metanol e uma pequena quantidade aplicada em placas de cromatografia em camada delgada (CCD). As placas foram desenvolvidas utilizando duas fases móveis (FM) diferentes: FM1 (AcOEt:AcOH:HCOOH:H<sub>2</sub>O, 10:1,1:1,1:2,6 v.v<sup>-1</sup>) e FM2 (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH, 9:1:0,25 v.v<sup>-1</sup>). Os compostos que se desenvolveram nas placas de CCD foram avaliados com lâmpada de UV (254 e 365 nm) e aspergidas com os respectivos reveladores: Dragendorf (alcaloides e nitrogênio heterocíclico); iodocloroplatinato (alcaloides); NP-PEG (flavonoides); Anisaldeído (terpenoides, saponinas e propilpropanóides) e Lieberman-Burchard (terpenoides, esteroides e saponinas) (WAGNER; BLADT, 1995).

#### 4.6 Avaliação do potencial antioxidante

O potencial antioxidante foi realizado pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Primeiramente foi otimizada as concentrações de partida para cada amostra (Tabela 1).

**Tabela 1** – Concentrações das amostras para a determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH.

Amostras	Caule	Folha	Raiz
		µg.mL <sup>-1</sup>	
Extrato	200	250	250
FrH	3234	250	5000
FrD	2970	250	1500
FrA	700	50	66
FrBU	20	25	80
FrAG	1050	250	333

Fonte: o autor.

Uma solução de cada amostra foi preparada em metanol nas concentrações da Tabela 1. A partir desta solução foram preparadas as seguintes diluições: 83, 66, 49, 32 e 15%. Para cada uma destas diluições, uma alíquota de 0,30 mL foi

misturada com 3,70 mL de solução de DPPH (de concentração 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em metanol). Foi realizado um branco nestas mesmas condições não contendo o DPPH. Após a adição do radical DPPH, as soluções foram deixadas em repouso e suas absorbâncias registradas no comprimento de onda de 517 nm após uma hora. O consumo do radical para cada diluição foi determinado em porcentagem pela equação 1:

$$\text{DPPH}_{\text{sequestrado}} (\%) = \frac{AbvC_1 - (AbvA - AbvC_2) \times 100}{AbvC_1} \quad (\text{equação 1})$$

Sendo que  $AbvC_1$  corresponde à absorbância do controle 1 (0,30 mL de metanol + 3,70 mL de DPPH $\cdot$ );  $AbvA$  corresponde a absorbância da amostra ao final de 60 minutos e  $AbvC_2$  corresponde a absorbância do controle 2 (0,30 mL de amostra + 3,70 mL de metanol).

A concentração média efetiva ( $CE_{50}$ ), que representa a concentração de amostra necessária para consumir 50% dos radicais de DPPH, foi calculada a partir do gráfico plotado com a porcentagem de DPPH consumido *versus* as concentrações da amostra (ARGOLO et al., 2004). O teste foi realizado em triplicata e o resultado final é a média dos valores.

#### 4.7 Determinação do teor de fenóis totais

Foi empregada a metodologia descrita por Morais et al. (2008). Inicialmente foi adicionado a um tubo de ensaio 0,5 mL de solução metanólica das amostras (as concentrações foram otimizadas e estão apresentadas na Tabela 2), 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10 % (v.v $^{-1}$ ) e 2,0 mL de uma solução recentemente preparada de carbonato de sódio 7,5 % (m.v $^{-1}$ ). Essa mistura foi mantida por 5 min em banho-maria a 50°C, e registrada a absorbância a 760 nm. Para o branco, foi realizado o mesmo procedimento utilizando 0,5 mL de metanol. O teor de fenóis totais das amostras foi quantificado pela equação da reta da curva analítica estabelecida com padrões de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e expressando os resultados em mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de extrato. Foi descontada a absorbância do branco em cada

leitura das amostras. O teste foi realizado em triplicata sendo o resultado final a media dos valores e seu desvio padrão.

**Tabela 2** – Concentrações das amostras para a determinação de fenóis totais.

<b>Amostras</b>	<b>Caule</b>	<b>Folha</b>	<b>Raiz</b>
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$		
Extrato	400	500	50
FrH	1000	1000	1000
FrD	500	500	500
FrA	100	100	100
FrBU	20	100	20
FrAG	500	500	500

Fonte: o autor.

#### 4.8 Determinação do teor de taninos condensados

Este procedimento foi realizado segundo Morais et al. (2008). Primeiramente em um tubo de ensaio adicionou-se 2,0 mL de solução metanólica da amostra (as concentrações foram otimizadas e estão apresentadas na Tabela 3) e 3,0 mL de solução de vanilina ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em ácido sulfúrico 70% (m.v<sup>-1</sup>). Esta mistura foi mantida por 15 min em banho-maria a 50 °C, posteriormente foi registrada a absorbância a 500 nm. Em seguida, foi feito o branco de acordo com este mesmo procedimento utilizando 2,0 mL de metanol. O teor de taninos condensados foi quantificado pela equação da reta da curva analítica construída com padrões de catequina (5,10, 15, 20, 25 e 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e expressos como mg de EC (equivalente de catequina) por grama de extrato, descontando a absorbância do branco. O ensaio foi realizado em triplicata sendo o resultado final a media dos valores.

**Tabela 3** – Concentrações das amostras para a determinação do teor de taninos condensados.

<b>Amostras</b>	<b>Caule</b>	<b>Folha</b>	<b>Raiz</b>
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$		
Extrato	250	250	50
FrH	1000	250	1000
FrD	500	250	500
FrA	100	50	100
FrBU	25	25	20
FrAG	500	250	500

Fonte: o autor.

#### 4.9 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), de acordo o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) utilizando para as bactérias anaeróbicas a CLSI 2012a, e para as bactérias aeróbicas CLSI 2012b.

##### 4.9.1 *Microrganismos utilizados*

Para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC). As aeróbicas foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717) e as anaeróbicas foram: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 48417).

##### 4.9.2 *Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)*

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de todas as amostras e antibióticos de referência (cloranfenicol, ampicilina e gentamicina), foram realizadas pela técnica de microdiluição em caldo conforme Holetz et al. (2002). Cada amostra foi prepara uma solução estoque a concentração de 2,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  em

dimetilsulfóxido (DMSO). Cada inóculo foi assepticamente misturado ao caldo, e sua densidade ajustada para 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC.mL $^{-1}$ ) e diluído 1:10 no procedimento de microdiluição em placa 96 poços.

Na microdiluição, foram realizadas diluições seriadas em concentrações de 3.000 à 1,46  $\mu$ g.mL $^{-1}$  em caldo a partir da solução estoque de cada amostra, com volume final em cada poço de 200  $\mu$ L. Também foram realizados os controles de esterilidade do caldo, controle do inóculo (que deve apresentar crescimento), controle de esterilidade dos extratos, e controle do solvente (DMSO).

Após o preparo das microplacas, estas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, para as bactérias aeróbicas incubadas em estufa e para as bactérias anaeróbicas na jarra anaeróbica. Decorrido o período foi determinada a CIM através do uso da resazurina. A leitura foi realizada observando-se a mudança da coloração da resazurina em que a presença da cor azul representa ausência de crescimento e a cor rosa é interpretada como presença de crescimento bacteriano.

#### 4.10 Atividade antifúngica

Esta atividade foi realizada seguindo o protocolo da NCCLS M27-A3 (2008).

##### 4.10.1 Preparo do inóculo

Para o ensaio antifúngico foram utilizados os fungos: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabata* (ATCC 15126). Primeiramente, os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Após esse período, com o auxílio de alça de platina esterilizada, algumas colônias dos fungos foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL de solução salina 0,85%, esses tubos foram ajustados a densidade para 0,5 da escala de McFarland ( $6 \times 10^6$  UFC.mL $^{-1}$ ). Em seguida foram realizadas as diluições recomendadas pela NCCLS M27-A em caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) até que o inóculo obtivesse  $1,2 \times 10^3$  UFC.mL $^{-1}$ .

#### 4.10.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A técnica da determinação da CIM foi realizada por microdiluição em placas de 96 poços com o caldo RPMI tamponado a pH 7,2. Foram feitas diluições seriadas em concentrações de 3.000 à 1,46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , partindo de uma solução estoque previamente preparada de cada amostra em DMSO. O volume final em cada poço era de 200  $\mu\text{L}$ .

Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Decorrido este período foi determinada a CIM através do uso da resazurina. A leitura das placas foi realizada observando-se a mudança da coloração da resazurina onde a presença da cor azul representa ausência de crescimento enquanto que a cor rosa é interpretada como presença de crescimento fúngica.

Como controle positivo foi utilizada a Anfotericina B, sendo diluída para obter a concentração de 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  à 0,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , na microplaca de 96 poços. Para a validação dos ensaios, quanto ao controle da Anfotericina B foram utilizadas cepas de referência, para se obter uma faixa de CIM de 0,5 a 2,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Também foram realizados outros controles como: de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), controle do inóculo (que deve apresentar crescimento devido à ausência de agentes antimicrobianos), controle de esterilidade dos antifúngicos, controle de esterilidade dos extratos, e controle do solvente (DMSO) que é o controle negativo.

### 4.11 Atividade antileishmania

#### 4.11.1 Preparo dos meios de cultura

O caldo *brain heart infusion* (BHI) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, e suplementado com 5% de soro fetal bovino e L-glutamina (2 mM).

#### 4.11.2 Cultivo dos protozoários

O estágio promastigotas de *Leishmania amazonensis* da cepa PH8 cultivado em BHI suplementado à temperatura de 25 °C.

#### 4.11.3 Preparo das amostras

Para o teste com *L. amazonensis*, as amostras foram dissolvidas em metanol e diluídos com BHI suplementado, formando uma solução estoque 640  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A concentração final de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v.v<sup>-1</sup>).

#### 4.11.4 Teste de viabilidade celular

Este teste foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, a partir da solução estoque, sendo feitas as diluições com o BHI suplementado, obtendo-se as concentrações a serem testadas (512  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  à 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O volume final de cada poço foi de 100  $\mu\text{L}$ , sendo 20  $\mu\text{L}$  de inóculo (solução com  $1 \times 10^8$  parasitas em 2,0 mL) com 80  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras. Também foram realizados os controles de crescimento do inóculo, solvente (metanol 3%), de inibição (Anfotericina B 0,005 mg.mL<sup>-1</sup>), meio de cultura e das amostras. A estrutura da placa de 96 poços é apresentada na Figura 10.

**Figura 10** – Estrutura da placa para o teste de antileishmania.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Controles	
512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	← crescimento
256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	← metanol 3%
128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	← Anfotericina B 0,005 mg mL <sup>-1</sup>
64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	← meio de cultura
32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	← Amostra 1
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	← Amostra 2
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	← Amostra 3
4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	

Fonte: o autor.

A placa de *L. amazonensis* foi incubada por 48 horas a 25 °C. Em seguida adicionada 2  $\mu\text{L}$  em cada poço de uma solução de resazurina a 3 mM em phosphate buffered saline (PBS) (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006) e novamente incubado nas mesmas condições por 24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a partir dos valores das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função do controle de

crescimento. A partir desses resultados, foi construído um gráfico de dose-resposta com regressão não linear utilizado no cálculo do  $IC_{50}$  (concentração em que 50% dos parasitas foram inibidos) (CHIBALE et al., 2007).

#### 4.12 Atividade citotóxica

##### 4.12.1 *Preparo do meio de cultura*

Foi realizada utilizando o método de diluição em microplaca. O meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10% (v.v<sup>-1</sup>) de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mM), D-glicose (4.500 mg.L<sup>-1</sup>), bicarbonato de sódio (2.000 mg.L<sup>-1</sup>), HEPES (2.380 mg.L<sup>-1</sup>), piruvato de sódio (1.100 mg.L<sup>-1</sup>), penicilina (60 mg.L<sup>-1</sup>), gentamicina (40 mg.L<sup>-1</sup>) e estreptomicina (10 mg.L<sup>-1</sup>).

##### 4.12.2 *Cultura de células*

A cultura da célula Vero ATCC CCL 81(fibroblastos de rim de macaco verde da África) foi mantida em DMEM suplementado, a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 4.12.3 *Preparo das amostras*

As amostras foram dissolvidas em metanol e diluídas com DMEM suplementado, para formar uma solução estoque de 640 µg.mL<sup>-1</sup>. A concentração final de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v.v<sup>-1</sup>).

##### 4.12.4 *Teste de viabilidade celular*

Para avaliação da citotoxicidade, utilizou-se o método de microdiluição em placa 96 poços. Na realização de cada teste foi preparada uma solução contendo  $1 \times 10^6$  células em 10,0 mL de meio DMEM suplementado, desta foram transferido 100 µL para cada poço da microplaca, que foi então incubada por 6 horas a 37°C com

atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço.

Na sequência, o meio de cultura de cada poço foi retirado e adicionado as soluções das amostras nas concentrações testadas (512 µg.mL<sup>-1</sup> à 4 µg.mL<sup>-1</sup>). O volume final de cada poço foi de 100 µL e a quantidade de células presentes em cada poço foi de 1x10<sup>4</sup>. Foram preparados os controles de crescimento celular, solvente (metanol 3% (v.v<sup>-1</sup>)), negativo (0% de viabilidade celular), meio DMEM suplementado e amostras. A estrutura da placa de 96 poços com as concentrações e os controles está apresentada na Figura 11.

**Figura 11** – Estrutura da placa para o teste de citotoxicidade.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Controles	
512 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	← crescimento
256 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	← metanol 3%
128 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	← DMSO 30%
64 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	← meio de cultura
32 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	← Amostra 1
16 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	← Amostra 2
8 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	← Amostra 3
4 µg mL <sup>-1</sup> →	○	○	○	○	

Fonte: o autor.

Após ser preparada, a placa foi incubada por 48 horas a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foi adicionado 10 µL de uma solução de resazurina a 3 mM em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006). Novamente foi incubada por 24 horas nas mesmas condições. Em seguida foi realizada leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A partir das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle crescimento. Foi construindo um gráfico de dose-resposta com regressão não linear para o cálculo do CC<sub>50</sub> (concentração em que se tenha 50% de viabilidade celular) (CHIBALE et al., 2007).

#### 4.12.5 Índice de seletividade

Os dados de CC<sub>50</sub> foram comparados com os dados de atividades biológicas promissoras através da equação do índice de seletividade (IS) (CASE et al., 2006) (Equação 2)

$$IS = \log \frac{CC_{50}(\text{ amostra})}{IC_{50} \text{ ou } CE_{50} \text{ ou } CIM(\text{ amostra})}$$

Equação 2

#### 4.13 Extração do óleo essencial

O material vegetal fresco (folhas) foi submetido à extração dos óleos essenciais por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger (MORAIS et al., 2009). Para cada extração, foram utilizados cerca de 125,0 g de amostra triturada, com 1250,0 mL de água destilada em um balão de fundo redondo. O material foi extraído por 4 horas e a suspensão do óleo foi recolhido em funil de separação e extraído 3 vezes com 5,0 mL de diclorometano. Este, por sua vez foi filtrado com sulfato de magnésio anidro (para reduzir a umidade) sendo o diclorometano removido a temperatura ambiente e o óleo obtido foi guardado em frasco lacrado de cor âmbar e armazenado em freezer a -18,0 ± 5 °C até o momento de sua utilização.

#### 4.14 Separação e identificação dos constituintes do óleo essencial

A separação e a identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial foi obtida por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM – marca Shimadzu, modelo CG2010-QP2010). O equipamento foi programado para uma rampa de temperatura de 60-246 °C (3 °C.min<sup>-1</sup>); injetor no modo split a 220 °C; hélio a fluxo constante de 1,02 mL.min<sup>-1</sup> na coluna. O detector de massas foi programado com energia de impacto de 70 eV e foram captados fragmentos de 40 a 650 Da; interface a 246 °C; temperatura da fonte de íons de 240°C; volume injetado de 1,0 µL. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com

bibliotecas de espectros de massas da Wiley (7, 139 e 229), Nist (8, 27 e 147), SHIM2205, SHIMDEMO e através do índice aritmético (IA). Utilizou-se uma mistura de padrões de alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> para a obtenção dos tempos de retenção, necessários para o cálculo dos índices aritméticos (equação 3) das amostras, conforme mostrado na equação 3 (ADAMS, 2007).

$$IA (\text{amostra}) = 100 P_z + 100 ((TR_{(x)} - TR_{P_z}) / (TR_{(P_z+1)} - TR_{(P_z)}))$$

Equação 3

Onde:

P<sub>z</sub> = número de carbonos do alcano de tempo de retenção anterior ao composto analisado;

TR<sub>(x)</sub> = tempo de retenção do composto analisado;

TR<sub>P<sub>z</sub></sub> = tempo de retenção do alcano de tempo de retenção anterior ao composto analisado;

TR<sub>(P<sub>z</sub>+1)</sub> = tempo de retenção do alcano de tempo de retenção posterior ao composto analisado.

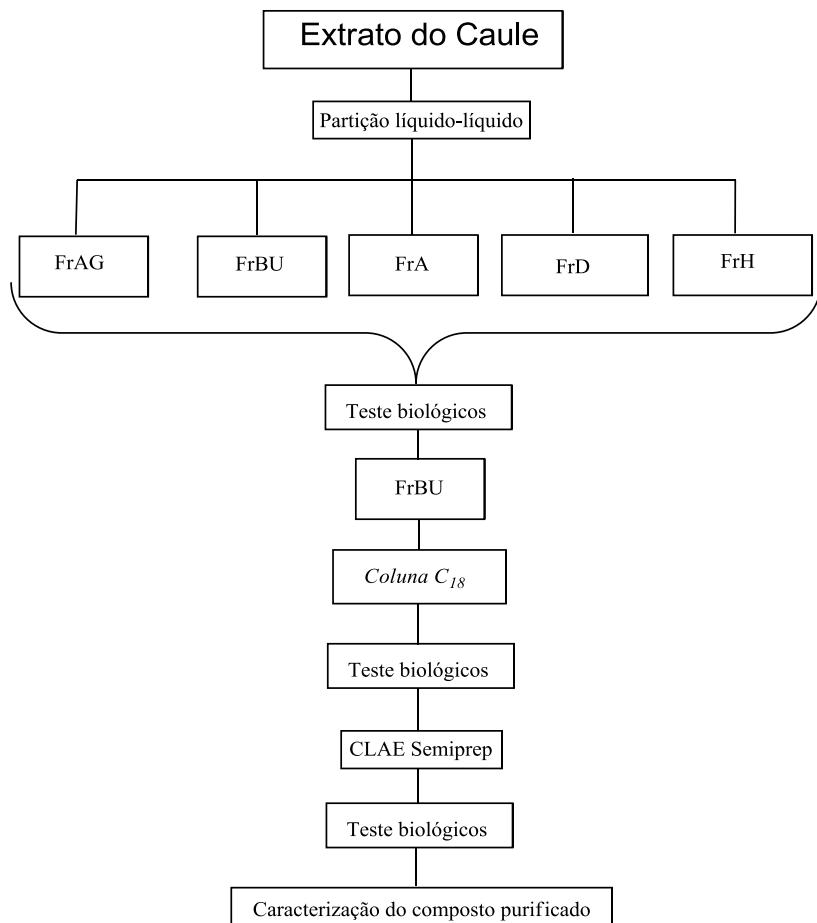
#### 4.15 Análise por CLAE/EM

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE/EM) foram realizadas em um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Zorbax C<sub>18</sub>, 2,1 mm de diâmetro interno, 5 cm de comprimento, partículas de 1,8 µm, a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1 % (v.v<sup>-1</sup>)) (A) e metanol (B), com o gradiente: 2% de B (0 min), 98% de B (0 - 15 min); 100% de B (15 - 17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 58 psi, gás secante a 8 L.min<sup>-1</sup> a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KV.

#### 4.16 Fracionamento biodirecionado

O fracionamento foi direcionado em relação aos ensaios biológicos, sendo o caule a parte da planta selecionada para a purificação, visto que esta apresentou maior potencial nas atividades biológicas, como será apresentado nos resultados e discussões. O processo de purificação está apresentado na Figura 12.

**Figura 12** – Fluxograma do fracionamento biodirecionado do extrato do caule.



Fonte: o autor.

A FrBU do caule (1,02224 g) foi aplicada em uma coluna com 19 cm de altura de fase estacionária com fase reversa (C<sub>18</sub>) e com diâmetro de 3 cm, para eluição foi utilizado um gradiente da mistura de metanol e água na proporção 2% metanol:água até 100% metanol. A coluna foi eluída com a seguinte sequência de fase móvel (sendo apresentada a quantidade e a composição da fase móvel): 100,0 mL da proporção 2% metanol:água, seguida de 80 mL das proporções de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90% e finalizou-se a

eluição com 150 mL de metanol. Ao final deste procedimento foi realizado o monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), para agrupar as frações semelhantes, utilizando-se os reveladores NP-PEG, Anisaldeído e Lieberman-Burchard e UV.

As frações foram submetidas às atividades biológicas e a mais ativa foi indicada para prosseguir no processo de purificação.

#### 4.16.1 CLAE semipreparativa

A fração com maior atividade foi submetida a um processo de purificação em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa da marca Shimadzu equipado com duas bombas LC-6AD, forno CTO-20A, detector de UV-Vis SPD-M20D, coletor de frações FRC-10A, e injetor automático SIL-10AF, controlado pelo software LC Solution. A coluna preparativa utilizada foi Phenomenex Synergi Hydro C<sub>18</sub> (100 × 21,20 mm). O sistema de solvente utilizado foi metanol (B):água (A)(v.v<sup>-1</sup>) com um gradiente: 5min (25% de B), 5 – 20min (25 – 80% de B), 20 – 25min (80% de B), 25 – 45min (80 – 100% de B) e 45 – 50min (100% B) a um fluxo de 8 mL·min<sup>-1</sup>. Foi realizado injeções de 400 µL da amostra a concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup>. As frações foram coletadas e concentradas em evaporador rotativo, lyophilizadas e guardadas em frascos âmbar.

#### 4.17 Análise estatística

Os dados obtidos na pesquisa foram avaliados pelo método da Análise de Variância (ANOVA), sendo considerados estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram nível de significância menor que 5 % ( $P < 0,05$ ). E para determinar as diferenças significativas entre as médias considerou-se o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o programa SigmaPlot 11.0.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Rendimento extração etanólica

O rendimento para os extratos etanólicos obtido por maceração está apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4** - Rendimento dos extratos etanólicos da *B. oxyclada*.

Material	Massa das extrações (g)											
	Massa vegetal	U (%)	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	Total	R. (%)		
Caule	1	889,88	5,9	23,55	11,27	8,18	5,01	4,44	3,48	55,93	6,68	
	2	394,85	5,9	6,83	3,82	3,56	3,10	1,40	1,92	20,63	5,55	
	3	463,07	5,9	9,97	6,55	3,96	3,28	2,48	1,67	27,91	6,41	
		T.	1747,8	5,9	15,70	11,39	8,32	7,07	40,35	21,64	104,47	6,41 ± 0,59
Raiz	1	1090,33	7,1	23,00	18,31	14,55	13,02	11,88	5,12	85,88	8,48	
	2	429,17	7,1	11,38	10,84	6,53	3,71	3,47	2,59	38,52	9,66	
	3	488,22	7,1	12,47	5,69	3,40	3,50	3,07	1,37	36,6	8,07	
		T.	2007,72	7,1	46,85	11,39	8,32	7,07	40,35	21,64	141,52	8,48 ± 0,83
Folha	1	338,73	7,3	13,71	6,00	4,25	2,76	1,74	2,31	30,77	9,80	
	2	156,82	7,3	6,45	2,22	2,41	1,72	1,11	1,12	15,03	10,34	
	3	166,23	7,3	5,17	4,22	2,80	1,90	1,52	1,01	16,62	10,79	
		T.	661,78	7,3	25,33	12,44	9,46	6,38	4,37	4,44	62,42	10,34 ± 0,49

Nota: T. – Total; R. – Rendimento (%(m.m<sup>-1</sup>)); U – Umidade (%(m.m<sup>-1</sup>)). As análises mostraram diferença significativa entre as médias do total de cada extração pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido p<0,05 para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

Analizando-se os rendimentos dos extratos etanólicos das amostras da *B. oxyclada* apresentados na Tabela 4, pode-se observar que o maior rendimento encontrado foi para extração da folha, seguido das raízes e caule. Observa-se que os rendimentos diminuíram durante o período de extração, portanto as sextas

extrações foram as que obtiveram os menores rendimentos, o que justifica a finalização do processo nesta etapa.

Comparando o rendimento entre os extratos etanólicos das folhas da *B. oxyclada* ( $10,34 \pm 0,49\% \text{ (m.m}^{-1}\text{)}$ ) com a da *Banisteriopsis argyrophylla* ( $11,63\% \text{ (m.m}^{-1}\text{)}$ ) (OLIVEIRA, 2016), observa-se que ambas possuem rendimentos entre 10 e 12%, isto pode ocorrer por ambas pertencerem ao mesmo gênero.

## 5.2 Rendimento das partições líquido-líquido

O extrato bruto das folhas, raízes e caules da *B. oxyclada* foram submetidos à partição líquido-líquido, a partir de solventes orgânicos com polaridades crescentes e o rendimento calculado está apresentado nas Tabelas 5, 6 e 7.

**Tabela 5** – Rendimento da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos caules de *B. oxyclada*.

Solvente	Extrato caules (28,7233g)					Total (g)	Rendimento (% (m.m <sup>-1</sup> ))
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	Extração (g)	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>		
FrH	0,8582	0,2515	0,1223	0,0643	0,0435	1,3336	$4,64 \pm 0,30^a$
FrD	0,6936	0,1559	0,0780	0,0623	0,0527	1,0425	$3,63 \pm 0,25$
FrA	0,3207	0,5385	0,3157	0,3335	0,2148	1,3897	$4,84 \pm 0,23^a$
FrBU	3,5914	3,4610	2,0295	1,1181	0,8425	11,0425	$38,44 \pm 0,17$
FrAG	12,3724	-	-	-	-	12,3720	$43,07 \pm 0,11$

Nota: as análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p < 0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

**Tabela 6** – Rendimento da partição líquido-líquido do extrato etanólico das raízes de *B. oxyclada*.

Solvente	Extrato caules (61,7131g)					Total (g)	Rendimento (% (m.m <sup>-1</sup> ))
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	Extração (g)	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>		
FrH	0,8834	0,2054	0,1097	0,0520	0,0403	1,2908	2,09 ± 0,02
FrD	0,8652	0,4389	0,3577	0,2114	0,8535	2,7267	4,42 ± 0,10
FrA	0,2811	0,2755	0,9705	1,0303	0,9772	3,5346	5,72 ± 0,14
FrBU	14,6240	8,6800	4,5990	2,8382	1,7618	32,5030	52,67 ± 0,08
FrAG	20,7630	-	-	-	-	20,7630	33,64 ± 0,19

Nota: As análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

**Tabela 7** – Rendimento da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *B. oxyclada*.

Solvente	Extrato caules (39,2106g)					Total (g)	Rendimento (% (m.m <sup>-1</sup> ))
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	Extração (g)	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>		
FrH	3,3330	0,7716	0,3428	0,1784	0,1695	4,7953	12,23 ± 0,20
FrD	3,9225	0,6911	0,2876	0,2409	0,2151	5,3572	13,66 ± 0,16
FrA	1,3899	0,8962	0,7754	0,5716	0,5419	4,1750	10,65 ± 0,04
FrBU	0,9058	3,7152	3,2890	1,8978	1,1167	10,9245	27,86 ± 0,22
FrAG	12,6792	-	-	-	-	12,6792	32,34 ± 0,13

Nota: As análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

Analizando o rendimento das frações para o extrato do caule pode-se averiguar que o maior rendimento foi o da fração aquosa, seguido pela fração *n*-butanol, acetato de etila, hexano e diclorometano. Para o extrato da raiz a fração com maior rendimento foi a *n*-butanol, seguida da água, acetato de etila, diclorometano e hexano. Já para o extrato da folha a fração aquosa foi a de maior rendimento, seguida da fração *n*-butanol, diclorometano, hexano e acetato de etila.

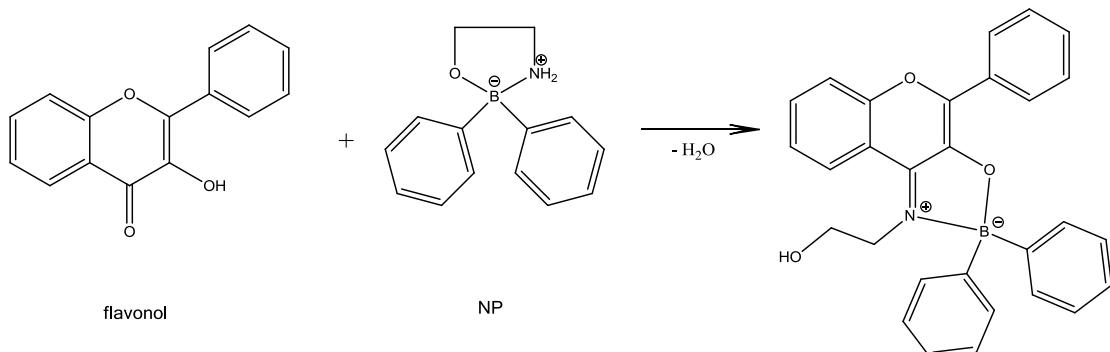
Observa-se que os maiores rendimentos foram encontrados nas frações mais polares como *n*-butanol e água, indicando uma maior quantidade de compostos com polaridade mais elevada.

### 5.3 Prospecção fitoquímica

Na prospecção das classes de metabólitos que estão presentes nos extratos e frações foram utilizados alguns reveladores, como dragendorff, iodocloroplatinato, NP-PEG, anisaldeído e Lieberman-Burchard. Para a revelação de alcaloides e de nitrogênio heterocíclico foi aplicado o dragendorff, que é uma solução de nitrato de bismuto acidificada com ácido acético, que na presença destes tipos de compostos, ocorre à formação de coloração marrom-alaranjada. Ainda para os alcaloides também foi utilizado o iodocloroplatinato, que consiste em uma solução de ácido hexacloroplatínico (IV) com iodeto de potássio, o qual na presença de alcaloides ocorre a formação de coloração marrom, com fundo das manchas azul-cinzento (WAGNER; BLADT, 1995).

Na determinação da presença de flavonoides, foi utilizada uma solução com difenilboriloxietilamina (*Natural Product Reagent* – NP) e polietilenoglicol (PEG), cujo o NP forma um composto de coordenação com o flavonoide, dependendo da estrutura do flavonoide pode se observar a fluorescência verde-amarelo-laranja quando exposta a luz ultravioleta ( $\lambda = 365\text{nm}$ ). Um exemplo da formação do composto está apresentado na Figura 13 (WAGNER; BLADT, 1995; KARTING; GÖBEL, 1996; MATTEINI et al., 2011).

**Figura 13** – Reação do flavonol com NP.



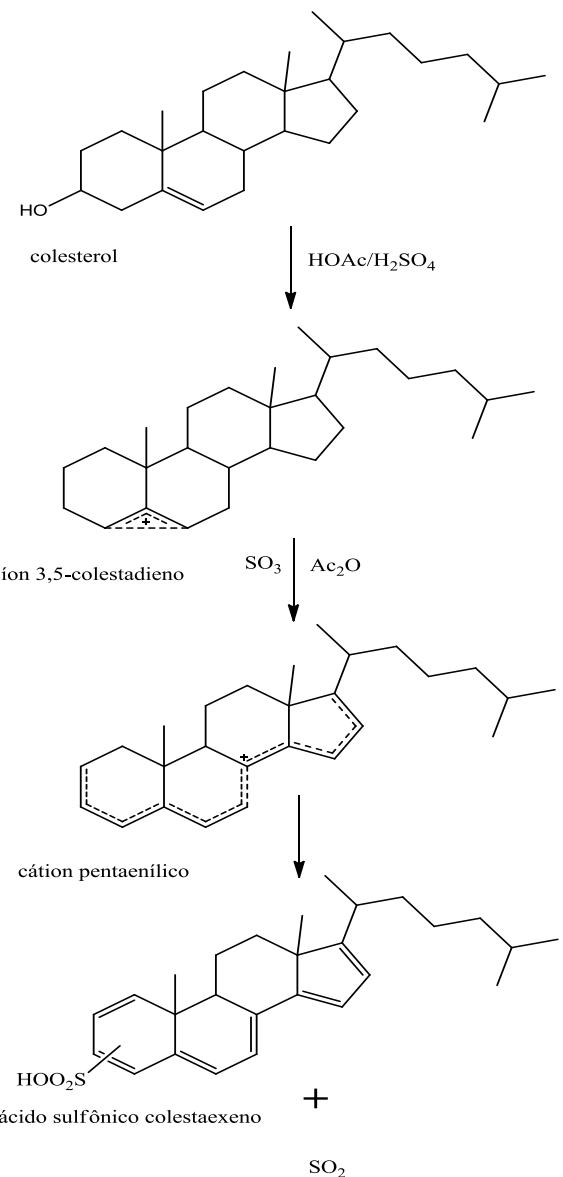
Fonte: KARTING; GÖBEL, 1996.

O revelador a base de anisaldeído é uma mistura de anisaldeído com ácido acético e ácido sulfúrico em metanol, este é um revelador que indica a presença de esteroides, saponinas e propilpropanoides, através de uma reação de condensação

do anisaldeído com o composto com dupla ligação, formando um produto colorido (KATO, 1964).

O revelador Lieberman-Burchard é uma mistura de ácido acético com ácido sulfúrico em etanol, este indica a presença de terpenoides, esteroides e saponinas, através da reação como está representada na Figura 14, a qual na primeira etapa a hidroxila do colesterol foi protonada seguida da eliminação de água, formando o íon 3,5-colestadieno, na segunda etapa temos a ocorrência de várias reações de oxidação levando a formação do intermediário cátion pentaenílico, que leva a produção do ácido sulfônico colestaexeno com sistemas conjugados nos anéis (BURKE et al., 1974; WAGNER; BLADT, 1995).

**Figura 14** – Reação do colesterol com o reagente de Lieberman-Burchard.



Fonte: adaptado de BURKE et al., 1974.

Os resultados da prospecção fitoquímica estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10.

**Tabela 8 –** Resultados da prospecção fitoquímica das frações e extrato do caule da *B. oxyclada*.

Amostras	<sup>a</sup> Flavonoides	<sup>b</sup> Alcaloides	<sup>c</sup> Alcaloides/ Nitrogênio Heterocíclico	<sup>d</sup> Terpenoides/ Saponinas/ Propilpropanóide	<sup>e</sup> Terpenoides/ Esteroides/ Saponinas
Extrato	++++	-	-	++	++
FrH	++	-	-	++++	+
FrD	+++	-	-	++++	++
FrA	++++	-	-	+++	+++
FrBU	++++	-	-	++	++
FrAG	++	-	-	++	++

Reveladores: <sup>a</sup>NP-PEG, <sup>b</sup>Iodocloroplatinado, <sup>c</sup>Dragendorf, <sup>d</sup>Anisaldeído e <sup>e</sup>Liberman-Burchard.

Positivo (+) / Negativo (-)

A intensidade da presença da classe de metabólito é representada pelo número de (+).

Fonte: o autor.

**Tabela 9 –** Resultados da prospecção fitoquímica das frações e extrato da raiz da *B. oxyclada*.

Amostras	<sup>a</sup> Flavonoides	<sup>b</sup> Alcaloides	<sup>c</sup> Alcaloides/ Nitrogênio Heterocíclico	<sup>d</sup> Terpenoides/ Saponinas/ Propilpropanoide	<sup>e</sup> Terpenoides/ Esteroides/ Saponinas
Extrato	++++	-	-	+++	+++
FrH	-	-	-	++++	++++
FrD	-	-	-	++++	+++
FrA	++++	-	-	+	++
FrBU	++	-	-	+	+
FrAG	+	-	-	+	+

Reveladores: <sup>a</sup>NP-PEG, <sup>b</sup>Iodocloroplatinado, <sup>c</sup>Dragendorf, <sup>d</sup>Anisaldeído e <sup>e</sup>Liberman-Burchard.

Positivo (+) / Negativo (-).

A intensidade da presença da classe de metabólito é representada pelo número de (+).

Fonte: o autor.

**Tabela 10 – Resultados da prospecção fitoquímica das frações e extrato da folha da *B. oxyclada*.**

Amostras	<sup>a</sup> Flavonoides	<sup>b</sup> Alcaloides	<sup>c</sup> Alcaloides/ Nitrogênio Heterocíclico	<sup>d</sup> Terpenoides/ Saponinas/ Propilpropanoides	<sup>e</sup> Terpenoides/ Esteroides/ Saponinas
Extrato	+++	-	-	+++	++
FrH	-	-	-	+++	-
FrD	++++	-	-	++++	+
FrA	++++	-	-	+	-
FrBU	++++	-	-	+++	++
FrAG	+	-	-	+	+

Reveladores: <sup>a</sup>NP-PEG, <sup>b</sup>Iodocloroplatinado, <sup>c</sup>Dragendorf, <sup>d</sup>Anisaldeído e <sup>e</sup>Liberman-Burchard.

Positivo (+) / Negativo (-)

A intensidade da presença da classe de metabólito é representada pelo número de (+).

Fonte: o autor.

Através dos testes de prospecção foi possível verificar que os extratos e as frações dos caules, folhas e raízes de *B. oxyclada* apresentaram substâncias das classes dos flavonoides, terpenos, saponinas e propilpropanoides. Além de constatar a ausência de alcaloides e nitrogênio heterocíclico.

Através desta prospecção observou-se uma maior intensidade de compostos polares como flavonoides, o que contribui para justificar os maiores rendimento nas frações mais polares durante o processo de fracionamento dos extratos.

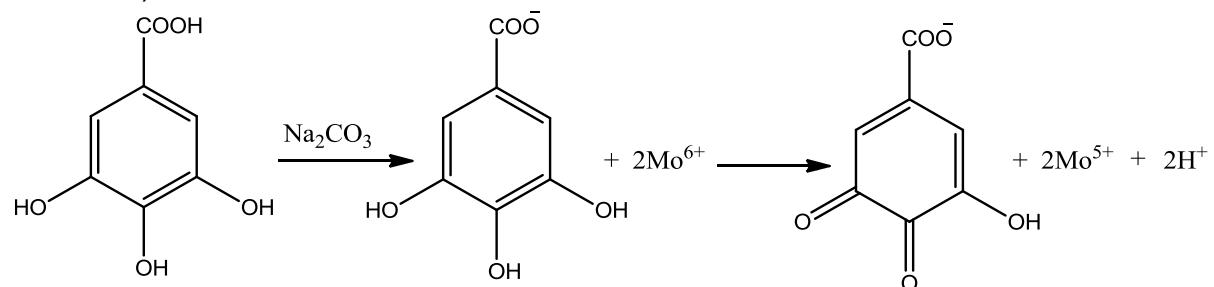
Outro fato relevante é que, dentre todas as classes de metabólitos encontradas, as que se sobressaem foram as dos flavonoides, sendo esta encontrada com maior concentração nas frações acetato de etila e *n*-butanol.

Em outras espécies do gênero foram encontrados os mesmos perfis fitoquímicos deste estudo, como no trabalho com o extrato e frações das folhas da *B. laevifolia* foram encontrados flavonoides, terpenoides, saponinas, propilpropanoides e esteroides (NUNES et al., 2016), também no estudo das folhas da *B. argyrophylla* seu extrato e frações apresentaram flavonoides, terpenoides, saponinas, propilpropanóide e esteroides (Oliveira, 2016). Como o perfil fitoquímico é parecido, as amostras da *B. oxyclada* possuem grande oportunidade de ser promissora em relação a atividades biológicas como antifúngica e antioxidante, visto que nestes trabalhos foram descritas estas atividades.

#### 5.4 Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

A determinação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, que se fundamenta na redução sofrida pelos ácidos fosfomolibídico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e fosfotungístico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) em presença de substâncias fenólicas. Neste processo de redução ocorre a mudança da coloração da solução de amarelo para azul. Esta mudança pode ser acompanhada em espectrofotômetro permitindo a quantificação dos compostos fenólicos, um exemplo desta reação está apresentado na Figura 15 (MESSERSCHMIDT et al., 2011).

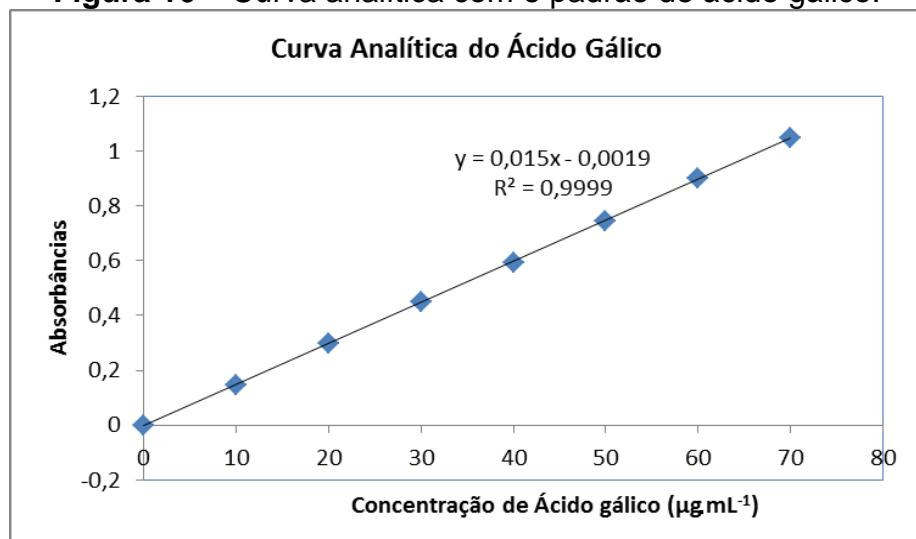
**Figura 15 – Reação do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu).**



Fonte: OLIVEIRA, 2009.

Para a quantificação foi construída uma curva analítica com padrão de ácido gálico, que esta apresentada na Figura 16.

**Figura 16 – Curva analítica com o padrão de ácido gálico.**



Fonte: o autor.

A partir da curva analítica de ácido gálico foi calculado o teor de fenóis totais, pelo meio da interpolação das absorbâncias dos extratos e das frações. Os resultados estão expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (Tabela 11).

**Tabela 11** – Teores de fenóis totais dos extratos e das frações da *B. oxyclada*.

<b>Amostras</b>	<b>Caule</b>	<b>Raiz</b>	<b>Folha</b>
	mg de EAG g <sup>-1</sup> da amostra		
Extrato	84,30 ± 11,64 <sup>a</sup>	713,20 ± 9,33	83,30 ± 1,80 <sup>a</sup>
FrH	25,50 ± 1,29 <sup>c</sup>	16,50 ± 4,80	39,80 ± 0,10 <sup>e</sup>
FrD	45,80 ± 7,86 <sup>d, e</sup>	60,50 ± 5,86	30,10 ± 0,70 <sup>b</sup>
FrA	425,60 ± 11,67 <sup>f</sup>	417,90 ± 5,33 <sup>f</sup>	239,90 ± 4,00
FrBU	506,30 ± 2,72	786,33 ± 11,00	384,30 ± 4,30
FrAG	49,60 ± 2,74 <sup>d</sup>	118,50 ± 2,20	26,60 ± 3,70 <sup>b,c</sup>

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

De acordo com os dados da Tabela 11 os resultados de fenóis totais demonstram que os maiores valores de fenóis foram encontrados nas frações acetato de etila e *n*-butanol, o que foi indicado na prospecção fitoquímica, sendo estas que apresentaram maior intensidade de flavonoides. Estes fatos indicam que a maior parte da composição dos extratos é de compostos fenólicos, visto que os maiores rendimentos durante o fracionamento dos extratos foram destas frações mais polares, que apresentaram maior teor de fenóis totais, com destaque para as frações *n*-butanol, as quais exibiram o maior rendimento no fracionamento dos extratos.

Comparando os três extratos, o da raiz apresentou maior teor de compostos fenólicos, e consequentemente entre todas as frações, a que apresenta maior concentração destes compostos foi à fração *n*-butanol da raiz.

Observou-se também que as frações de menor polaridade (hexano e diclorometano) apresentaram o menor teor de compostos fenólicos, fato que é justificado mediante a polaridade dos compostos fenólicos serem maior,

corroborando com a prospecção fitoquímica, a qual indicou para as frações hexano e diclorometano mais compostos da classe dos terpenoides.

Os valores de teor de compostos fenólicos da folha da *B. oxyclada* estão comparados com a *B. laevifolia* e a *B. argyrophylla* na Tabela 12.

**Tabela 12** – Comparação do teor de fenóis totais dos extratos e das frações das folhas da *B. oxyclada* com a *B. laevifolia* e a *B. argyrophylla*.

Amostras	* <i>B. laevifolia</i>	** <i>B. argyrophylla</i>	<i>B. oxyclada</i>
	mg de EAG g <sup>-1</sup> da amostra		
Extrato	542,00 ± 2,10	337,13 ± 1,44	83,30 ± 1,80
FrH	66,20 ± 1,60 <sup>a</sup>	174,91 ± 1,93	39,80 ± 0,10
FrD	495,10 ± 0,70	73,10 ± 1,12	30,10 ± 0,70 <sup>b</sup>
FrA	660,00 ± 1,50	405,46 ± 3,20	239,90 ± 4,00
FrBU	784,70 ± 5,60	229,46 ± 1,07	384,30 ± 4,30
FrAG	-	67,48 ± 0,45 <sup>a</sup>	26,60 ± 3,70 <sup>b</sup>

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

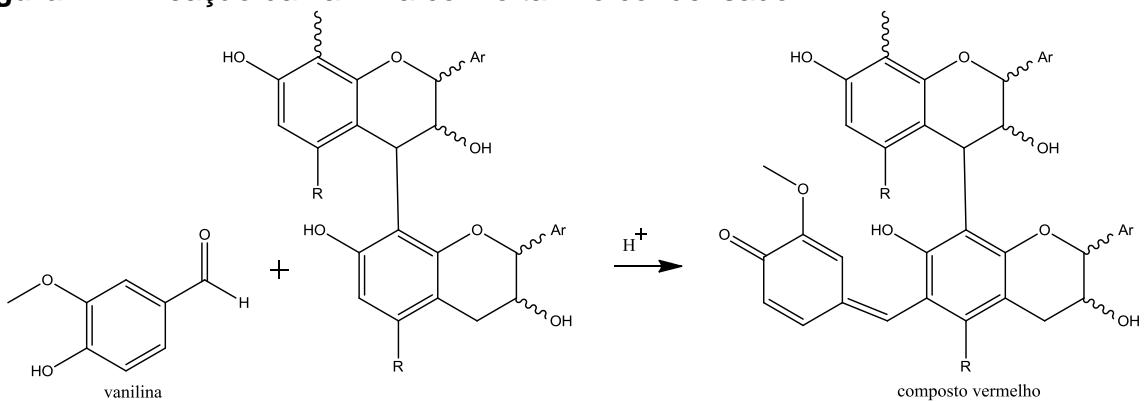
Fonte: \* NUNES et al., 2016; \*\* OLIVEIRA, 2016.

As duas espécies (*B. laevifolia* e *B. argyrophylla*) apresentaram maior teor de compostos fenólicos em relação a *B. oxyclada* tanto no extrato como nas frações. Isto indica de maneira geral que as folhas da *B. oxyclada* possuem uma menor concentração de compostos com estrutura fenólica como flavonoides e taninos condensados, que as demais espécies.

## 5.5 Determinação de Taninos Condensados

Os taninos condensados são polímeros de monômeros de catequina com várias hidroxilas fenólicas, que possuem importantes atividades biológicas como a antioxidante. O teor de taninos condensados presentes nos extratos e nas frações da *B. oxyclada* foi quantificado através do método da vanilina sulfúrica, este baseia-se na reação da vanilina com os taninos em meio ácido, formando um composto vermelho (Figura 17), que pode ser quantificado (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

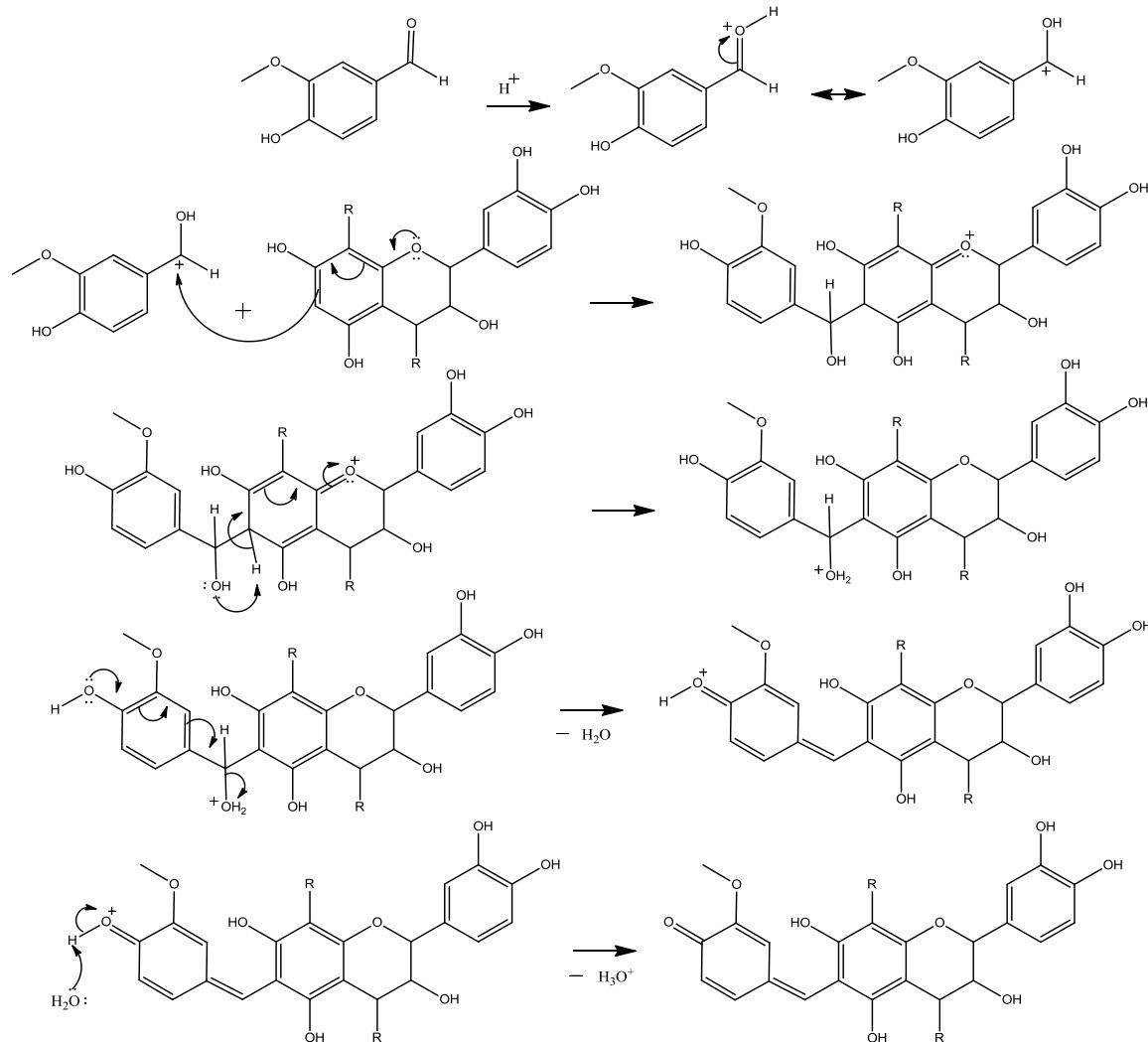
**Figura 17 – Reação da vanilina com o tanino condensado**



Fonte: SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001.

A reação que ocorre é do tipo substituição eletrofílica aromática, no trabalho Sousa (2015), há uma proposta de mecanismo para a reação, que esta apresentada na Figura 18.

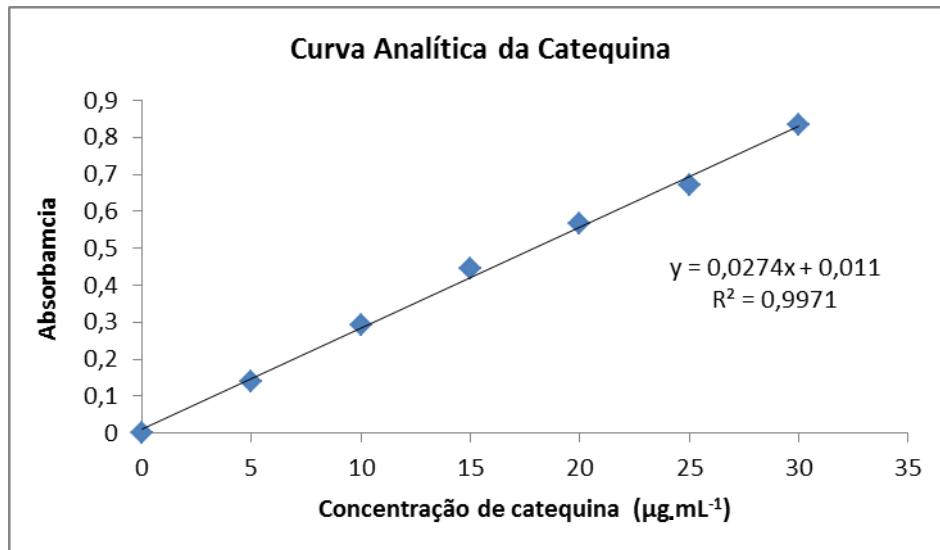
**Figura 18 – Reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéquico.**



Fonte: adaptado de SOUSA, 2015.

A quantificação do teor de taninos condensados foi realizada através da construção de uma curva analítica utilizando a catequina (Figura 19).

**Figura 19 – Curva Analítica da Catequina.**



Fonte: o autor.

As absorbâncias obtidas das amostras dos extratos e das frações foram interpoladas à curva analítica de catequina, e os resultados de teor de taninos condensados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina por grama de amostra, estes estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13 – Resultados da quantificação de taninos condensados dos extratos e das frações da *B. oxycyclada*.**

Amostra	Caule	Raiz	Folha
		mg EC g⁻¹ de amostra	
Extrato	58,50 ± 8,74 <sup>d</sup>	406,90 ± 14,23	88,70 ± 3,00
FrH	37,20 ± 0,81 <sup>b, c</sup>	27,20 ± 2,90 <sup>a</sup>	96,60 ± 4,90
FrD	35,50 ± 1,67 <sup>b</sup>	38,10 ± 1,58 <sup>b, c</sup>	81,20 ± 3,20
FrA	184,90 ± 11,86	283,20 ± 0,36	397,40 ± 4,00
FrBU	720,80 ± 1,82	996,40 ± 7,30	840,90 ± 10,00
FrAG	25,60 ± 4,35 <sup>a</sup>	55,20 ± 4,69 <sup>d</sup>	39,30 ± 1,75 <sup>c</sup>

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

Após analisar a Tabela 13, observa-se dentre os extratos brutos a raiz apresentando o maior teor de taninos condensados. Entre as frações verifica-se, que as de *n*-butanol se sobressaem em relação às demais, comparando as três frações de *n*-butanol a da raiz apresentou o maior teor.

Os resultados do teor de taninos condensados apresentaram o mesmo perfil de valores do resultado de fenóis totais, sendo o extrato da raiz o de maior destaque dentre os três extratos. As frações acetato de etila e *n*-butanol foram as com maior teor, também se sobressaindo a do *n*-butanol, sugerindo que a classe de compostos fenólicos predominante nos extratos e frações seja a de taninos condensados.

Observando os dados, em especial do extrato e frações da raiz, pode-se sugerir que a maior parte da composição da raiz seja de taninos condensados, visto que ao fracionar o extrato, a fração de maior rendimento (52,67%) foi a de *n*-butanol, e esta possui o maior teor de compostos fenólicos entre as demais frações, sendo em destaque a classe predominante a de taninos condensados.

Os resultados das folhas estão comparados com outras duas espécies do gênero na Tabela 14. Não foram encontrados dados referentes para as análises de caules e raízes.

**Tabela 14** – Comparação dos teores de taninos condensados dos extratos e das frações de folhas de espécies do gênero *Banisteriopsis*.

Amostras	* <i>B. laevifolia</i>	** <i>B. argyrophylla</i>	<i>B. oxyclada</i>
	mg EC g <sup>-1</sup> de amostra		
Extrato	274,60 ± 8,20 <sup>a, b</sup>	272,48 ± 0,31 <sup>a</sup>	88,70 ± 3,00
FrH	252,00 ± 3,40	99,08 ± 2,49 <sup>c</sup>	96,60 ± 4,90 <sup>c</sup>
FrD	278,60 ± 2,70 <sup>b</sup>	51,83 ± 1,14	81,20 ± 3,20
FrA	268,90 ± 3,30 <sup>a</sup>	208,79 ± 1,14	397,40 ± 4,00
FrBU	382,10 ± 1,70	226,59 ± 2,86	840,90 ± 10,00
FrAG	-	36,01 ± 0,65	39,30 ± 1,75

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

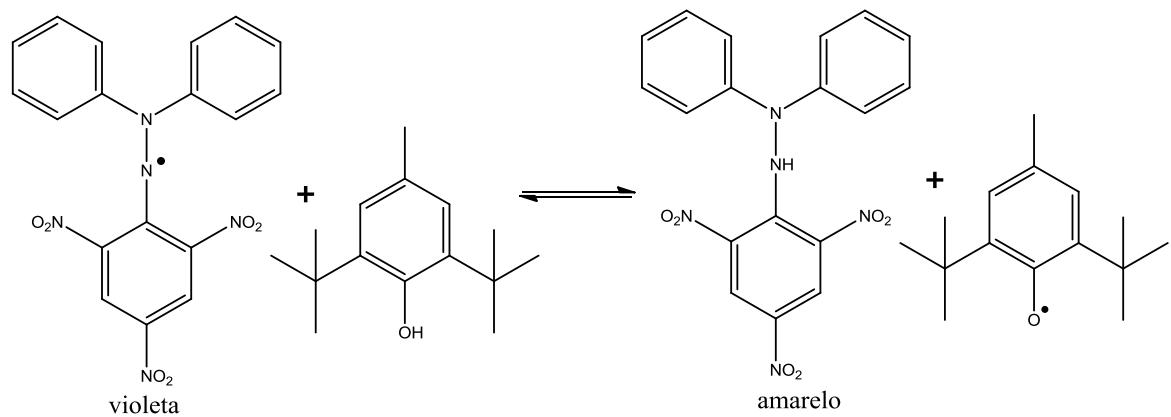
Fonte: \* NUNES et al., 2016; \*\* OLIVEIRA, 2016.

Comparando-se as três espécies entre extratos e frações, o maior teor de taninos condensados foi à fração *n*-butanol da *B. oxyclada*, seguida da fração acetato de etila da mesma espécie. Este comparativo juntamente com o da Tabela 12 sugere que as espécies *B. laevifolia* e *B. argyrophylla*, possuem maior teor de compostos fenólicos que a *B. oxyclada*. Mas o teor de taninos foi muito superior para a espécie deste estudo, sugere-se que a *B. laevifolia* e *B. argyrophylla* possuem outras classes de compostos fenólicos predominantes, como por exemplo, os flavonoides, já a *B. oxyclada* há predominância dos taninos condensados.

## 5.6 Avaliação do potencial antioxidante

Na determinação do potencial antioxidante foi utilizado o método do sequestro do radical livre DPPH, que se baseia na reação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila, que absorve a luz em 517 nm e possui coloração violeta, que na presença de substâncias antioxidantes ocorre a reação de redução formando 2,2-difenil-1-picrildrazina cuja coloração é amarela (Figura 20). Esta mudança de coloração pode ser monitorada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Visível (OLIVEIRA et al., 2009).

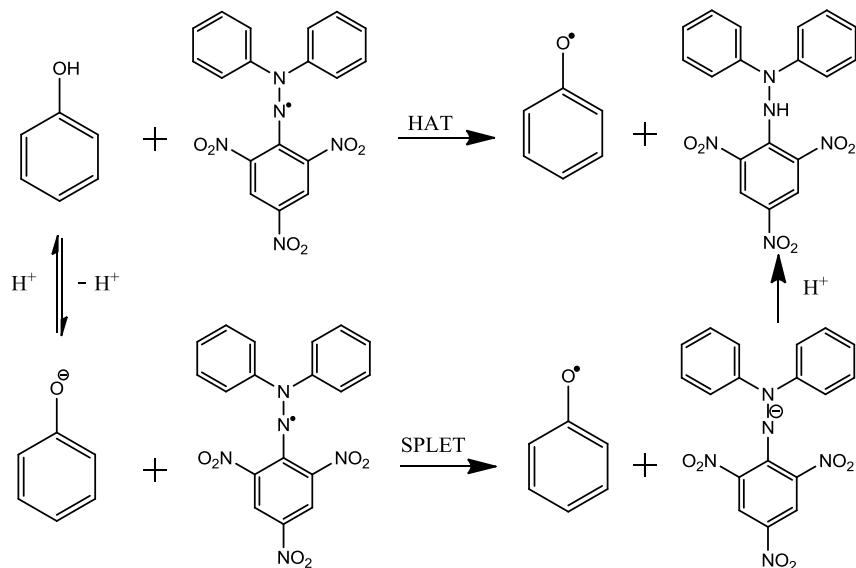
**Figura 20** – Reação do DPPH com butilidroxitolueno (BHT).



Fonte: adaptado de OLIVEIRA et al., 2009.

Na reação do composto fenólico com o radical DPPH o mecanismo pode ocorrer de duas maneiras (em metanol): transferência de hidrogênio atômico (HAT – “hydrogen atom transfer”) ou por perda sequencial de próton na transferência de elétron (SPLET – “sequential proton loss electron transfer”). Estes dois mecanismos estão representados na Figura 21 (LIU, 2010).

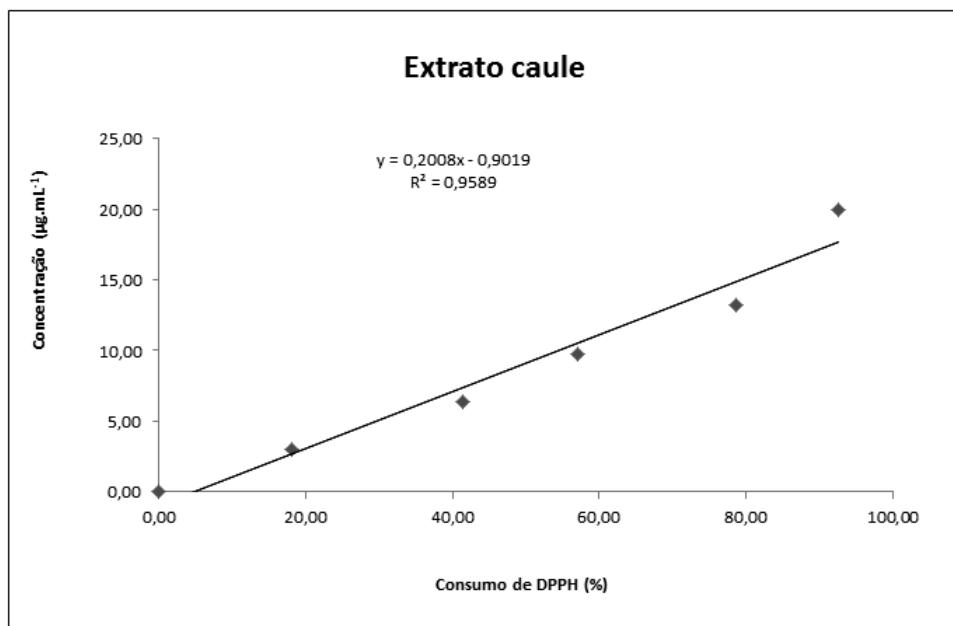
**Figura 21** – Reação do fenol com o DPPH em metanol.



Fonte: adaptado de LIU, 2010.

Para esta análise foram construídas curvas analíticas do extrato e das frações com diferentes concentrações *versus* a porcentagem de DPPH consumido para a determinação do CE<sub>50</sub> (concentração efetiva média) para as amostras (ARGOLO et al., 2004). Como exemplo deste tipo de curva analítica, na Figura 22 está representado uma das curvas construída para a amostra de extrato do caule.

**Figura 22** – Exemplo de curva analítica para o cálculo do CE<sub>50</sub>.



Fonte: o autor.

A partir da construção destas curvas foi possível calcular o potencial antioxidante dos extratos e frações (Tabela 15).

**Tabela 15** – Valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) da capacidade antioxidante para o extrato e frações da *B. oxyclada*.

Amostra	Caule	Raiz	Folha
		$CE_{50}(\mu\text{g.mL}^{-1})$	
Extrato	$6,38 \pm 1,50$ <sup>a, b, e</sup>	$7,58 \pm 0,13$ <sup>a, e</sup>	$25,90 \pm 1,10$
FrH	$242,43 \pm 23,24$	$> 200,00$	$160,70 \pm 3,40$
FrD	$81,75 \pm 4,55$	$64,61 \pm 4,65$ <sup>c</sup>	$100,40 \pm 3,90$
FrA	$35,00 \pm 0,70$	$3,75 \pm 0,60$ <sup>d</sup>	$6,50 \pm 0,40$ <sup>b</sup>
FrBU	$1,28 \pm 0,17$	$3,97 \pm 0,27$ <sup>d</sup>	$6,80 \pm 0,80$ <sup>b, e</sup>
FrAG	$57,32 \pm 3,74$ <sup>c</sup>	$22,00 \pm 1,22$	$119,50 \pm 2,60$
BHT*			$7,30 \pm 0,30$ <sup>e</sup>

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

\*Controle positivo (butilidroxitolueno)

Fonte: o autor.

Quanto menor o valor de  $CE_{50}$  maior é o potencial antioxidante da amostra, isto significa que é necessária uma menor concentração de amostra para consumir 50% do radical DPPH (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005). Analisando a Tabela 15, comparando-se os extratos, o da raiz e o do caule apresentaram melhor potencial seguido da folha. Entre as frações, as de *n*-butanol predominaram, com o caule apresentando o melhor valor de  $CE_{50}$  ( $CE_{50}=1,28 \pm 0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Observa-se também que o  $CE_{50}$  da fração *n*-butanol do caule ( $CE_{50}=1,28 \pm 0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), fração acetato de etila da raiz ( $CE_{50}=3,75 \pm 0,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a fração *n*-butanol da raiz ( $CE_{50}=3,97 \pm 0,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentaram melhor potencial que o padrão BHT ( $CE_{50}=7,30 \pm 0,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Os resultados obtidos na prospecção fitoquímica (Tabelas 8, 9 e 10) demonstram que os extratos da *B. oxyclada* e suas frações apresentaram como classes de metabólitos secundários majoritários os flavonóides, resultado que corrobora com os resultados dos ensaios de avaliação do potencial antioxidante (DPPH), já que esta classe de compostos possui atividade antioxidante conhecida.

Os testes de fenóis totais e taninos condensados (Tabela 13) indicaram maior concentração destes compostos para as frações *n*-butanol dos extratos, o que mais uma vez explica os melhores potenciais antioxidantes para estas frações, já que estes compostos estão em altas concentrações, e suas capacidades antioxidantes já foram descritas em vários estudos.

Um fato intrínseco foi que a fração *n*-butanol da raiz apresentou maior teor de fenóis (Tabela 11) e taninos condensados (Tabela 13), consequentemente era para ela ter apresentado o melhor potencial antioxidante (Tabela 15), mas a fração que apresentou melhor potencial foi *n*-butanol do caule, a qual apresentou o segundo maior teor de fenóis, e a terceira maior concentração de taninos condensados. Isto indica que esta fração possui outros compostos com característica fenólica muito promissora para estudos aprofundados em relação à busca de novos antioxidantes naturais.

Comparando os valores de  $CE_{50}$  pode se classificar os extratos e frações em relação à intensidade do potencial antioxidante, valores de  $CE_{50}$  menores que  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  são considerados de potencial elevado,  $CE_{50}$  entre  $50 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como moderados,  $CE_{50}$  entre  $100 - 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como baixo e  $CE_{50}$  maior que  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como inativo (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005). A classificação dos extratos e frações está representada na Tabela 16.

**Tabela 16** – Classificação dos extratos e frações pela intensidade do potencial antioxidante.

Amostra	Caule	Raiz	Folha
Extrato	elevado	elevado	elevado
FrH	inativo	inativo	baixo
FrD	moderado	moderado	baixo
FrA	elevado	elevado	elevado
FrBU	elevado	elevado	elevado
FrAG	moderado	elevado	baixo

Fonte: o autor.

Os resultados de potencial antioxidante das folhas da *B. oxyclada* foram comparados com duas espécies do gênero na Tabela 17.

**Tabela 17** – Comparação do potencial antioxidante dos extratos e das frações de folhas de espécies do gênero *Banisteriopsis* CE<sub>50</sub>.

Amostras	* <i>B. laevifolia</i>	** <i>B. argyrophylla</i> µg.mL <sup>-1</sup>	<i>B. oxyclada</i>
Extrato	4,50 ± 0,90 <sup>a, b</sup>	4,27 ± 0,80 <sup>a</sup>	25,90 ± 1,10
FrH	58,10 ± 1,40	12,02 ± 2,00	160,70 ± 3,40
FrD	9,10 ± 0,80 <sup>c</sup>	17,03 ± 0,40	100,40 ± 3,90
FrA	4,10 ± 0,50 <sup>a</sup>	4,10 ± 0,10 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,40 <sup>d</sup>
FrBU	8,40 ± 1,00 <sup>c</sup>	4,80 ± 0,10 <sup>b</sup>	6,80 ± 0,80 <sup>c, d</sup>
FrAG	-	23,07 ± 2,30	119,50 ± 2,60

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido p<0,05 para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: \* NUNES et al., 2016; \*\* OLIVEIRA, 2016.

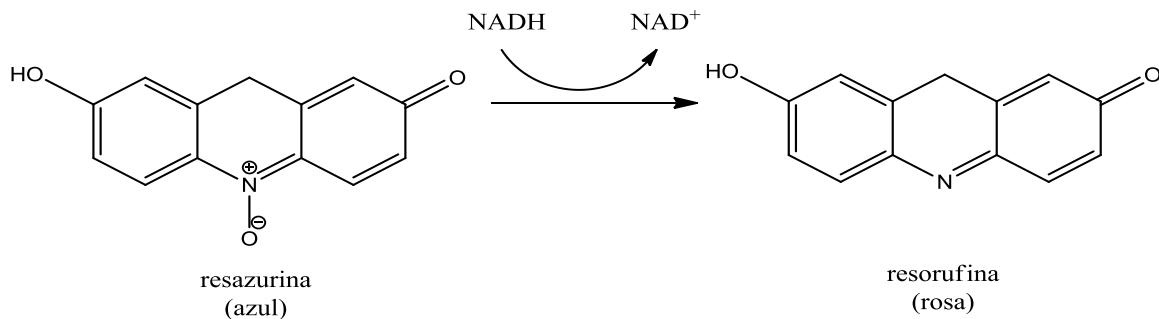
Através dos dados apresentados na Tabela 17, em linhas gerais, entre extrato e frações de folhas a espécie que demonstra maior potencial antioxidante foi a *B. argyrophylla*, no entanto todas apresentaram potenciais elevados, se destacando em todas as espécies as frações acetato de etila e *n*-butanol, frações estas que nos três estudos apresentaram maior teor de fenóis totais e taninos condensados.

## 5.7 Atividade antibacteriana

Tendo em vista a necessidade da busca de novos compostos que possam ser utilizados no tratamento de enfermidades causadas por bactérias, foi avaliada a atividade antibacteriana dos extratos e frações da *B. oxyclada*, pelo método de microdiluição em caldo, em diferentes concentrações das amostras frente as bactérias aeróbicas e anaeróbicas, utilizando como indicador a resazurina.

A resazurina é um corante de cor azul que na presença dos microorganismos (como bactérias, fungos, protozoários e células) é convertido em resorufina de coloração rosa, esta reação de redução esta apresentada na Figura 23 (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007).

**Figura 23** – Reação de redução da resazurina.



Fonte: adaptado de BACHELOR; ZHOU, 2004.

Os extratos e frações da *B. oxyclada* foram submetidos a avaliação do potencial antibacteriano frente as bactérias aeróbicas e anaeróbicas, e os resultados foram expresso em concentração inibitória mínima(CIM) (Tabela 18 e 19), ou seja a concentração mínima necessária para inibir a bactéria.

**Tabela 18** – Atividades antibacterianas com bactérias aeróbias (CIM em  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) para os extratos e frações das folhas, caules e raízes da *B. oxyclada*.

	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
	µg.mL <sup>-1</sup>			
<b>Folha</b>				
Extrato	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrH	>400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrD	400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrA	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrBU	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrAG	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
<b>Caule</b>				
Extrato	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrH	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrD	400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrA	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrBU	>400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrAG	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
<b>Raiz</b>				
Extrato	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrH	200 <sup>b</sup>	200 <sup>b</sup>	200 <sup>b</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrD	>400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrA	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrBU	>400 <sup>a</sup>	400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
FrAG	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>	>400 <sup>a</sup>
<b>Controle*</b>	0,922	7,375	7,375	1,844

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

\*Concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (Clorexidina).

Fonte: o autor.

**Tabela 19** – Atividades antibacterianas com bactérias anaeróbias (CIM em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os extratos e frações das folhas, caules e raízes da *B. oxyclada*.

	<i>P. gingivalis</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>B. fragilis</i>
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$			
<b>Folha</b>				
Extrato	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrH	200 <sup>a</sup>	400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrD	25 <sup>c</sup>	400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrA	200 <sup>a</sup>	400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrBU	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrAG	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
<b>Caule</b>				
Extrato	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrH	100 <sup>d</sup>	400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrD	25 <sup>c</sup>	400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrA	200 <sup>a</sup>	400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrBU	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrAG	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
<b>Raiz</b>				
Extrato	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrH	100 <sup>d</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrD	25 <sup>c</sup>	400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrA	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrBU	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
FrAG	200 <sup>a</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>	>400 <sup>b</sup>
<b>Controle*</b>				1,475

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes. \*Concentração do controle positivo testado para as anaeróbias (Metronidazol).

Fonte: o autor.

Quanto menor for o valor CIM, melhor é a atividade, neste contexto, para as bactérias aeróbicas o CIM de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da fração hexano das folhas para as bactérias *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*, foi o melhor resultado entre todos os extrato e frações. Para as bactérias anaeróbicas, a melhor atividade foi o CIM de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  encontrado nas frações diclorometano dos três extratos.

Segundo Rios e Recio (2005), valores de CIM inferiores a 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  são considerados promissores. Sendo assim, os extratos e frações da *B. oxyclada* não apresentaram atividade promissora contra bactérias aeróbicas, visto que o menor valor de CIM encontrado foi de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Porem, os resultados contra as bactérias anaeróbias mostraram que as frações diclorometano da folha, caule e raiz apresentaram CIM de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para a *P. gingivalis*, sendo considerado promissor.

Este resultado promissor das frações diclorometano pode estar associado à presença da classe dos terpenoides encontrada nestas frações na prospecção

fitoquímica, já que vários terpenos possuem atividade antibacteriana descrito na literatura (COWAN, 1999).

Comparando esta atividade com espécie do mesmo gênero observa o CIM contra a *P. gingivalis* de 25 µg.mL<sup>-1</sup> para as frações diclorometano dos extratos da *B. oxycyclada*, e CIM de 200 µg.mL<sup>-1</sup> para a fração diclorometano do extrato da folha da *B. laevifolia* (NUNES et al., 2016), sendo considerado as frações diclorometano dos extratos da *B. oxycyclada* mais ativas contra *P. gingivalis* que a fração diclorometano do extrato da folha da *B. laevifolia*.

### 5.8 Atividade antifúngica

Em função da resistência que os fungos apresentam os tratamentos, há necessidade da busca de novas moléculas para o tratamento das doenças causadas por este tipo de microorganismo. Foram avaliados os extratos e frações da folha, raiz e caule da *B. oxycyclada* frente às espécies de *Candida*, através do método de microdiluição em caldo. Os resultados estão expostos em CIM na Tabela 20.

**Tabela 20** – Atividade antifúngica para os extratos e frações da *B. oxycyclada*.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
	µg.mL <sup>-1</sup>				
<b>Folha</b>					
Extrato	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrH	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrD	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrA	187,5	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrBU	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrAG	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
<b>Caule</b>					
Extrato	375 <sup>b</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrH	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrD	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrA	93,75 <sup>c</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrBU	23,43 <sup>d</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrAG	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
<b>Raiz</b>					
Extrato	46,87	750	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrH	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrD	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrA	93,75 <sup>c</sup>	750	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrBU	23,43 <sup>d</sup>	187,5	>1500 <sup>a</sup>	-	-
FrAG	375 <sup>b</sup>	>1500 <sup>a</sup>	>1500 <sup>a</sup>	-	-
<b>Controle*</b>	-	-	-	2	1

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes. \*Controle positivo testado para as leveduras (Anfotericina).

Fonte: o autor.

Observando a Tabela 20, as melhores atividades encontradas foram para frações *n*-butanol do extrato da raiz e caule contra *C. albicans*.

Tandon e colaboradores (2004), consideraram amostras ativas e promissoras para atividade antifúngica aquelas que apresentaram CIM menor ou igual a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Neste sentido, as amostras mais promissoras foram o extrato das raízes com CIM de 46,87  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e as frações *n*-butanol da raiz e do caule com CIM de 23,43  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para ambas contra a *C. albicans*.

Este indicativo de atividade antifúngica contra *C. albicans* é de altíssima relevância, visto que esta espécie de *Candida* é a causadora mais comum de infecções micóticas, como a candidíase, doença esta que atinge milhões de pessoas todos os anos (SARDI et al., 2013; LIMA et al., 2006). As frações *n*-butanol da raiz e do caule demonstraram ser promissoras para a busca de novos antifúngicos.

Outras espécies do gênero já apresentaram atividades antifúngicas como o extrato etanólico das folhas da *B. laevifolia* com CIM de 31  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para a *C. albicans* (NUNES et al., 2016), e o extrato e frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da folha da *B. argyrophylla* com CIM de 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (OLIVEIRA, 2016). Mas comparando com os resultados obtidos das frações *n*-butanol da raiz e caule da *B. oxyclada* (CIM de 23,43  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a presente planta apresenta maior potencial antifúngico que as duas espécies citadas.

## 5.9 Atividade antileishmania

O estudo para descoberta de novos princípios ativos para o tratamento das doenças negligenciadas é algo necessário, para isto, neste estudo foram testados os extratos e frações da folha, raiz e caule da *B. oxyclada* frente ao protozoário *Leishmania amazonensis*. Esta avaliação foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, com utilização como agente revelador a resazurina. Os resultados desta avaliação estão apresentados na Tabela 21.

**Tabela 21** – Atividade antileishmania dos extratos e frações da *B. oxyclada*.

Amostra	Cl <sub>50</sub> (μg mL <sup>-1</sup> ) <i>Leishmania amazonensis</i>
<b>Folha</b>	
Extrato	>512 <sup>a</sup>
FrH	>512 <sup>a</sup>
FrD	>512 <sup>a</sup>
FrA	>512 <sup>a</sup>
FrBU	>512 <sup>a</sup>
FrAG	>512 <sup>a</sup>
<b>Caule</b>	
Extrato	>512 <sup>a</sup>
FrH	270±36
FrD	453±26
FrA	>512 <sup>a</sup>
FrBU	>512 <sup>a</sup>
FrAG	>512 <sup>a</sup>
<b>Raiz</b>	
Extrato	>512 <sup>a</sup>
FrH	>512 <sup>a</sup>
FrD	370±15
FrA	>512 <sup>a</sup>
FrBU	>512 <sup>a</sup>
FrAG	>512 <sup>a</sup>
<b>Anfotericina B</b>	0,29±0,01

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

\*Concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (Clorexidina).

Fonte: o autor.

Para a atividade antileishmania quanto menor o valor de Cl<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% dos protozoários) melhor a atividade. Isto significa que é necessária uma menor concentração das substâncias para inibir 50% dos protozoários. Neste sentido, a melhor atividade encontrada foi a fração hexano do extrato do caule (Cl<sub>50</sub> = 270 ± 36 μg.mL<sup>-1</sup>) seguido da fração diclorometano do extrato da raiz (Cl<sub>50</sub> = 370 ± 15 μg.mL<sup>-1</sup>) e a fração diclorometano do extrato do caule (Cl<sub>50</sub> = 453 ± 26 μg.mL<sup>-1</sup>).

A atividade mesmo não sendo promissora (valor muito alto de Cl<sub>50</sub>), ainda é inédita para espécie e para o gênero, já que até o momento do presente estudo não

há relato na literatura sobre atividade leishmanicida para as plantas do gênero *Banisteriopsis*.

### 5.10 Citotoxicidade

Um dos fatores de grande relevância quando busca-se novos compostos para princípios ativos de novos fármacos é a toxicidade destas substâncias. O ensaio inicial é a citotoxicidade *in vitro*, que têm como objetivo colocar a substância em contato direto com a cultura de células, permitindo avaliar a toxicidade do material (MARTINS, 2012).

Desta forma, foi avaliada a citotoxicidade dos extratos e frações da folha, raiz e caule da *B. oxyclada* frente à cultura de células Vero, pelo método de microdiluição em caldo, utilizando como agente revelador a resazurina. Os resultados foram expressos em CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica de 50%) e estão apresentados na Tabela 22.

**Tabela 22** – Citotoxicidade dos extratos e frações da *B. oxyclada*.

Amostra	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) Célula Vero
<b>Folha</b>	
Extrato	140 $\pm$ 13
FrH	53 $\pm$ 9
FrD	128 $\pm$ 2
FrA	>512 <sup>a</sup>
FrBU	>512 <sup>a</sup>
FrAG	>512 <sup>a</sup>
<b>Caule</b>	
Extrato	>512 <sup>a</sup>
FrH	308 $\pm$ 19
FrD	360 $\pm$ 10
FrA	>512 <sup>a</sup>
FrBU	>512 <sup>a</sup>
FrAG	>512 <sup>a</sup>
<b>Raiz</b>	
Extrato	243 $\pm$ 13
FrH	273 $\pm$ 10
FrD	168 $\pm$ 5
FrA	>512 <sup>a</sup>
FrBU	>512 <sup>a</sup>
FrAG	>512 <sup>a</sup>

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido p<0,05 para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

Na determinação da concentração citotóxica quanto maior o valor de CC<sub>50</sub> menor é a toxicidade das amostras. Desta forma analisando os dados da Tabela 22, a fração mais tóxica encontrada é a de hexano das folhas (CC<sub>50</sub>= 53 ± 9 µg.mL<sup>-1</sup>), mas todas as frações diclorometano e hexano apresentaram certa toxicidade. Esta toxicidade indica que elas são candidatas menos promissoras para possíveis isolamentos de substâncias, visto que suas composições apresentam citotoxicidade.

No estudo de Case e colaboradores (2006), há uma proposta de comparação entre a atividade biológica e a citotoxicidade através do índice de seletividade (IS), o qual permite classificar as amostras testadas, em mais ativas ou mais citotóxicas. Desta maneira, foi calculado para as amostras que apresentaram melhores atividades (Tabela 23).

**Tabela 23** – Índice de seletividade para as atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e antileishmania.

Célula Vero	C. albicans ATCC 28366		P. gingivalis ATCC 33277		DPPH		Leishmania amazonensis		
	CC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	CIM (µg mL <sup>-1</sup> )	IS	CIM (µg mL <sup>-1</sup> )	IS	CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	IS	CI <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	IS
<b>Folha</b>									
Extrato	140 ± 13	>1500	-	200	-0,15	25,90 ± 1,10	0,73	>512	-
FrH	53 ± 90	>1500	-	200	-0,57	160,70 ± 3,40	-0,48	>512	-
FrD	128 ± 20	>1500	-	25	0,71	100,40 ± 3,90	0,10	>512	-
FrA	>512	187,50	0,43	200	0,41	6,50 ± 0,40	1,89	>512	-
FrBU	>512	>1500	-	200	0,41	6,80 ± 0,80	1,87	>512	-
FrAG	>512	>1500	-	200	0,41	119,50 ± 2,60	0,63	>512	-
<b>Caule</b>									
Extrato	>512	375	0,13	200	0,41	6,38 ± 1,50	1,90	>512	-
FrH	308 ± 19	>1500	-	100	0,48	242,43 ± 23,24	0,10	270 ± 36	0,05
FrD	360 ± 10	>1500	-	25	1,15	81,75 ± 4,55	0,64	453 ± 26	-0,09
FrA	>512	93,75	0,73	200	0,41	35 ± 0,70	1,16	>512	-
FrBU	>512	23,43	1,34	200	0,41	1,28 ± 0,17	2,60	>512	-
FrAG	>512	>1500	-	200	0,41	57,32 ± 3,74	0,95	>512	-
<b>Raiz</b>									
Extrato	243 ± 13	46,87	0,71	200	0,08	7,58 ± 0,13	1,50	>512	-
FrH	273 ± 10	>1500	-	100	0,44	> 200,00	-	>512	-
FrD	168 ± 50	>1500	-	25	0,82	64,61 ± 40,65	0,42	370 ± 15	-0,34
FrA	>512	93,75	0,73	200	0,41	3,75 ± 0,60	2,14	>512	-
FrBU	>512	23,43	1,34	200	0,41	3,97 ± 0,27	2,11	>512	-
FrAG	>512	375	0,14	200	0,41	22,0 ± 1,22	1,36	>512	-

Fonte: o autor.

Na análise do índice de seletividade considera-se que quanto mais positivo for o valor do índice, a amostra é mais ativa do que citotóxica, e quanto mais negativo for o índice, a amostra é mais citotóxica do que ativa (CASE et al., 2006).

Com este critério, na atividade contra *C. albicans* as amostras que demonstraram ser mais ativas foram as frações *n*-butanol da raiz e caule. Para a atividade contra *P. gingivalis* a amostra mais ativa foi à fração diclorometano do caule. No sequestro do radical DPPH a amostra de maior potencial foi à fração *n*-butanol do caule. Para a atividade antileishmania a fração mais ativa foi a hexano do caule.

Analizando de forma geral, a fração *n*-butanol do extrato do caule, apresentou melhor atividade antifúngica ( $CIM = 23,43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e o maior potencial antioxidante ( $CE_{50} = 1,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com menor citotoxicidade. Com isto esta fração é a mais indicada para o processo de fracionamento biomonitorado.

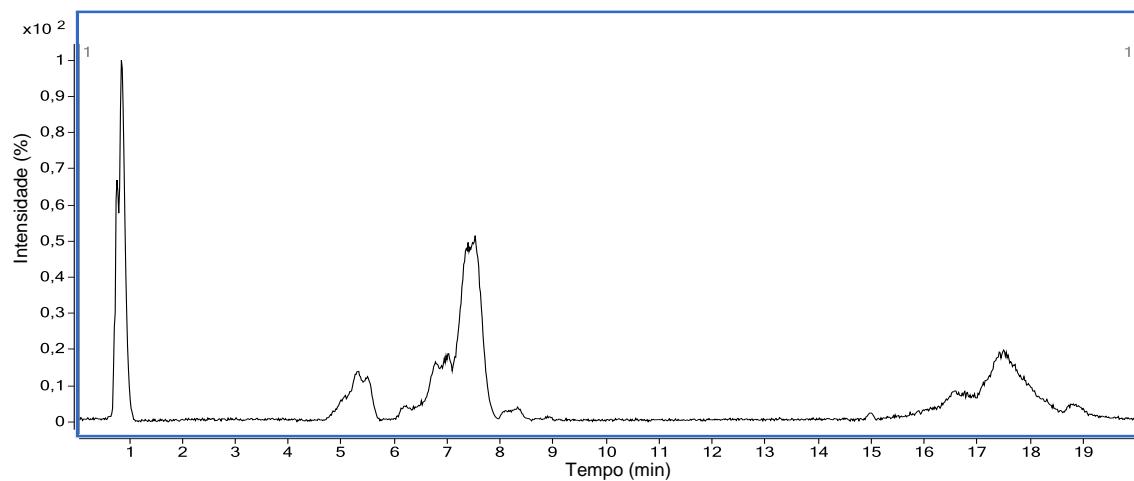
A fração diclorometano do caule também se mostrou promissora frente a *P. gingivalis*, além de baixa citotoxicidade, mas o seu rendimento durante o processo de partição líquido-líquido foi muito baixo (3,63%), tornado inviável o seu fracionamento.

### 5.11 Análises de CLAE/EM

As frações *n*-butanol e acetato de etila dos extratos apresentaram as melhores atividades antioxidantes e antifúngicas, assim estas foram analisadas por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e sugerido uma proposta de composição destas frações.

As frações *n*-butanol e acetato de etila do extrato do caule foram avaliadas por CLAE/EM, e seus cromatogramas estão apresentados na Figura 24 e 25, e as propostas de composição na Tabela 24 e 25 a seguir.

**Figura 24** – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração *n*-butanol do extrato do caule.



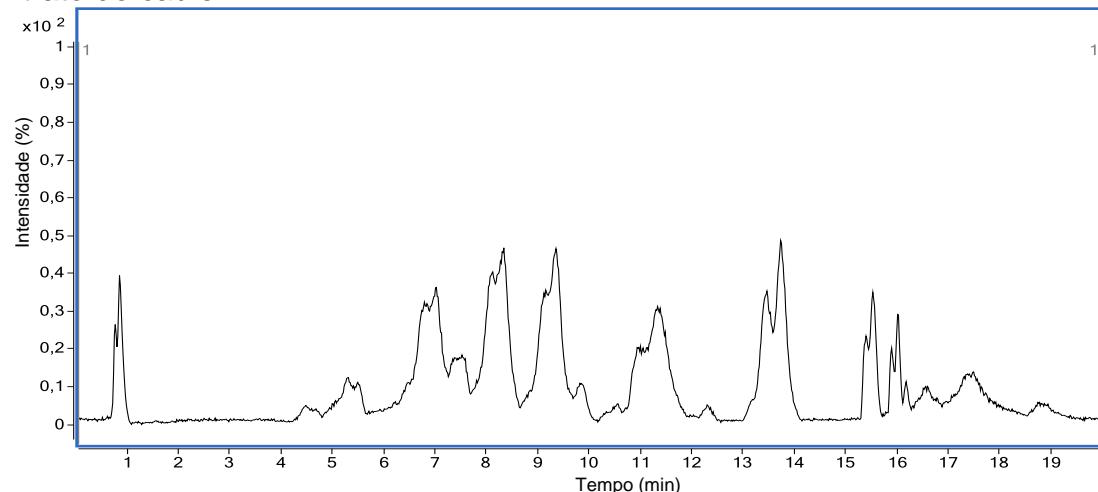
Fonte: o autor.

**Tabela 24** – Proposta de composição para a fração *n*-butanol do extrato do caule.

TR (min)	[M – H] <sup>–</sup>	Fragmentos ( <i>m/z</i> )	Δ <sub>m</sub> (ppm)	Compostos	Referências
0,85	191,0571	173	5,2	ácido quínico (15)	1, 2
5,31	353,0881	191; 179; 161; 135	0,8	ácido 3-O- cafeoilquínico (16)	2, 4
6,17	337,0934	191; 163; 119	1,4	ácido 4-O- <i>p</i> - coumaroilquínico (17)	3, 4
6,71	353,0883	191	1,4	ácido 5-O- cafeoilquínico (18)	4
7,49	472,1470	426; 293; 149		NI	
8,06	289,0722	245	1,4	(epi)catequina (19 e 20)	5, 6

1 - (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004); 2 – (MASIKE et al., 2017); 3 – (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012); 4 – (BAMAWA; NDJELE; FOMA, 2013); 5 – (SAID et al., 2017); 6 – (BYSTROM et al., 2008).  
NI – não identificado; Δ<sub>m</sub> (ppm) – erro da massa experimental referente a teórica.

**Figura 25** – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração acetato de etila do extrato do caule.



Fonte: o autor.

**Tabela 25** – Proposta de composição para a fração acetato de etila do extrato do caule.

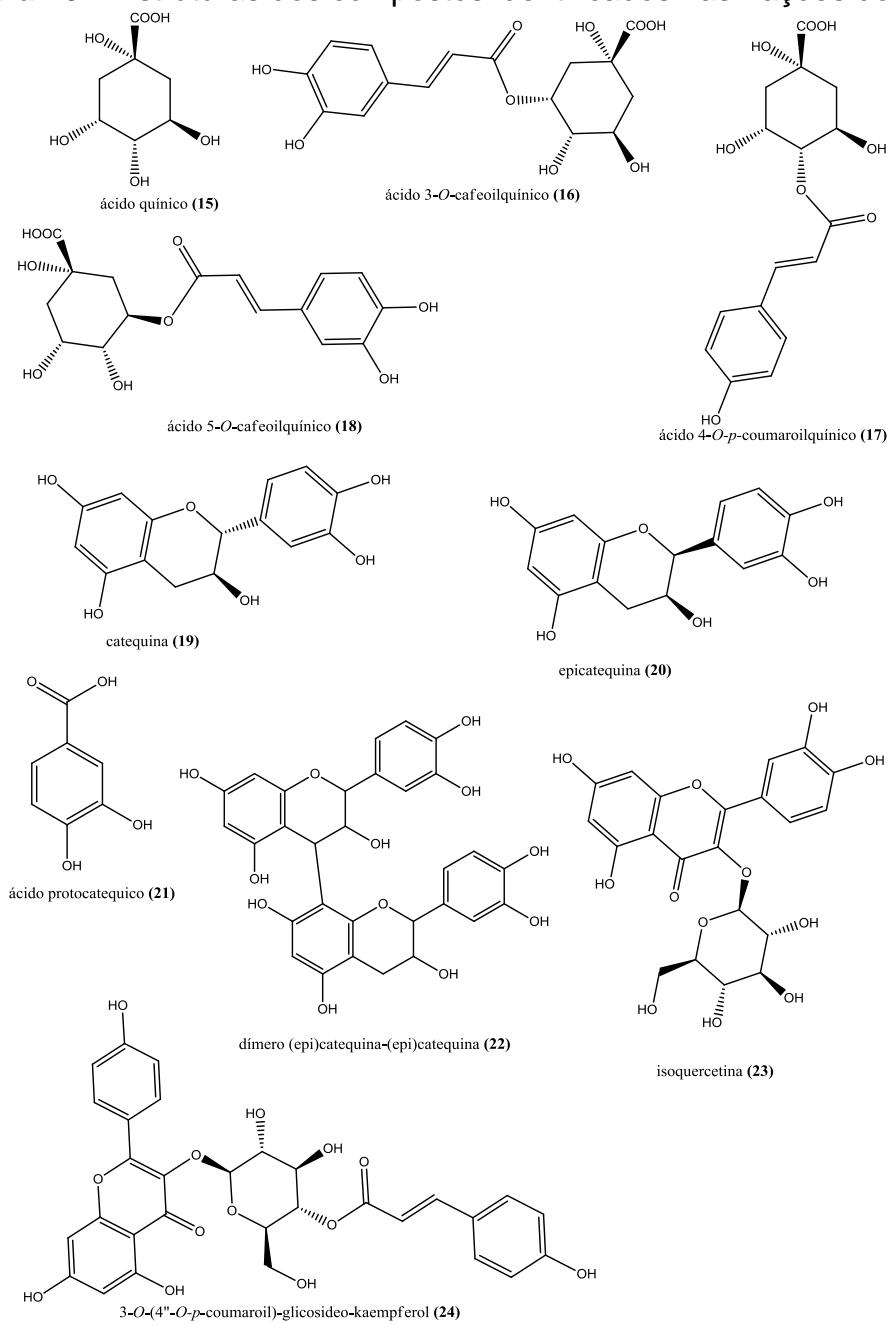
TR (min)	[M – H] <sup>–</sup>	Fragments (m/z)	Erro (ppm)	Compostos	Referências
0,85	191,0571	173; 127	5,7	ácido quínico (15)	1; 2
4,49	153,0200	109	0,4	ácido protocatequico (21)	3
5,29	353,0883	191; 179; 161; 135	1,41	ácido 3-O-cafeoilquínico (16)	2; 4
5,44	577,1363	425, 407, 289	2,07	dímero (epi)catequina-(epi)catequina (22)	5
6,17	337,0934	191; 163; 119	2,66	ácido 4-O-p-coumaroilquínico (17)	2; 6
6,77	353,0885	191	1,98	ácido 5-O-cafeoilquínico (18)	2
7,06	577,1359	425, 407, 289	1,38	dímero (epi)catequina-(epi)catequina (22)	5
7,49	472,1471	426; 293; 149	NI		
8,06	289,0723	245	1,72	(epi)catequina (19 e 20)	5; 7
9,27	451,1046	341	NI		
9,80	367,1041	191; 179; 161; 135	NI		
10,51	577,1361	425; 407; 289	1,73	dímero (epi)catequina-(epi)catequina (22)	5
11,30	137,0246	NI			
12,01	463,0894	300; 301	2,59	isoqueracetina (23)	4
13,50	451,1044	341	NI		
15,50	593,1316	285	2,52	3-O-(4"-O-p-coumaroil)-glicosideo-kaempferol (24)	8
16,03	419,2298	239	NI		

1 - (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004); 2 – (MASIKE et al., 2017); 3 – (CHEN et al., 2012); 4 – (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012); 5 – (SAID et al., 2017); 6 – (BAMAWA; NDJELE; FOMA, 2013); 7 – (BYSTROM et al., 2008); 8 – (KAJDZANOSKA; GJAMOVSKI; STEFOVA, 2010).

NI – não identificado;  $\Delta_m$  (ppm) – erro da massa experimental referente a teórica.

Na Figura 26 estão apresentados as estruturas dos compostos identificados nas frações acetato de etila e *n*-butanol do extrato do caule da *B. oxyclada*.

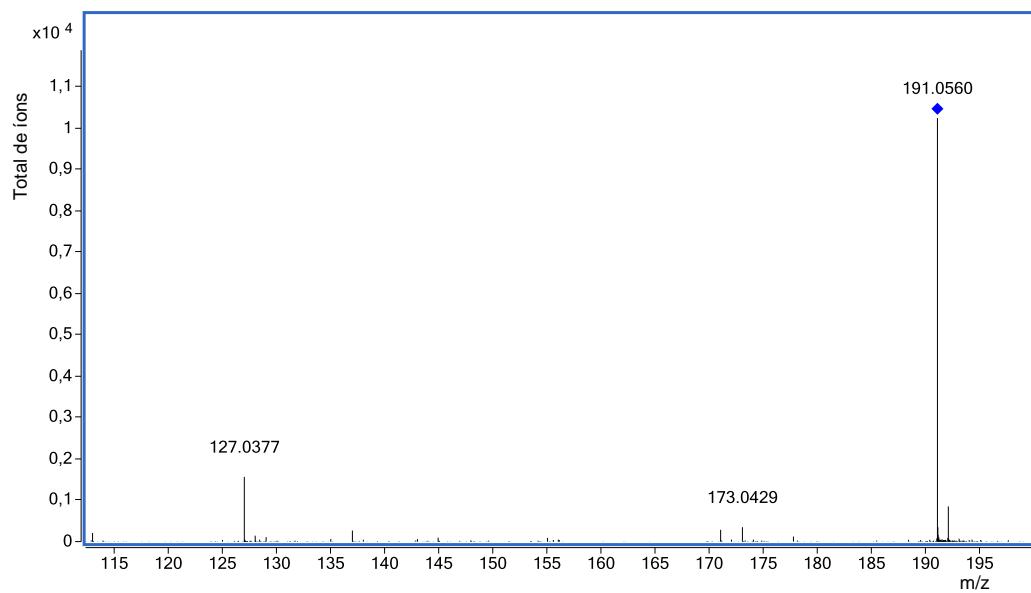
**Figura 26 – Estruturas dos compostos identificados nas frações do caule.**



Fonte: o autor.

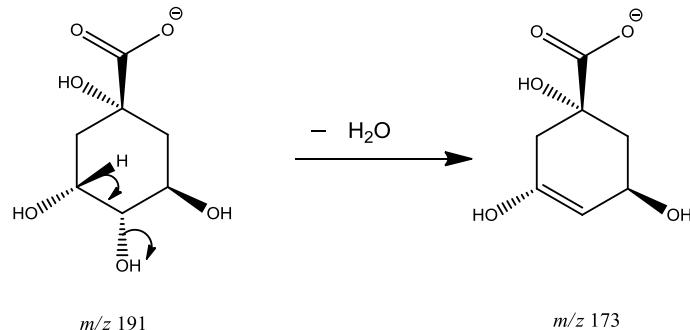
Através dos dados da Tabela 24 em relação à composição da fração *n*-butanol do caule observa-se a prevalência de ácidos orgânicos, como o ácido quínico, ácidos clorogênicos (ácido 3-O-caffeoilquínico, ácido 4-O-p-coumaroilquínico e ácido 5-O-caffeoilquínico), além do composto de *m/z* 472 não identificado até o momento, e uma representante dos flavan-3-ol ((epi)catequina). Para a identificação dos compostos foram realizados os espectros de EM/EM e propostos os mecanismos de fragmentação, apresentados nas Figuras de 27 a 36.

**Figura 27** – Espectro de EM/EM do íon  $m/z$  191.



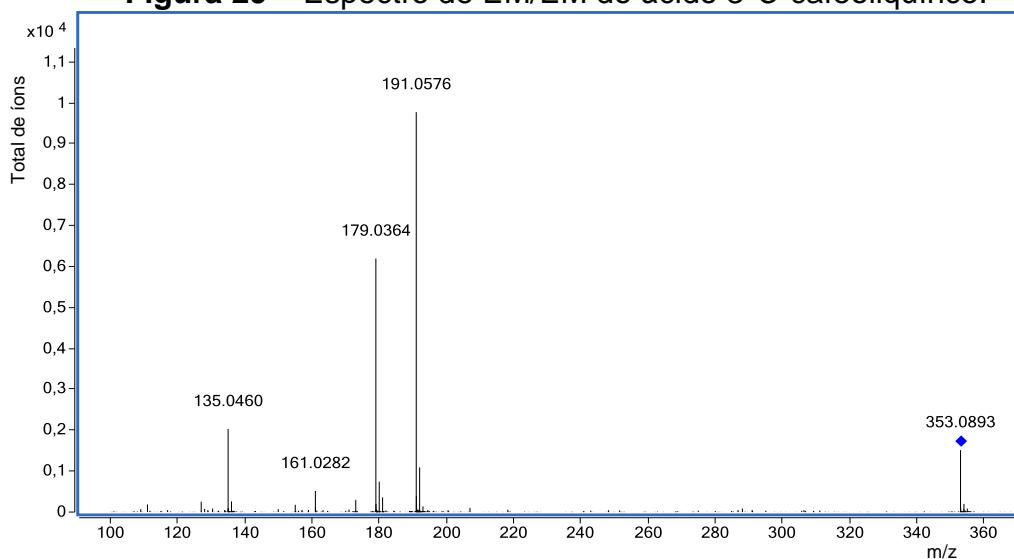
Fonte: o autor.

**Figura 28** – Proposta de fragmentação para o ácido quínico.



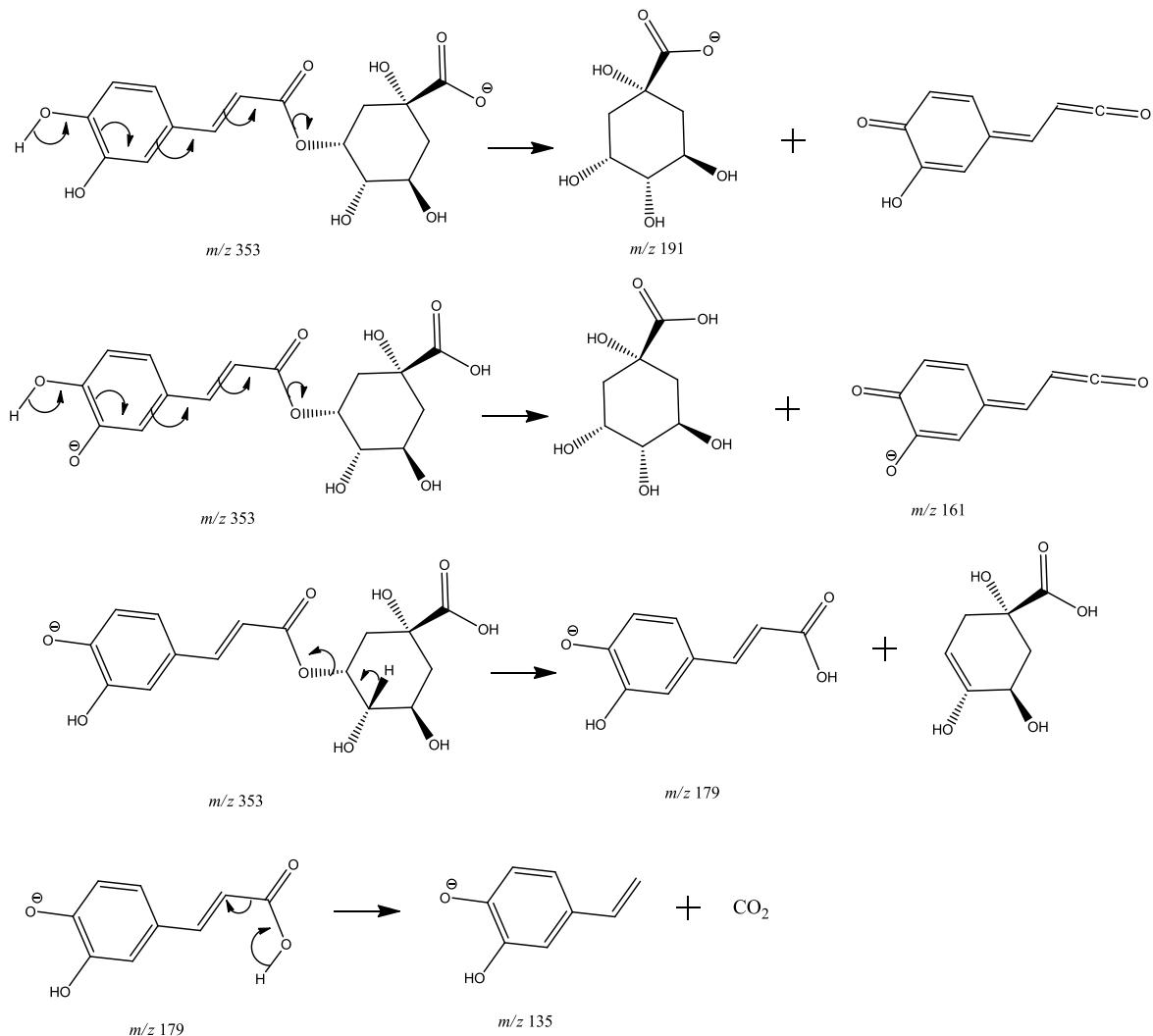
Fonte: adaptado de Masike et al., 2017.

**Figura 29** – Espectro de EM/EM do ácido 3-O-cafeoilquínico.



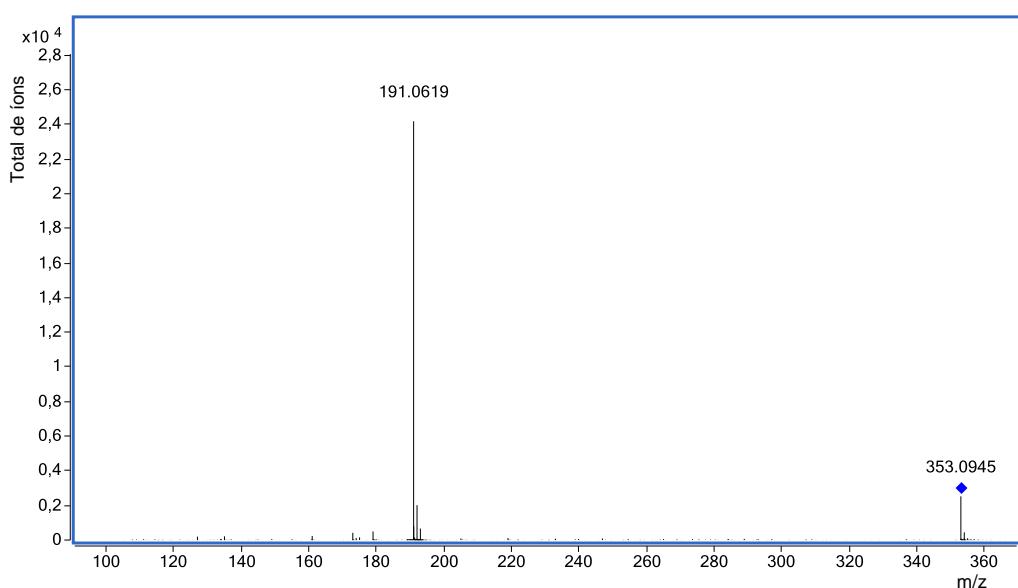
Fonte: o autor.

**Figura 30 – Proposta de fragmentação para o ácido 3-O-cafeoilquínco.**



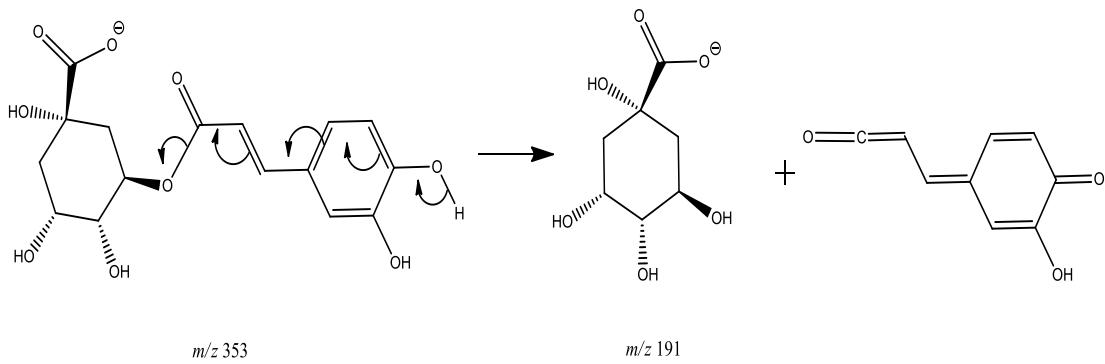
Fonte: o autor.

**Figura 31 – Espectro de EM/EM do ácido 5-O-cafeoilquínco.**



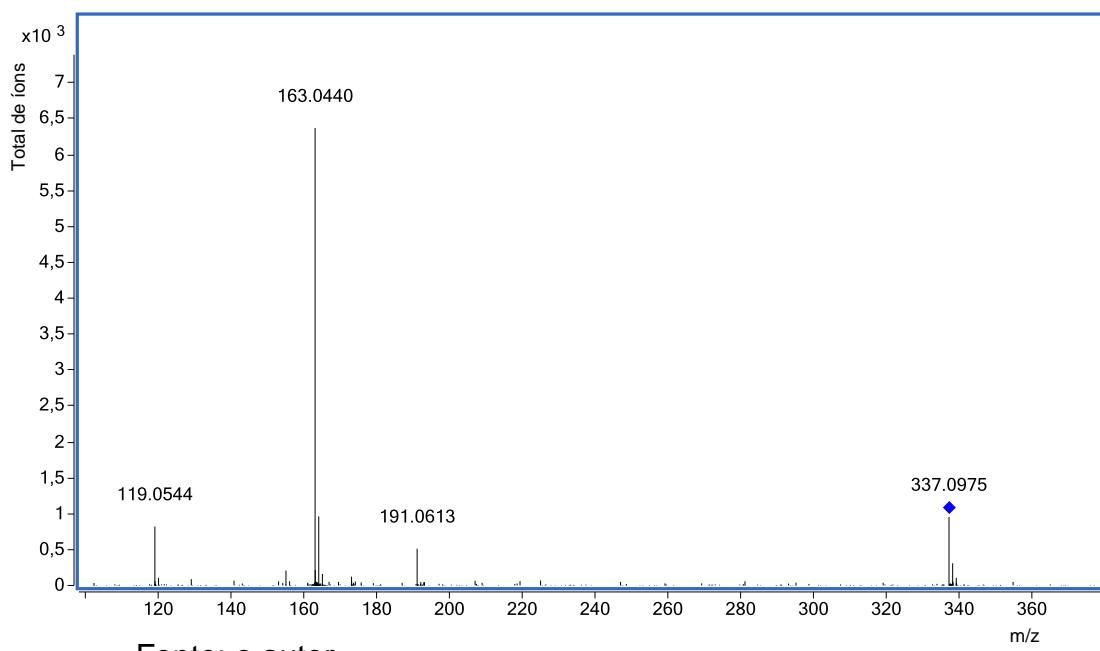
Fonte: o autor.

**Figura 32** – Proposta de fragmentação para o ácido 3-O-cafeoilquínico.



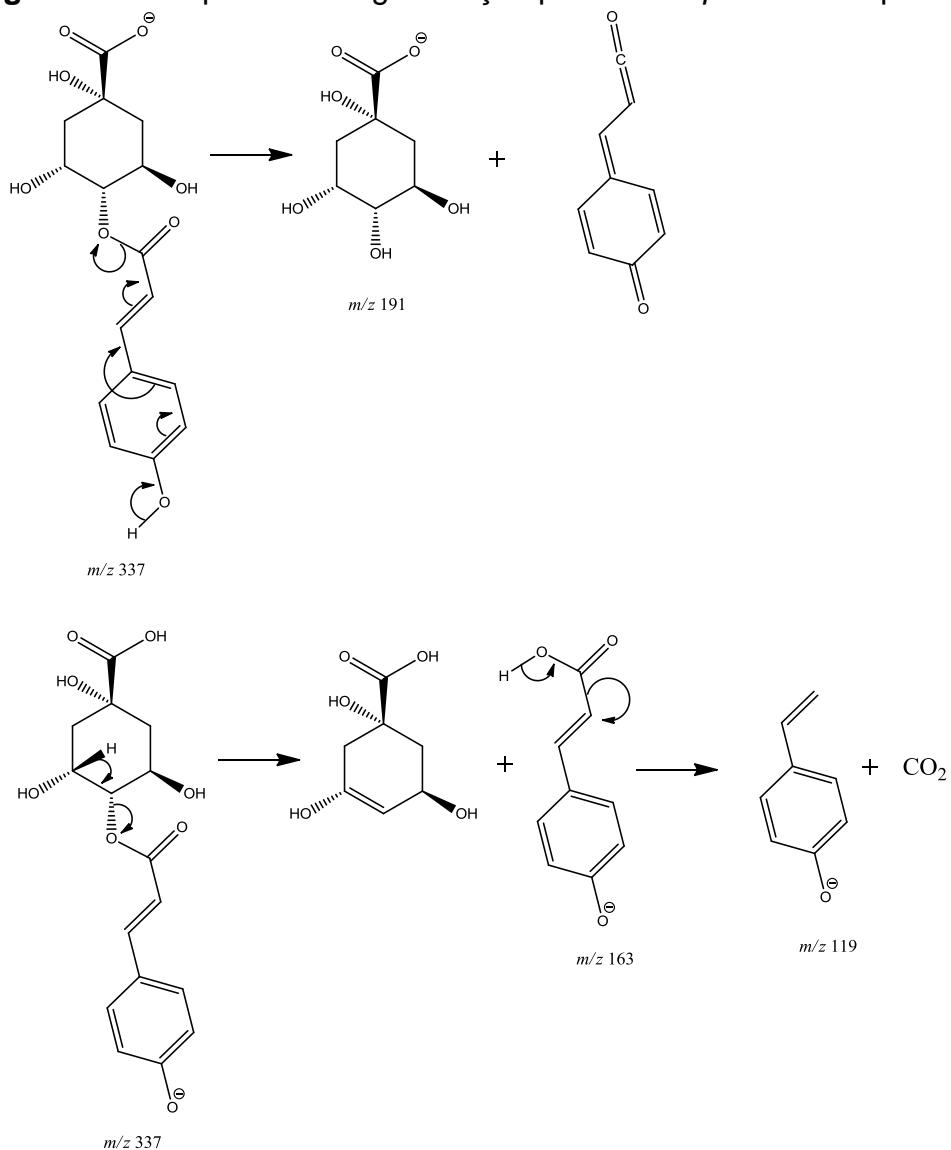
Fonte: o autor.

**Figura 33** – Espectro de EM/EM do 4-O-*p*-coumaroilquínico.



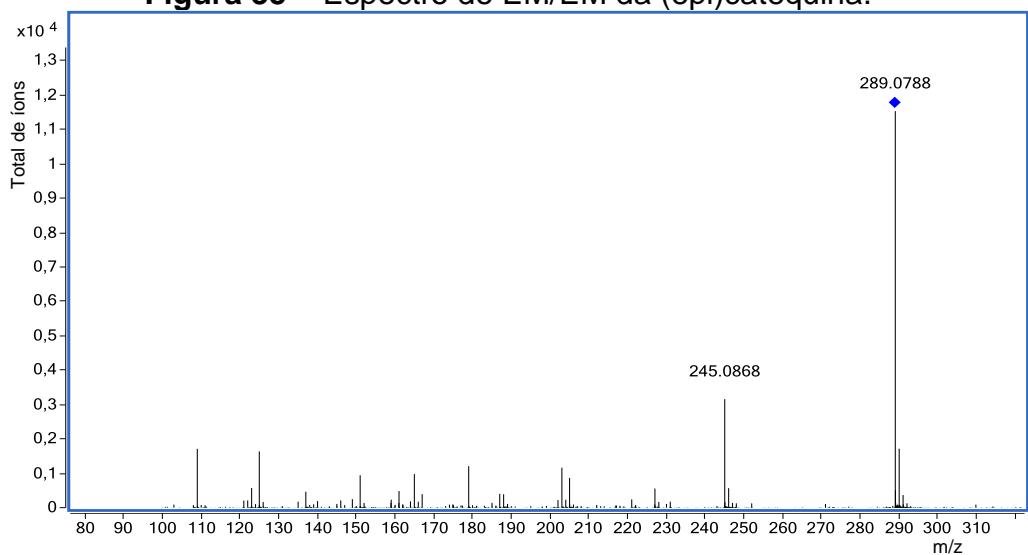
Fonte: o autor.

**Figura 34 – Proposta de fragmentação para o 4-O-*p*-coumaroilquínico.**



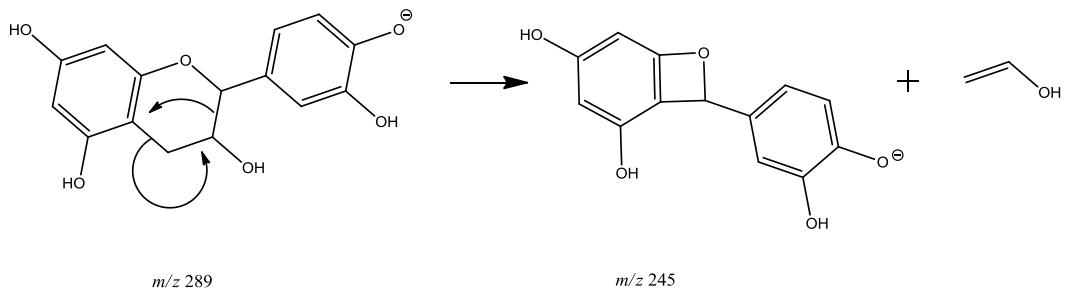
Fonte: o autor.

**Figura 35 – Espectro de EM/EM da (epi)catequina.**



Fonte: o autor.

**Figura 36 – Proposta de fragmentação para a (epi)catequina.**

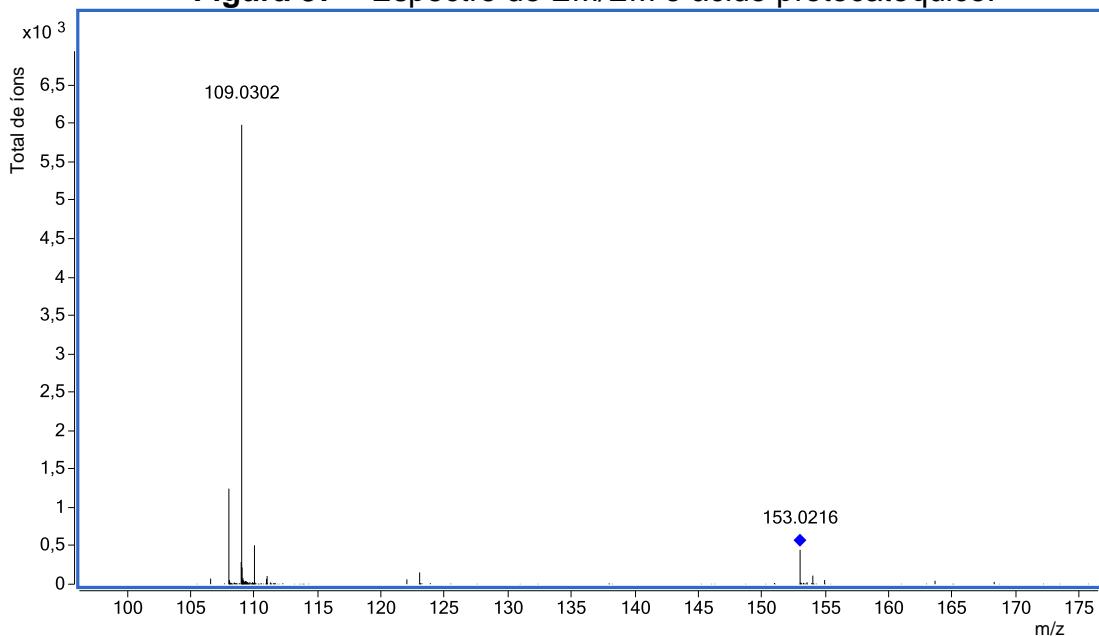


Fonte: o autor.

Encontrou-se na composição desta fração dois isômeros, o ácido 3-O-cafeoilquínico e o ácido 5-O-cafeoilquínico, tal distinção só foi possível por causa da diferença nos EM/EM entre os dois compostos.

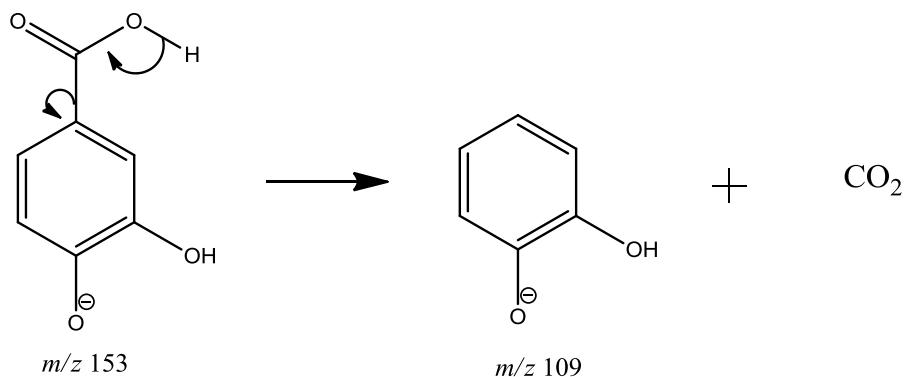
Analizando os dados da Tabela 25 da fração de acetato de etila do extrato do caule, foram encontrados ácidos orgânicos (ácido quínico; ácido protocatequico; ácido 3-O-cafeoilquínico; ácido 4-O-*p*-coumaroilquínico e ácido 5-O-cafeoilquínico), favan-3-ol ((epi)catequina), taninos condensados (dímero (epi)catequina-(epi)catequina), flavonóis (isoqueracetina, 3-O-(4"-O-*p*-coumaroil)-glicosideo-kaempferol). Também foram realizados os espectros de EM/EM e pospostos os mecanismos de fragmentação para os compostos identificados, os quais estão apresentados nas Figuras 37 a 44.

**Figura 37 – Espectro de EM/EM o ácido protocatequico.**



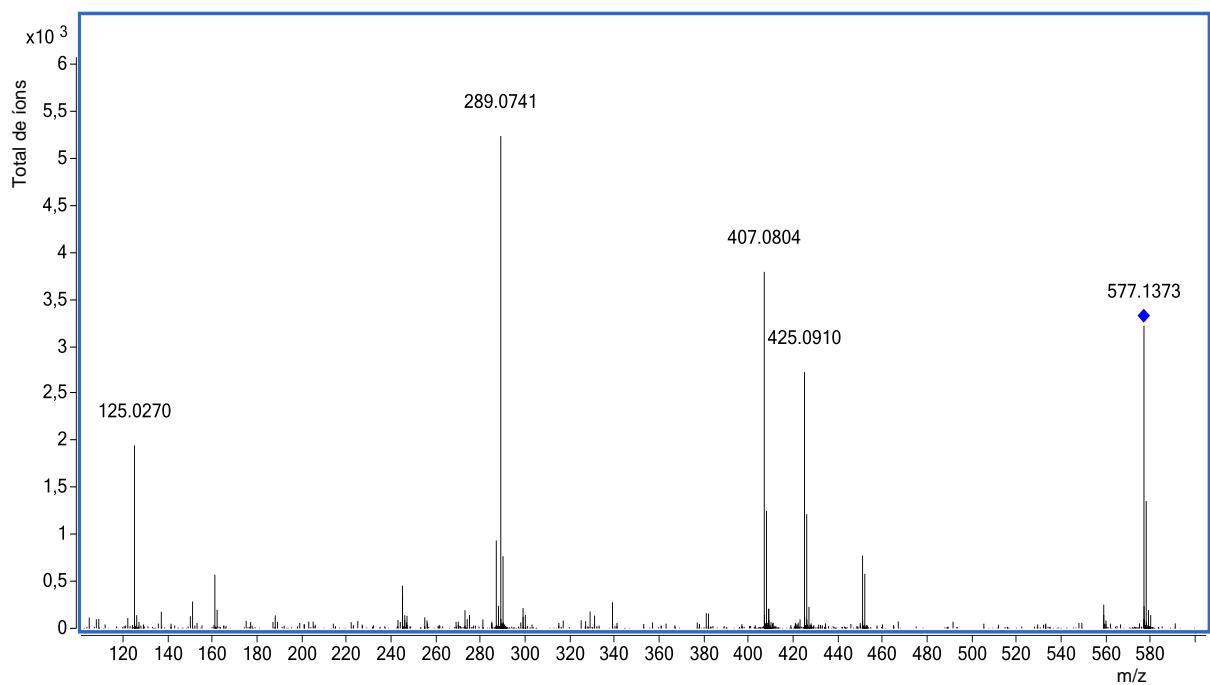
Fonte: o autor.

**Figura 38** – Proposta de fragmentação para o ácido protocatequico.



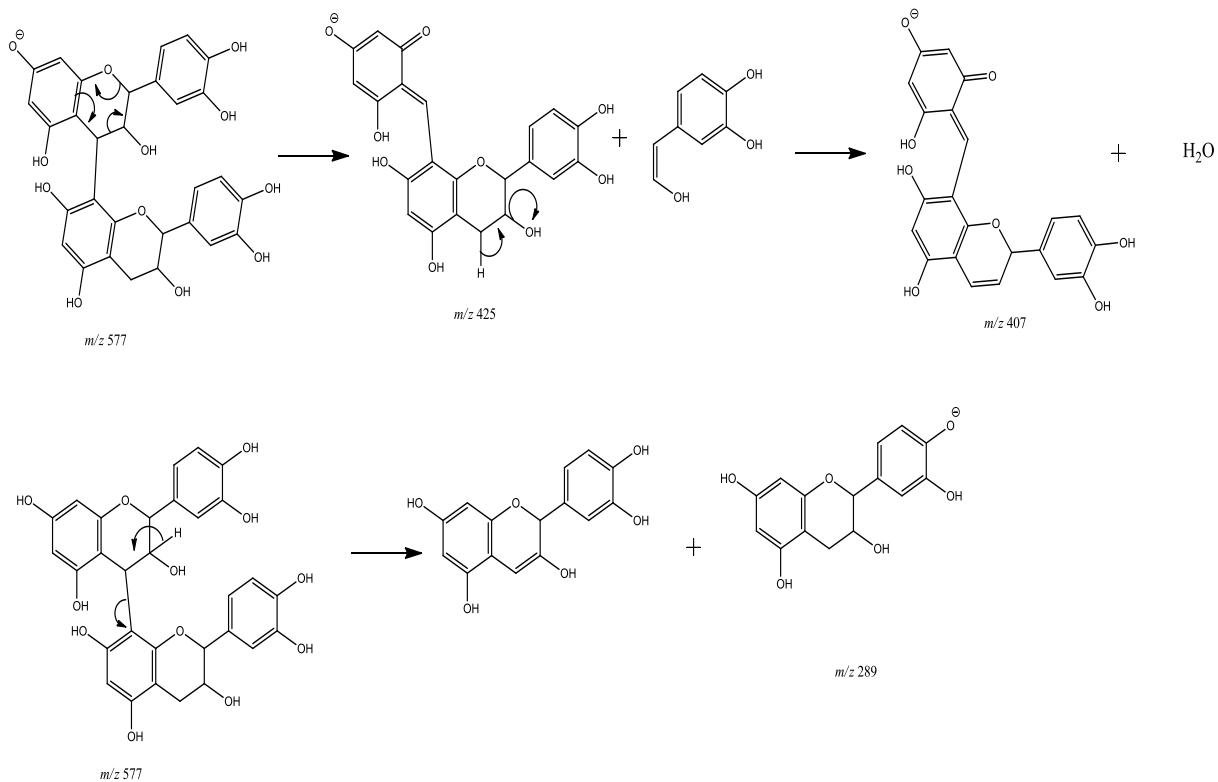
Fonte: o autor.

**Figura 39** – Espectro de EM/EM do dímero (epi)catequina-(epi)catequina.



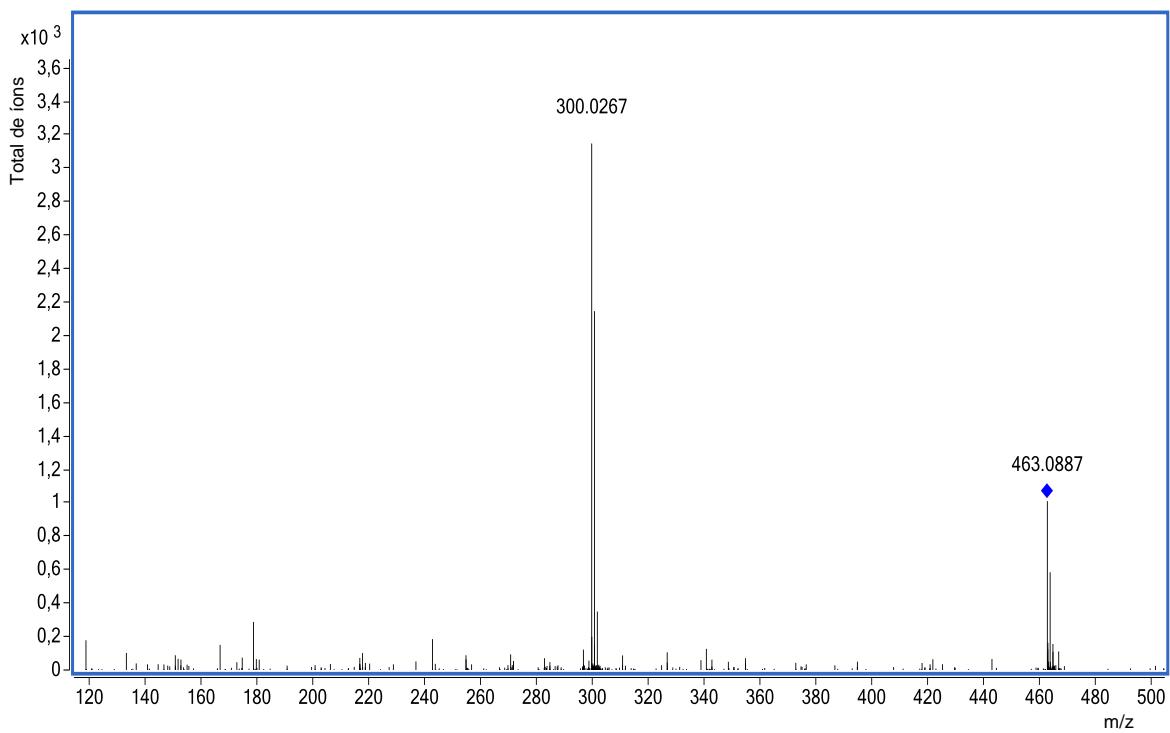
Fonte: o autor.

**Figura 40** – Proposta de fragmentação para o dímero (epi)catequina-(epi)catequina.



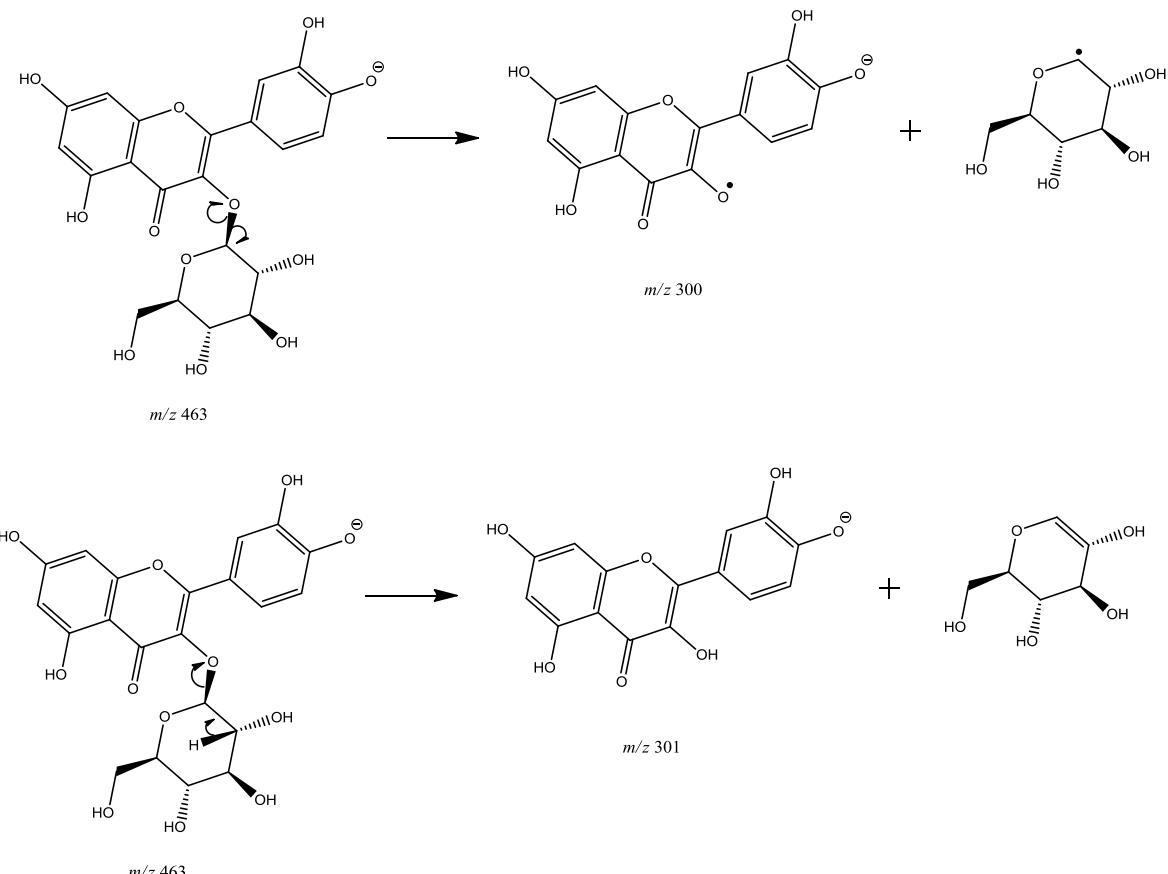
Fonte: o autor.

**Figura 41** – Espectro de EM/EM da isoquerctina.



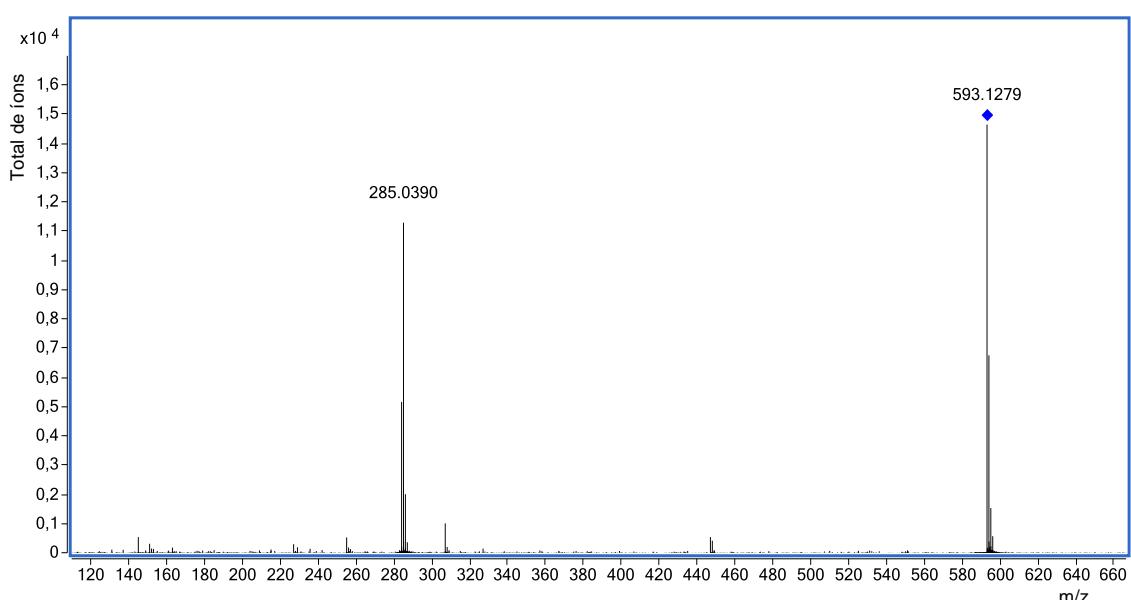
Fonte: o autor.

**Figura 42 – Proposta de fragmentação para isoquerctina.**



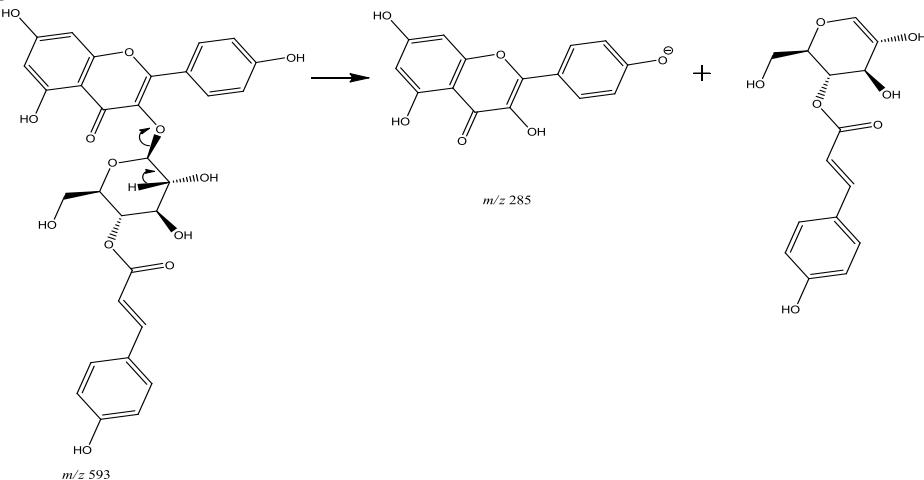
Fonte: o autor.

**Figura 43 – Espectro de EM/EM do 3-O-(4"-O-p-coumaroil)-glicosideo-kaempferol.**



Fonte: o autor.

**Figura 44** – Proposta de fragmentação para o 3-O-(4"-O-p-coumaroil)-glicosideo-kaempferol.

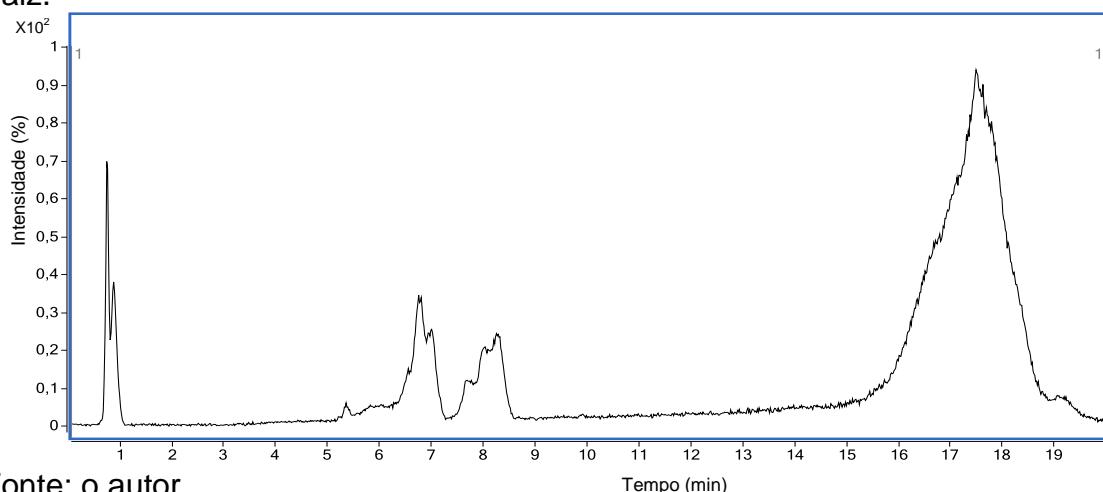


Fonte: o autor.

Os resultados encontrados na composição das frações *n*-butanol e acetato de etila confirmam a presença de substâncias fenólicas, como o previsto nas análises de prospecção fitoquímica e teor de fenóis totais, além da presença de poucos taninos condensados, que foram encontrados apenas na fração acetato de etila. Mas de modo geral as substâncias encontradas possuem caráter antioxidante, o que justifica estas frações apresentarem atividade antioxidante.

Também foram realizadas as análises de CLAE/EM para as frações acetato de etila e *n*-butanol do extrato da raiz da *B. oxycyclada*. Seus cromatogramas são apresentados nas Figuras 45 e 46, e a proposta de composição para as frações estão apresentadas nas Tabelas 26 e 27.

**Figura 45** – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração *n*-butanol do extrato da raiz.

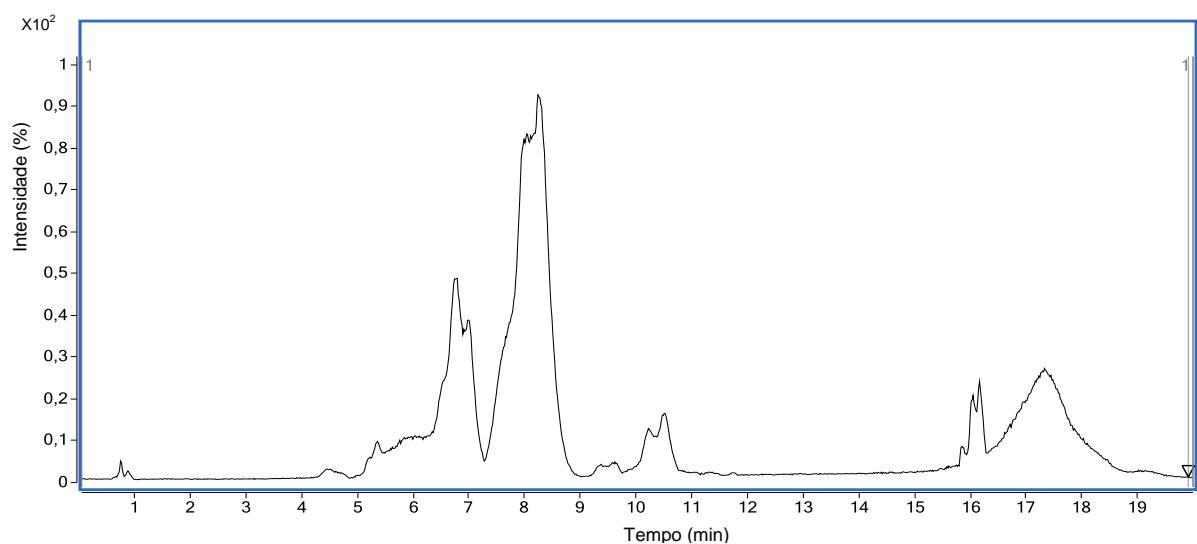


Fonte: o autor.

**Tabela 26** – Proposta de composição para a fração *n*-butanol do extrato da raiz.

TR (min)	[M – H] <sup>–</sup>	Fragmentos ( <i>m/z</i> )	Δ <sub>m</sub> (ppm)	Compostos	Referências
0,76	341,1009	179		NI	
5,44	577,1352	425; 407; 289	0,17	dímero (epi)catequina- (epi)catequina (22)	1
7,06	577,1350	425; 407; 289	0,17	dímero (epi)catequina- (epi)catequina (22)	1
7,72	865,1979	713; 695; 577; 425; 407; 289	0,69	trimero (epi)catequina- (epi)catequina- (epi)catequina (25)	1
8,06	289,0722	245	1,4	(epi)catequina (19 e 20)	1; 2

1 – (SAID et al., 2017); 2 – (BYSTROM et al., 2008).

NI – não identificado; Δ<sub>m</sub> (ppm) – erro da massa experimental referente a teórica.**Figura 46** – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração acetato de etila do extrato da raiz.

Fonte: o autor.

**Tabela 27** – Proposta de composição para a fração acetato de etila do extrato da raiz.

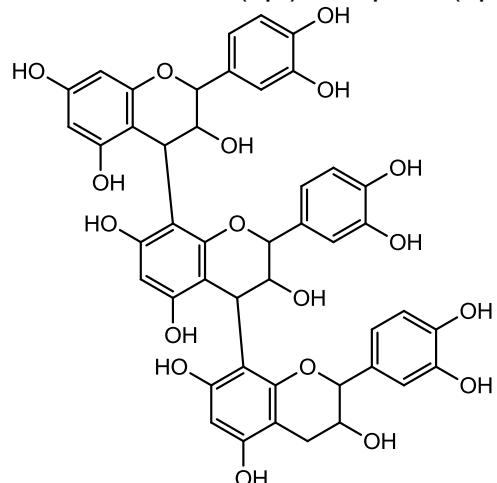
TR (min)	[M – H] <sup>–</sup>	Fragmentos (m/z)	$\Delta_m$ (ppm)	Compostos	Referências
0,76	341,1009	179		NI	
4,49	153,0191	109	1,3	ácido protocatequico (21) dímero	1
5,44	577,1342	425; 407; 289	1,55	(epi)catequina- (epi)catequina (22) dímero	2
7,06	577,1350	425; 407; 289	0,17	(epi)catequina- (epi)catequina (22) trímero	2
7,72	865,1984	713; 695; 577; 425; 407; 289	0,11	(epi)catequina- (epi)catequina- (epi)catequina (25)	2
8,06	289,0725	245	2,4	(epi)catequina (19 e 20)	2; 3
9,54	727,1640	559; 407; 289		NI	
10,50	577,1343	425; 407; 289		dímero (epi)catequina- (epi)catequina (22)	2
16,01	329,2340	229; 211; 171; 139		NI	

1 – (CHEN et al., 2012); 2 – (SAID et al., 2017); 3 – (BYSTROM et al., 2008).

NI – não identificado;  $\Delta_m$  (ppm) – erro da massa experimental referente a teórica.

A estrutura do trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina presente na composição das frações *n*-butanol e acetato de etila está representada na Figura 47.

**Figura 47** – Estrutura do trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina.



trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina (25)

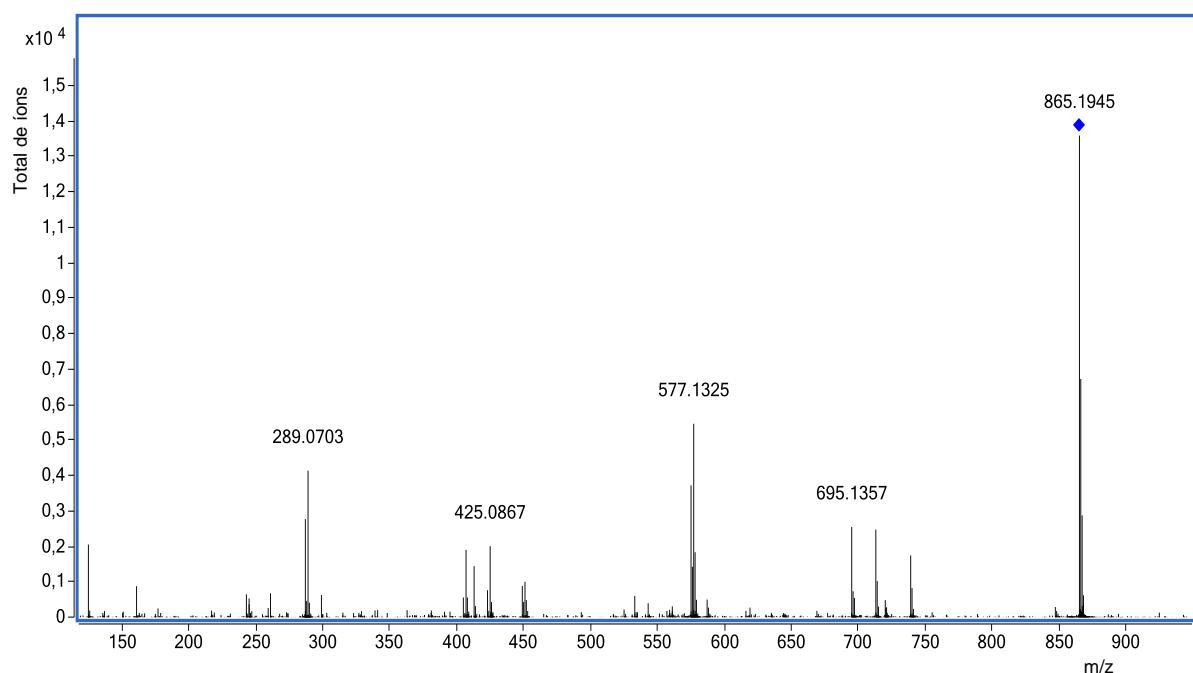
Fonte: o autor.

Analizando os dados da Tabela 26, observa-se que na composição da fração *n*-butanol do extrato da raiz prevaleceu a presença de taninos condensados (dímero (epi)catequina-(epi)catequina e o trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina) e favan-3-ol ((epi)catequina). Na Tabela 27 observa-se que a fração acetato de etila da raiz também apresentou a mesma composição da fração *n*-butano da raiz, apenas incluindo a presença do ácido protocatequico.

A composição das frações *n*-butano e acetato de etila do extrato da raiz justifica o alto teor de taninos condensados encontrados nas análises. Além de permitir propor que a atividade antioxidante está diretamente correlacionada com a presença dos taninos condensados nestas duas frações.

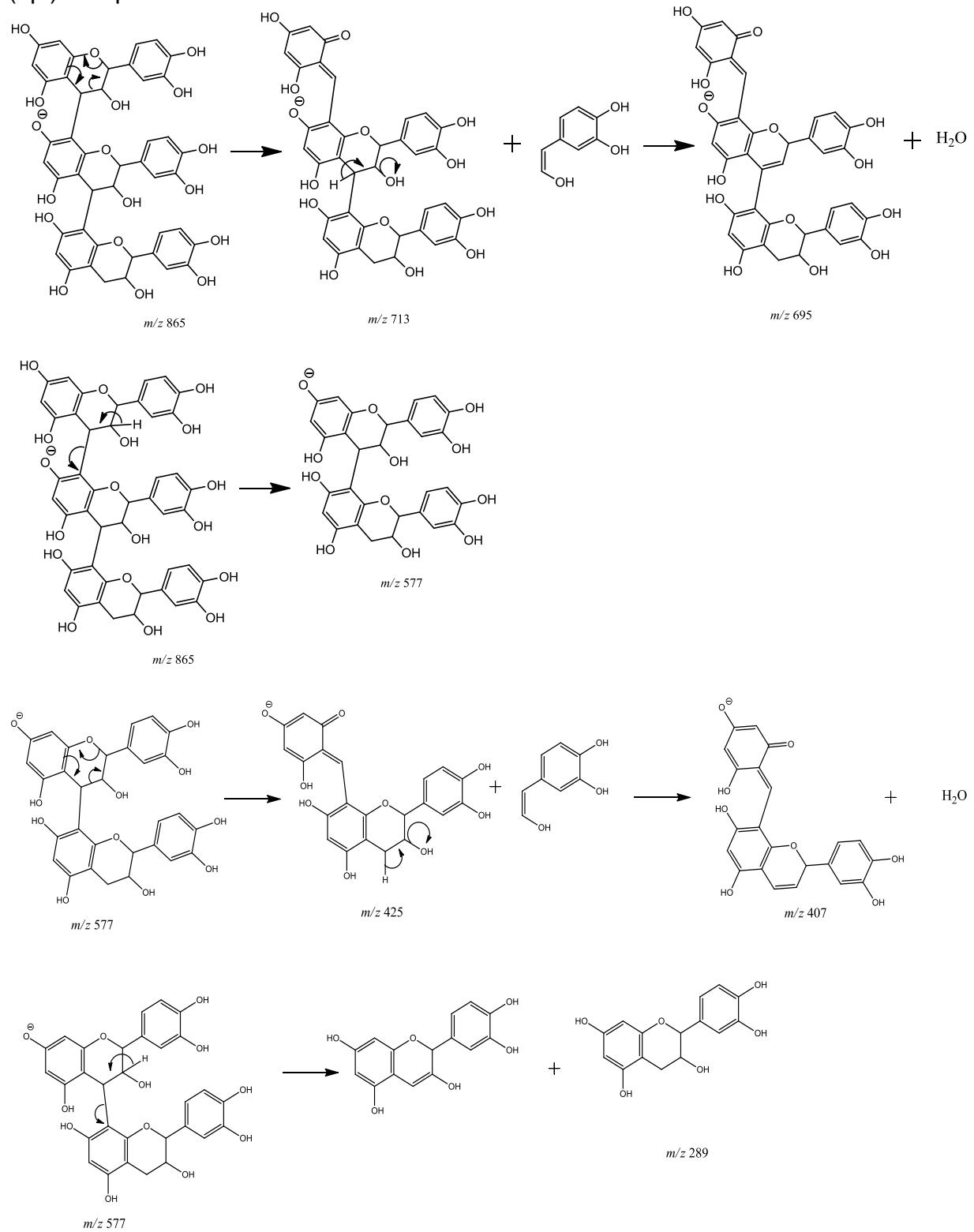
Entre os taninos condensados encontrados tem se o trímero de unidades de (epi)catequina, este foi submetido a análise de EM/EM e foi proposto a fragmentação para estrutura (Figuras 48 e 49).

**Figura 48** – Espectro de EM/EM do trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina.



Fonte: o autor.

**Figura 49** – Proposta de fragmentação para o trímero (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina.

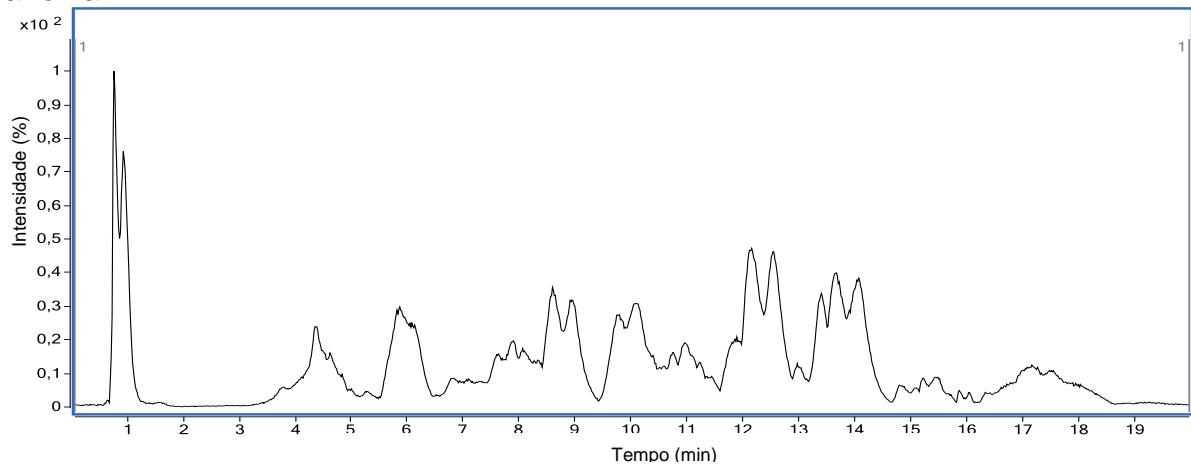


Fonte: o autor.

Também foram realizados as análises de CLAE/EM para as frações *n*-butanol e acetato de etila do extrato das folhas, seus cromatogramas estão apresentados

nas Figuras 50 e 51, e suas respectivas propostas de composição nas Tabelas 28 e 29.

**Figura 50** – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração *n*-butanol do extrato da folha.



Fonte: o autor

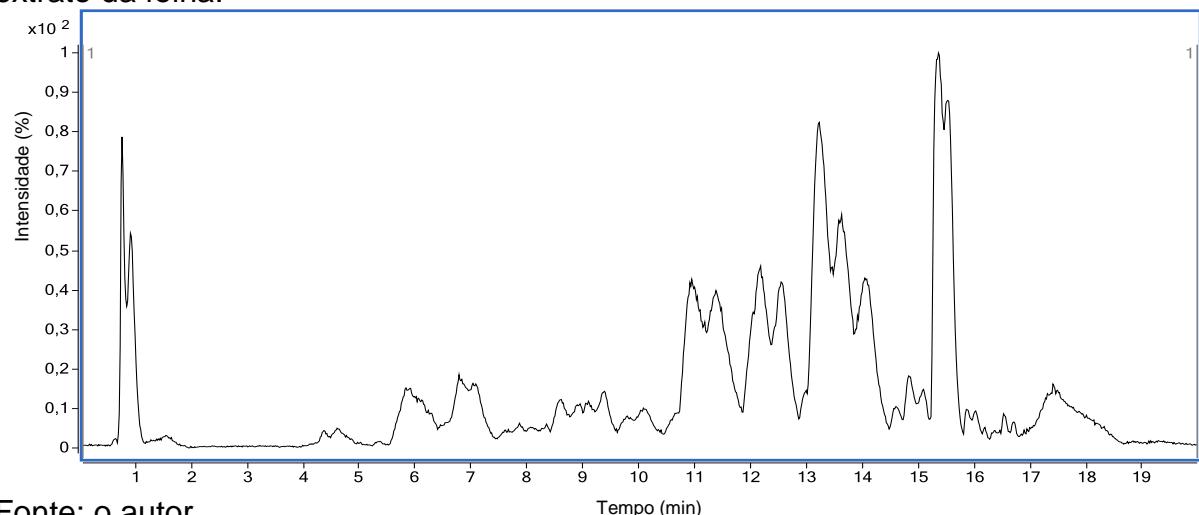
**Tabela 28** – Proposta de composição para a fração *n*-butanol do extrato da folha.

TR (min)	[M – H] <sup>-</sup>	Fragmentos ( <i>m/z</i> )	$\Delta_m$ (ppm)	Compostos	Referências
0,85	191,0560	173; 127	0,52	ácido quínico (15)	1; 2
4,40	467,2149	421; 179		NI	
4,65	315,0721	153; 152; 109; 108	0,31	ácido hexosideo protocatequico (26)	3
5,85	285,0616	152; 108		NI	
6,77	353,0874	191	1,13	ácido 5-O- cafeoilquínico (19)	2
7,85	447,1501	401; 269	1,56	hexose-pentose- benzenometanol (aduto formiato) (27)	4
8,06	431,1915	385; 179	1,85	roseosideo (aduto fomiato) (28)	4
8,60	371,0976	249; 121		NI	
10,08	439,1809	393; 261; 149		NI	
10,74	403,1957	223		NI	
10,88	595,1285	359; 300		NI	
				7-O-xylosideo-3-O- rutinosideo-queracetina (29)	5
10,93	741,1857	300	3,64		
11,84	725,1910	519; 284		NI	
12,54	609,1443	300	2,95	rutina (30)	1; 6; 7
13,37	593,1496	285	2,69	3-O-rutinosideo- kaempferol (31)	4
14,04	623,1599	315		NI	
14,86	567,1697	521; 413; 293		NI	

1 - (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004); 2 – (MASIKE et al., 2017); 3 – (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012); 4 – (SPÍNOLA et al., 2014); 5 – (SIMIRGIOTIS et al., 2015); 6 – (BYSTROM et al., 2008); 7 – (SAID et al., 2017).

NI – não identificado;  $\Delta_m$  (ppm) – erro da massa experimental referente a teórica.

**Figura 51** – Cromatograma da análise por CLAE/EM da fração acetato de etila do extrato da folha.



Fonte: o autor.

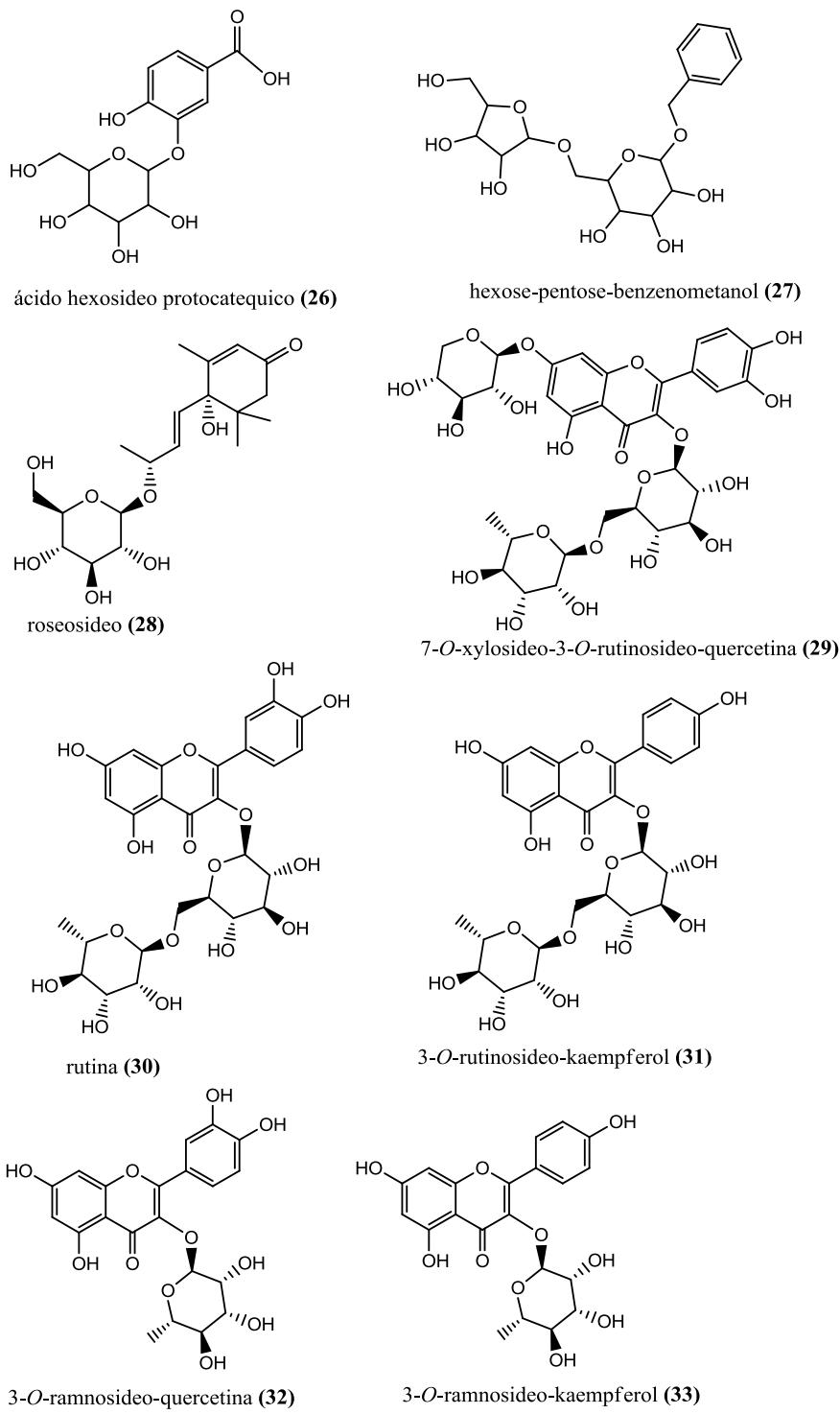
**Tabela 29** – Proposta de composição para a fração acetato de etila do extrato da folha.

TR (min)	[M – H] <sup>-</sup>	Fragmentos (m/z)	Δ <sub>m</sub> (ppm)	Compostos	Referências
0,85	191,0559	173; 127	1,04	ácido quínico (15) ácido protocatequico (21)	1; 2
4,49	153,0200	109			3
4,65	315,0717	153; 152; 109; 108	1,58	ácido hexosideo protocatequico (26)	4
5,85	285,0613	153; 152; 108		NI	
6,77	353,0869	191	2,54	ácido 5-O- cafeoilquínico (18)	2
7,85	447,1504	401; 269	0,89	hexose-pentose- benzenometanol (aduto formiato) (27)	5
8,60	371,0957	249; 121		NI	
9,27	451,1034	341		NI	
10,08	439,1805	393; 261; 149		NI	
11,30	137,0245			NI	
12,01	463,0875	300; 301	1,51	isoqueracetina (23)	4
12,54	609,1449	300	1,96	rutina (30)	1; 6; 7
13,21	447,0927	301	1,34	3-O-ramnosideo- queracetina (32)	6
14,04	623,1600	315; 151		NI	
14,57	431,0973	285	2,55	3-O-ramnosideo- kaempferol (33)	8
14,86	567,1704	521; 413; 293		NI	
15,50	593,1287	285	2,36	3-O-(coumaroil- glicosideo)- kaempferol(24)	9

1 - (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004); 2 – (MASIKE et al., 2017); 3 – (CHEN et al., 2012); 4 – (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012); 5 – (SPÍNOLA et al., 2014); 6 – (BYSTROM et al., 2008); 7 – (SAID et al., 2017); 8 – (ZHAO et al., 2014); 9 – (KAJDZANOSKA; GJAMOVSKI; STEFOVA, 2010).  
NI – não identificado; Δ<sub>m</sub> (ppm) – erro da massa experimental referente a teórica.

Algumas das estruturas identificadas nas frações *n*-butanol e acetato de etila do extrato da folha estão apresentadas na Figura 52.

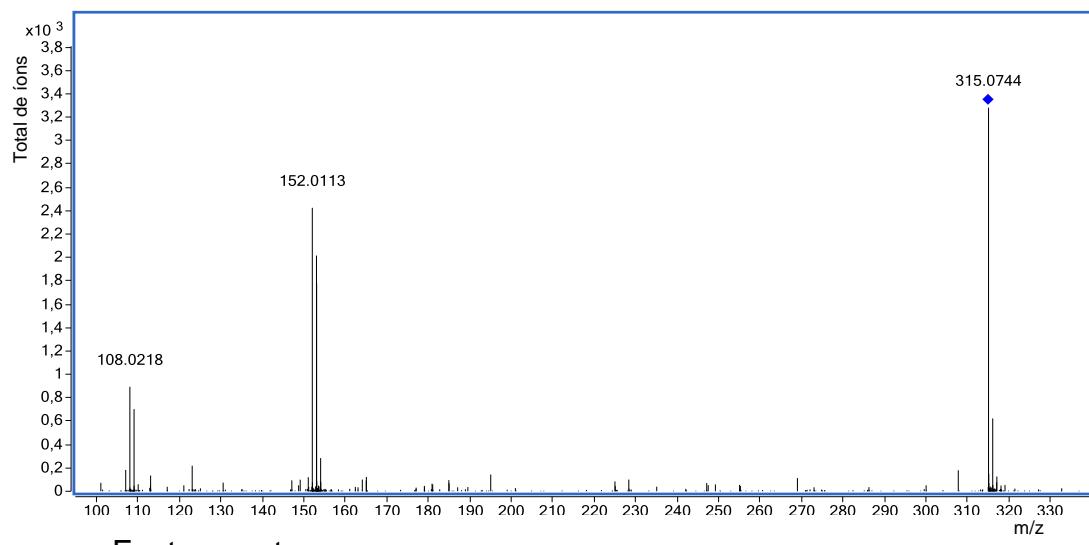
**Figura 52** – Estrutura de compostos presentes nas frações acetato de etila e *n*-butanol do extrato da folha.



Fonte: o autor.

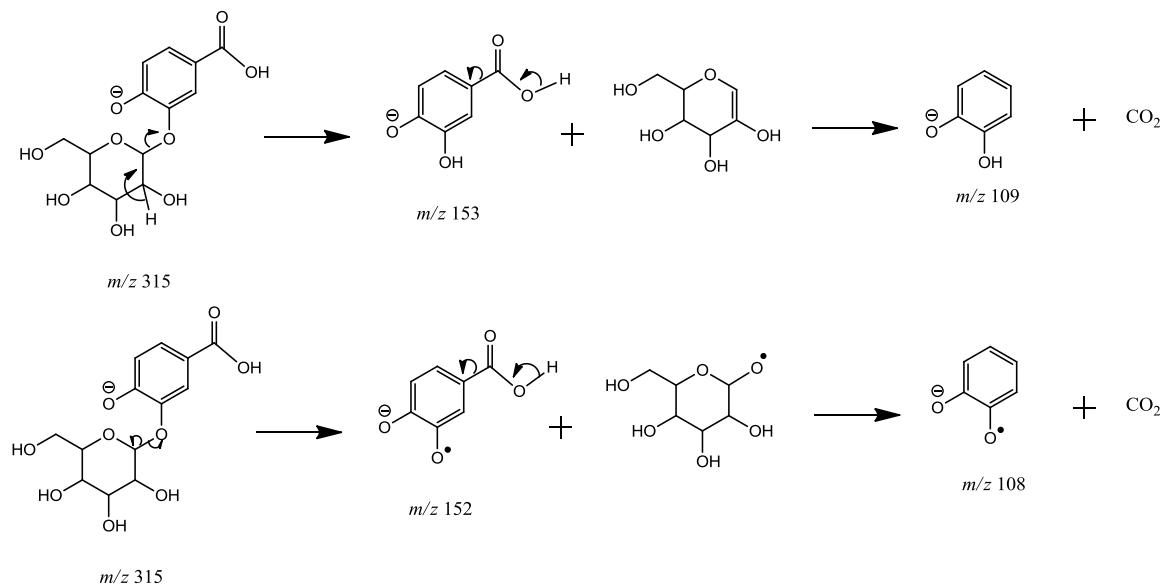
Analisando a Tabela 28 da fração *n*-butanol do extrato da folha, foram encontrados ácidos orgânicos (ácido quínico, ácido hexosideo protocatequico e ácido 5-O-cafeoilquínico) e flavonóis (7-O-xyloside-3-O-rutinoside-quercetina, rutina, 3-O-rutinoside-kaempferol). Foram realizados os espectros de EM/EM e pospostos os mecanismos de fragmentação para alguns dos compostos identificados, os quais estão apresentados nas Figuras 53 a 64.

**Figura 53** – Espectro de EM/EM do ácido hexosideo protocatequico.



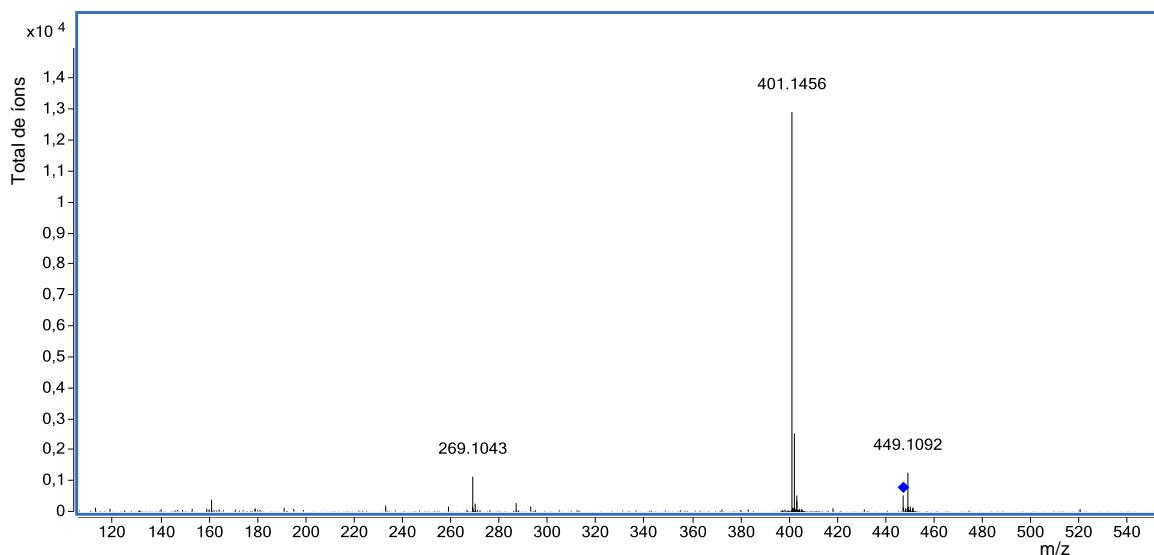
Fonte: o autor.

**Figura 54** – Proposta de fragmentação para o ácido hexosideo protocatequico.



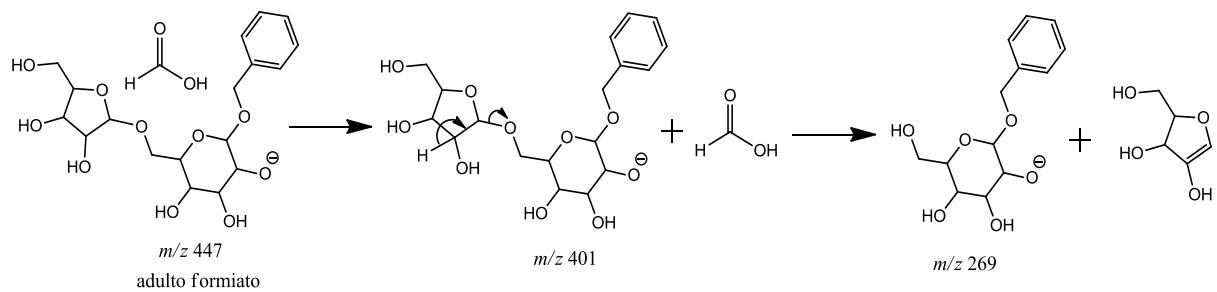
Fonte: o autor.

**Figura 55 – Espectro de EM/EM do hexose-pentose-benzenometanol**



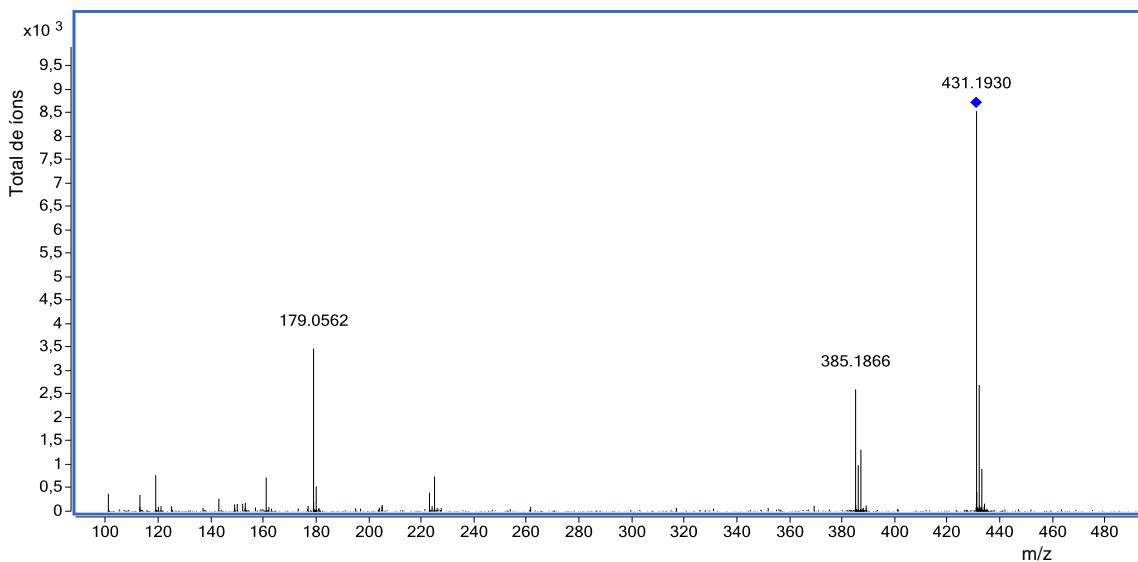
Fonte: o autor.

**Figura 56 – Proposta de fragmentação para a hexose-pentose-benzenometanol**



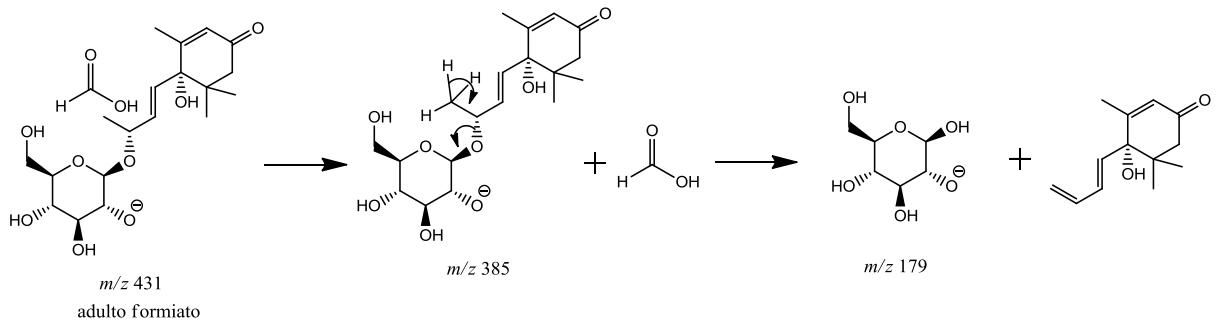
Fonte: o autor.

**Figura 57 – Espectro de EM/EM da roseosideo**



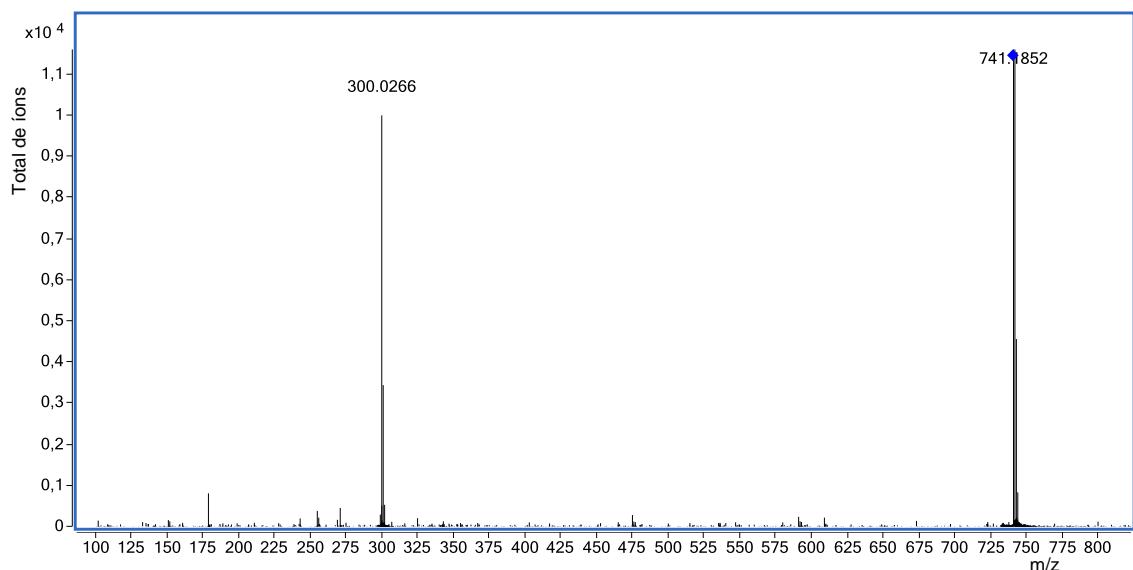
Fonte: o autor.

**Figura 58** – Proposta de fragmentação para a roseosideo.



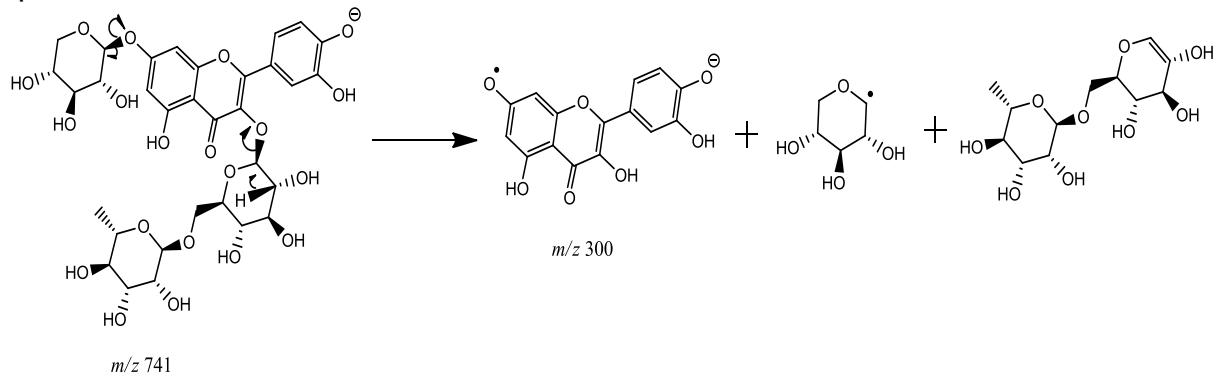
Fonte: o autor.

**Figura 59** – Espectro de EM/EM do 7-O-xylosideo-3-O-rutinosideo-quercetina.



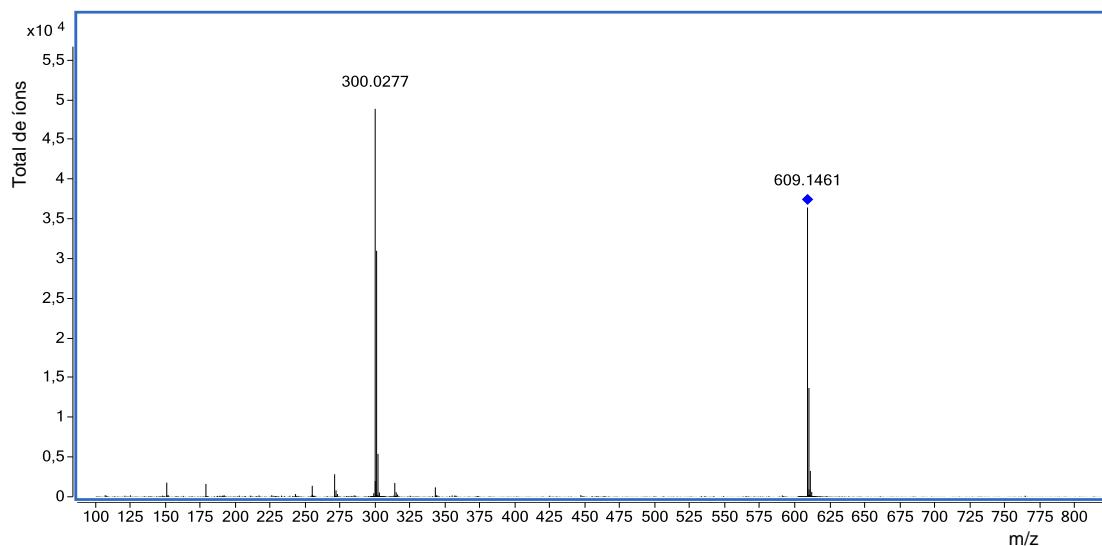
Fonte: o autor.

**Figura 60** – Proposta de fragmentação para o 7-O-xylosideo-3-O-rutinosideo-quercetina.



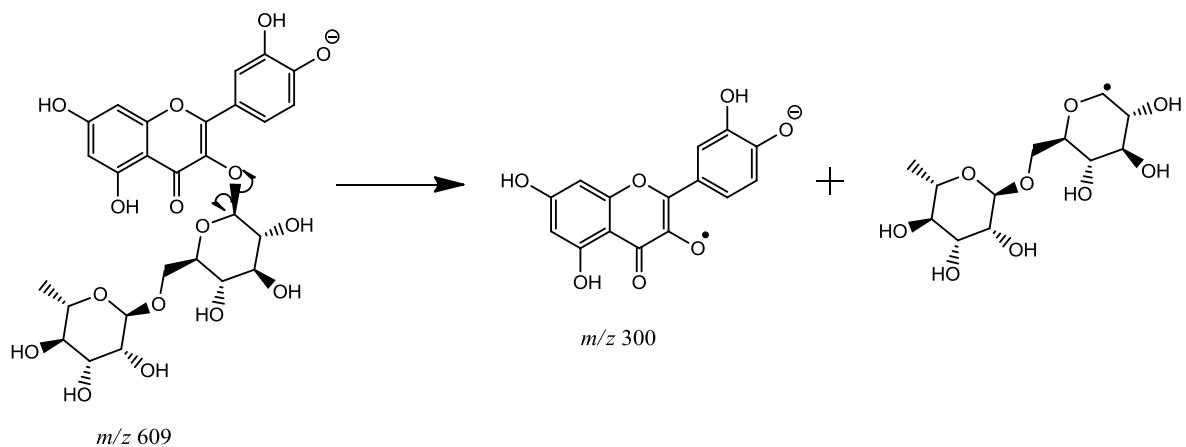
Fonte: o autor.

**Figura 61 – Espectro de EM/EM da rutina.**



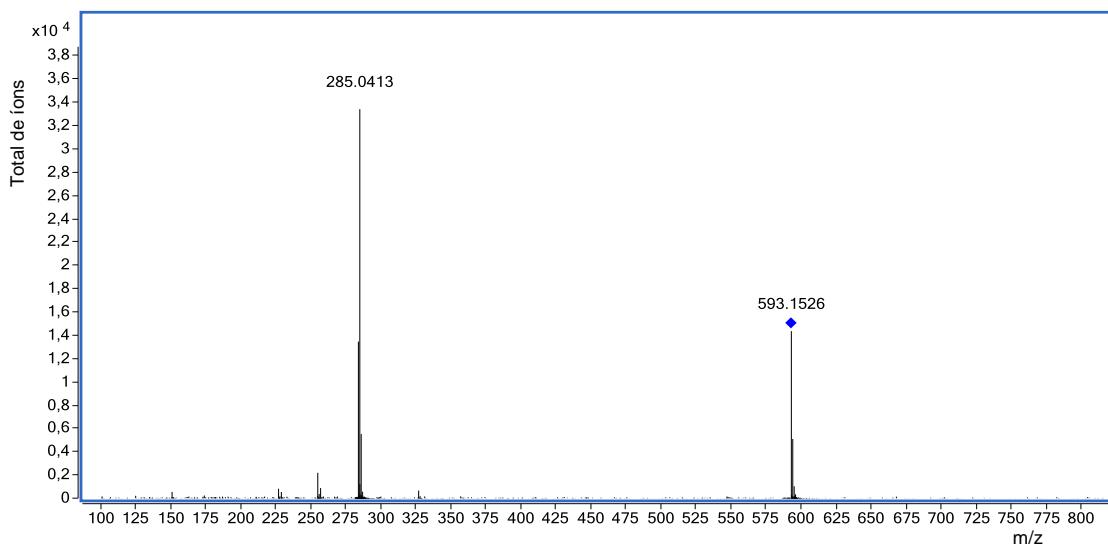
Fonte: o autor.

**Figura 62 – Proposta de fragmentação para a rutina.**



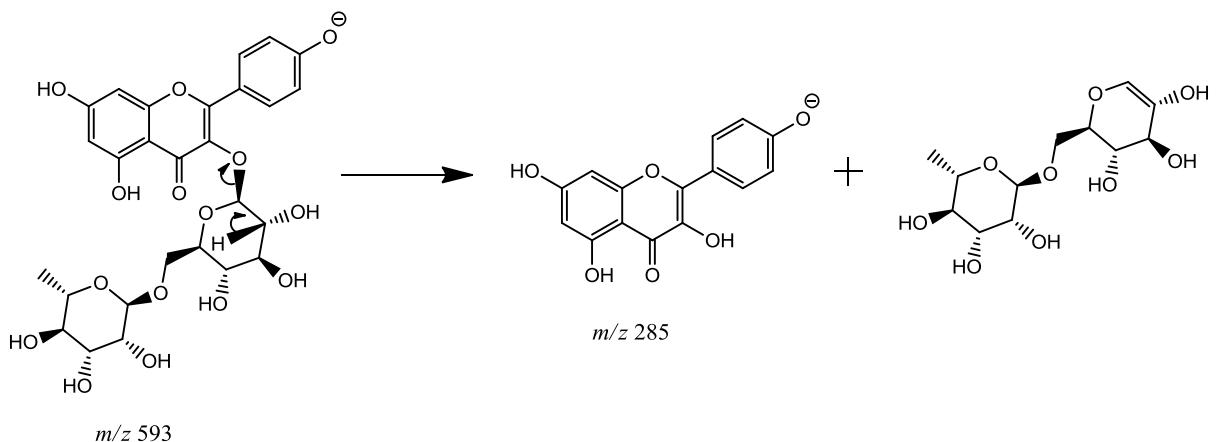
Fonte: o autor.

**Figura 63 – Espectro de EM/EM do 3-O-rutinosideo-kaempferol.**



Fonte: o autor.

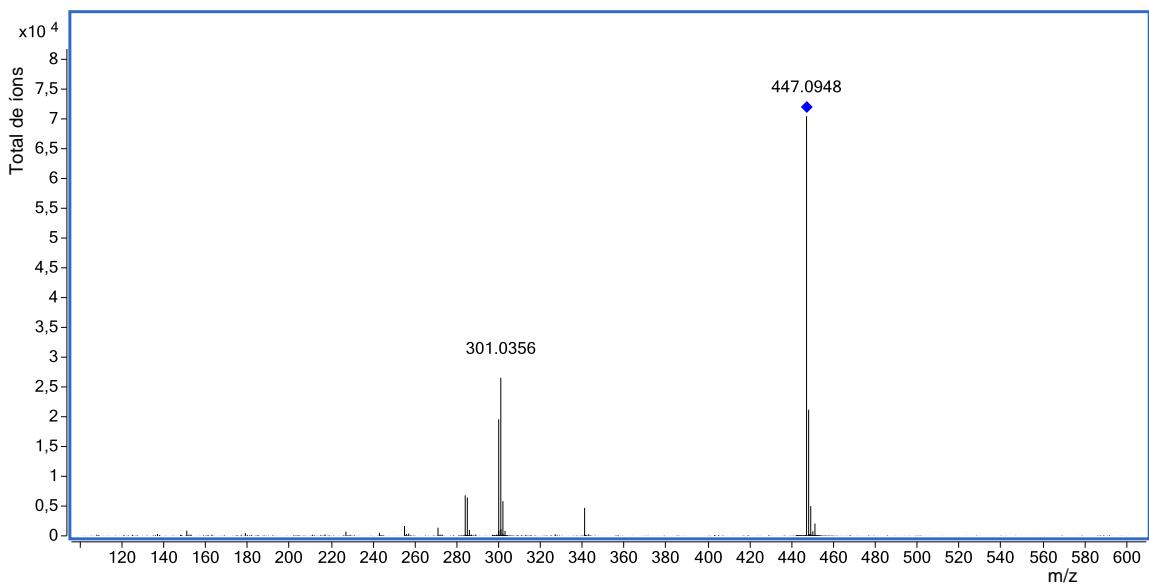
**Figura 64** – Proposta de fragmentação para o 3-O-rutinosideo-kaempferol.



Fonte: o autor.

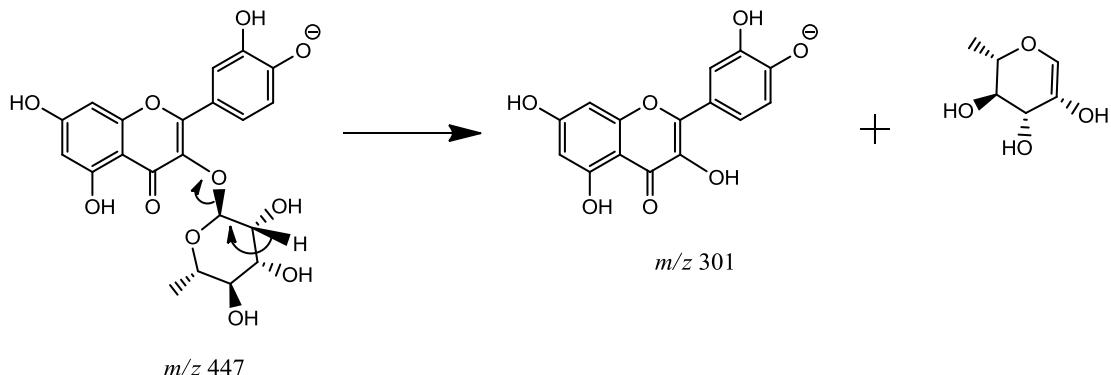
Analisando a Tabela 29 da fração acetato de etila do extrato da folha, foram encontrados na sua composição ácidos orgânicos (ácido quínicoo, ácido protocatequico, ácido hexosideo protocatequico e ácido 5-O-cafeoilquínicoo) e flavonóis (isoqueracetina, rutina, 3-O-ramnosideo-queracetina, 3-O-ramnosideo-kaempferol e 3-O-(4"-O-p-coumaroil)-glicosideo-kaempferol). Também foram realizados os espectros de EM/EM e posposto os mecanismos de fragmentação para alguns dos compostos identificados. Estes estão apresentados nas Figuras 65 a 68.

**Figura 65** – Espectro de EM/EM do 3-O-ramnosideo-queracetina.



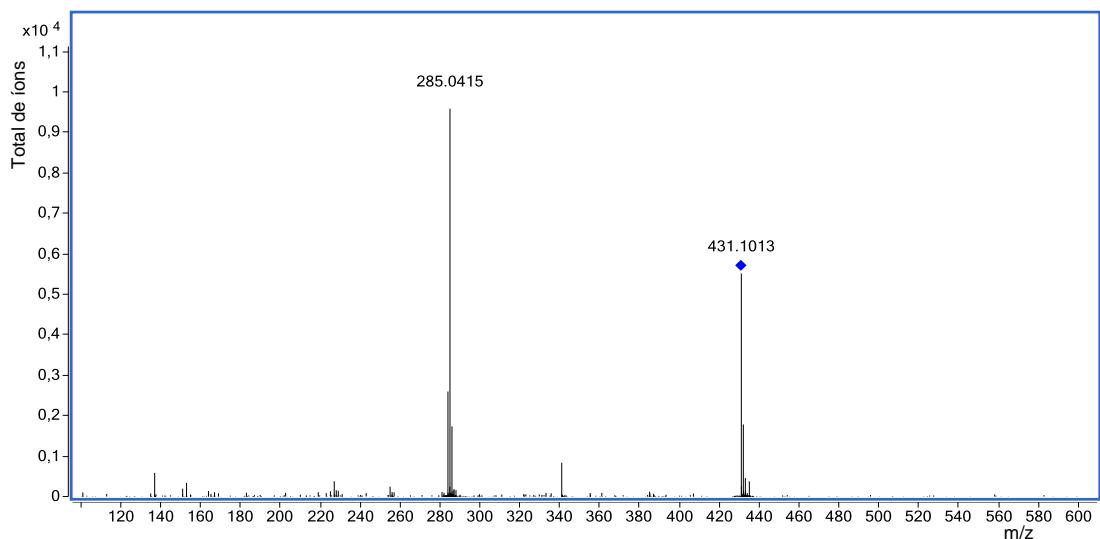
Fonte: o autor.

**Figura 66** – Proposta de fragmentação para o 3-O-ramnosideo-quercetina.



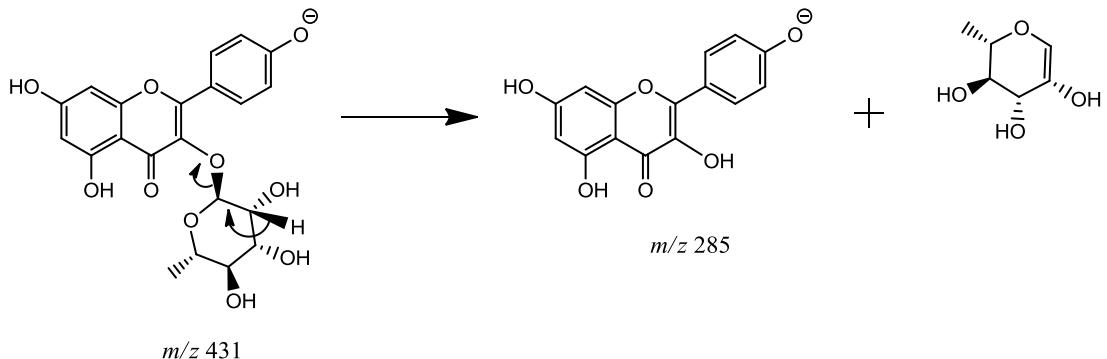
Fonte: o autor.

**Figura 67** – Espectro de EM/EM do 3-O-ramnosideo-kaempferol.



Fonte: o autor.

**Figura 68** – Proposta de fragmentação para o 3-O-ramnosideo-kaempferol.



Fonte: o autor.

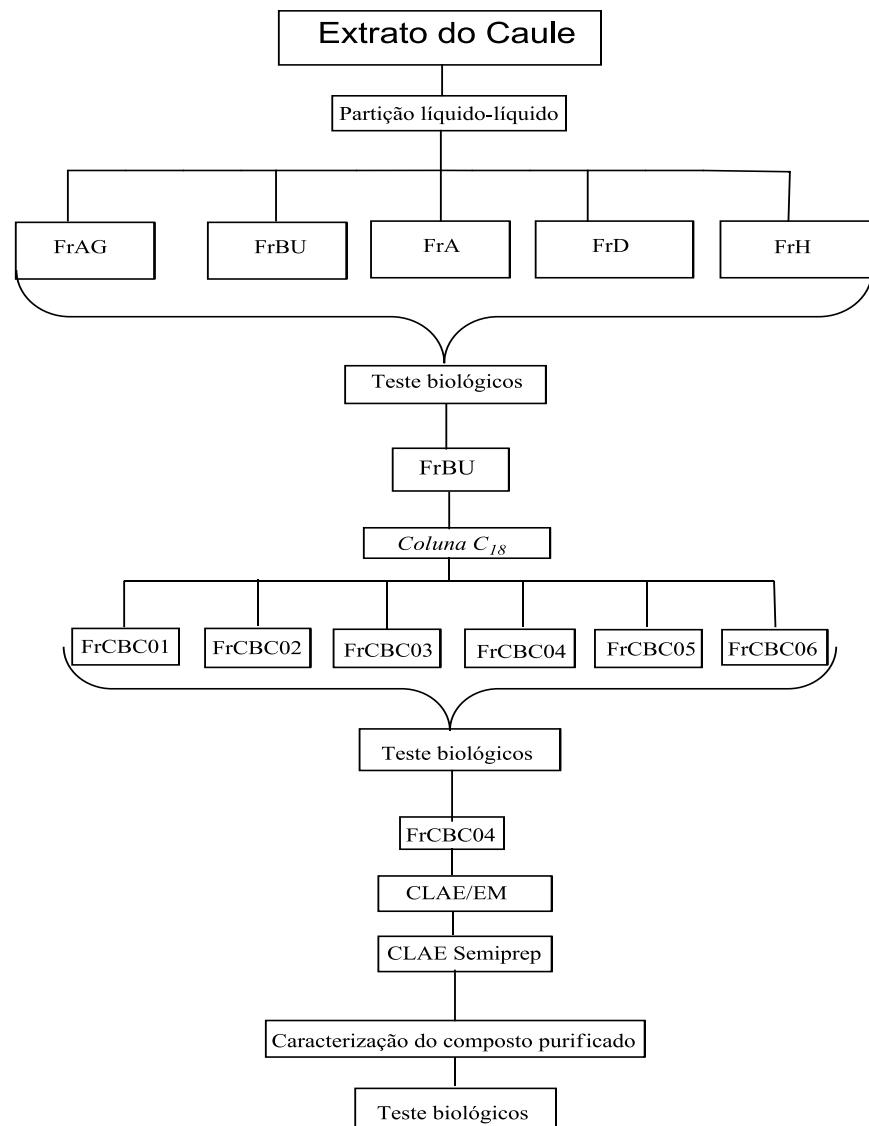
De modo geral as frações *n*-butanol e acetato de etila do extrato das folhas apresentam em sua composição, basicamente ácidos orgânicos e flavonóis, o que

justifica sua atividade antioxidante, visto que todos estes compostos possuem este caráter antioxidante.

### 5.12 Fracionamento

Após analisar todas as atividades pesquisadas foi selecionado a fração *n*-butanol do caule para o processo de fracionamento, devido a fração ter apresentado o melhor potencial antioxidante ( $CE_{50} = 1,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), maior atividade antifúngica ( $CIM = 23,43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), baixa citotoxicidade ( $CC_{50} = >512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e pelos índices de seletividade terem indicado que a fração é mais ativa do que citotóxica. A purificação do componente ativo seguiu fluxograma apresentado a seguir (Figura 69):

**Figura 69** - Fluxograma do fracionamento extrato caule.



Fonte: o autor.

A fração *n*-butanol do extrato do caule foi submetida a uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub>, na qual a amostra foi fracionada em 109 frações, que foram monitoradas em cromatografia em camada delgada e agrupadas em 6 frações (FrCBC – fração da coluna da fração *n*-butanol do caule) cuja as massas estão apresentadas na Tabela 30.

**Tabela 30** – Massas das frações obtidas da coluna com 1,02g de fração *n*-butanol do extrato do caule.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (% (m.m <sup>-1</sup> ))
FrCBC01	104,60	10,25
FrCBC02	83,52	8,19
FrCBC03	98,38	9,65
FrCBC04	140,67	13,79
FrCBC05	131,57	12,90
FrCBC06	19,69	1,93

Fonte: o autor.

As frações foram novamente submetidas às atividades antifúngica e antioxidante e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 31 para antifúngica e na Tabela 32 para o potencial antioxidantante.

**Tabela 31** – Atividade antifúngica das frações da coluna em C<sub>18</sub> da fração *n*-butanol do caule.

	FrCBC01	FrCBC02	FrCBC03	FrCBC04	FrCBC05	FrCBC06	Anfotericina B
μg.mL <sup>-1</sup>							
<i>C. albicans</i>	>3000 <sup>a</sup>	>3000 <sup>a</sup>	11,72 <sup>b</sup>	5,86 <sup>d</sup>	5,86 <sup>d</sup>	11,72 <sup>b</sup>	-
<i>C. tropicalis</i>	>3000 <sup>a</sup>	>3000 <sup>a</sup>	23,43 <sup>c</sup>	11,72 <sup>b</sup>	23,47 <sup>c</sup>	23,47 <sup>c</sup>	-
<i>C. glabrata</i>	>3000 <sup>a</sup>	>3000 <sup>a</sup>	5,86 <sup>d</sup>	2,93 <sup>e</sup>	2,93 <sup>e</sup>	5,86 <sup>d</sup>	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	1

Nota: As análises com a mesma letra não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido *p*<0,05 para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

**Tabela 32** – Potencial antioxidante das frações da coluna em C<sub>18</sub> da fração *n*-butanol do caule.

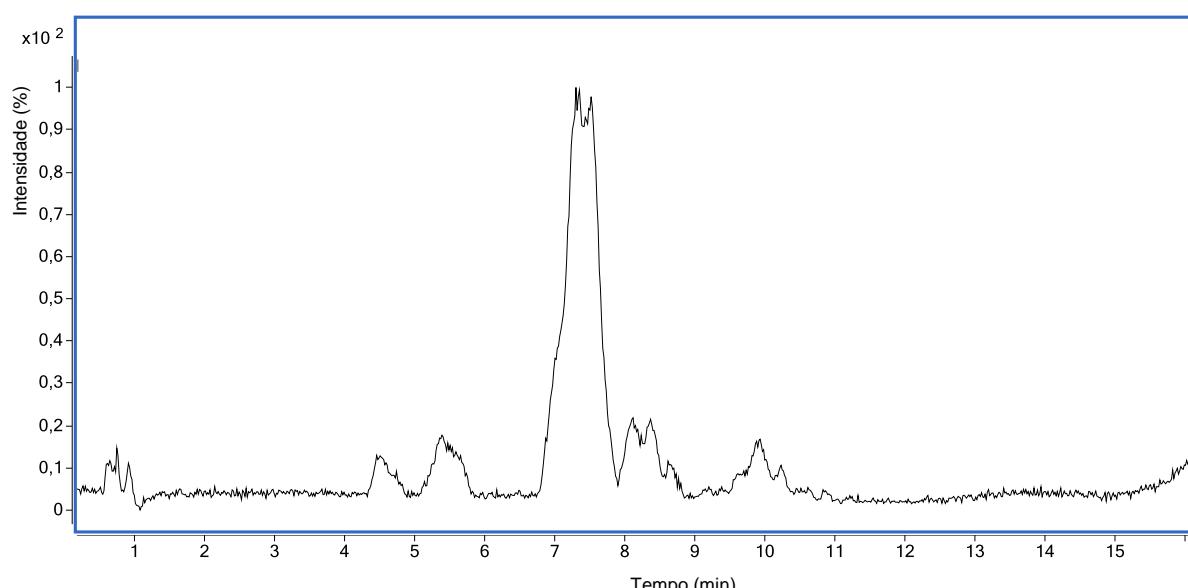
Fração	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
FrCBC01	-
FrCBC02	20,23±1,76
FrCBC03	3,25±0,05
FrCBC04	2,46±0,06
FrCBC05	3,59±0,10
FrCBC06	5,06±0,08
BHT*	7,3 ± 0,3

Nota: As análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes. \*Controle positivo (butilidroxitolueno)

Fonte: o autor.

Analizando os resultados da Tabela 31, verifica-se que houve uma melhora considerável da atividade antifúngica com o processo de fracionamento. Levando em consideração as três espécies de *Candida* a melhor atividade encontrada foi para a fração FrCBC04. Esta também apresentou melhor atividade antioxidante (Tabela 32), sendo selecionada para continuação do processo de purificação. Esta fração foi submetida primeiramente a uma análise por CLAE/EM, sendo o cromatograma apresentado na Figura 70, e a proposta de composição da fração na Tabela 33.

**Figura 70** – Cromatograma CLAE/EM da fração FrCBC04.



Fonte: o autor.

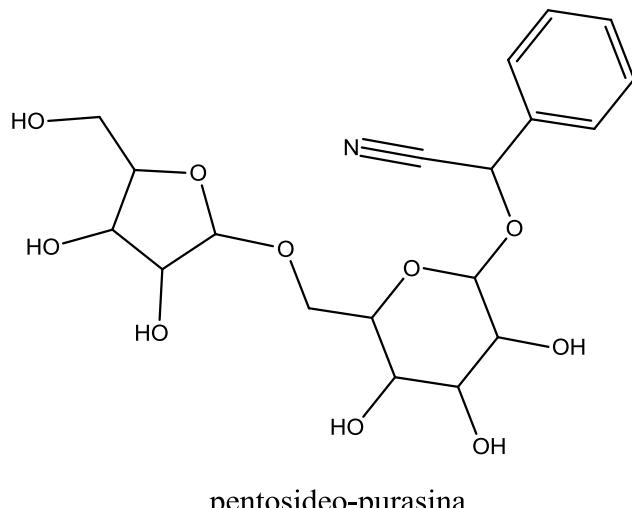
**Tabela 33** – Proposta de composição para a fração FrCBC04.

TR (min)	[M – H] <sup>-</sup>	Fragmentos (m/z)	Δm (ppm)	Compostos	Referências
0,85	191,0567	173; 127	0,5	ácido quínico	1
4,49	153,0195	109	1,3	ácido protocatequico	2
5,37	137,0243		0,72	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	3
7,49	472,1469	426; 293; 149	1,9	pentosideo-purasina	
8,06	289,0722	245	1,4	(epi)catequina	4; 5
8,25	359,0990	293; 151		NI	
8,65	167,0354	152; 108		NI	
9,88	597,2192	551; 419; 233		NI	

1 - (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004); 2 – (CHEN et al., 2012); 3 – (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012); 4 – (SAID et al., 2017); 5 – (BYSTROM et al., 2008).

NI – não identificado;  $\Delta_m$  (ppm) – erro da massa experimental referente a teórica.

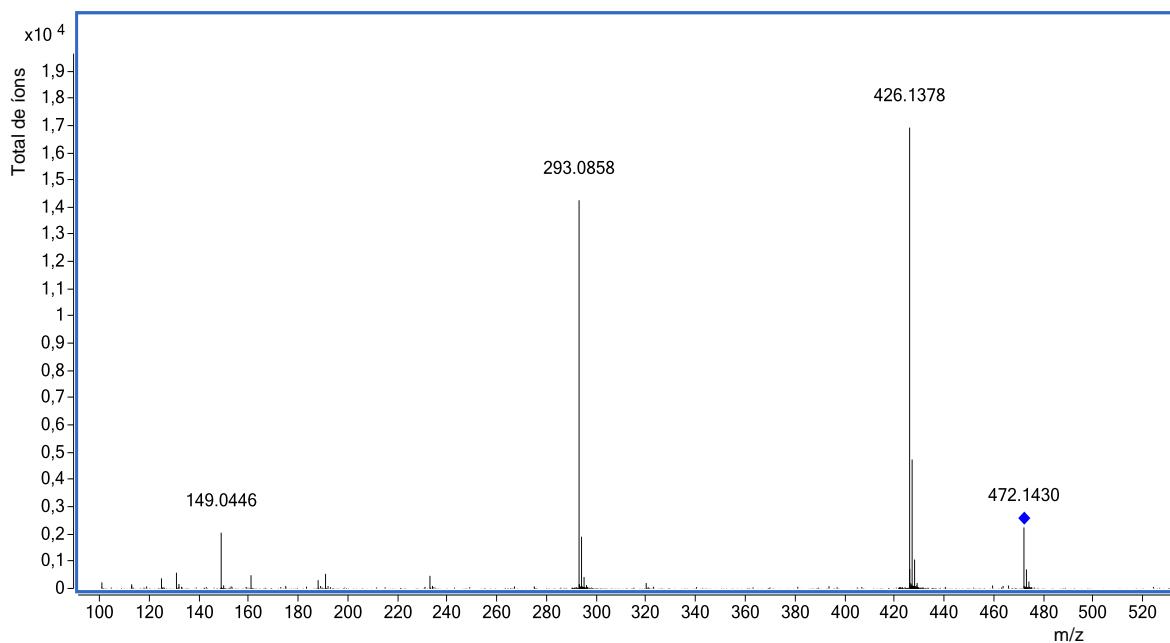
Analizando a Tabela 33 observa-se a presença de ácidos orgânicos (ácido quínico, ácido *p*-hidroxibenzoico e o ácido protocatequico), flavan-3-ol ((epi)catequina) e o composto majoritário da fração identificado como pentosideo-purasina (Figura 71).

**Figura 71** – Estrutura do composto majoritário da fração FrCBC04.

Fonte: o autor.

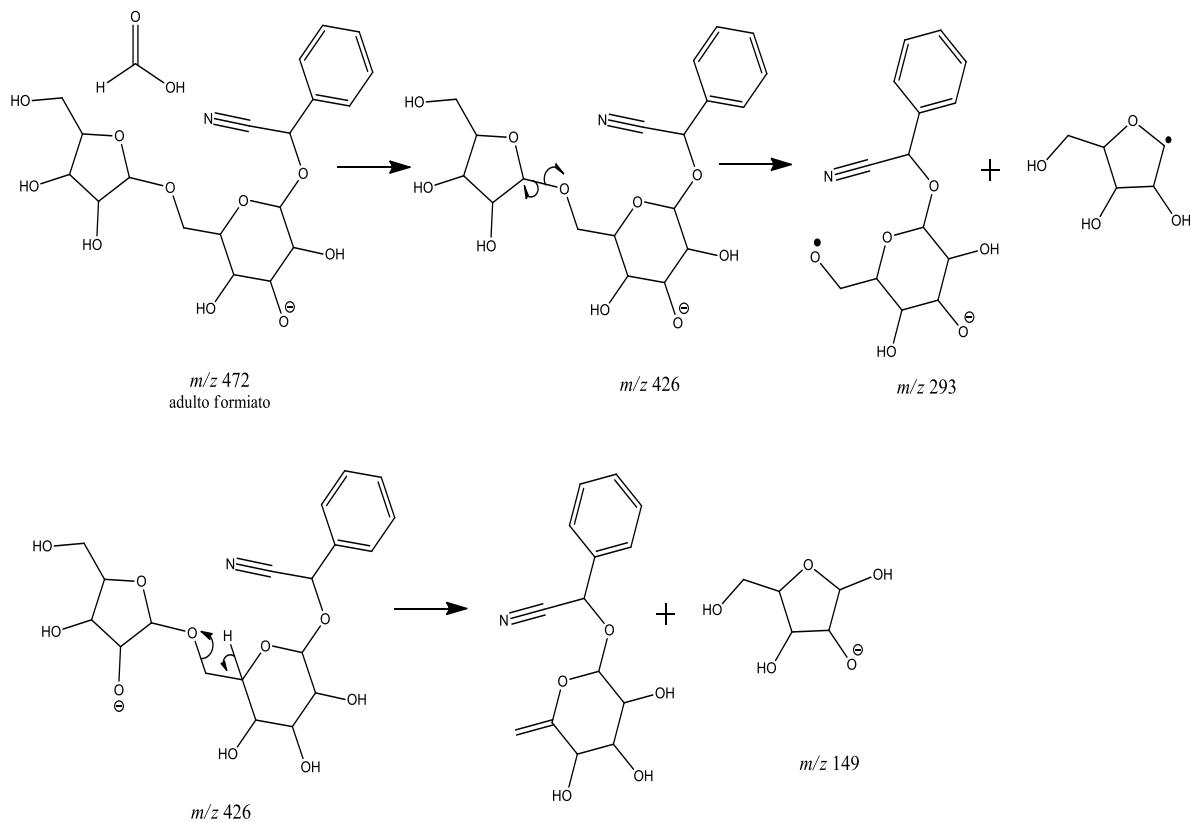
Para este composto majoritário foi realizada a análise de EM/EM e a proposta de fragmentação para o composto, apresentados a seguir nas Figuras 72 e 73.

**Figura 72 – Espectro de EM/EM do pentosideo-purasina.**



Fonte: o autor.

**Figura 73 – Proposta de fragmentação para o pentosideo-purasina.**

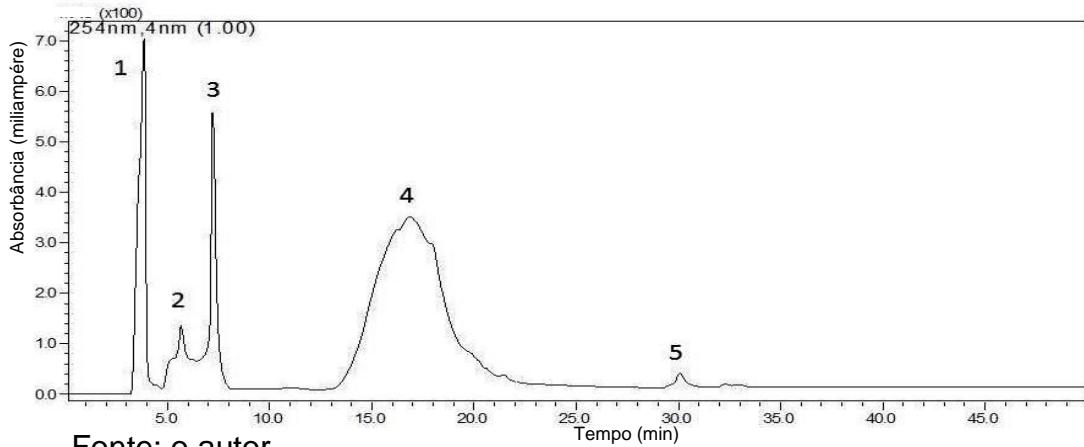


Fonte: o autor.

Foi possível chegar à estrutura do pentosideo-purasina, graças às análises de massa de alta resolução e a de EM/EM, sendo também considerando o perfil de metabólitos identificados nas diferentes partes da *B. oxycyclada*, como o composto hexose-pentose-benzenometanol (27) presente nas folhas da planta. Foi levado em consideração como descrito por Picmanová e colaboradores (2015) que estes tipos de compostos podem ser utilizados pela planta para transporte de nitrogênio das folhas para as raízes.

A fração FrCBC04 foi submetida a CLAE semipreparativa, para a purificação do composto majoritário, sendo o cromatograma da análise apresentado na Figura 74.

**Figura 74** – Cromatograma da fração FrCBC04 por CLAE semipreparativa.



Fonte: o autor.

No fracionamento com CLAE semipreparativa foram injetados 90 mg da amostra FrCBC04 em várias injeções, produzindo as frações 1, 2, 3, 4 e 5. Suas respectivas massas estão apresentadas na Tabela 34.

**Tabela 34** – Rendimento das frações do CLAE semipreparativa da fração FrCBC04.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (% (m.m <sup>-1</sup> ))
FrCLAE01	1,02	1,13
FrCLAE02	1,55	1,72
FrCLAE03	9,05	10,06
FrCLAE04	30,15	33,50
FrCLAE05	2,50	2,78

Fonte: o autor.

A fração FrCLAE04 cujo o constituinte é a pentosideo-purasina, foi submetida as atividades antifúngica, antioxidante e citotoxicidade e os resultados estão apresentados na Tabela 35.

**Tabela 35** – Atividade antifúngica, antioxidante e citotoxicidade do composto pentosideo-purasina.

	CIM					CC <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>		
$\mu\text{g.mL}^{-1}$							
pentosideo-purasina	12,5	1,56	100	-	-	> 512	3,35 ± 0,8
Anfotericina	-	-	-	1,0	0,5	-	-
*BHT	-	-	-	-	-	-	7,3 ± 0,3
Índice de seletividade	1,61	2,51	0,7	-	-	-	2,18

Nota: As análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p<0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

\* Controle positivo (butilidroxitolueno).

Fonte: o autor.

O composto purificado apresentou atividade antifúngica promissora principalmente para a *Candida tropicalis* com CIM de  $1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , indicando que o pentosideo-purasina é um candidato para princípio ativo para o tratamento de doenças causadas por este fungo, além disto, o composto não é citotóxico ( $\text{CC}_{50} = >512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A substância também apresentou potencial antioxidante com  $\text{CE}_{50}$  de 3,35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Esta atividade do composto purificado foi menor do que a fração FrCBC04, indicando que na fração pode ter ocorrido sinergismo dos constituintes para melhor atividade.

Este composto identificado abre as possibilidades de estudos futuros principalmente em relação à atividade antifúngica, como, mecanismos de ação da substância, mudanças estruturais na molécula para melhorar a atividade e testes de outras espécies de fungos.

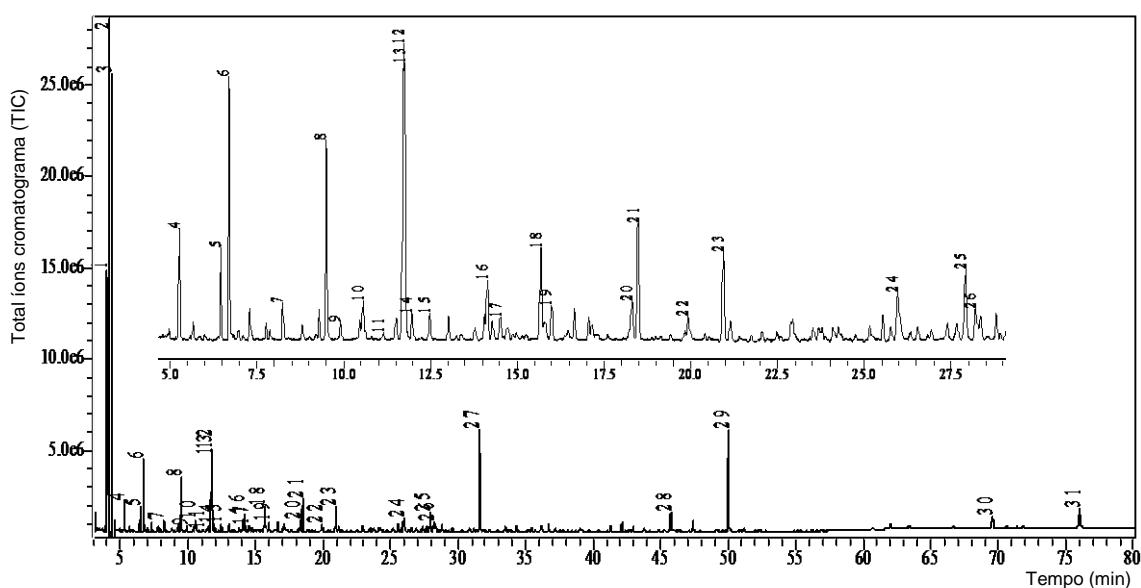
### 5.13 Óleo Essencial

O óleo essencial das folhas da *B. oxyclada* foi produzido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, sendo determinado o rendimento de  $0,016 \pm 0,002\%$ . Na literatura foi encontrado apenas um trabalho de óleo essencial para espécies do gênero *Banisteriopsis*, para as folhas da *B. laevifolia*, que apresentou rendimento de 0,06 % (NUNES, 2016), este comparativo demonstra que outras espécies do gênero podem obter rendimentos superiores ao da *B. oxyclada*.

Os constituintes principais do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM). O cromatograma está apresentado na Figura 75. Para a identificação dos constituintes foram realizadas três extrações e suas respectivas injeções. No processo de identificação foram utilizadas as bibliotecas de espectro de massa e por índice aritmético (IA) comparando com a literatura, adotando como requisito similaridade dos espectros de massa acima de 90% e diferença do IA de no máximo 10 unidades.

Os resultados da identificação dos principais constituintes voláteis da folha estão apresentados na Tabela 36.

**Figura 75** - Cromatograma do óleo essencial das folhas da *B. oxyclada* por CG-EM.



Fonte: o autor.

**Tabela 36** – Composição do óleo essencial das folhas da *B. oxyclada*.

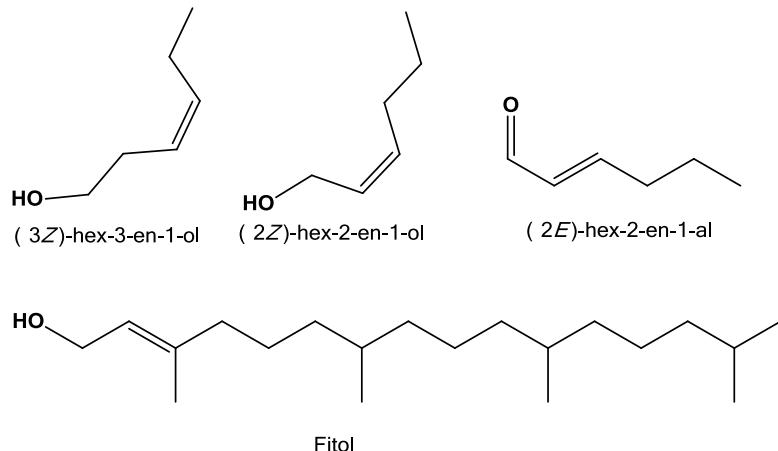
Nº	TR	NOME	IA calculado	IA teórico	(%) TIC
1	4,001	(2E)-hex-2-en-1-al	836	846*	9,73
2	4,147	(3Z)-hex-3-en-1-ol	844	850*	15,26
3	4,379	(2Z)-hex-2-en-1-ol	857	859*	13,00
4	5,261	(2E, 4E)-hex-2,4-dien-1-al	904	907*	1,78
5	6,460	(2E)-hept-2-en-1-al	947	947*	1,58
6	6,703	benzaldeido	955	952*	3,24
7	8,248	(2E, 4E)-hept-2,4-dien-1-al	1.008	1.005*	1,13
8	9,501	Benzenoacetaldeido	1.041	1.036*	3,26
9	9,913	(2E)-oct-1-en-1-al	1.052	1.049*	1,15
10	10,558	octan-1-ol	1.070	1.063*	1,43
11	11,140	(E)-oxido de Linalol (furanoide)	1.085	1.084*	1,25
12	11,724	nonan-1-al	1.101	1.100*	3,89
13	11,759	linalol	1.102	1.095*	2,80
14	11,966	hotrienol	1.107	1.108**	1,20
15	12,474	2-fenil-etan-1-ol	1.119	1.116**	1,07
16	14,136	(2E, 6Z)-nona-2,6-dien-1-ol	1.158	1.159*	1,25
17	14,513	isomero((2E, 6Z)-nona-2,6-dien-1-ol)	1.167	-	1,11
18	15,680	Salicilato de metila	1.194	1.190*	2,03
19	15,991	decan-1-al	1.202	1.201*	1,08
20	18,304	geraniol	1.254	1.249*	1,45
21	18,480	(2E)-dec-2-en-1-al	1.258	1.260*	2,5
22	19,923	(2E, 4Z)-dec-2,4-dien-1-al	1.291	1.292*	1,16
23	20,933	(2E, 4E)-dec-2,4-dien-1-al	1.314	1.315*	1,81
24	25,963	NI	-	-	2,04
25	27,907	4-(2,6,6-trimetil-cicloex-1-en-1-il)-but-3-en-2-ona	1.478	1.487*	1,77
26	28,197	NI	-	-	1,19
27	31,585	NI	-	-	5,12
28	45,757	ácido palmítico	1.960	1.962**	1,63
29	50,013	fitol	2.093	2.096**	10,06
30	69,564	NI	-	-	1,59
31	76,022	NI	-	-	2,44

Nota: \* ADAMS, 2007; \*\*NIST. NI – não identificado.

Fonte: o autor.

Analizando a Tabela 36 da composição do óleo essencial das folhas da *B. oxyclada*, tem se como componentes majoritários (Figura 75) o (3Z)-hex-3-en-1-ol (15,26 %), (2Z)-hex-2-en-1-ol (13,00%), fitol (10,06%) e o (2E)-hex-2-en-1-al (9,73%).

**Figura 76** – Compostos majoritários do óleo essencial das folhas da *B. oxycyclada*.



Fonte: o autor.

A maioria dos constituintes encontrados na composição do óleo pertencem a classe dos álcoois e aldeídos, sendo que os quatro constituintes majoritários representam 48,05 % do óleo essencial, destes três são álcoois (38,32%) e um aldeído (9,73%).

O óleo essencial foi submetido à atividade antileishmania e a citotoxicidade, estes resultados estão apresentados na Tabela 37 a seguir.

**Tabela 37** – Atividade antileishmania e citotoxicidade do óleo essencial da *B. oxycyclada*.

Amostra	$IC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$	$CC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$	IS
	<i>Leishmania amazonensis</i>	Célula Vero	
Óleo essencial	32 ± 1	36 ± 3	0,05
Fitol	49 ± 3	95 ± 6	0,29
Anfotericina B	0,29 ± 0,01	-	-

Nota: As análises mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p < 0,05$  para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor.

Os resultados da Tabela 37 demonstram que o óleo essencial das folhas da *B. oxycyclada* apresenta atividade antileishmania, indicando que entre seus constituintes possa haver princípios ativos para o tratamento desta doença negligenciada.

Abordando os constituintes majoritários *versus* a atividade contra o protozoário do gênero leishmania, verifica-se na literatura que no trabalho de SILVA e colaboradores (2015), houve atividade antileishmania de uma fração do extrato de *Lacistema pubescens* rica em fitol contra a *Leishmania amazonensis*

( $Cl_{50} = 44,0 \pm 0,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e o óleo essencial da *B. oxyclada* com o fitol (10,06%) em sua composição apresentou melhor atividade com o  $Cl_{50}$  de  $32 \pm 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Diante deste fato, foi realizado a atividade antileishmania com o padrão de fitol em que, se obteve o valor de  $Cl_{50}$  de  $49 \pm 3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Isto indica que parte da atividade do óleo essencial é proveniente do fitol, mas também sugere que outros constituintes estão contribuindo para atividade, abrindo então a possibilidades de se encontrar outros compostos no óleo essencial com potencial em relação atividade antileishmania.

## 6 Conclusão

Os resultados de fenóis totais demonstraram que as frações acetato de etila e *n*-butanol dos extratos da *B. oxyclada* possuem a maior concentração de compostos fenólicos. Observou-se que os maiores rendimentos durante o fracionamento dos extratos foram destas frações, indicando que a maior parte da composição dos extratos é de compostos fenólicos.

A concentração de taninos condensados também foi maior para as frações acetato de etila e *n*-butanol, em destaque para as frações da raiz. Este fato também foi confirmado com as análises por CLAE/EM indicando que os principais constituintes das frações da raiz são os taninos condensados.

Os maiores potenciais antioxidantes encontrados foram para as frações acetato de etila e *n*-butanol, em destaque para a fração *n*-butanol do extrato do caule.

A maior atividade antibacteriana encontrada foi para as frações diclorometano dos extratos (raiz, caule e folha) com CIM de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a *P. gingivalis*, mas considerando a citotoxicidade a fração diclorometano do caule se destacou entre as demais, por apresentar também baixa citotoxicidade.

Para antileishmania, as maiores atividades encontradas foram a fração hexano do extrato do caule ( $Cl_{50} = 270 \pm 36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a fração diclorometano do extrato da raiz ( $Cl_{50} = 370 \pm 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a fração diclorometano do extrato do caule ( $Cl_{50} = 453 \pm 26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Considerando a citotoxicidade, a fração com maior potencial e menor citotoxicidade foi à fração hexano do caule.

As maiores atividades antifúngica foram as frações *n*-butanol do extrato da raiz e do caule com CIM de  $23,43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , contra a *C. albicans*, também não

apresentaram citotoxicidade, sendo frações promissoras para a busca de novos antifúngicos.

As frações mais ativas em diferentes atividades foram às frações *n*-butanol e acetato de etila dos extratos do caule, raiz e folha. Estas frações foram analisadas por CLAE/EM, constatando que as frações do caule apresentaram em sua composição ácidos orgânicos, flavan-3-ol, flavonóis e taninos condensados, com prevalência dos ácidos orgânicos. Nas frações da raiz foram encontrados ácidos orgânicos, flavan-3-ol e taninos condensados, com prevalência dos taninos condensados. Nas folhas foram encontrados ácidos orgânicos, flavan-3-ol, flavonóis e taninos condensados, com prevalência dos flavonóis.

Com todos os resultados das atividades realizadas, foi selecionada a fração *n*-butanol do caule para o processo de fracionamento. Desta foi purificado o composto o pentosideo-purasina, o qual apresentou atividade antifúngica promissora principalmente para a *Candida tropicalis* com CIM de 1,56 µg.mL<sup>-1</sup>, indicando que o composto é um forte candidato para atuar como princípio ativo no tratamento de doenças causadas por este fungo, além disto, o composto não apresentou citotoxicidade.

Este trabalho sugere estudos futuros em relação à atividade antifúngica do composto pentosideo-purasina, fato este importante, já que os fungos são causadores de diferentes doenças, e que tem causado varias mortes ao redor do mundo.

O óleo essencial das folhas da *B. oxyclada* apresentou em sua composição principalmente as classes dos álcoois e aldeídos, em que os quatro constituintes majoritários representam 48,05% do óleo essencial ((3Z)-hex-3-en-1-ol (15,26%), (2Z)-hex-2-en-1-ol (13,00%), fitol (10,06%) e o (2E)-hex-2-en-1-al (9,73%)), destes três são álcoois (38,32%) e um aldeído (9,73%).

O óleo essencial da *B. oxyclada* apresentou atividade antileishmania, sendo proposto que o fitol presente em sua composição como responsável por parte da atividade, mas também sugere que outros constituintes estão contribuindo para atividade. O que é de grande relevância já que novos estudos podem ser realizados em relação a este protozoário causador desta doença negligenciada.

## Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4º ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804 p.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 10-15, 2001.

ANDERSON, W. R. Lophanthera, a genus of Malpighiaceae – the evidence from morphology. **Memoirs of the University of Michigan Herbarium**. v. 19, n. 64, p. 210-224, 1990.

ANDERSON, W.R.; DAVIS, C.C. Expansion of Diploterys at the expense of Banisteriopsis (Malpighiaceae). **Harvard Papers in Botany**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.3100/1043-4534\(2006\)95\[1:EODATE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3100/1043-4534(2006)95[1:EODATE]2.0.CO;2)

ANDRADE, N. J.; DIAS, I.; PINHEIRO, A. L.; MONTANARI, R. M.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A. ; SILVA, C. J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100019>

ANESE, S., GRISI, P. U.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V. C.; GUALTIERI, S. C. J. Fitotoxicidade de extratos etanólicos de frutos e folhas de Banisteriopsis oxyclada (A. Juss) B. Gates sobre o crescimento de plantas daninhas. **Biotemas**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2016v29n1p1>

ARAUJO, J. S. **Anatomia foliar de 16 espécies de Malpighiaceae ocorrentes em área do cerrado**. 2008, 50 f.. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

ARGOLO, A. C.; SANTANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from Bauhinia monandra. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.014>

BAMAWA, C. M.; NDJELE, L. M.; FOMA, F. M. Characterization of leaf phenolic compounds of Hymenocardia ulmoides (Wild plant tea) by HPLC-MS<sup>n</sup>. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Research**., v. 4, n. 4, p. 170-174 , 2013.

BATCHELOR, R. H.; ZHOU, M. User of cellular glucose-6-phosphate dehydrogenase for cell quantitation: applications in cytotoxicity and apoptosis assays. **Analytical Biochemistry**, v. 329, p. 35-42, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.007>

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BURKE, R. W.; DIAMONDSTONE, B. I.; VELAPOLDI, R. A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 794-801, 1974.

BYSTROM, L. M.; LEWIS, B. A.; BROWN, D. L.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, R. L. Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1017-1024, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.058>

CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; ANDERSON, W.; HILLS, H. G. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid RBCL and MatK sequences. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 10, p. 1847-1862, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/3558361>

CARTAXO-FURTADO, N. A. D. E. O.; SAMPAIO, T. O.; XAVIER, M. A.; MEDEIROS, A. D. D. E.; FEREIRA, J. V. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 1091-1096, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1590/1983-084x/14\\_153](https://doi.org/10.1590/1983-084x/14_153)

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 82-89, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.005>

CHEN, H. J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 260-285, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms13010260>

CHEN, W.; WANG, D.; WANG, L. S.; BEI, D.; WANG, J.; SEE, W. A.; MALLERY, S. R.; STONER, G. D.; LIU, Z. Pharmacokinetics of protocatechuic acid in mouse and its quantification in human plasma using LC-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 908, p. 39–44, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.032>

CHIBALE, K; CHOUTEAU, F.; LATEGAN, C. A.; MAHARAJ, V. J.; PILLAY, P.; SMITH, P. J.; VLEGGAAAR, R. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1200-1205, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.019>

**CLSI Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria.** CLSI Document M11-A8. 8. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a. 39 p.

**CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** CLSI Document M7-A9. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b. 63 p.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, p. 1414-1416, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aaa6097>

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000300007>

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-Deoxyhexosyl Flavones and Antioxidant Properties of *Passiflora edulis* Leaf Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10187-10193, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf072119y>

FREITAS, L. B. O.; BOAVENTURA, M. A.; SANTOS, W. L.; STEHMAN, J. R.; JUNIOR, D. D.; LOPES, M. T. P.; MAGALHÃES, T. F. F.; SILVA, D. L.; RESENDE, M. A. Allelopathic, cytotoxic and antifungal activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisabdra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 9-16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.02.006>

FRIAS, U. A.; COSTA, M. C. M.; TAKAHASHI, J. A.; OKI, Y. *Banisteriopsis* Species: a source of bioactive of potential medical application. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**. v. 1, n. 3, p. 163-171, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.6000/1927-3037/2012.01.03.02>

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79 f. (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GATES, B. *Banisteriopsis*, *Diplopterys* (Malpighiaceae). **Flora Neotropica**, v. 1, n. 30, p. 237-245, 1982.

GERITS, E.; DEFRAINE, V.; VANDAMME, K.; CREMER, K.; BRUKER, K.; THEVISSEN, K.; CAMMUE, B. P. A.; BEULLENS, S.; FAUVART, M.; VERSTRAETEN, N.; MICHELS, JAN. Repurposing toremifene for the treatment of oral infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 1846-1862, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01846-16>

GHAMMOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GHOSAL, S.; MAZUMDER, U. K. Alkaloids of the leaves of *Banisteriopsis argentea*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2840-2841, 1971. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97304-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97304-7)

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n. 2, 374-381, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GÓMEZ-BARRIO, A.; VEJA, C.; ESCARIO, J. A.; ROLÓN, M. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, p. 103-107, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

IBRAM. **Bioma Cerrado**. 2012. Disponível em:<[www.ibram.df.gov.br/informacoes/meio-ambiente/bioma-cerrado.html](http://www.ibram.df.gov.br/informacoes/meio-ambiente/bioma-cerrado.html)>.

KAJDZANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 181-194, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20450/mjce.2010.165>

KARTNIG, T.; GÖBEL, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester. **Journal of Chromatography A**, v. 740, p. 99-107, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00102-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00102-1)

KATO, K. A new color reaction of steroid with anhydrous aluminum chloride and anisaldehyde. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, n. 11, p. 1319-1328, 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/cpb.12.1319>

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**. v.1, n.1, p. 147-155, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x>

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIA, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011>

LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr900302x>

MARTINS, M. M. **Constituintes voláteis, fenóis totais, capacidade antioxidante e biológica de folhas, flores e raízes da Vernonia brasiliiana Less.** 2012. 66 f. (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MASIKE, K.; MHLONGO, M.; MUDAU, S. P.; NOBELA, O.; NCUBE, E. N.; TUGIZIMANA, F.; GEORGE, M. J.; MADALA, N. E. Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 29, p. 2-7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0262-8>

MATTEINI, P.; AGATI, G.; PINELLI, P.; GOTI, A. Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. **Chemical Monthly**, v. 142, p. 885-893, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00706-011-0545-z>

MENDONÇA, C. B. F.; JUNIOR, E. F. S.; GONÇALVES-ESTEVES, V. Palinologia de espécies de Malpighiaceae Juss. ocorrentes nas restingas do Estado do Rio de Janeiro. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 519-529, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S2236-89062007000400007>

MESSERSCHMIDT, A.; MAES, L.; AL-MUSAYEIB, N. M.; COS, P.; MOTHANA, R. A. In vitro antiplasmodial, antileishmanial and anttrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n.1, p. 1-7 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-49>

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.198-207, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500031>

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido à diferente grau de torra. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200011>

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

**NCCLS Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma Aprovada - Documento M27-A2 do NCCLS. 2. ed. Wayne, PA: NCCLS, 2002. 51 p.**

NG, L. K.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of Cigarette Tobacco by Direct Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry (ESI-ITMS) Analysis of the Aqueous Extracts-A Novel and Simple Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7251-7257, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf040203x>

**NIST Standard Reference Data.** 2016. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

NUNES, B. C.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, A.; CUNHA, L. C. S.; SILVA, C. V.; TEIXEIRA, T. L.; AMBRÓSIO, M. A. L. V.; MARTINS, C. H. G.; AQUINO, F. J. T. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of Banisteriopsis laevifolia (A. Juss) B. Gates leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 277-289, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.016>

O'CONNELL, F. D.; LYNN, E. V. The alkaloid of Banisteriopsis inebrians Morton. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 42, n. 12, p. 753-754, 1953. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.3030421215>

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova** v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>

OLIVEIRA, A. M. F.; CUNHA, E. V. L.; WANDERLEY, F. T. S.; TAVARES, J. F.; ASSIS, T. S.; ROLIM, T. L. Constituintes químicos e atividade antioxidante de Byrsinima gardneriana(Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 524-527, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400007>

OLIVEIRA, D. M. **Estudo fitoquímico e biológico das folhas de Banisteriopsis argyrophylla (A. Juss) B. Gates (Malpighiaceae)**. 2016. 145 f. (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

PASTORE, G. M.; SOUSA, C. A. S.; CARRASCO, L. C.; MALTA, L. G.; ROESLER, R.; HOLANDA, R. B. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>

PICMNOVÁ, M.; NEILSON, E. H.; MOTAWIA, M. S.; OLSEN, C. E.; AGERBIRK, N.; GRAY, C. J.; FLITSCH, S.; MEIES, S.; SILVESTROS, D.; JORGENSEN, K.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; MOLLER, B. L.; BJARNHOLT, N. A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by the comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species. **Journal of Biochemistry**, v. 469, p. 375-389, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20150390>

Pubchem. **Chlorhexamed.** 2017. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5353524#section=Top>

QUEIROZ, G. S. **Flavonóides de bunchosia armeniaca e derivados de 2-arilideno-1- $\alpha$ -tetralona: obtenção e atividades biológicas.** 2012, 145 f. (Dissertação mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RANGEL, E. T. **Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em Leishmania (Leishmania) chagasi.** 2010. 131 f. (Doutorado em Ciência da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400018>

RESENDE, M. L. F.; GUIMARÃES, L. L. Inventários da biodiversidade do bioma Cerrado: biogeografia de plantas. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 14, 2007.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.17348/era.3.0.25-36>

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

SAID, R. B.; HAMED, A. I.; MAHALEL, U. A.; AL-AYED, A. S.; KOWALCZYK, M.; MOLDOCH, J.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 512, p. 1-18, 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms18030512>

SANTOS, A. O.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-71672006000100012>

SAMOYLENKO, V.; RAHMAN, M. M.; TEKWANI, B. L.; TRIPATHI, L. M.; WANG, Y. H.; KHAN, S. I.; KHAN, I. A.; MILLER, L. S.; JOSHI, V. C.; MUHAMMAD, I. Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 357-367, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.030>

SARDI, J. C. O.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1–2, p. 21-40, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

SILVA, J. M.; ANTINARELLI, L. M. R.; RIBEIRO, A.; COIMBRA, E. S.; SCIO, E. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. **Experimental Parasitology**, v. 15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.09.009>

SIMIRGIOTIS, M. J.; BENITES, J.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, p. 11490-11507, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules200611490>

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, C. C. COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CALVACANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

SOUSA, R. M. F. D. **ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia calycina* Cambess E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DE ALFA-AMILASE**. 2015. 222 f. (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, TROMBERT, D. M. Morfoanatomia e ontogênese das sementes de espécies de *Banisteriopsis* C.B. Robinson e *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 3, p. 733-740, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000300011>

SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. *Myrica faya*: A New Source of Antioxidant Phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9722-9735, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf503540s>

STANTON, M.A. **Respostas a herbivoria em *Arclepias curassavica* (Apocynaceae: Asclepiadoideae)**: defender, crescer ou reproduzir. 2008. 90 f. (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

TAKAHASHI, J. A.; COSTA, M. C. M.; FRIAS, U. A. Caracterización fitoquímica y de las actividades antibacterianas y anticolinesterasa de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.16, n. 1, p. 60-71, 2011.

TANDON, V. K.; CHHOR, R. B.; SINGH, R. V.; RAI, S.; YADAV, D. B. Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1079-1083, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.01.002>

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a Química medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n.2, p. 326-337, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>

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

ZHAO, Y., LI, X.; ZENG, X.; HUANG, S.; HOU, S.; LAI, X. Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1359–1363, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3ay41288a>

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**: a thin layer chromatography athlas. Springer. 2ed., 1995, p. 368.

WANG, Y. H.; SAMOYLENKO, V.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I. A.; MILLER, L. S.; CHAURASIYA, N. D.; RAHMAN, M. M.; TRIPATHI, L. M.; KHAN, S. I.; JOSHI, V. C.; WIGGER, F. T.; MUHAMMAD, I. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p.662-671, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.02.013>

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÉA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39-62, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000100009>

## APENDICE A – Resumo gráfico.

