



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

EDMILSON DE OLIVEIRA ROCHA

**Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie
Banisteriopsis campestris (A. Juss.) Little**

**UBERLÂNDIA
2018**



EDMILSON DE OLIVEIRA ROCHA

**Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie
Banisteriopsis campestris (A. Juss.) Little**

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

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof . Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Chang

UBERLÂNDIA

2018

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

R672e Rocha, Edmilson de Oliveira, 1975-
2018 Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie
Banisteriopsis campestris (A. Juss.) Little [recurso eletrônico] /
Edmilson de Oliveira Rocha. - 2018.

Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes.

Coorientador: Roberto Chang.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.309>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. 2. *Banisteriopsis* - Brasil. 3. Antioxidantes. 4. Agentes
antiinfecciosos. I. Moraes, Sérgio Antônio Lemos de, 1961- (Orient.). II.
Chang, Roberto, 1962- (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



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 89/PPQUI.

DATA: 14/12/2018

DISCENTE: Edmilson de Oliveira Rocha

MATRÍCULA: 11423QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little.

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 quatorze de dezembro do ano de dois mil e dezoito, no(a) Auditório B do Bloco 50 no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Welington de Oliveira Cruz, da(o) do Instituto de Química da UFU, Carlos Alberto de Oliveira, do Instituto de Química da UFU, Natal Junio Pires, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Sebastião Francelino da Cruz, do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de São Paulo 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 PPQUI. 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

O mesmo

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 90 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17:00 horas e 50 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz

Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Prof. Dr. Natal Junio Pires

Prof. Dr. Sebastião Francelino da Cruz

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

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus pai, por me dar força e discernimento para superar os obstáculos deste trabalho.

Aos meus amados pais Ruy e Lourdes, por todo amor e educação.

A minha esposa Ana Maria e os meus filhos Túlio, Sofia e Kimberly pelo carinho e incentivo constantes.

Aos amigos e companheiros de trabalho Edmar Eustáquio, Moacir Junior, Otávio Molinaroli, José Eduardo, André Macedo e Cleiseano Paniagua pela amizade e incentivo.

Aos meus orientadores e amigos de laboratório de pesquisa que me incentivaram e apoiaram, dando força nos momentos mais difíceis.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química pelo incentivo e infraestrutura concedida, para a realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, pela confiança depositada em mim durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Chang por ter me acompanhado durante a execução deste trabalho na condição de coorientador.

Aos Professores. Dr. Evandro Afonso do Nascimento, Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, Dr. Luís Carlos Scalón Cunha e ao Dr. Mário Machado Martins por suas valiosas contribuições e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de pesquisa NuPPeN, Carla, Daiane, Kelly, Michele, Thamires, Rose, Eder, Marcus Vinícius, Marília, Rafael, Leandro, Flavia e Tiara pela amizade e apoio nos trabalhos de laboratório.

Aos Professores Dr. Wellington de Oliveira Cruz, Dr. Carlos Alberto de Oliveira e Dra. Harumi Otaguro, pelas valiosas críticas e sugestões proferidas durante o exame de qualificação desta tese, que contribuíram e enriqueceram enormemente este trabalho.

Ao Laboratório Multusuário do Instituto de Química da UFU pelas análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, Universidade de Franca, pela realização das análises de atividade antimicrobiana e antifúngica.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola e o discente Allisson Benatti Justino do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU pela realização da atividade inibitória de α -amilase e α -glicosidase.

Ao Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU pela realização das atividades antiprotozoária e citotóxica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Reis Soares da Faculdade de Engenharia Química da UFU pela disponibilidade na utilização do cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas.

RESUMO

Neste trabalho, o estudo fitoquímico e atividade biológica da espécie *Banisteriopsis campestris*, que é endêmica no Brasil com distribuição geográfica nos Biomas da Caatinga e do Cerrado, foi realizado. O presente trabalho avaliou as atividades antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antileishmania, citotóxica e inibitória contra α -amilase e α -glicosidase, e glicação dos óleos essenciais, extratos e partições de partes da planta, além de caracterizar e/ou determinar a estrutura dos constituintes químicos presentes nas partições e óleos essenciais. Para desenvolvimento do trabalho, extratos etanólicos das folhas, caules e raízes, foram preparados e particionados com solventes de polaridade crescente, gerando as partições de hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e a partição residual chamada de metanol/água. Todos os extratos e partições foram submetidos à prospecção fitoquímica, determinação de teores de fenóis totais, proantocianidinas, flavonoides, atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC, ensaio de inibição da α -amilase, α -glicosidase e glicação, avaliação das atividades antimicrobiana e antifúngica, além das análises dos constituintes presentes nas partições mais ativas por CLAE/EM. Os óleos essenciais das flores, folhas, caules e raízes foram extraídos por hidrodestilação, identificados por CG/EM e realizadas análises de atividade antimicrobiana, antifúngica, antileishmania, antioxidante e citotóxica. Foram identificados por prospecção fitoquímica, terpenos, flavonóides e compostos fenólicos, presentes nos extratos e partições. As partições acetato de etila e *n*-butanol foram as que exibiram melhores resultados para atividade antioxidante, inibitória para α -amilase e α -glicosidase. A partição acetato de etila das folhas, caule e raiz foram analisadas por CLAE/EM e foram identificadas em suas composições, ácidos orgânicos, flavonoides e procianidinas do tipo B1, B2 e C3. A partição hexano do caule teve excelentes valores de concentração inibitória mínima (CIM) para as bactérias aeróbias e anaeróbias, com valores de CIM abaixo de 50 μ mL⁻¹ contra as bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces naeslundii*. Nos óleos essenciais os principais compostos identificados na raiz e caule foram ácidos graxos; nas folhas foram identificadas além destes ácidos graxos, como compostos principais, o alfa terpineol, fitol e esqualeno. O óleo essencial da flor apresentou aproximadamente 9% de monoterpenos, 14,5% de sesquiterpenos destacando-se, alfa-terpineol e (*E*)-nerolidol.

Os óleos essenciais apresentaram atividade antiprotozoária contra *Leishmania amazonensis* e os óleos do caule e raízes apresentaram baixa citotoxicidade contra as linhagens de células Vero. Os óleos também inibiram o crescimento de todas as bactérias orais testadas, com destaque para o óleo das raízes com potente atividade antibacteriana com inibição para todas as espécies de bactérias com valores de CIM variando de 12,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os óleos do caule e raízes foram os que exibiram melhores resultados de atividades antioxidantes. As amostras de óleo das raízes e caule apresentaram uma inibição para glicação acima de 50%, com destaque para o caule com porcentagem de 79,11%.

Palavras-chave: *Banisteriopsis campestris*, antioxidante, antimicrobiana, antileishmania, citotóxica.

ABSTRACT

In this work, the phytochemical study and biological activity of the species *Banisteriopsis campestris*, which is endemic in Brazil with geographic distribution in the Caatinga and Cerrado Biomes, was carried out. The present work evaluated the antimicrobial, antifungal, antioxidant, antileishmanial, cytotoxic and inhibitory activities against α -amylase and α -glycosidase, and glycation of the essential oils, extracts and plant part partitions, also characterizing and/or determining the structure of the chemical constituents present in the partitions and essential oils. For the development of the work, ethanolic extracts of the leaves, stems and roots were prepared, which were partitioned with solvents of increasing polarity, generating the hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol partitions and a residual partition called methanol/water. All extracts and partitions were submitted to phytochemical prospecting, determination of total phenol contents, proanthocyanidins, flavonoids, antioxidant activity by DPPH and ORAC methods, α -amylase and α -glycosidase inhibition assay and glycation and evaluation of antimicrobial and antifungal activities, also the identification of the constituents present in the most active partitions by HPLC/MS. The essential oils from flowers, leaves, stems and roots were extracted by hydrodistillation and identified by GC/MS and the assays of antimicrobial, antifungal, antileishmanial, antioxidant and cytotoxic activities were performed. Terpenes, flavonoids and phenolic compounds were identified by phytochemical prospection in extracts and partitions. The ethyl acetate and *n*-butanol partitions exhibited the best results for antioxidant and inhibitory activity for α -amylase and α -glycosidase. The ethyl acetate partition of leaves, stem and root were analyzed by HPLC/EM, and compounds as organic acids, flavonoids and procyanidins of type B1, B2 and C3, were identified in their compositions. The hexane stem partition had excellent minimum inhibitory concentration (MIC) values for aerobic and anaerobic bacteria, with MIC values below 50 μ mL⁻¹ against the bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Actinomyces naeslundii*. In the essential oils, the main compounds identified in root and stem were fatty acids; in the leaves, besides these fatty acids, alpha terpineol, phytol and squalene, were identified as main compounds. The flower essential oil contains about of 9% monoterpenes, 14.5% sesquiterpenes, standing out, alpha-terpineol and (E)-nerolidol. The essential oils presented antiprotozoal activity against *Leishmania amazonensis*, and stem and root oils showed low

cytotoxicity against Vero cell lines. The oils also inhibited the growth of all oral bacteria tested, with the root oil standing out with potent antibacterial activity with inhibition for all bacteria species with MIC values ranging from 12.5 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The stem and root oils were the ones that exhibited the best antioxidant activity results. The oil samples from the roots and stem showed an inhibition for glycation above 50%, standing out the stem with a percentage of 79.11%.

Keywords: *Banisteriopsis campestris*, antioxidant, antimicrobial, antileishmania, cytotoxic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do bioma Cerrado no Brasil	1
Figura 2. Representação dos salicilatos desenvolvidos como fármacos no período de 1800-1900.	3
Figura 3. Exemplos de metabólitos secundários.	3
Figura 4. Principais classes de compostos fenólicos.....	4
Figura 5. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.	5
Figura 6. Estrutura básica dos flavonoídes.....	6
Figura 7. Estrutura química de uma (a) proantocianidina constituída pela catequina e unidades poliméricas de epicatequina, (b) estrutura genérica flavonóide Kaempferol, R1=H, R2=H; Quercetina, R1=OH, R2=H; Miracetina, R1=OH, R2=OH..	7
Figura 8. Estrutura química do <i>trans</i> -resveratrol	7
Figura 9. Reação de condensação entre as unidades de DMAP e IPP formando os terpenos.	10
Figura 10. Estruturas de alguns sesquiterpenos importantes.....	11
Figura 11. Exemplos de alcaloides.....	12
Figura 12. Panorama do setor HPPC 2017 (a) consumo mundial e (b) consumo na América Latina.	13
Figura 13. Resumo das espécies de <i>Banisteriopsis</i> em regiões do Brasil por domínio fitogeográfico.	20
Figura 14. Estrutura química de alcaloides β -carbolínicos.	20
Figura 15. Imagem da espécie <i>Banisteriopsis campestris</i>	22
Figura 16. Fluxograma do trabalho.....	24
Figura 17. Foto ilustrativa do aparelho de Clevenger utilizado para hidrodestilação.	26
Figura 18. Partição líquido-líquido dos extratos.....	28
Figura 19. Cromatograma do óleo essencial da raiz.	50
Figura 20. Cromatograma do óleo essencial do caule.	51
Figura 21. Cromatograma do óleo essencial da folha.	52
Figura 22. Cromatograma do óleo essencial da flor.	53
Figura 23. Fórmulas estruturais dos compostos identificados de <i>B. campestris</i>	57

Figura 24. Prospecção fitoquímica das folhas de (a) <i>B. laevifolia</i> e (b) <i>B. argyrophylla</i>	69
Figura 25. Curva de calibração do ácido gálico.....	70
Figura 26. Curva de calibração da catequina.....	73
Figura 27. Curva de calibração da quercetina.....	75
Figura 28. Reação entre composto fenólico e o radical DPPH.....	77
Figura 29. Cromatogramas da partição acetato de etila da (a) folha, (b) caule e (c) raiz de <i>B. campestris</i> por CLAE/EM.....	93
Figura 30. Estrutura das moléculas identificadas pela análise de CLAE/EM da partição acetato etila da folha.....	95
Figura 31. Estrutura das moléculas identificadas pela análise de CLAE/EM da partição acetato etila do caule.....	97
Figura 32. Estrutura das moléculas identificadas pela análise de CLAE/EM da partição acetato etila raiz.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas.....	8
Tabela 2. Classificação dos terpenos com base no número de unidades de isopreno	9
Tabela 3. Espécies de plantas do gênero <i>Banisteriopsis</i> de ocorrência no Brasil	17
Tabela 4. Concentração das amostras utilizadas na determinação de fenóis totais.....	31
Tabela 5. Concentração das amostras utilizadas na determinação proantocianidinas.....	32
Tabela 6. Concentração inicial das amostras na cubeta.....	33
Tabela 7. Rendimento da extração dos OEs de <i>B. campestris</i>	45
Tabela 8. Composição química dos OEs de <i>B. campestris</i>	46
Tabela 9. Classificação e composição dos compostos presentes nos OE de diferentes partes de <i>B. campestris</i>	49
Tabela 10. Classificação dos terpenos identificados nos OEs das diversas partes de <i>B. campestris</i>	54
Tabela 11. Atividade antimicrobiana dos OEs.....	59
Tabela 12. Atividade antifúngica dos OEs.....	61
Tabela 13. Atividade antileishmania (CI_{50}) e citotoxicidade (CC_{50}) dos OEs.....	62
Tabela 14. Capacidade antioxidante e inibição da glicação dos OEs.....	63
Tabela 15. Teor de umidade nas amostras.....	65
Tabela 16. Massas e porcentagens dos extratos etanólicos obtidos.....	65
Tabela 17. Rendimento da partição líquido-líquido dos extratos.....	66
Tabela 18. Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos e partições da folha, caule e raiz de <i>B. campestris</i>	67
Tabela 19. Teor de fenóis totais (FT).....	71
Tabela 20. Comparação dos teores de FT das folhas entre espécies de <i>Banisteriopsis</i>	72
Tabela 21. Teor de proantocianidina obtido nas diversas partes da planta.....	73
Tabela 22. Comparação dos teores de proantocianidinas das espécies <i>B. campestris</i> e <i>B. oxyclada</i>	74
Tabela 23. Teor de flavonoides obtidos para <i>B. campestris</i>	76

Tabela 24. Equações da reta da porcentagem de DPPH em função das concentrações de amostras	78
Tabela 25. Valores de CE ₅₀ da atividade antioxidante dos extratos e partições da folha, caule e raiz de <i>B. campestris</i>	79
Tabela 26. Comparação da atividade antioxidante entre espécies de <i>Banisteriopsis</i>	80
Tabela 27. Comparação da atividade antioxidante extrato/partições do caule e raiz de <i>B. campestris</i> e <i>B. oxyclada</i>	80
Tabela 28. Atividade antioxidante ORAC.....	82
Tabela 29. Resultado da atividade de inibição de α -amilase para <i>B. campestris</i>	83
Tabela 30. Resultado da inibição de α -glicosidase obtidas para <i>B. campestris</i>	84
Tabela 31. Resultado do potencial de inibição de glicação para os extratos e partições de <i>B. campestris</i>	85
Tabela 32. Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos e partições de <i>B. campestris</i>	87
Tabela 33. Resultado da atividade antifúngica dos extratos e partições da folha, caule e raiz de <i>B. campestris</i>	90
Tabela 34. Valores comparativos da atividade antifúngica dos extratos e partições das folhas de outras espécies de <i>Banisteriopsis</i>	91
Tabela 35. Proposta de composição da partição acetato de etila da folha.	94
Tabela 36. Proposta de composição da partição acetato de etila do caule.	96
Tabela 37. Proposta de composição da partição acetato de etila da raiz	98

LISTA DE SIGLAS

AA – Atividade antioxidante;

AAPH – 2,2-azois (2aminodinopropano) dihidrocloreto;

ABIHPEC – Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria;

Abs – Absorbância;

AGES – Produtos finais de glicação avançada;

ATCC – *American Type Culture Collection*;

BHI – *Brain heart infusion*;

BHT – Butilihidroxitolueno;

BSA – Albumina sérica bovina;

CC₅₀ – Concentração citotóxica em que 50% celulas estão vivas

CCD – Cromatografia camada delgada;

CE₅₀ – Concentração efetiva;

CG-DIC – Cromatógrafo gasoso com detector ionização em chama;

CG-EM – Cromatógrafo gasoso acoplada à espectrometria de massas;

CI₅₀ – Concentração inibitória 50%;

CIM – Concentração inibitória mínima;

CLAE/EM – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*;

Da – Dalton;

DMAP – 3,3-dimetilalil profosfato;

DMEM – *Dubelcco's Modified Eagle Medium*;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila;

EAG – Equivalente de ácido gálico;

EC – Equivalente de catequina;

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético;

EGTA – Ácido etlenoglicoltetracético;

EM – Espectro de massas;

EM/EM – Espectrometria de massa sequencial;

EQ – Equivalente de quercetina;

ET – Equivalente de Trolox;

f-AG – Fração enriquecida da enzima α -glicosidase;

f-AS – Fração de saliva enriquecida de α -amilase;

FT – Fenóis totais;

FPP – Farnesil pirofosfato;

GALG2- α -CNP – α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo;

GGPP – Geranilgeranil pirofosfato;

GPP – Geranil pirofosfato;

HPPC – Higiene pessoal perfumaria e cosmético;

IES – Ionização por eletrospray;

IG – Inibição de glicação;

IPP – 3-isopentenil pirofosfato;

IS – Índice de seletividade;

MES – Tampão ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico;

MOPS – Tampão 3-(N-morfolino)-propano-ácido sulfônico;

m/z – Relação massa/carga;

NP – Difenilboriloxietilamina;

OE – Óleo essencial;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

ORAC – Capacidade de sequestro do radical peroxil;

PBS – *Phosphate Buffered Saline*;

PEG – Polietilenoglicol;

p-NPG – 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo;

QTOF – *Quadrupolo Time of Flight*;

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*;

SBF – Soro fetal bovino;

TBS – Caldo triptona soja;

TR – Tempo de retenção;

Tris-HCl – Cloridrato de *tris*(hidroximetil)aminometano;

Trolox – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico;

UFC – Unidade de formação de colônias;

UV – Ultravioleta;

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	O bioma Cerrado	1
1.2.	Metabólitos secundários	2
1.2.1.	Compostos fenólicos	4
1.2.2.	Terpenos	8
1.2.3.	Alcaloides	11
1.3.	Óleos essenciais.....	12
1.4.	Atividade antioxidante	14
1.5.	Atividade antimicrobiana	15
1.6.	Atividade antileishmania	15
1.7.	Gênero <i>Banisteriopsis</i>	16
1.7.1.	Estudos referentes à <i>Banisteriopsis campestris</i>	21
2.	JUSTIFICATIVA.....	23
3.	OBJETIVOS.....	23
4.	METODOLOGIA.....	24
4.1.	Coleta e identificação da espécie	25
4.2.	Análises Químicas	25
4.2.1.	Preparo das amostras	25
4.3.	Obtenção dos óleos essenciais	26
4.3.1.	Extração por hidrodestilação	26
4.3.2.	Separação e identificação de compostos voláteis	27
4.4.	Extratos das folhas, caules e raízes	28
4.4.1.	Preparação dos extratos etanólicos.....	28
4.4.2.	Partição líquido-líquido dos extratos em etanol	28
4.4.3.	Prospecção fitoquímica	29
4.4.4.	Determinação de fenóis totais	30

4.4.5.Determinação de proantocianidinas	31
4.4.6.Determinação de flavonoides	32
4.5. Determinação da atividade antioxidante	32
4.5.1.Método do sequestro do radical livre (DPPH).....	32
4.5.2.Método de sequestro do radical peroxil (ORAC)	34
4.6. Determinação da inibição da atividade de α -amilase e α -glicosidase	34
4.6.1.Determinação da inibição da atividade de α -amilase	35
4.6.2.Determinação da inibição da atividade de α -glicosidase	36
4.6.3.Determinação do potencial de inibição de glicação	37
4.7. Atividade antimicrobiana	38
4.7.1.Microrganismos utilizados nos ensaios	38
4.7.2.Preparo das amostras pelo método de microdiluição	38
4.7.3.Preparo do inóculo.....	39
4.7.4.Preparo dos controles.....	39
4.7.5.Método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima	39
4.8. Atividade antifúngica dos extratos e partições frente às leveduras.....	40
4.8.1.Microrganismos utilizados no ensaio	40
4.8.2.Preparo do inóculo.....	40
4.8.3.Preparo dos controles.....	41
4.8.4. Método da microdiluição em caldo e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	41
4.9. Atividade citotóxica	42
4.9.1.Preparo do meio de cultura	42
4.9.2.Preparo das amostras	42
4.9.3.Teste de viabilidade celular	42
4.10. Atividade antileishmania	43

4.10.1.Preparo dos meios de cultura, cultivo dos protozoários e preparo das amostras	43
4.10.2.Teste de viabilidade celular	43
4.11. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a spectrometria de massas (CLAE/EM)	44
4.12. Análise estatística	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Composição química e atividades biológicas dos óleos essênciais.....	45
5.1.1.Teor de óleo essencial.....	45
5.1.2.Identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais	46
5.1.3.Aatividades antimicrobiana e antifúngica dos óleos essenciais.....	59
5.1.4.Aatividade antileishmania dos óleos essenciais	62
5.1.5.Capacidade antioxidante e inibição da glicação dos óleos essenciais ..	63
5.2. Extratos da raiz, caule e folhas	64
5.2.1.Determinação do teor de umidade.....	64
5.2.2.Extrato etanólico	65
5.2.3.Partição líquido-líquido dos extratos em etanol	66
5.3. Prospecção fitoquímica, fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides....	66
5.3.1.Prospecção fitoquímica	66
5.3.2.Teores de fenóis totais	70
5.3.3.Teores de proantocianidinas	72
5.3.4.Teores de flavonoides	75
5.4. Atividade antioxidante	77
5.4.1.Análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro radical livre DPPH	77
5.4.2.Análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical peroxil (ORAC)	81

5.5.	Determinação da inibição da atividade de α -amilase, α -glicosidase potencial de inibição de glicação	83
5.5.1.	Avaliação da atividade α -amilase	83
5.5.2.	Avaliação da atividade α -glicosidase	84
5.5.3.	Potencial de inibição de glicação.....	85
5.6.	Atividades antimicrobiana e antifúngica	86
5.6.1.	Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos e partições	86
5.6.2.	Resultados da atividade antifúngica dos extratos e partições	89
5.7.	Identificação dos principais constituintes por CLAE/EM da partição acetato de etila da folha, caule e raiz de <i>B. campestris</i>	92
6.	CONCLUSÕES.....	100
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	ANEXOS.....	123

1. INTRODUÇÃO

1.1. O bioma Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando a área central do Brasil, Figura 1, passando por doze estados brasileiros, englobando as nascentes das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata), o que resulta em um elevado potencial aquífero, favorecendo a sua biodiversidade (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017).

Figura 1. Distribuição do bioma Cerrado no Brasil.



Fonte: (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017).

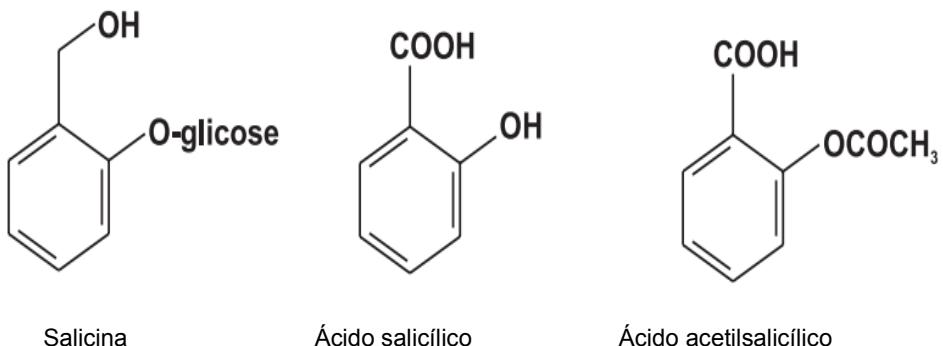
O Cerrado é considerado o *hotspot* da biodiversidade, apresentando grande interesse por pesquisadores de todas as áreas de conhecimento do Brasil e do mundo. Neste sentido, trabalhos de grande importância vêm sendo desenvolvidos neste bioma (BORGES et al., 2015), apresentando uma fauna mais rica do que as savanas do mundo (>7.000 espécies), possuindo altos níveis de endemismo (KLINK; MACHADO, 2005). No entanto, a taxa de desmatamento tem-se elevado anualmente, em função da expansão da fronteira agrícola. Os esforços para a preservação e conservação tem sido irrelevantes (somente 2,2% de sua área que se encontra sob proteção legal), implicando na ameaça de extinção de várias espécies da fauna e da flora, levando a extinção do bioma do cerrado (KLINK; MACHADO, 2005), e ocasionando a diminuição do nível de águas nos rios que são dependentes das nascentes originárias do cerrado para sua existência. Além disso, o cerrado é extremamente rico em diversidade social, onde vivem populações indígenas, quilombolas entre outras, que sobrevivem dos recursos naturais oriundos deste bioma, constituindo-se em uma riqueza de patrimônio histórico e cultural brasileiro (AGUIAR et al., 2016).

1.2. Metabólitos secundários

Desde a antiguidade, a humanidade tem despertado o interesse em buscar princípios ativos provenientes de extratos vegetais capazes de aliviar e curar doenças. Uma das primeiras formas de aplicação de produtos naturais se deu por intermédio da ingestão de ervas, folhas e raízes. A partir do último século, despertou-se o interesse em plantas utilizadas pela medicina popular pelo fato de sintetizarem uma diversidade de estruturas químicas biologicamente ativas (COMPEAN; YNAL-VEZ, 2014; KARUPPUSAMY, 2009; VINING, 1990).

Desde então, os químicos vêm se dedicando a estudar as sustâncias químicas encontradas em plantas provenientes de todos os biomas existentes. Esses estudos relacionados com a extração de princípios ativos de plantas com propriedades medicinais resultam atualmente na produção de diversos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Com o avanço do conhecimento, foi possível sintetizar vários princípios ativos encontrados até então na natureza, como por exemplo, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico (aspirina), fármacos desenvolvidos a partir de salicilatos, Figura 2, obtidos de *Salix alba* (salgueiro) (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006).

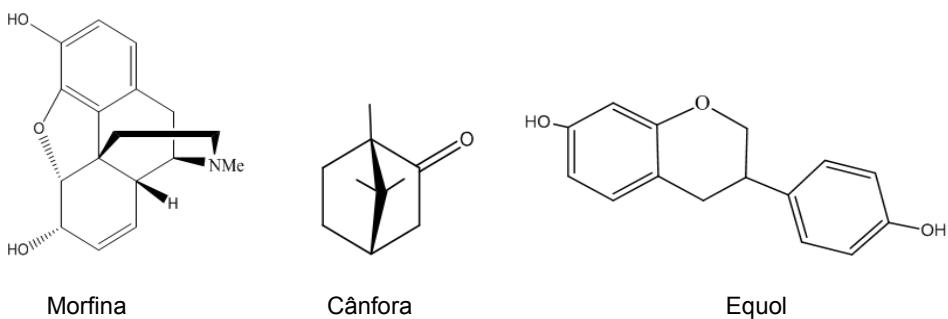
Figura 2. Representação dos salicilatos desenvolvidos como fármacos no período de 1800-1900.



Fonte: (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006).

A atividade metabólica é uma das características presentes nos seres vivos. O metabolismo consiste em reações químicas que ocorrem no interior das células. Diante da diversidade dos compostos presentes nos seres vivos, há alguns que são essenciais para a vida da célula, sendo conhecidos como metabólitos primários (MP), outros não necessários, são designados de metabólitos secundários (MS) (LOBO; LOURENÇO, 2007). Entre os MP, destacam-se os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, polissacarídeos, proteínas e lipídeos que possuem uma distribuição universal nas plantas. Enquanto os MS não apresentam essa mesma distribuição, em função de não serem necessários para completar o ciclo de vida da planta, porém cumprem um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Exemplos de metabólitos secundários são apresentados na Figura 3.

Figura 3. Exemplos de metabólitos secundários.



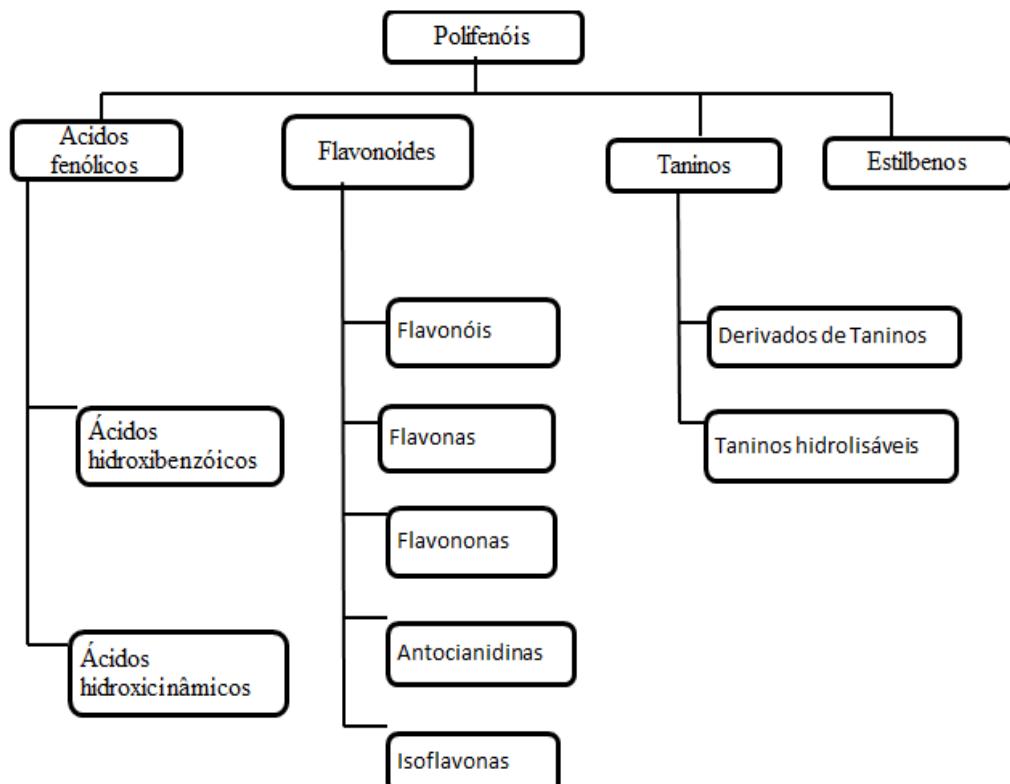
Fonte: (LOBO; LOURENÇO, 2007).

Os metabólitos secundários podem ser classificados com base na estrutura química (por exemplo, presença de anéis e açúcares), na composição (nitrogenados ou não) e na sua solubilidade em diferentes solventes. Além disso, podem ser classificados de acordo com suas vias biossintéticas (TIWARI; RANA, 2015), existindo três principais grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (GARCIA; CARRIL, 2009; LOBO; LOURENÇO, 2007; SIMÕES et al., 2004).

1.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados por apresentarem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas e as suas estruturas podem variar desde uma molécula fenólica simples, até mesmo a polimérica (OZCAN et al., 2014; ANGELO; JORGE, 2007). Quando presentes em vegetais podem estar na forma livre ou complexada a açúcares e proteínas, sendo distribuídos em quatro classes principais: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e estilbenos, Figura 4.

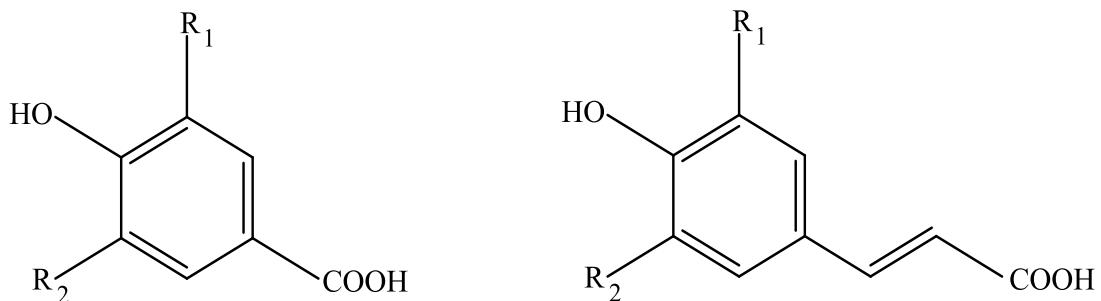
Figura 4. Principais classes de compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de Ozacan et al., 2014.

Os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos: ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, Figura 5. Dentre os ácidos hidroxibenzóicos incluem: gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuíco, vanílico e siríngico que tem estrutura C₆-C₁. Já os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C₆-C₃), entre os quais se destacam os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico sendo os mais comuns (BALASUNDRAM et al., 2006).

Figura 5. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.



Ácido *p*-hidroxibenzóico: R₁ = R₂ = H

Ácido protocatecuíco R₁ = OH, R₂ = H

Ácido vanílico R₁ = OCH₃, R₂ = H

Ácido siríngico R₁ = R₂ = OCH₃

Ácido *p*-cumárico: R₁ = R₂ = H

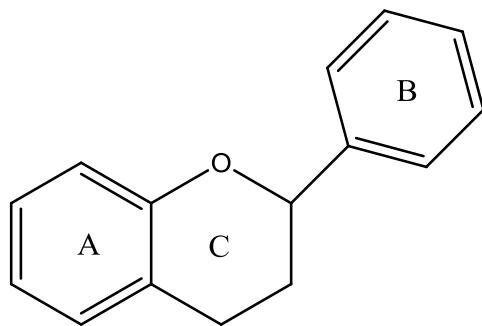
Ácido caféico: R₁ = OH, R₂ = H

Ácido ferúlico: R₁ = OCH₃, R₂ = H

Fonte: (ANGELO; JORGE, 2007).

Os flavonóides se constituem em uma ampla classe de compostos fenólicos naturais provenientes das plantas. Eles apresentam uma série de propriedades bioquímicas e farmacológicas de interesse, tais como, estruturas polifenólicas de baixo peso molecular, com quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental constituído de dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado (C) formando um sistema (C₆-C₃-C₆) (IGNAT et al., 2011), Figura 6.

Figura 6. Estrutura básica dos flavonoides.



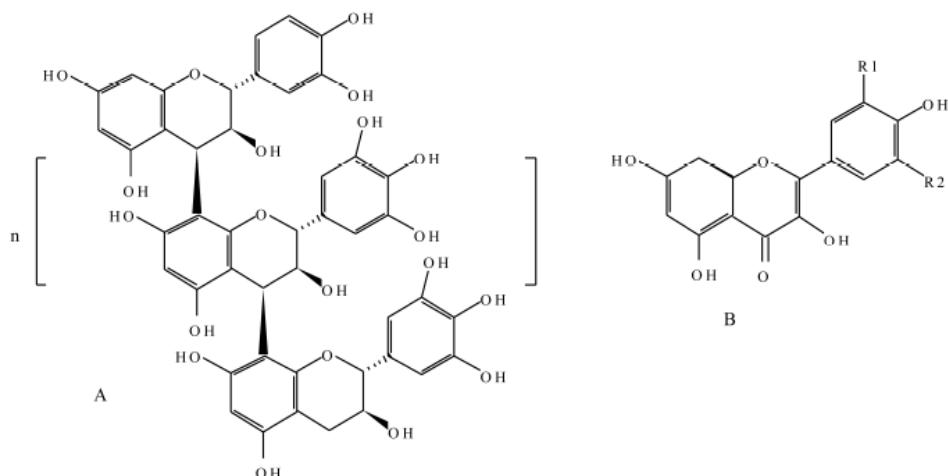
Fonte: O autor.

Pequenas diferenças nos padrões de substituição da estrutura básica originam vários subgrupos, sendo as mais importantes as flavanonas, flavanols, flavonas, isoflavonas e antocianidinas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBLYA, 2002).

Outra classe de compostos fenólicos são os taninos, que são polifenóis de massa molecular entre 500 a 3000 Da e são classificados de acordo com a sua estrutura química em taninos hidrolisáveis e condensados.

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e elágicos glicosilados, formados a partir da rota do ácido chiquímico, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Já os taninos condensados ou proantocianidinas são oligômeros de flavan-3-ol (catequina) em união ao flavan-3,4-diol (leucoantocianidinas). As unidades de flavan-3-ol estão ligadas pelo carbono 4 de uma estrutura com carbono 8 da outra (BHEKUMTHETHO; VAN STADEN, 2015; OZCAN et al., 2014; ANGELO; JORGE, 2007), conforme Figura 7.

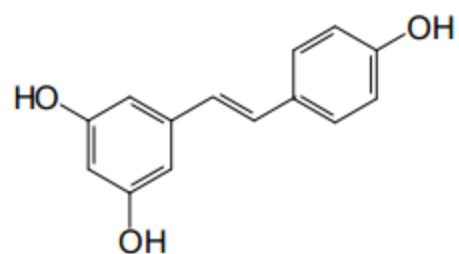
Figura 7. Estrutura química de uma (a) proantocianidina constituída pela catequina e unidades poliméricas de epicatequina, (b) estrutura genérica flavonóide. Kaempferol, R1=H, R2=H; Quercetina, R1=OH, R2=H; Miricetina, R1=OH, R2=OH.



Fonte: (BHEKUMTHETHO; VAN STADEN, 2015).

Os estilbenos são estruturalmente caracterizados pela presença de um núcleo de 1,2-difeniletíleno com o grupo hidroxila como substituinte nos anéis aromáticos. Eles existem na forma de monômeros ou oligômero, sendo mais conhecido o *trans*-resveratrol, Figura 8, possuindo um esqueleto de tri-hidroxiestileno (BASTOS et al., 2009; HAN et al., 2007). As principais fontes dietéticas de estilbenos se encontram na uva, vinho, soja e amendoim.

Figura 8. Estrutura química do *trans*-resveratrol.



Fonte: (BASTOS et al., 2009).

A heterogeneidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes como mostradas na Tabela 1 (ANGELO; JORGE, 2007).

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ – C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos.	C ₆ – C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides.	C ₆ – C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ – C ₄
Xantonas	C ₆ – C ₁ – C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ – C ₂ – C ₆
Flavonoides, isoflavonoides	C ₆ – C ₃ – C ₆
Lignanas e neolignanas	(C ₆ – C ₃) ₂
Biflavanóides	(C ₆ – C ₃ – C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ – C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ – C ₃ – C ₆) _n

Fonte: (ANGELO; JORGE, 2007).

1.2.2. Terpenos

Os terpenos (isoprenóides) são uma classe de substâncias provenientes de diversas plantas que apresentam uma diversidade de compostos. Esta classe de compostos apresenta uma variedade de propriedades farmacológicas, tendo sido atestada por inúmeros estudos (*in vitro*, pré-clínicos e clínicos) que confirmam suas propriedades (LANGE; AHKAMI, 2013). São insolúveis em água e seus derivados obtidos a partir da união de unidades isopreno (C5), sendo classificados em: (i) monoterpenos (C10); (ii) sesquiterpenos (C15); (iii) diterpenos (C20); (iv) triterpenos (C30) e (v) tetraterpenos (C40) (GARCIA; CARRIL, 2009), conforme apresentado na Tabela 2.

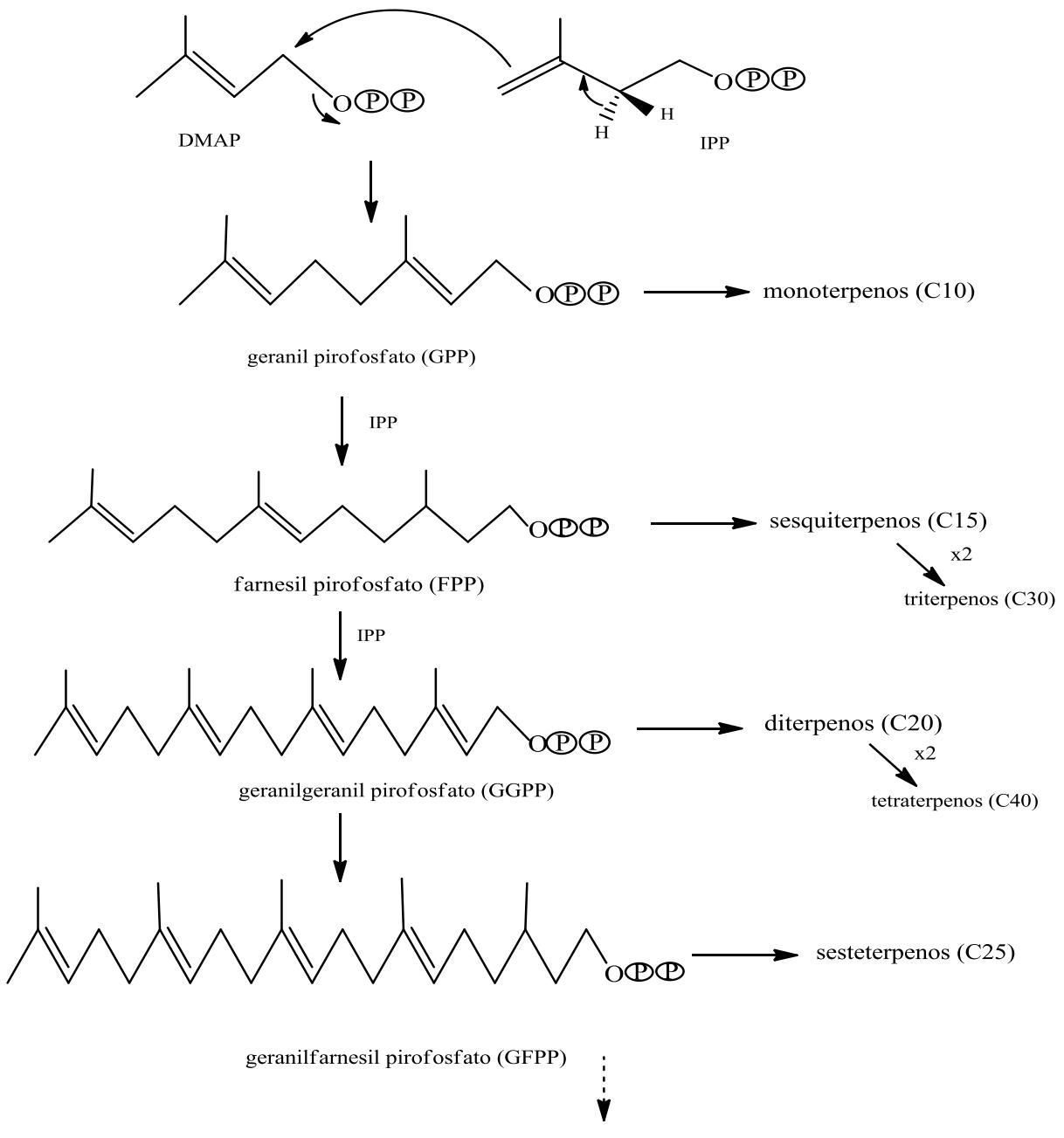
Tabela 2. Classificação dos terpenos com base no número de unidades de isopreno.

Átomos de Carbono	Unidades/Isoprénicas	Classificação
10	2	Monoterpeno
15	3	Sesquiterpeno
20	4	Diterpeno
25	5	Sesterterpeno
30	6	Triterpeno
40	8	Tetraterpeno

Fonte: O autor.

Os terpenos são sintetizados a partir dos intermediários de 3,3'-dimetilalil pirofosfato (DMAP) e 3-isopentenil pirofosfato (IPP) que são obtidos através de duas vias biossintéticas: mevalonato e fosfato de deoxilulose. As moléculas de DMAP e IPP se combinam por reação de condensação (cauda-cabeça) para formar terpenos maiores, Figura 9. Esta reação é catalisada pela enzima prenil-transferase levando a formação da cadeia de geranil pirofosfato (GPP), que é a precursora dos monoterpenos. A condensação da cadeia de C10 com novas unidades de IPP leva a formação de cadeias de farnesil pirofosfato (FPP) C15, geranilgeranil pirofosfato (GGPP) C20 e geranilfarnesil pirofosfato (GFPP) C25, sendo precursoras, respectivamente, dos sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos. Além disso, pode ocorrer a condensação de duas cadeias de FPP e de duas cadeias de GGPP, levando a obtenção dos triterpenos e tetraterpenos, respectivamente (DEWICK, 2009; LOBO; LOURENÇO, 2007).

Figura 9. Reação de condensação entre as unidades de DMAP e IPP formando os terpenos.



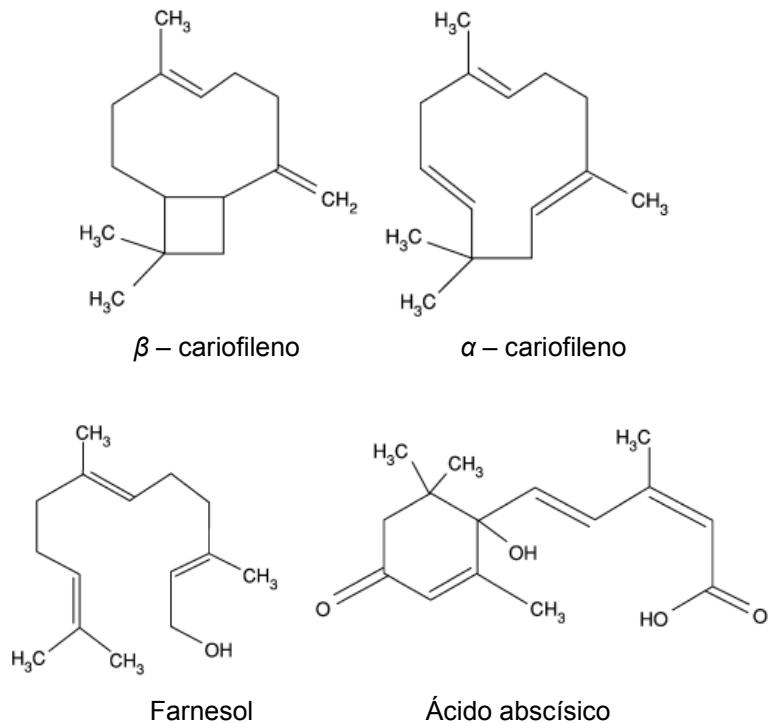
Fonte: (LOBO; LOURENÇO, 2007).

Os monoterpenos são substâncias de ocorrência natural, sendo constituinte dos óleos de fragrância extraídos das folhas. Diversos estudos demonstraram que alguns monoterpenos possuem atividades quimioterápicas contra vários tipos de câncer, entre eles: D-limoneno, álcool perílico, carvacrol, D-carvona e geraniol (SHARMA et al., 2017).

Os sesquiterpenos são substâncias encontradas nos óleos essenciais de plantas, possuindo propriedades farmacológicas e funcionando como feromônios e

hormônios juvenis. Podem ser divididos em duas classes: (i) acíclica e a (ii) cíclica (GRABMANN, 2005; BRUNETON, 2001). Alguns sesquiterpenos são representados pela Figura 10.

Figura 10. Estruturas de alguns sesquiterpenos importantes.



Fonte: (GRABMANN, 2005).

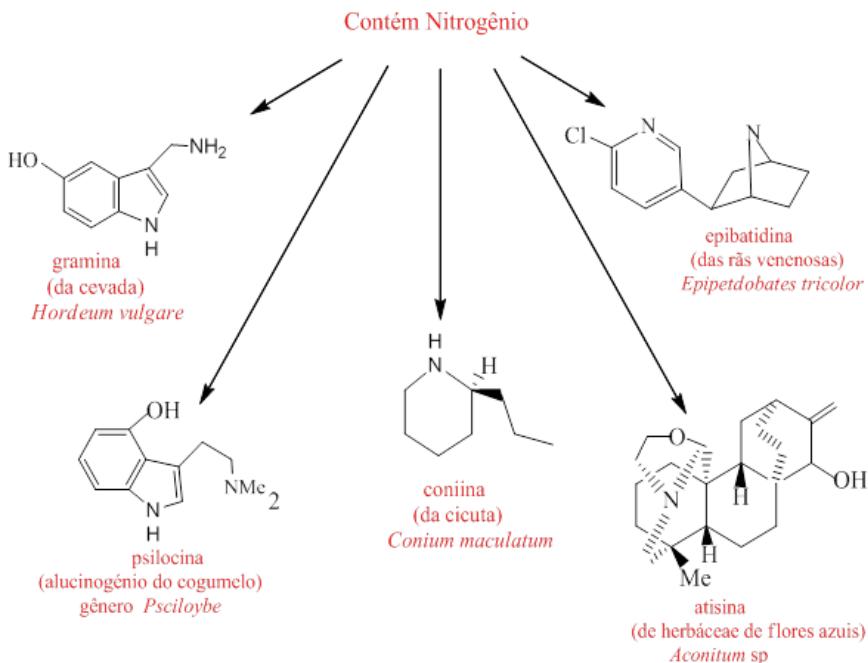
Os diterpenos são constituídos por um grupo de compostos C₂₀, sendo formado a partir da biossíntese do GGPP, possuindo diversas propriedades, entre as quais: (i) edulcorantes: esteviosídeo (isolado da espécie *Stevia rebaudiana*, Asteraceae) e (ii) farmacológicas: paclitaxel (isolado das cascas das árvores do gênero *Taxus*) comercializado como taxol (GRABMANN, 2005; WAGNER; EMADFA, 2003; BRUNETON, 2001).

1.2.3. Alcaloides

O termo alcaloide foi proposto por W. Meissner no século XIX, para designar compostos básicos de origem natural que apresentam nitrogênio em sua composição química (DEWICK, 2009), possuindo propriedades farmacológicas (CABRAL; PITA, 2015; DEWICK, 2009), podendo ser classificados de acordo com a sua origem

biossintética, sendo derivado em grande parte de aminoácidos alifáticos, aromáticos como a fenilalanina, tirosina, e o triptofano (LOBO; LOURENÇO, 2007), conforme Figura 11.

Figura 11. Exemplos de alcaloides.



Fonte: Adaptado de LOBO e LOURENÇO, 2007.

1.3. Óleos essenciais

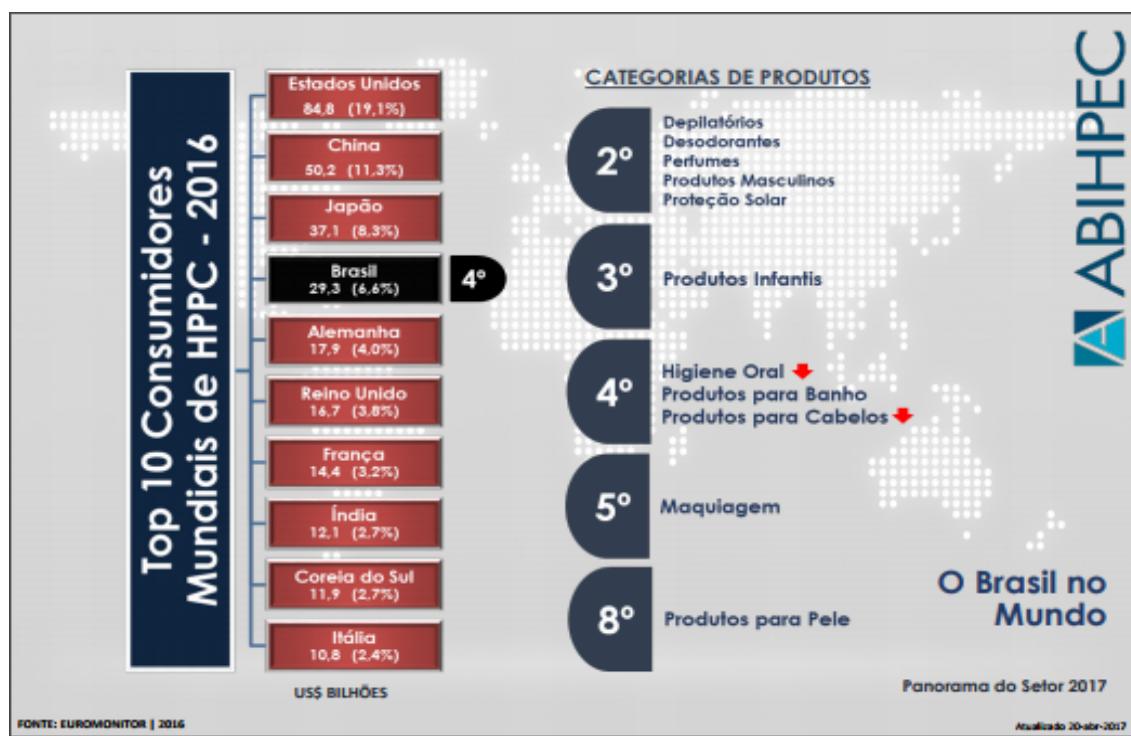
Os óleos essenciais são constituídos por substâncias voláteis que possuem componentes aromáticos, conferindo odor e sabor. São provenientes de mais de 17.500 espécies de plantas pertencentes a diversas famílias, incluindo *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Lamiaceae* e *Asteraceae* (REGNAULT-ROGER et al., 2012), podendo ser obtidos como subprodutos do metabolismo de plantas e são comumente referidos como metabólitos secundários.

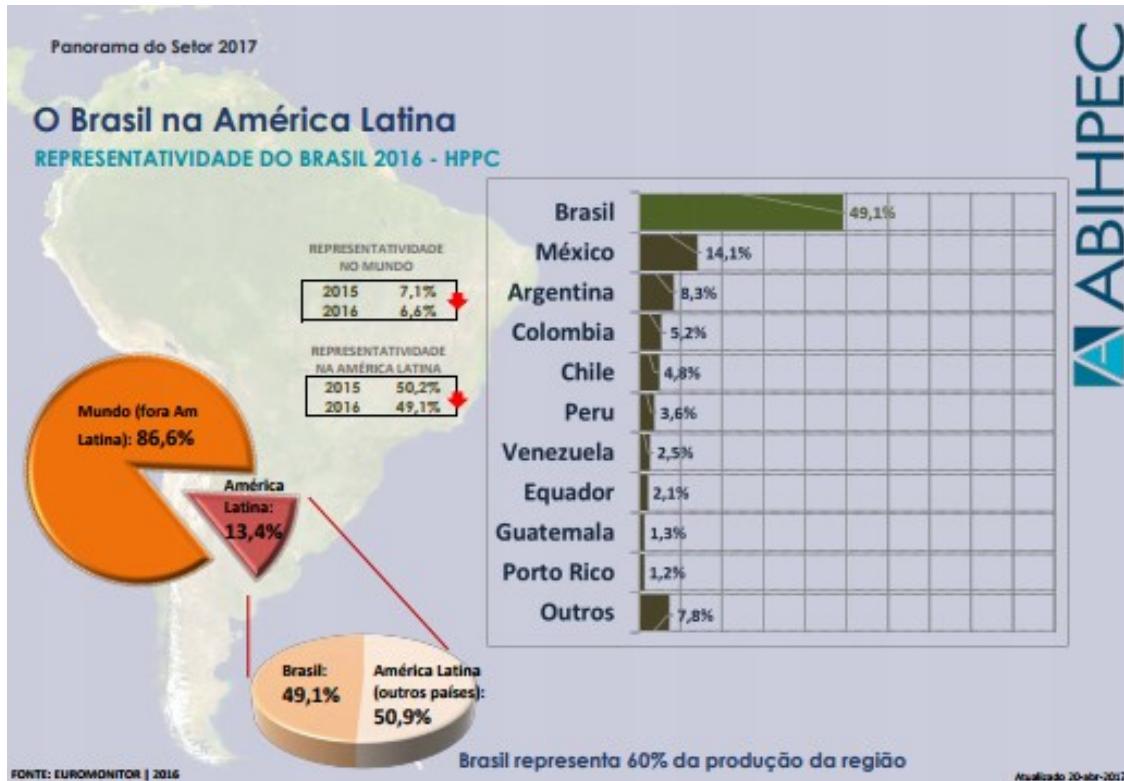
Os óleos essenciais podem ser encontrados e obtidos de diferentes partes das plantas, tais como: (i) flores (laranja); (ii) folhas (limão e eucalipto), (iii) madeira (sândalo); (iv) raízes (gramia); (v) rizomas (gingibre); (vi) frutas (erva-doce e anis); (vii) sementes (noz-moscada) entre outros (REGNAULT-ROGER et al., 2012). Além disso, auxiliam a planta em várias funções, incluindo: (i) atração de polinizadores; (ii)

proteção contra a variação de temperaturas e (iii) repelente contra pragas e/ou microrganismos (PAVELA, 2015).

Os óleos essenciais se constituem em uma das principais matérias-primas na indústria de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosmético (HPPC) sendo o Brasil o quarto maior mercado mundial e o primeiro na América Latina, produzindo 60% de HPPC (ABIHPEC, 2017), Figura 12. Diversos outros setores empregam os óleos essenciais, tais como o setor alimentício, químico e de medicamentos (MIRANDA et al., 2016; SOUZA et al., 2010). A maior parte dos óleos essenciais produzidos no Brasil é proveniente do subproduto obtido da indústria de suco de laranja, representando 50% da produção mundial de óleo essencial oriunda desta cultura (SPEZIALI, 2012; BIZZO et al., 2009).

Figura 12. Panorama do setor HPPC 2017 (a) consumo mundial e (b) consumo na América Latina.





Fonte: (ABIHDPEC, 2017).

Os óleos essenciais possuem em sua composição uma variedade de moléculas voláteis, tais como: terpenos, terpenoídes, compostos alifáticos e aromáticos derivados do fenol que possuem propriedades bactericidas e fungicidas (KNEZEVIC et al., 2016; AKTHAR et al., 2014).

1.4. Atividade antioxidante

Atualmente, diversos estudos demonstram que o consumo de frutas e vegetais aumenta o teor de substâncias que possuem propriedades antioxidantes, tais como os compostos fitoquímicos (polifenóis) que atuam na prevenção de algumas doenças relacionadas ao envelhecimento. Em função disso, o consumo mundial de produtos e derivados ricos em substâncias com estas propriedades, vem ganhando mercado em função dos benefícios à saúde e as propriedades terapêuticas atribuídas (SUCUPIRA et al., 2012; KEVERS et al., 2011).

Os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos ou naturais. Os sintéticos são utilizados como aditivos nos alimentos para prevenir ou retardar a oxidação lipídica durante o processo de armazenamento, sendo empregado há várias déca-

das (CHORILLI et al., 2007; MAIA, 2007). Porém, seu uso vem sendo reduzido em função da segurança alimentar e demanda por produtos com menos aditivos químicos (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015; CAROCHO; FERREIRA, 2012). Já os antioxidantes naturais são provenientes de flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis, vitamina C, carotenoides, entre outros. Sendo que os compostos fenólicos podem ocorrer em todas as partes das plantas entre os quais: frutos, sementes, folhas, caule e raízes (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015; COTINGUIBA et al., 2013).

1.5. Atividade antimicrobiana

A resistência microbiana está relacionada à capacidade de perda de eficácia dos antibióticos de forma rápida frente a organismos patogênicos, que em alguns anos poderão não conseguir combater as diversas infecções geradas pelas bactérias. Diante disso, existe a necessidade de estudos visando novos compostos com propriedades antimicrobianas, sendo relevante investir em pesquisas que visem identificar novas substâncias moleculares ativos. Para tanto, as plantas se apresentam como fonte de pesquisa para identificação de novos metabólitos que possuam tais propriedades, uma vez que já se conhece diversas propriedades medicinais (KALAYCI, 2016; MICKYMARAY et al., 2016; MONTE et al., 2014).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que identificam a atividade antimicrobiana com diversas espécies de plantas (COSTA et al., 2017; CHINSEMBU, 2015; BANERJEE et al., 2014; VIEIRA et al., 2014; CUNHA et al., 2013; FREITAS et al., 2013; OSTROSKY et al., 2008) evidenciando-se em uma importante fonte para a busca de novos compostos biologicamente ativos.

1.6. Atividade antileishmania

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários intracelulares que pertencem ao gênero *Leishmania*. Podem ser transmitidas ao homem e outros mamíferos por insetos fêmeas de flebotomíneos, causando doenças como a leishmaniose e a Chagas. Estas doenças são oriundas de condições precárias de saneamento básico, constituindo-se em um dos principais problemas de saúde pública que afeta a população mais carente, estando entre as doenças mais negligenciadas do mundo (COSTA et al., 2016).

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS) a leishmaniose é uma doença endêmica em 98 países, com uma incidência de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos por ano. O tratamento consiste, em parte, no uso de medicamentos incluem os pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e antimoniato de meglumina, que são tóxicos e geralmente apresentam efeitos adversos no paciente (ROSA, 2017; TAYLOR et al., 2011).

Embora tenha ocorrido um aumento de publicações nos últimos anos em relação à obtenção de substâncias com potencialidades para tratar a leishmaniose, ainda é necessário um maior investimento de recursos em pesquisas nesta área (BRITO et al., 2013).

1.7. Gênero *Banisteriopsis*

A família Malpighiaceae, apresenta 77 gêneros e aproximadamente 1300 espécies que englobam trepadeiras, árvores e arbustos, possuindo sua maior diversidade na América do Sul (DAVIS; ANDERSON, 2010; SOUZA; LORENZI, 2008). No Brasil, esta família é representada por 44 gêneros e aproximadamente 561 espécies, sendo encontradas majoritariamente em biomas do Cerrado (MAMEDE et al., 2015; CONCEIÇÃO et al., 2011). As espécies mais conhecidas são frutíferas, entre as quais a acerola (*Malpighia glabra*) e o murici (*Byrsonima crassa*), que podem ser consumidos na forma *in natura*, sucos, sorvetes, geleias, doces, entre outros. Além disso, possuem um grande potencial medicinal, uma vez que diversos estudos revelaram a presença de substâncias antioxidantes tais como taninos, flavonoídes, catequinas, terpenoídes, proantoncianidinas entre outros. As propriedades biológicas, tais como anticancerígena, antiviral e antibacteriana já foram determinadas (SANTOS et al., 2017; VERDAM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2011).

O gênero *Banisteriopsis*, possui 92 espécies encontradas na América do Sul, com ocorrência na Bolívia, Equador, Colômbia, Peru e Brasil. No Cerrado, este gênero é encontrado na forma de liana, arbusto e árvores de pequeno porte (ARAÚJO, 2014). Algumas espécies se aprimoraram nas diversas fitofisionomias do Cerrado, como *B. argyrophilla*, enquanto outras espécies são limitadas a determinados *habitats*, evidenciando uma distribuição mais pontual como a apresentada por *B. verno-niifolia* que ocorre em campos rupestres. Assim, espécies deste gênero no Cerrado

podem ocupar a mesma área geográfica, pertencendo a diferentes espécies com características bem restritas, destacando umas das outras (LIMA, 2005). No Brasil, foram identificadas 47 espécies deste gênero, sendo que 34 destes são endêmicas, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Espécies de plantas do gênero *Banisteriopsis* de ocorrência no Brasil.

Nome Científico	Origem	Endemismo	Domínios Fitogeográficos
<i>Banisteriopsis acerosa</i> (Nied.) B.Gates	Nativa	Não	Cerrado
<i>Banisteriopsis adenopoda</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado, Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis andersonii</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis angustifolia</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado
<i>Banisteriopsis anisandra</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Não	Cerrado
<i>Banisteriopsis arborea</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis argyrophylla</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Não	Cerrado
<i>Banisteriopsis basifixa</i> B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis byssacea</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis caapi</i> (Spruce ex Griseb.) Morton	Nativa	Não	Amazônia
<i>Banisteriopsis calcicola</i> B.Gates	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado
<i>Banisteriopsis campestris</i> (A. Juss.) Little	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado
<i>Banisteriopsis cipoensis</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis confusa</i> B.Gates	Nativa	Não	Amazônia, Cerrado
<i>Banisteriopsis gardneriana</i> (A. Juss.) W.R.Anderson & B.Gates	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado
<i>Banisteriopsis goiana</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis harleyi</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado

Continuação da Tabela 3

Nome científico	Origem	Endemismo	Domínios Fitogeográficos
<i>Banisteriopsis hatschbachii</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis hirsuta</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis irwinii</i> B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis laevifolia</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Amazônia, Cerrado
<i>Banisteriopsis latifolia</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis lyrata</i> B.Gates	Nativa	Não	Amazônia
<i>Banisteriopsis magdalensis</i> B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis malifolia</i> (Nees & Mart.) B.Gates	Nativa	Sim	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis martiniana</i> (A. Juss.) Cuatrec.	Nativa	Não	Amazônia
<i>Banisteriopsis megaphylla</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Cerrado
<i>Banisteriopsis membranifolia</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Amazônia, Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis multifoliolata</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis muricata</i> (Cav.) Cuatrec.	Nativa	Não	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis nummifera</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Não	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis oxyclada</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Não	Amazônia, Caatinga, Cerrado
<i>Banisteriopsis paraguariensis</i> B.Gates	Nativa	Não	Cerrado
<i>Banisteriopsis parviflora</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis parviglandula</i> B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica

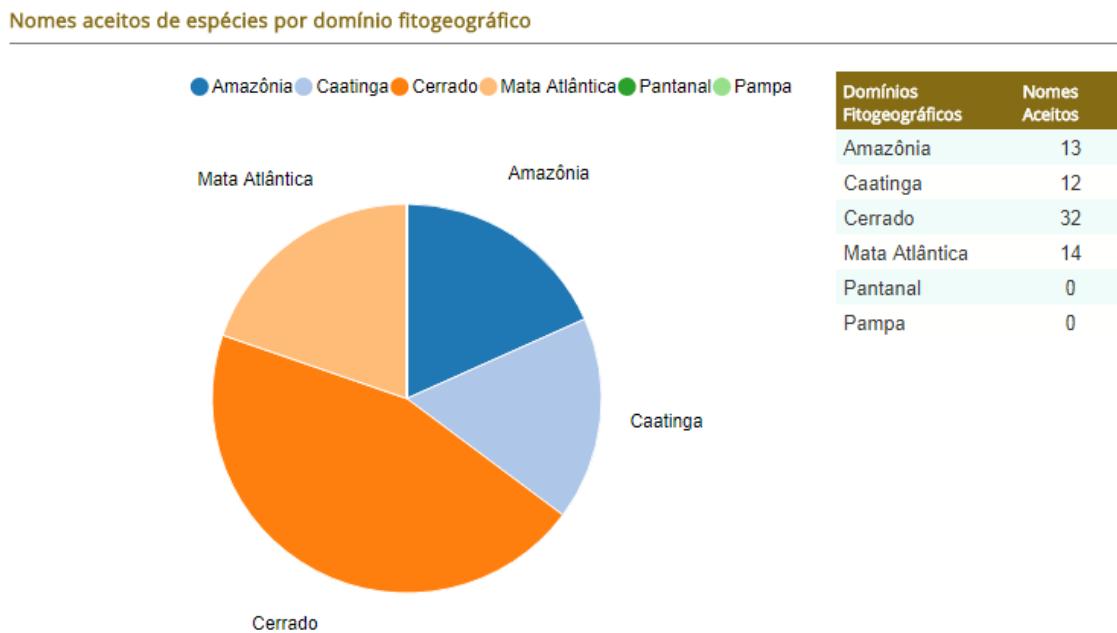
Continuação da Tabela 3

Nome científico	Origem	Endemismo	Domínios Fitogeográficos
<i>Banisteriopsis prancei</i> B.Gates	Nativa	Sim	Amazônia, Cerrado
<i>Banisteriopsis pseudojanusi</i> (Nied.) B.Gates	Nativa.	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis pulchra</i> B.Gates	Nativa	Não	Cerrado
<i>Banisteriopsis quadriglandula</i> B.Gates	Nativa	Sim	Caatinga
<i>Banisteriopsis salicifolia</i> (DC.) B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis schizoptera</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado
<i>Banisteriopsis schwannioides</i> (Griseb.) B. Gates	Nativa	Sim	Amazônia
<i>Banisteriopsis scutellata</i> (Griseb.) B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis sellowiana</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Mata Atlântica
<i>Banisteriopsis stellaris</i> (Griseb.) B.Gates	Nativa	Sim	Amazônia, Caatinga, Cerrado
<i>Banisteriopsis variabilis</i> B.Gates	Nativa	Não	Cerrado
<i>Banisteriopsis verneriiifolia</i> (A. Juss.) B.Gates	Nativa	Sim	Caatinga, Cerrado

Fonte: (MAMEDE et al., 2015).

Dentre os domínios fitogeográficos, o Cerrado é o que apresenta maior parte de plantas do gênero *Banisteriopsis*, 32 das 47 conhecidas, entre as quais: *B. arborea*; *B. cipoensis*; *B. goiana* entre outras. Algumas espécies estão distribuídas por todo território brasileiro, *B. malifolia* (Nees & Mart.); *B. muricata* (Cav.) Cuatrec e *B. nummifera* (A. Juss.). A Figura 13 resume as espécies por domínio fitogeográfico.

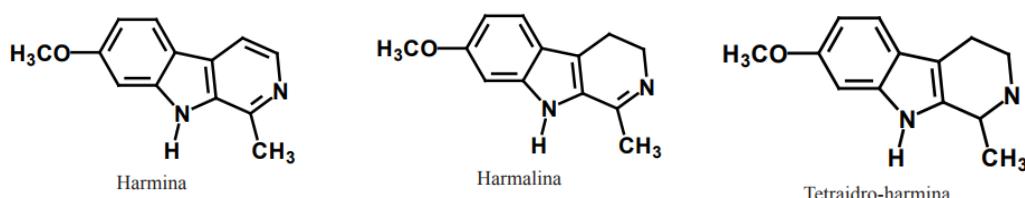
Figura 13. Resumo das espécies de *Banisteriopsis* em regiões do Brasil por domínio fitogeográfico.



Fonte: (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017).

Na literatura, são encontrados vários estudos com *Banisteriopsis*, sendo a *Banisteriopsis caapi* uma das espécies mais estudadas deste gênero. Esta espécie possui compostos alucinógenos, sendo produzida a partir do seu extrato uma bebida psicoativa conhecida por *ayahuasca*, utilizada por indígenas e grupos religiosos. Esta espécie possui como componentes principais os alcaloides β -carbolínicos, tais como: (i) harmina (HRM), também conhecida como telepatina; (ii) harmalina (HRL) e (iii) tetraidro-harmina (THH) (SCHENBERG et al., 2015; DE SOUZA, 2011; PIRES et al., 2010). A estrutura destes alcaloides β -carbolínicos, é apresentada na Figura 14.

Figura 14. Estrutura química de alcaloídes β -carbolínicos.



Fonte: (PIRES et al., 2010).

Além disso, existem estudos referentes às atividades antimicrobianas, alelopáticas, citotóxica e antifúngica dos constituintes de extratos de folhas e raízes de *B. anisandra* (PÁDUA et al., 2013; FREITAS et al., 2011). Para a espécie *B. laevifolia* estudos das folhas apontam atividade antimicrobiana e citotóxica (NUNES et al., 2016). Já a *B. argyrophylla* possui atividade antioxidante e antifúngica presentes no extrato da folha desta espécie (OLIVEIRA, 2016). Para *B. oxyclada* avaliaram atividades biológicas dos extratos da folha, caule e raiz (MARTINS, 2018). Em outro estudo referente à *B. pubipetala*, avaliou-se a presença de compostos voláteis nas sementes por Headspace, perfil graxo por CG-EM e as propriedades físico-químicas do óleo extraído das sementes (PRAZERES et al., 2017).

1.7.1. Estudos referentes à *Banisteriopsis campestris*

Na família Malpighiaceae encontra-se a espécie *Banisteriopsis campestris*, sendo endêmica do Brasil com distribuição geográfica nos biomas da Caatinga e do Cerrado. Ela é popularmente conhecida como cipó prata e utilizada na medicina popular como diurético, no tratamento de problemas renais e anti-inflamatórios por meio dos seus ramos, folhas e flores (PÁDUA et al., 2013; ISHARA et al., 2008; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Esta espécie apresenta as seguintes características: (i) é um arbusto que raramente excede a 1,5m de altura, (ii) seus ramos apresentam poucas subdivisões, (iii) suas folhas podem alcançar 7 cm de comprimento e 5 cm de largura e (iv) as folhas apresentam um par de nectários extraflorais na base da nervura principal, Figura 15. A fenologia de *B. campestris* é marcadamente sazonal, com florescimento ocorrendo de dezembro a fevereiro e a frutificação (samaras) em janeiro. A folhagem ocorre de setembro a dezembro. No período de maio a setembro (seca), as plantas perdem suas folhas ficando em estado avançado de senescência e sem nectários extraflorais ativos (SILVA; DEL-CLARO, 2013).

Figura 15. Imagem da espécie *Banisteriopsis campestris*.



Fonte: O autor.

A literatura apresenta uma ampla lista de trabalhos florísticos e/ou taxonômicos contemplando a *B. campestris*, entre os quais estudos estruturais e de ontogênese de frutos e semente desta espécie comparado ao das espécies *B. oxyclada*, *B. stellaris* e *Diplopterys pubipetala* e com outras espécies da família (SOUTO; OLIVEIRA, 2008). Existem ainda trabalhos referentes à composição florística, frequência e distribuição nas áreas de Cerrado (ARAUJO; MEIRA, 2016; SOUTO; OLIVEIRA, 2012; ISHARA et al., 2008).

Frias e colaboradores (2012) verificaram a presença de flavonóides nas flores e folhas de *B. anisandra*, *B. campestris*, *B. laevifolia* e *B. malifolia* por triagem fitoquímica qualitativa. Barônio e colaboradores (2017) investigaram a importância da composição química do óleo essencial das flores de três espécies de *Banisteriopsis*, incluindo, *B. campestris* para a manutenção e sobrevivência de 31 espécies de abelhas.

2. JUSTIFICATIVA

Pelo levantamento bibliográfico, observou-se a existência de trabalhos que estão relacionados exclusivamente com estudos botânicos e taxonômicos da espécie *Banisteriopsis campestris*. Por outro lado, a literatura é escassa de trabalhos relacionados à composição química, atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antileishmania e inibitória de α -amilase e α -glicosidase para a espécie, constituindo-se um amplo campo de conhecimento a ser ainda explorado. Para tanto o presente trabalho busca investigar o potencial químico e biológico dos óleos essenciais, extratos e partições obtidos das flores, folhas, caule e raízes da espécie *B. campestris*.

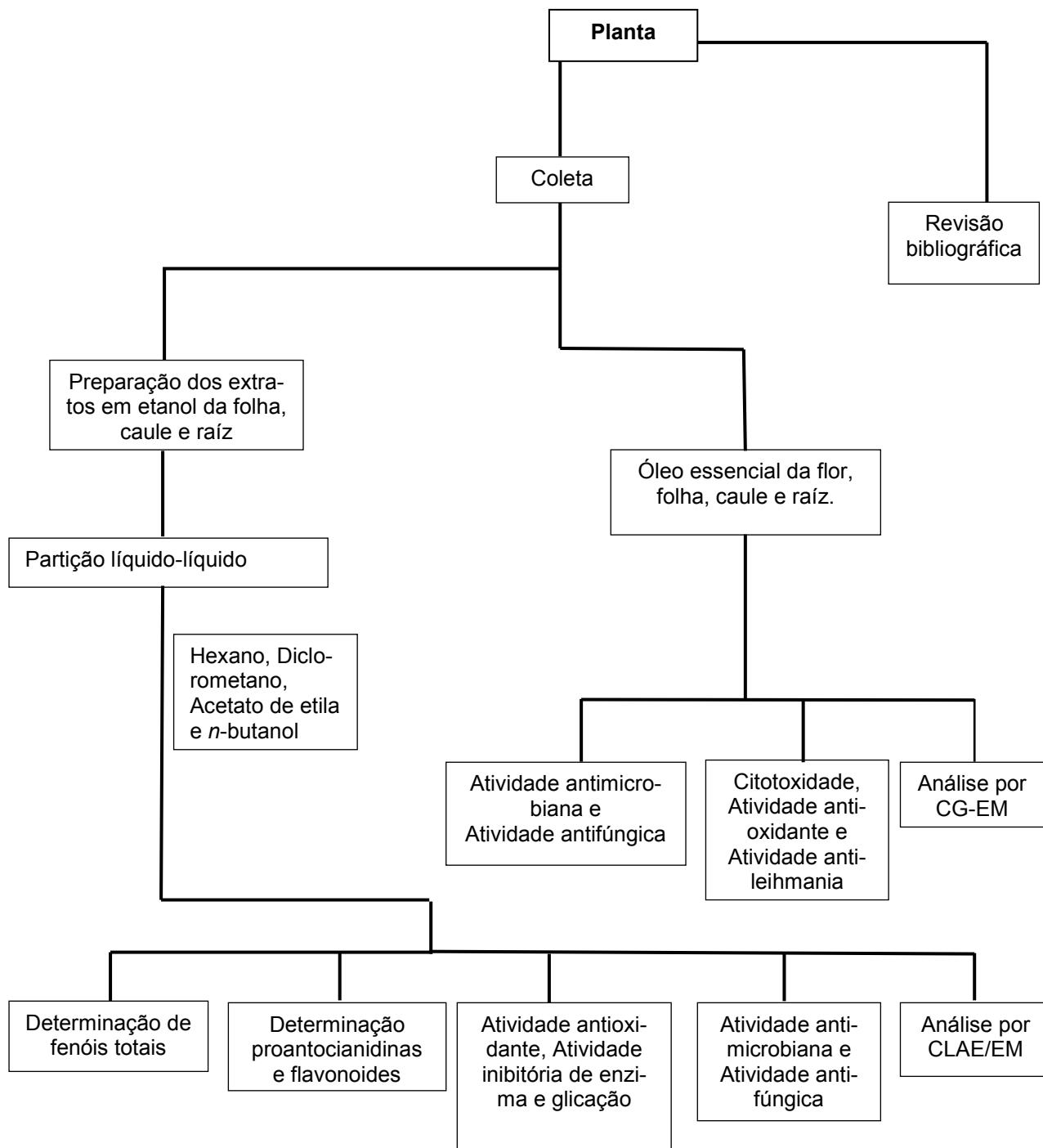
3. OBJETIVOS

Analisar e quantificar os constituintes químicos obtidos a partir dos extratos, partições e óleos essenciais provenientes das diversas partes da espécie *Banisteriopsis campestris* (flores, folhas, caule e raiz), bem como avaliar possíveis atividades biológicas associadas às substâncias presentes nas diversas partes desta espécie.

4. METODOLOGIA

A Figura 16 mostra um fluxograma dos trabalhos efetuados para planta *Banisteriopsis campestris*.

Figura 16. Fluxograma do trabalho.



Fonte: O autor.

4.1. Coleta e identificação da espécie

As amostras das espécies *Banisteriopsis campestris* foram coletadas entre os meses de janeiro a agosto de 2015 na reserva particular do Clube Caça e Pesca Itororó localizado no município de Uberlândia MG, segundo as coordenadas geográficas: 18° 58'56.1" S, 48° 17'46.0"W. Posteriormente levadas e acondicionadas no laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQUFU). Identificação botânica foi feita pela pesquisadora Dr. Maria Candida Henrique Mamede do Instituto de Botânica de São Paulo. Espécimen testemunha foi herborizado e incorporado ao acervo do Herbário Uberlandenses do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob o registro de número 72.462 para *Banisteriopsis campestris*.

4.2. Análises Químicas

4.2.1. Preparo das amostras

No laboratório, as amostras de *B. campestris* foram separadas em folhas, caule e raiz, acondicionadas após colheita a temperatura ambiente (27 °C) pelo período de 7 dias com o intuito de reduzir o teor de umidade a menos de 10%. Para se confirmar se o teor de umidade foi alcançado, utilizou-se uma balança de luz infravermelha, para isso pesou-se aproximadamente 1,00 g de amostra que foi aquecida até 105 °C e posteriormente efetuou-se a leitura do teor de umidade. Após o período de secagem, as amostras foram picadas e trituradas em um liquidificador, armazenadas em frascos de polietileno e acondicionadas a aproximadamente -18 °C para posteriormente ser efetuado o preparo dos extratos.

Para obter os óleos essenciais, utilizaram-se amostras frescas (flores, folhas, caules e raízes) que foram coletadas no período da manhã a fim de se minimizar a taxa de volatilização dos constituintes.

4.3. Obtenção dos óleos essenciais

4.3.1. Extração por hidrodestilação

Cerca de 100,0 g de amostras oriundas das diversas partes (flores, folhas, caules e raízes) da espécie *B. campestris* foram pesadas, sendo posteriormente cortadas e submetidas à extração por um período de 4 horas (MORAIS et al., 2009). Em seguida, a mistura obtida foi transferida para um funil de separação e submetida à extração com diclorometano (3x de 10,0 mL), obtendo-se uma fase aquosa e uma orgânica. A fase aquosa foi descartada e a orgânica submetida à secagem utilizando sulfato de sódio anidro como agente dessecante. Em seguida, realizou-se a filtração deixando-se o filtrado à temperatura ambiente até a evaporação completa do solvente, obtendo-se o óleo essencial que foi acondicionado em um frasco e armazenado no freezer até o momento das análises. O sistema de extração empregado é representado pela Figura 17.

Figura 17. Foto ilustrativa do aparelho de Clevenger utilizado para hidrodestilação.



Fonte: O autor.

4.3.2. Separação e identificação de compostos voláteis

Os compostos voláteis foram separados e identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), empregando-se uma coluna capilar OV5. A temperatura do forno foi programada para permanecer entre 60-240 °C, com taxa da rampa aquecimento de 3 °C min⁻¹ e injetor no modo split (1:20) a 220 °C, utilizando gás hélio como gás de arraste com um fluxo constante de 1 mL min⁻¹. O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV, registrando fragmentos de 40 a 650 u. A amostra foi dissolvida em diclorometano e injetando-se 1,0 µL no equipamento.

A concentração relativa dos constituintes dos óleos foi determinada em um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização em chama (CG-DIC) Shimadzu modelo CG2014, operando nas mesmas condições do CG-EM, o gás de arraste foi alterado para nitrogênio. Os componentes foram identificados pelas áreas de seus respectivos picos no cromatograma e confirmados por meio do uso de bibliotecas de espectros de massas da Wiley (7,139 e 229), Nist (27 e 147) e Shim 2205 em comparação com os índices aritméticos (IA) calculados e tabelados na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2013). Os índices aritméticos (IA) foram calculados com base nos padrões de alcanos lineares C₈ – C₄₀, utilizando-se a Equação 1.

$$IA(x) = 100 + 100 P_z \left[\frac{(t(x) - t(P_z))}{t(P_{z+1}) - t(P_z)} \right] \quad (1)$$

Em que:

- x é o composto no tempo t;
- Pz: alcano antes do composto de tempo x;
- Pz +1: alcano depois do composto de tempo x.

4.4. Extratos das folhas, caules e raízes.

4.4.1. Preparação dos extratos etanólicos

Transferiu-se, previamente secos e triturados, 554,74 g (folhas), 650,44 g (caules) e 917,24 g (raízes) da espécie *B. campestris* para um erlenmeyer de 2,0 L, adicionando-se como solvente extrator o etanol 95% (v.v⁻¹) até o volume de 2,0 L a temperatura ambiente, deixando-o em contato pelo período de 7 dias. Posteriormente, realizou-se a filtração e a evaporação do solvente em um rotaevaporador sob pressão reduzida a temperatura de 40 °C, em seguida realizou-se a liofilização dos extratos. Este processo foi repetido sete vezes e os extratos obtidos foram acondicionados em frascos de vidro e mantidos no freezer até a realização das análises.

4.4.2. Partição líquido-líquido dos extratos em etanol

Os extratos etanólicos foram submetidos à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). Os extratos foram solubilizados em 300,0 mL de uma mistura de metanol e água 9:1 (v.v⁻¹), transferidos para um funil de separação, Figura 18, onde realizou-se a extração líquido-líquido com os solventes, repetindo-se por cinco vezes. Nas extrações com acetato de etila e *n*-butanol acrescentou-se água a fim de se obter uma melhor separação das fases. Os solventes contidos nas partições foram removidos conforme descrito no item 4.4.1.

Figura 18. Partição líquido-líquido dos extratos.



Fonte: O autor.

4.4.3. Prospecção fitoquímica

Para a realização deste ensaio, preparou-se soluções em metanol na concentração de aproximadamente $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, aplicando-as em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) com fase estacionária de sílica 60 g utilizando-se o indicador de fluorescência e dois tipos de eluentes: (i) clorofórmio, metanol e hidróxido de amônio na proporção de 9:1:0,25; (ii) ácido fórmico, ácido acético, acetato de etila e água na proporção 1,1:1,1:10,0:2,6. Os reveladores empregados foram preparados conforme metodologia de Wagner e Bladt (1996), descrita a seguir:

a) Detecção de terpenos, esteróides, fenois e açúcares

Anisaldeído-ácido sulfúrico: Uma solução contendo anisaldeído 5% (v v^{-1}) em ácido acético glacial foi preparada. Em seguida foram adicionado 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A placa CCD foi borrifada com o revelador e aquecida a 100 °C entre 5 a 10 minutos.

b) Detecção de terpenos e esteróides

Liebermann-Burchard: 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados cuidadosamente a 50,0 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa foi pulverizada com 10,0 mL da solução e aquecida a 100 °C entre 5 a 10 min, observando-a em câmara escura com luz UV (365 nm).

c) Detecção de alcaloides

(i) Dragendorf: Duas soluções foram preparadas: na solução A foram dissolvidos 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adicionado 40,0 mL de água destilada sob aquecimento. Na solução B foi dissolvido cerca de 8,0 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água. A partir destas soluções preparadas previamente, obteve uma solução estoque pela mistura de ambas na mesma proporção. A solução reveladora é feita a partir da mistura de 1,0 mL da solução estoque, 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água.

(ii) Iodocloro platinado: Duas soluções foram preparadas. A solução A continha ácido hexacloroplatínico (IV) 5% em água ($m\ v^{-1}$) e a solução B iodeto de potássio 10% em água ($m\ v^{-1}$). A solução reveladora foi preparada pela mistura de 1,0 mL da solução A com 9,0 mL da solução B e 10,0 mL de água.

d) Detecção de flavonoides

(i) NP/PEG: Duas soluções foram preparadas. A solução metanólica de difenilboriloxietilamina (NP) 1% ($m\ v^{-1}$), solução A, e a solução etanólica de polietileno glicol-4000 (PEG4000) 5% ($m\ v^{-1}$), solução B. A solução reveladora foi preparada misturando 10,0 mL da solução A e 8,0 mL da solução B. Após borrifação na placa de CCD, a revelação foi observada em câmara escura de luz UV (365 nm).

(ii) Cloreto de alumínio: Foi preparada uma solução metanólica de AlCl_3 1% ($m\ v^{-1}$). A placa CCD foi borrifada com o revelador e observada em luz visível.

4.4.4. Determinação de fenóis totais

Uma solução metanólica das amostras (extratos e partições) foi preparada nas concentrações apresentadas na Tabela 4. Assim, foi transferida uma alíquota de 0,5 mL para um tubo de ensaio e adicionado 2,5 mL de uma solução aquosa do reativo *Folin-Ciocalteau* a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. Foi encubada por 5 minutos em banho aquecido a 50 °C e posteriormente medida a absorbância da amostra em 760 nm. Para obtenção do branco o mesmo procedimento foi realizado utilizando 0,5 mL de metanol. O teor de fenóis totais (FT) foi quantificado pela leitura da absorbância das amostras, convertendo este sinal analítico em concentração por intermédio de uma equação de reta obtida por uma curva de calibração previamente construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g}\ \text{mL}^{-1}$) e os resultados são expressos como miligramas de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de amostra (SOUZA et al., 2007).

Tabela 4. Concentração das amostras utilizadas na determinação de fenóis totais.

Amostras	Concentração das amostras ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
Extrato/partições	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico	250	250	150
Hexano	250	250	250
Diclorometano	250	250	250
Acetato de etila	150	150	100
<i>n</i> -Butanol	150	150	100
Metanol/Água	250	250	250

Fonte: O autor.

4.4.5. Determinação de proantocianidinas

Uma solução em metanol das amostras (extratos e partições) foi preparada, nas concentrações especificadas na Tabela 5. Uma alíquota de 2,0 mL foi retirada e transferida para um tubo de ensaio, em seguida adicionou-se 3,0 mL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico a 70%, resultando em uma solução de 5,0 mg mL^{-1} , mantendo-a em banho de água a uma temperatura de 50 °C por 15 minutos. Posteriormente, resfriou-se esta mistura e mediu-se a absorbância em 500 nm, do branco e da amostra. O teor de proantocianidinas foi quantificado pela leitura da absorbância das amostras, convertendo este sinal analítico em concentração por intermédio de uma equação de reta obtida por uma curva de calibração previamente construída com padrões de catequina (5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados são expressos como miligramas de EC (equivalente de catequina) por grama de amostra (MORAIS et al., 2009).

Tabela 5. Concentração das amostras utilizadas na determinação proantocianidinas.

Amostras	Concentração das amostras ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Extrato/partições	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico	50	50	30	
Hexano	50	50	50	
Diclorometano	50	50	250	
Acetato de etila	50	50	30	
<i>n</i> -Butanol	50	50	30	
Metanol/Água	50	50	50	

Fonte: O autor.

4.4.6. Determinação de flavonoides

Em um tubo de ensaio foram adicionados 2,0 mL da solução metanólica do extrato/partições ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) em metanol 5% ($m\text{ v}^{-1}$) e 2,0 mL de metanol. A mistura foi mantida em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente, mediu-se da absorbância da amostra em 425 nm, o mesmo foi realizado para o branco da amostra. Os resultados foram expressos em miligramas de EQ (equivalente de quercetina) por grama de amostra. As absorbâncias obtidas foram quantificadas em uma equação de reta obtida por uma curva de calibração da quercetina (1 a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$) conforme metodologia proposta e descrita por Woisky e Salatino (1998).

4.5. Determinação da atividade antioxidante

4.5.1. Método do sequestro do radical livre (DPPH)

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), adaptada da metodologia proposta por Brand-Williams e colaboradores (1995).

Uma solução estoque foi preparada e a partir desta, realizou-se o preparo de soluções em variadas concentrações (83, 66, 49, 32 e 15%) conforme a Tabela 6. Posteriormente, transferiu-se 0,3 mL das soluções preparadas para tubos de ensaio, protegidos da luz, e adicionou-se 2,7 mL de solução de DPPH em metanol (35 µg mL⁻¹). Em seguida, a mistura foi mantida em repouso durante 1 hora a temperatura ambiente, e medindo-se absorbância em 517 nm. Para leitura do controle, substituíram-se as amostras de trabalho por uma mistura de 0,3 mL de metanol e 2,7 mL de solução de DPPH, efetuando-se também a leitura do branco desta amostra. O butilidroxitolueno (BHT) foi utilizado como controle positivo.

Tabela 6. Concentração inicial das amostras na cubeta.

Amostras	Concentração inicial dos extratos e partições (µg mL⁻¹)		
	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico	25	12	6
Hexano	200	200	600
Diclorometano	70	70	70
Acetato de etila	10	10	6
<i>n</i> -Butanol	7,5	6,5	6
Metanol/Água	700	60	15

Fonte: O autor.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA) após 1 hora de reação, que corresponde à porcentagem de DPPH sequestrado foi determinada pela Equação 2.

$$\%AA = \left\{ \frac{[Abs.\text{controle} - (Abs.\text{amostra} - Abs.\text{branco})]}{Abs.\text{controle}} \right\} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

- Abs._{controle} = absorbância inicial da solução constituída por 0,3 mL de metanol e 2,7 mL de solução de DPPH;

- $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = absorbância da mistura reacional constituída por 0,3 mL da amostra e 2,7 mL de solução de DPPH;
- $\text{Abs}_{\text{branco}}$ = absorbância da mistura constituída por 0,3 mL da amostra e 2,7 mL de metanol.

A concentração efetiva, que consiste na quantidade de amostra necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}), foi determinada a partir da equação da reta de uma curva analítica obtida pelo gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado após 1 hora de reação em função das concentrações das amostras.

4.5.2. Método de sequestro do radical peroxil (ORAC)

A partir dos extratos e partições, realizou-se as diluições em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração aproximada de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparados em tampão fosfato a 75 mmol L^{-1} em pH 7,4. Posteriormente misturou-se 25 μL dos extratos/partições com 150 μL de fluoresceína ($0,085 \text{ nmol L}^{-1}$) e incubados à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, adicionou-se 30 μL da solução de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH) para início da reação. A intensidade de fluorescência ($485 \text{ nm}_{\text{ex}} / 528 \text{ nm}_{\text{em}}$) foi determinada em um espectrofluorímetro durante 90 minutos, efetuando-se leituras a cada 90 segundos. O branco da amostra consistiu em substituir o extrato/partição por tampão fosfato e no controle positivo foi utilizado ácido ascórbico.

A capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (PRIOR et al., 2003). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os seus resultados foram expressos em μmol equivalente de Trolox por grama de amostra.

4.6. Determinação da inibição da atividade de α -amilase e α -glicosidase

As análises de inibição de α -amilase e α -glicosidase foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia com a colaboração do Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola.

4.6.1. Determinação da inibição da atividade de α -amilase

Os extratos e partições das amostras foram analisados em relação à sua capacidade em inibir a atividade da α -amilase pelo método GALG2CNP modificado, utilizando o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- α -CNP) modificado e uma fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase (f-AS) (DE GOUVEIA et al., 2014; SANTOS et al., 2012). Para o preparo da f-AS, coletou-se uma amostra de saliva humana e a armazenou a uma temperatura de aproximadamente -20 °C por 48 horas. Após esse período foi descongelada e centrifugada a 12000 xg por 10 minutos a 20 °C e o sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sepharose utilizando como fase móvel um tampão contendo 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano) (pH 8,0), 10 mmol L⁻¹ de EDTA e 10 mmol L⁻¹ de EGTA. O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio (50 mmol L⁻¹, pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50 mmol L⁻¹ de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), contendo 5 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio, 140 mmol L⁻¹ de tiocianato de potássio e 300 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio (pH 6,0).

As amostras do extrato e partições foram dissolvidas em DMSO e incubadas com a f-AS (proporção de 1:10) durante 30 minutos a 37° C. A reação foi iniciada pela adição de 320 µL do substrato GAL-G2- α -CNP (12 mmol L⁻¹) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 3 minutos, com intervalo de 1 minuto, a 37 ° C. O controle foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão MES. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado foi apresentado como porcentagem de inibição da α -amilase, calculado por meio da Equação 5. As Equações 3 e 4 determinam a atividade da enzima em U mL⁻¹ e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição de α -amilase.

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-amilase (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{[\Delta \text{Absmin}^{-1} \cdot V_f \cdot F_d]}{\xi \cdot V_s \cdot I} \quad (3)$$

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-amilase (\%)} = \frac{(A_{\text{amostra}})}{(A_{\text{controle}})} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Inibição de } \alpha\text{-amilase (\%)} = 100 - \text{Atividade de } \alpha\text{-amilase (\%)} \quad (5)$$

Onde:

- ΔAbsmin^{-1} é a diferença de absorbância por minuto;
- V_f é o volume total da reação ($328 \mu\text{L}$);
- V_s é o volume de amostra (extrato/partição mais enzima α -amilase, $8 \mu\text{L}$);
- F_d é o fator de diluição da saliva (50);
- ξ é o coeficiente de absorvidade molar do 2-cloro-*p*-nitrofenol;
- I é o comprimento do percurso da luz (0,97);
- A_{controle} é a atividade da α -amilase;
- A_{amostra} é a atividade da α -amilase na presença do extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações para a determinação dos valores de Cl_{50} . O Cl_{50} consiste em determinar a concentração inibitória de amostra necessária para inibir em 50% a atividade de α -amilase. O Cl_{50} foi determinado a partir da equação da reta obtida por uma curva analítica do gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração das amostras.

4.6.2. Determinação da inibição da atividade de α -glicosidase

As amostras de extrato/partições foram avaliadas em relação à sua capacidade em inibir a atividade da α -glicosidase, utilizando-se uma mistura do substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranósideo (p-NPG) (SHAN et al., 2016) com uma fração enriquecida da enzima α -glicosidase (f-AG) (SigmaAldrich I-1630) (TOMA et al., 2014). Para o preparo da f-AG, utilizou-se cerca de 200 mg de pó cetônico obtido do intestino de rato, sendo homogeneizado em 3,0 mL de solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% ($m\ v^{-1}$), sendo posteriormente centrifugado a 12000 xg por 30 minutos e o sobrenadante (f-AG) foi utilizado no ensaio. As amostras de extratos/partições foram dissolvidas em DMSO e incubadas com a f-AG e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de glutatona reduzida (diluída em tampão fosfato a 50 mmol L^{-1} , pH 6,8) durante 20 minutos a 37°C . A reação foi iniciada pela adição do substrato p-NPG (4 mmol L^{-1} , em tampão fosfato de sódio a 50 mmol L^{-1} em pH 6,8) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 30 minutos a cada 5 minutos a 37°C . O controle foi realizado substituindo os extratos/partições por tampão fosfato. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com o resultado sen-

do expresso em porcentagem de inibição da α -glicosidase, calculado por meio da Equação 6.

$$\text{Inibição da } \alpha\text{-glicosidase} = \left(\frac{(\text{ASC controle} - \text{ASC amostra})}{\text{ASC controle}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Onde:

- $\text{ASC}_{\text{controle}}$ é a área sob a curva na ausência de extratos/partições;
- $\text{ASC}_{\text{amostra}}$ é a área sob a curva na presença de extratos/partições.

4.6.3. Determinação do potencial de inibição de glicação

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 50 mg mL⁻¹ de BSA (Albumina Sérica Bovina) diluída em tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4) com posterior adição de 1,25 mol L⁻¹ de frutose diluída no mesmo tampão e o extrato/partições diluídos em DMSO. Os tubos foram incubados à 37 °C por 72 horas na ausência de luz. Após esse período, 1,6 mL de ácido tricloroacético 20% (m v⁻¹) foram adicionados em cada tubo e centrifugados a 10000 xg por 10 minutos e o *pellet* foi ressuspêndido em 1,6 mL de tampão fosfato. A redução da fluorescência do BSA ao se ligar ao açúcar (frutose) foi avaliada em espectrofluorímetro, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm (SRI HARSHA et al., 2014). O controle foi realizado substituindo o extrato/partições por DMSO. O branco foi realizado substituindo a frutose por tampão fosfato e o extrato/partições por DMSO. A quercetina foi usada como controle positivo. A porcentagem de inibição de glicação (IG) foi calculada por meio da Equação 7.

$$\text{IG}(\%) = 100 - \left(\frac{(\text{IF}_{\text{amostra}} - \text{IF}_{\text{branco}})}{(\text{IF}_{\text{controle}} - \text{IF}_{\text{branco}})} \times 100 \right) \quad (7)$$

Sendo:

- $\text{IF}_{\text{amostra}}$: a intensidade de fluorescência na presença de extrato/partição;
- $\text{IF}_{\text{branco}}$: a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e extrato/partição;

- IF_{controle} a intensidade de fluorescência na ausência de extrato/partição.

4.7. Atividade antimicrobiana

Os ensaios biológicos para verificação da atividade antimicrobiana foram feitas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca. A atividade antimicrobiana dos extratos, partições e dos óleos essenciais de *B. campestris* foram determinadas utilizando o método da microdiluição em caldo (CARVALHO et al., 2011). Foi utilizado o meio de cultura CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2012 a) e CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2012 b).

Os microrganismos utilizados, preparo das soluções, reagentes empregados e a metodologia do experimento para a determinação das concentrações inibitórias mínimas são descritos a seguir com base na literatura.

4.7.1. Microrganismos utilizados nos ensaios

Para determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas diversas cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC), sendo: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC43717), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Bacteroides fragilis* (ATCC25285) e *Bacteroides thetaiomicron* (ATCC 29741).

4.7.2. Preparo das amostras pelo método de microdiluição

As amostras foram inicialmente selecionadas em concentrações de aproximadamente 8.000 µg mL⁻¹ e em seguida foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução mãe para teste de microdiluição em caldo para aeróbios: retirou-se 125 µL da solução inicial e acrescentou-se 1875 µL de caldo triptona de soja (TSB), obtendo-se uma solução de 500 µg mL⁻¹.

- Solução mãe para o teste de microdiluição em caldo para anaeróbios: retirou-se 125 µL da solução inicial e acrescentou-se 2437,5 µL de caldo Schaedler suplementado, obtendo-se uma solução de 500 µg mL⁻¹.

4.7.3. Preparo do inóculo

As culturas de 24 horas dos microrganismos indicadores foram transferidas mediante o auxílio de uma alça de platina esterilizada, crescidos no meio Ágar tripota de soja com 0,5% de sangue de carneiro em solução salina. O mesmo procedimento foi utilizado para preparação das bactérias anaeróbias com crescimento de 72 horas em Ágar Schedler. O inóculo foi padronizado, fazendo a comparação deste com o tubo 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) para bactérias na escala Mc Farland. O inóculo foi preparado para todas as bactérias.

4.7.4. Preparo dos controles

Para o controle positivo frente aos microrganismos indicadores, utilizou-se o dicloridrato de clorexidina para as bactérias aeróbias nas concentrações de 0,115 a 59,0 µg mL⁻¹ e para as bactérias anaeróbias metronidazol nas concentrações de 0,0115 a 5,9 µg mL⁻¹ como controle positivo. Posteriormente, realizou-se a microdiluição do caldo para os seguintes controles: esterilidade dos caldos TBS e Schaedler, controle da cultura (inóculo), esterilidade da clorexidina, metronidazol, amostras e controle do DMSO.

4.7.5. Método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima

Este ensaio foi realizado em capela de fluxo laminar, em que todos os materiais utilizados foram esterilizados previamente. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços, sendo adicionado em cada poço o inóculo, o caldo triptona de soja ou caldo Schaedler e a amostra das soluções preparadas. Ao final o volume de cada poço foi 100,0 µL para microrganismos aeróbios e 200 µL para anaeróbios. Os intervalos de concentração das amostras foram de 0,195 a 400 µg mL⁻¹, determinando-

se a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento de microrganismos indicadores.

Para os microgarnismos aeróbios as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas em microaerofilia, posteriormente colocadas para incubação e em cada poço adicionados 30,0 µL de resazurina preparada em solução aquosa 0,01% ($m\ v^{-1}$). Este sistema revelador permite a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra testada, sendo que a cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e a cor vermelha, a presença. Os microrganismos anaeróbicos foram incubados de 48 a 72 horas em câmara de anaerobiose a 37 °C. Em seguida foi utilizado o mesmo revelador para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) frente aos microrganismos anaeróbios.

4.8. Atividade antifúngica dos extratos e partições frente às leveduras

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada na Universidade de Franca, utilizando-se o método da microdiluição em caldo, considerando as normas estabelecidas pela NCCLS M-27 A3 (2002).

4.8.1. Microrganismos utilizados no ensaio

Para a determinação da atividade antifúngica dos extratos brutos, partições e óleos essenciais, foram utilizadas as cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC), sendo: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabata* (ATCC 15126).

4.8.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado baseado nas normas preconizadas pela NCCLS M-27 A3. Inicialmente, as leveduras foram cultivadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, com o auxílio de alça de platina esterilizada, transferiu-se colônias das leveduras para tubos contendo 2 mL de solução salina 0,85% ($m\ v^{-1}$). Estes tubos foram comparados a escala de McFarland 0,5 para se obter o valor de $6 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹. Em seguida foram realizadas as diluições

em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $1,2 \times 10^3$ UFC mL⁻¹. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 preparado numa solução tampão MOPS até pH 7,2.

4.8.3. Preparo dos controles

Para o controle positivo foi utilizada a droga anfotericina B, sendo diluída em caldo para obter concentrações entre 0,031 a 16,0 µg mL⁻¹. Na validação dos ensaios, o controle anfotericina B foi testado frente a cepas de referência, *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), para se obter uma faixa de CIM entre 0,5 a 2,0 µg mL⁻¹. Uma vez que se as leveduras estiverem dentro desta faixa descrita, consideram-se os resultados válidos segundo a NCCLS M-27 A3. Realizou-se também, os controles 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, partições, óleo essencial e controle do solvente (DMSO), sendo este último o controle negativo. O controle do solvente foi realizado para que não haja dúvidas em relação à inibição do crescimento do microrganismo, pois em algumas concentrações o solvente pode levar a inibição do crescimento microbiano.

4.8.4. Método da microdiluição em caldo e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A técnica de determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços. Foram realizadas diluições nas concentrações de 3.000 a 1,46 µg mL⁻¹, utilizando-se o caldo RPMI como meio de cultura tamponado com MOPS com pH 7,2, resultando em um volume final de 200 µL. Para o controle positivo realizou-se o mesmo procedimento, com concentrações de 0,031 a 16,0 µg mL⁻¹ e para o controle negativo, DMSO, foram testadas concentrações variando de 5 a 1% (v.v⁻¹).

Após a montagem das microplacas, o caldo, amostras e o inóculo foram adicionados, além dos controles, nos poços e estes foram incubados por 48 horas a 37 °C. Posteriormente realizou-se a determinação do CIM pelo uso do revelador resazurina e incubadas por mais 30 minutos para posterior revelação. A coloração azul representa ausência de crescimento fúngico enquanto a cor vermelha é presença.

4.9. Atividade citotóxica

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

4.9.1. Preparo do meio de cultura

O meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O preparo consiste na adição de 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mmol L⁻¹ de L-glutamina, 4.500 mg L⁻¹ de D-glicose, 2.000 mg L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 2.380 mg L⁻¹ de HEPES, 1.100 mg L⁻¹ de piruvato de sódio, 60 mg L⁻¹ de penicilina, 40 mg L⁻¹ de gentamicina e 10 mg L⁻¹ estreptomicina.

A cultura da célula Vero utilizada foi ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África) e foram mantidas em DMEM, a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

4.9.2. Preparo das amostras

As amostras foram dissolvidas em metanol e diluídas com DMEM, até a formação de uma solução mãe de 640 µg mL⁻¹. A concentração final de metanol da solução mãe não ultrapassou 3%.

4.9.3. Teste de viabilidade celular

Para avaliação da citotoxicidade, foi utilizado o método de microdiluição em placas com 96 poços. Em cada teste preparou-se uma solução contendo 1x10⁶ células em 10 mL de meio DMEM suplementado, transferindo 100 µL para cada poço de análise, com posterior incubação por 6 horas a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Depois de aderidas, o meio de cultura de cada poço foi retirado e em seguida foram adicionadas soluções das amostras a serem testadas nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg mL⁻¹, partindo-se da solução mãe recém preparada. O volume final de cada poço foi de 100 µL e a concentração de células presentes em cada poço foi de 1x10⁴ células.

Após o procedimento descrito, a placa foi incubada por 48 horas a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, em seguida adicionados 10 µL de solução reveladora de resazurina a 3 mmol L⁻¹ em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006). Em seguida realizou-se a incubação por mais 24 horas nas mesmas condições, com posterior medida da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca. Os ensaios foram realizados em triplicata e a partir das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle de crescimento (controle positivo). A concentração citotóxica CC₅₀, concentração em que 50% das células estão vivas, foi calculada construindo um gráfico de dose-resposta com regressão não-linear (CHIBALE et al., 2007).

4.10. Atividade antileishmania

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

4.10.1. Preparo dos meios de cultura, cultivo dos protozoários e preparo das amostras

O caldo BHI foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, no qual 5% de soro fetal bovino (SFB) e 2,0 mmol L⁻¹ de glutamina foram adicionados. Para o estágio promastigotas foi utilizada a cepa de PH8 contendo *Leishmania amazonensis*, cultivada em BHI à 25 °C. Para os ensaios, as amostras foram dissolvidas em metanol e diluídas com BHI até a formação de uma solução mãe de 640 µg mL⁻¹. A concentração final de metanol desta solução não excedeu 3%.

4.10.2. Teste de viabilidade celular

Este teste foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, através da diluição da solução mãe em meio de cultura BHI para a *L. amazonensis*. O volume final de cada poço foi de 100 µL, sendo 20 µL de inóculo (solução com 1x10⁸ parasitas em 2,0 mL) com 80 µL das concentrações das amostras (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg mL⁻¹).

A placa de *L. amazonensis* foi incubada por 48 horas a 25 °C, em seguida adicionado em cada poço 2 µL de uma solução de resazurina a 3 mmol L⁻¹ em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006) e novamente incubada nas mesmas condições. Após, foi realizada a medida de absorbância em 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca, sendo que todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração. A viabilidade celular foi calculada em função do controle positivo, projetando um gráfico de dose-resposta com regressão não linear para o cálculo do IC_{50} , concentração em que 50% dos parasitas foram inibidos (CHIBALE et al., 2007).

4.11. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (CLAE/EM)

As análises das amostras de partições das folhas, caules e raízes de *B. campestris*, foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFG). O cromatógrafo utilizado consistia em um CLAE/EM (Agilent modelo Infinty 1260) acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução QTOF (do inglês “Quadrupolo Time of Flight”) Agilent modelo 6520 B com fonte de ionização por eletrospray (IES). A coluna cromatográfica utilizada foi da Agilent modelo Zorbax com 2,2 mm de diâmetro interno e 5 cm de comprimento com partículas de 1,8 µm. Para a fase móvel foi utilizada a água acidificada com ácido fórmico 0,1%, (v v⁻¹) que consistia na fase A, enquanto o metanol a fase B. Foi empregue um sistema gradiente de solvente iniciando com 2% de B e 98% de A e atingindo 98% de B em 15 minutos com permanência em 2 minutos com 98% de B, retornando a 2% B em 1 minuto, a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹. Os parâmetros de ionização foram: (i) pressão do nebulizador de 58 psi, (ii) gás secante a 8 L min⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e (iii) aplicação de uma energia de 4,5 kV no capilar.

Para as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) as energias de colisão foram ajustadas de acordo com cada íon precursor, moléculas desprotonadas, [M –H]. Os dados obtidos foram medidos em alta resolução no EM e comparadas através de erro, em ppm, calculado em relação a massa exata utilizando a equação 8.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{\text{massa exata} - \text{massa experimental}}{\text{massa exata}} \cdot 10^6 \quad (8)$$

4.12. Análise estatística

Todos os resultados das análises químicas foram obtidos a partir da média da triplicata com seu desvio padrão. Para as análises de citotoxicidade e antileishmania os ensaios foram realizados em triplicata e a partir das médias das absorbâncias foi construído o gráfico para o cálculo do CC_{50} e CE_{50} . Já para os testes de atividade antimicrobiana, as amostras foram avaliadas em triplicata, expressando-se a média aritmética dos três valores obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais

5.1.1. Teor de óleo essencial

O rendimento do óleo essencial (OE) foi obtido em relação à massa da planta e expresso em porcentagem, conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Rendimento da extração dos OEs de *B. campestris*.

	Amostra (g)	Umidade (%)	Óleo (g)	Rendimento (%)
Flor	155,50 ± 2,90	55,8 ± 1,3	0,010 ± 0,002	0,011 ± 0,002
Folha	100,23 ± 0,13	53,3 ± 1,7	0,013 ± 0,006	0,025 ± 0,009
Caule	100,33 ± 0,08	34,9 ± 1,8	0,023 ± 0,004	0,066 ± 0,016
Raiz	302,93 ± 5,88	29,8 ± 0,8	0,011 ± 0,003	0,012 ± 0,004

Fonte: O autor.

Pelos resultados da Tabela 7, o caule apresentou maior rendimento do OE ($0,066 \pm 0,016\%$) em relação às demais partes da planta. Na literatura foram encontrados dois trabalhos de óleos essenciais (OEs) para espécies do gênero *Banisterio-*

psis, ambos para OEs das folhas. Para *B. laevifolia* o rendimento foi de 0,06% (NUNES, 2014) e *B. oxyclada* 0,016% (MARTINS, 2018). Estes comparativos demonstram que outras espécies do gênero podem ter rendimentos superiores aos das folhas de *B. campestris*, porém próximo ao encontrado para o caule (0,066%).

Ao comparar-se com outras espécies, o OE das folhas de *Byrsonima verbascifolia*, coletado em diferentes estações do ano, apresentou rendimento variando de 0,003 a 0,005% (LOURENÇO et al., 2015), estando abaixo do encontrado para *B. campestris*. Entretanto, o rendimento do OE obtido é inferior aos apresentados por outras espécies já estudadas.

Chang e colaboradores (2011) obtiveram um rendimento de 0,94; 0,64; 0,15 e 0,12%, respectivamente, para frutos, folhas, caule e raízes de *C. pubescens*. No trabalho de Sousa e colaboradores (2015), foi obtido um rendimento de 0,39% para as folhas de *E. calycina*. Já Cunha e colaboradores (2013), conseguiram um rendimento de OE de 0,94, 0,46 e 0,12 % para o óleo das folhas, da casca e da madeira, respectivamente, para *Cassia bakeriana*.

5.1.2. Identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais

Quarenta e cinco compostos foram identificados nos OEs das diferentes partes de *B. campestris*, sendo identificado um total de 96,19% somente na flor, predominando os monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Na Tabela 8 estão representadas as composições dos OEs obtidos nas diferentes partes da planta.

Tabela 8. Composição química dos OEs de *B. campestris*.

	Compostos	IA Teórico	IA Real	Método Identificação	Composição (%)			
					Raiz	Caule	Folha	Flor
1	Hex-3-en-1-ol (Z)	850	862	a,b,c,d	-	-	-	0,55
2	Hexan-1-ol	867	878	a,b,c,d	-	-	-	2,01
3	Linalool	1095	1095	a,b,c,d	-	-	-	3,23
4	Álcool feniletílico	1117	1114	a,c,d	-	-	-	0,54
5	Nona-2,6-dien-1-ol(E,Z)	1159	1165	a,b,c,d	-	-	-	0,33
6	Non-2-en-1-ol (E)	1163	1168	a,b,c,d	-	-	-	0,35
7	Alfa Terpineol	1195	1195	a,b,c,d	-	-	0,95	2,44

Continuação Tabela 8

	Compostos	IA	IA	Método	Composição (%)			
		Teórico	Real	Identificação	Raiz	Caule	Folha	Flor
8	Nerol	1227	1230	a,b,c,d	-	-	-	0,40
9	Geraniol	1253	1256	a,b,c,d	-	-	0,83	1,86
10	Eugenol	1359	1361	a,b,c	-	-	0,42	1,00
11	Cariofileno (Z)	1408	1403	a,c,d	-	-	-	0,44
12	Cariofileno (E)	1417	1417	a,b,d	0,45	-	-	-
13	Geranil acetona	1453	1456	a,b,c,d	-	-	0,61	-
14	N.I.	1462	1468		-	-	-	0,52
15	Dodecan-1-ol	1473	1476	a,b,c,d	1,06	0,39	-	-
16	1R,3Z,9S-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo [7.2.0]undec-3-eno	1494	1482	b	4,81	-	-	-
17	Beta-ionona	1486	1490	a,b,c,d	-	-	0,91	-
18	Tridecan-2-ona	1495	1500	a,c,d	-	-	0,90	-
19	Nerolidol (Z)	1531	1535	a,c,d	-	-	-	3,17
20	N.I.		1547		0,52	-	-	-
21	Nerolidol (E)	1564	1570	a,b,c,d	0,82	0,84	1,15	10,51
22	Ácido dodecanoico	1575	1579	a,b,c,d	0,86	-	-	-
23	Dodecan-1-ol acetato (acetato de laurila)	1609	1604	b,d	1,68	-	-	-
24	N.I. Álcool sesquiterpeno		1651	-	1,38	-	-	-
25	Alfa cadinol	1651	1658	b	-	-	-	0,42
26	Tetradecan-1-ol (Álcool mirístico)	1679	1684	a,b,c,d	0,53	-	1,07	-
27	Pentadecan-2-ona	1697	1703	a,b,d	-	-	1,52	0,32
28	Pentadecanal	1717	1718	b	-	-	1,22	-
29	N.I.		1739		0,58	-	-	-
30	Ácido Tetradecanoico (Ácido mirístico)	1776	1781	a, b, d	3,58	2,25	1,39	2,2
31	Hexahidrofarnesil Acetona	1847	1848	b,d	-	-	2,66	2,95
32	Ácido pentadecanoico	1887	1881	b,d	2,16	1,93	0,76	0,66
33	Hexadecan-1-ol	1881	1887	b,c,d	0,60	-	0,62	-
34	N.I.		1891		-	-	0,54	-
35	N.I.		1897		-	-	1,97	-
36	Farnesil acetona	1919	1921	a,b,c,d	-	-	0,65	-

Continuação Tabela 8

	Compostos	Composição						
		IA Teórico	IA Real	Método Identificação	Raiz	Caule	Folha	Flor
37	Ácido cis-9-hexadecenoico (ácido palmitoleico)	1957	1962	b,d	-	4,15	1,13	-
38	Ácido Hexadecanoico (Ácido palmítico)	1979	1980	a,b,c,d	57,39	49,79	22,98	39,43
39	(E,E)-Geranil linalool	2026	2033	a,c,d	-	-	2,49	0,97
40	Octadecan-1-ol (Álcool estearílico)	2084	2088	a,b,c,d	-	-	0,51	-
41	Fitol	2119	2117	b,d	-	-	22,98	2,33
42	Ácido linoleico	2155	2149	b,d	10,38	11,63	0,80	2,75
43	N.I.	2159	2147		-	-	-	1,60
44	Ácido Oleico	2159	2155	b,d	5,47	4,83	3,49	-
45	Ácido octadecanoico (Ácido esteárico)	2180	2177	b,d	-	-	0,88	-
46	Acetato de octadecila	2208	2207	a,b,d	1,12	2,81	0,55	-
47	N.I.		2250		0,82	-	-	-
48	Tricosano	2300	2279	a,b,d	-	-	-	1,52
49	Acetato de eicosila	2409	2390	b,d	0,49	1,11	-	-
50	N.I.		2445	-	0,87	1,69	-	-
51	Pentacosano		2458	b,c,d	-	-	-	1,24
52	Heptacosano		2700	d	-	-	2,54	5,49
53	N.I.		2736	-	-	9,86	-	-
54	N.I.		2830	-	-	-	-	1,60
55	N.I.		2825	-	-	4,57	-	-
56	Esqualeno	2831	2868	b	0,96	1,89	3,63	-
57	N.I.		2909	-	-	-	1,27	-
58	N.I.		-	-	-	-	0,70	-
59	Triacontano	3000	3000	a,c	-	-	14,88	9,08
Total (%)					96,53	97,74	97,00	99,91
Compostos identificados (%)					92,36	81,62	92,52	96,19

Fonte: O autor.

Sendo:

- IA= Índice aritmético sobre a coluna OV5 (comparação com n-alcanos C₈ – C₃₀);

- N.I.= Não Identificado.
- Método de identificação: a) Índice aritmético, b) biblioteca de espectros de massas e índice de retenção Adams, c) comparação dos espectros de massas com a biblioteca Wiley, d) comparação dos índices aritméticos e espectros de massas com NIST 2017.

Os dados da Tabela 9 apresentam a classificação dos compostos no OE por grupos funcionais. Ao comparar as Tabelas 8 e 9, observa-se que os diterpenos oxigenados foram identificados apenas nos óleos da folha e flor. Os aldeídos foram representados somente pelo composto pentadecanal (1,22%), que foi encontrado no óleo das folhas. Entre os triterpenos destaca-se esqualeno, que foi identificado em todas as partes da planta: raiz (0,96%), caule (1,89%) e folha (3,63%), com exceção da flor onde não foi identificado.

Tabela 9. Classificação e composição dos compostos presentes nos OE de diferentes partes de *B. campestris*.

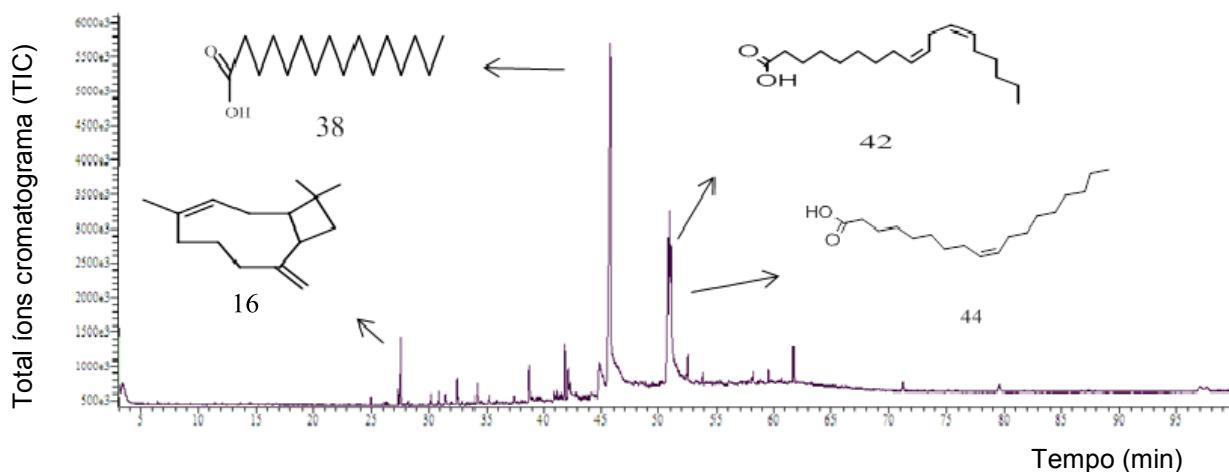
Grupo funcional	Raiz	Caule	Folha	Flor
Álcool	2,19	0,39	2,2	3,78
Aldeído	-	-	1,22	-
Cetona	-	-	5,08	3,27
Ester	3,29	3,92	0,55	-
Monoterpenos oxigenados	-	-	3,72	8,93
Sesquiterpenos oxigenados	0,82	0,84	1,8	14,10
Sesquiterpeno não oxigenados	5,26	-	-	0,44
Diterpenos oxigenados	-	-	25,47	3,3
Triterpeno	0,96	1,89	3,63	-
Alcanos de cadeia longa	-	-	17,42	17,33
Ácidos graxos	79,84	74,58	31,43	45,04
Compostos não identificados	4,17	16,12	4,48	3,72

Fonte: O autor.

Dezesseis compostos foram encontrados no OE da raiz desta espécie, tendo como principais constituintes o ácido palmítico (57,39%), linoleico (10,38%), oleico (5,47%) e 1R,3Z,9S-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo [7.2.0]undec-3-eno (4,81%), Figura 19.

O OE da raiz de *B. campestris* é constituído por álcoois alifáticos (2,19%), ácidos graxos (79,84%), ésteres (3,29%), sesquiterpeno oxigenado (0,82%), sesquiterpenos não oxigenados (5,26%) e triterpenos (0,96%). No cromatograma da análise do CG-EM mostrado na Figura 19, observou-se que estes componentes apresentaram tempo de retenção entre 23 a 75 minutos.

Figura 19. Cromatograma do óleo essencial da raiz.



Fonte: O autor.

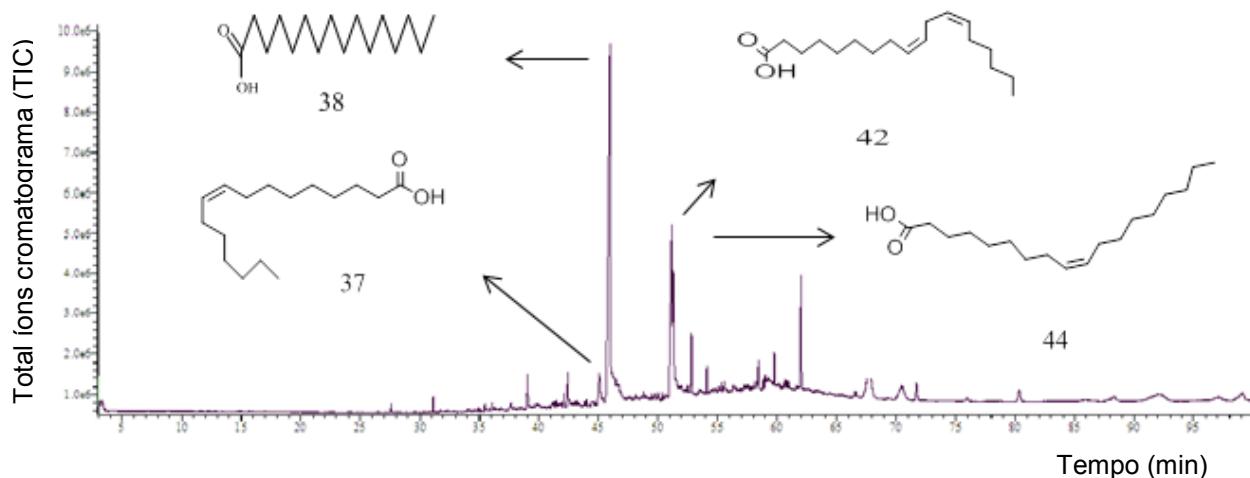
Os OEs de outras plantas também apresentam altos índices de ácidos graxos, como o da espécie *C. bakeriana* cujo OE é obtido da sua madeira e casca, sendo predominantemente composto por ácidos graxos, representando 51,27 e 85,35% respectivamente, conforme reportado por Cunha e colaboradores (2013). Em outro estudo, Furtado e colaboradores (2014) avaliaram a composição química do OE do caule de *Inga Laurina*, sendo identificada uma grande quantidade de ácidos graxos, 46,84%, e em particular o ácido palmítico, 25,40%. Já no trabalho de Chang e colaboradores (2011), no OE obtido da raiz de *C. pubescens* predominaram os sesquiterpenos e apresentou apenas um monoterpeno, o acetato de alfa-terpenila. Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho relacionado ao OE da raiz, para plantas do gênero *Banisteriopsis* para efeito comparativo com o estudo realizado na presente tese.

Neste trabalho, a composição química do OE do caule apresentou como componentes principais, os ácidos: palmítico (49,79%), linoleico (11,63%), oleico (4,83%), palmitoleico (4,15%) e outros em menor quantidade (4,18%) totalizando 74,58% da classe de ácidos graxos. Outras classes de compostos foram determina-

das, entre as quais os: álcoois (0,39%), ésteres (3,92%), sesquiterpenos (0,84%) e triterpenos (1,89%) (Figura 20). A percentagem dos compostos não identificados foi de 16,12%, tendo sua importância dentro da composição do óleo, podendo estar contribuindo com as atividades biológicas apresentadas pela planta (NUNES, 2016; SILVA, 2012).

A Figura 20 apresenta o cromatograma da análise de CG-EM do OE do caule de *B. campestris*.

Figura 20. Cromatograma do óleo essencial do caule.

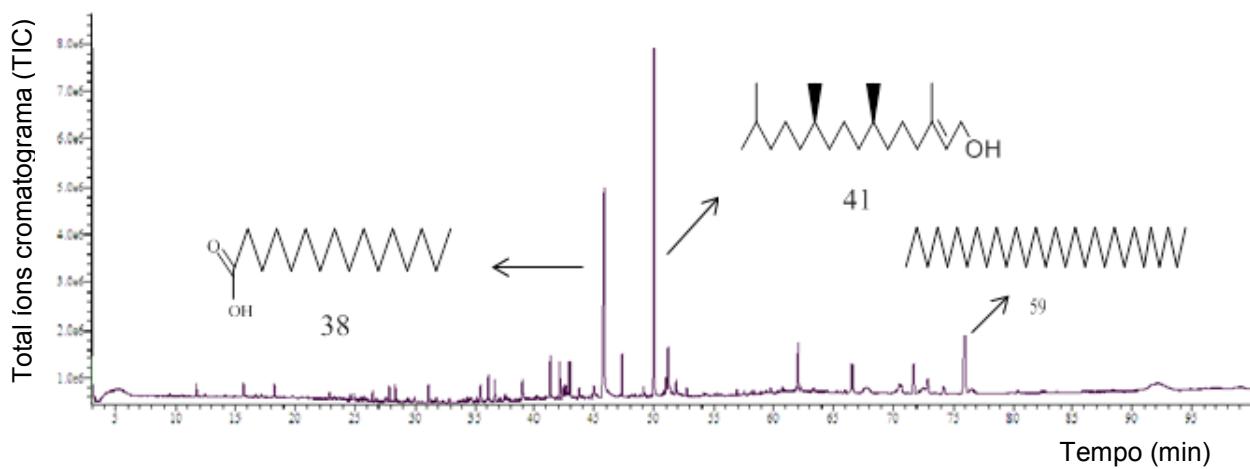


Fonte: O autor.

Pelo cromatograma foram identificados onze compostos presentes no OE do caule, sendo obtido um cromatograma de análise por CG-EM muito similar ao da raiz com compostos, cujo tempo de retenção foi de 25 a 75 minutos. Os compostos identificados no OE do caule também foram identificados na raiz, com exceção do ácido palmitoleico que foi encontrado apenas no caule.

Para a folha de *B. campestris* o cromatograma obtido é o descrito pela Figura 21. Os constituintes majoritários foram o ácido palmítico e fitol com (22,98%) cada, seguido do triacontano (14,88%).

Figura 21. Cromatograma do óleo essencial da folha.



Fonte: O autor.

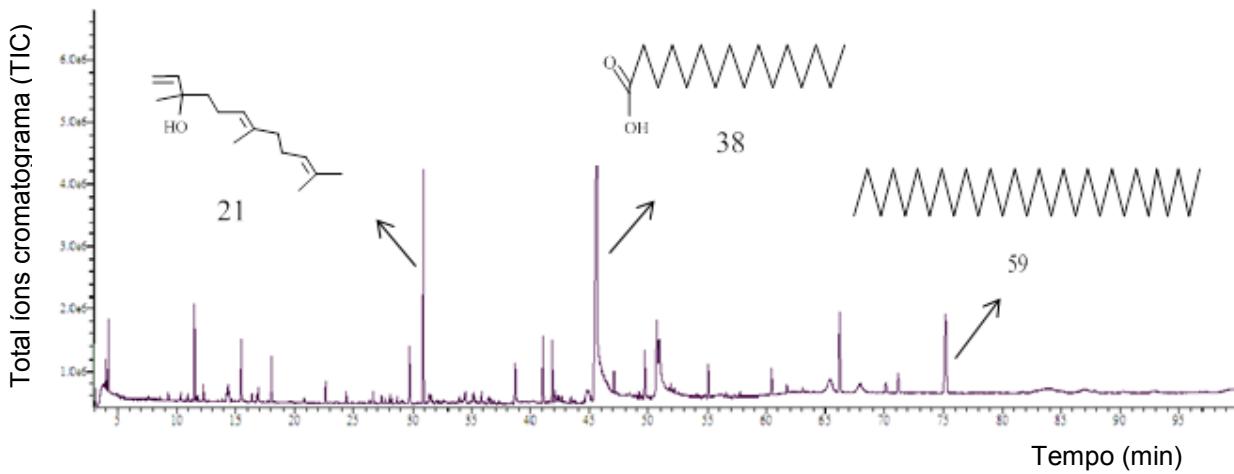
Neste cromatograma, verificou-se que o OE da folha apresentou picos cromatográficos em tempos de retenção entre 10 a 80 minutos, sendo que os compostos majoritários apresentaram tempos de retenção acima de 45 minutos.

No OE das folhas de *B. campestris* foram identificados vinte e sete compostos orgânicos voláteis totalizando 92,52% de sua composição. Assim, foram encontrados metabólitos em maior porcentagem entre os quais: ácidos graxos (31,43%), diterpenos (25,47%) e alcanos de cadeia longa (17,42%). Também foram identificadas outras classes de metabólitos como monoterpenos (3,72%), sesquiterpenos (1,8%), triterpeno (3,63 %), seguidos dos álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres (9,05%).

A constituição química e o potencial biológico dos OEs das espécies de *Banisteriopsis* foram pouco investigados até o momento. Na literatura, trabalhos envolvendo a caracterização química de OEs foram encontrados apenas para *B. laevifolia* e *B. oxyclada*. Ao comparar a composição química do OE das folhas de *B. laevifolia*, foram identificados como constituintes majoritários, (Z)-3-hexen-1-ol, o diterpeno fitol e untriacontano (NUNES, 2014). Para o OE das folhas de *B. oxyclada*, tem se como componentes majoritários o (Z)-hex-3-en-1-ol, (Z)-hex-2-en-1-ol e fitol (MARTINS, 2018). Entre estes compostos, apenas o fitol foi observado no óleo das três espécies, sendo que no óleo das folhas de *B. campestris* encontrado em maior percentual.

O cromatograma obtido para o óleo da flor de *B. campestris* pode ser observado na Figura 22. Ele apresenta em sua composição ácido palmitíco (39,43%), (*E*)-Nerolidol (10,51%) e triacontano (9,09%), como componentes principais.

Figura 22. Cromatograma do óleo essencial da flor.



Fonte: O autor.

Para o OE da flor, o ácido palmítico foi o constituinte majoritário (39,43%), o qual está presente em todas as partes da planta em maior composição. O OE da flor destaca-se em relação a outras partes da planta, devido à presença em maior percentagem de monoterpenos (8,93%) e sesquiterpenos (14,1%).

Barônio e colaboradores (2017) avaliaram a relação entre os OEs das flores de diferentes espécies de *Banisteriopsis*, dentre elas *B. campestris* com a visitação de abelhas. Os autores observaram que a espécie de *B. campestris* foi predominante a presença de ácidos graxos, n-nonocasano e hexadecanoato de metila. Já Carneiro e colaboradores (2017), identificaram no óleo de flores da espécie *E. Klotzschiana* (*Myrtaceae*), conhecida como pêra do Cerrado, alto teor de hidrocarbonetos sesquiterpenos (64,2%) principalmente: α -(*E*)-bergamoteno (29,9%), germacreno-*D* (12,1%) e β -bisaboleno (10,2%), e os monoterpenos oxigenados, tais como: o geraniol (1,6%), o citronelol (1,4%) e o eugenol (1,7%), apresentando maiores percentuais de sesquiterpenos e monoterpenos em relação ao óleo das flores de *B. campestris*.

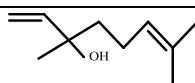
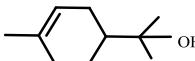
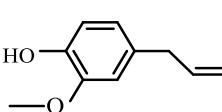
Ácidos graxos foram a principal classe de compostos encontrada nos OEs das diferentes partes da planta de *B. campestris*, destacando-se o ácido palmítico que foi o componente majoritário. A análise cromatográfica indicou também a presença de ácidos graxos insaturados, sendo identificados os ácidos palmitoleico, linoleico e oleico.

No estudo do óleo da semente de *Banisteriopsis pubipetala* os compostos majoritários foram os ácidos graxos: palmítico, oleico, linoleico e eicosanoico, sendo

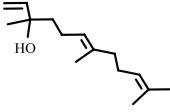
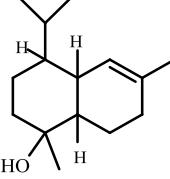
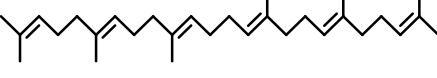
constatada a ausência de compostos voláteis nas sementes (PRAZERES et al., 2017). No estudo realizado com óleo da semente de *Malpighia glabra* (acerola) da família Malpighiaceae os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico foram identificados, sendo que os ácidos graxos insaturados foram mais abundantes do que os ácidos graxos saturados (EGYDIO; SANTOS, 2012). Os ácidos palmítico e oleico estão presentes no óleo da polpa de *Caryocar brasiliense* (pequi), que é uma planta característica do cerrado nas proporções 38,11% e 56,5% (TRAESSEL et al., 2016). Estes compostos também estão presentes no óleo essencial das partes de *B. campestris* como uns dos constituintes majoritários.

Derivados terpênicos, tais como, os monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e os fenilpropanóides são importantes constituintes dos OE obtidos de plantas (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). Os terpenos e terpenoides apresentam relevante importância para o setor de aromatizantes, sendo imprescindíveis na determinação do sabor dos alimentos. Alguns são precursores de vitaminas e outros apresentam papel importante na defesa contra herbívoros (FILIPE; BICAS, 2017). No presente estudo foram identificadas quatro classes de terpenos de acordo com as unidades de isopreno: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpeno. A classificação pode ser observada na Tabela 10.

Tabela 10. Classificação dos terpenos identificados nos OEs das diversas partes de *B. campestris*.

Unidades Isopreno	Número de Carbonos	Classificação	Parte do Vegetal	Estruturas dos Terpenos
2	10	Monoterpeno	Folha e Flor	 Linalool  Alfa Terpineol  Geraniol  Eugenol

Continuação Tabela 10.

Unidades isopreno	Número de carbonos	Classificação	Parte do Vegetal	Estrutura dos Terpenos
3	15	Sesquiterpeno	Raiz, Caule, folha e Flor	 (E) Nerolidol
4	20	Diterpeno	Folha e Flor	 Alfa cadinol
6	30	Triterpeno	Raiz, Caule e Folha	 (E,E)-Geranyl-Linalol
				 Fitol
				 Esqualeno

Fonte: O autor.

O fitol é um álcool alifático, sendo considerado um diterpeno (20 átomos de carbono e 4 unidades de isopreno) sendo de grande importância, trata-se de um dos principais componentes da clorofila (VETTER et al., 2012). É utilizado na indústria de cosméticos, xampus, sabonetes, detergentes entre outros (MCGINTY et al., 2010). Na medicina, apresenta atividades antinociceptivas e antioxidantes (SANTOS et al., 2013), bem como antinflamatória e antialérgica (RYU et al., 2011), além de estudos apontarem atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* (SAIKIA et al., 2010; IONUE et al., 2005).

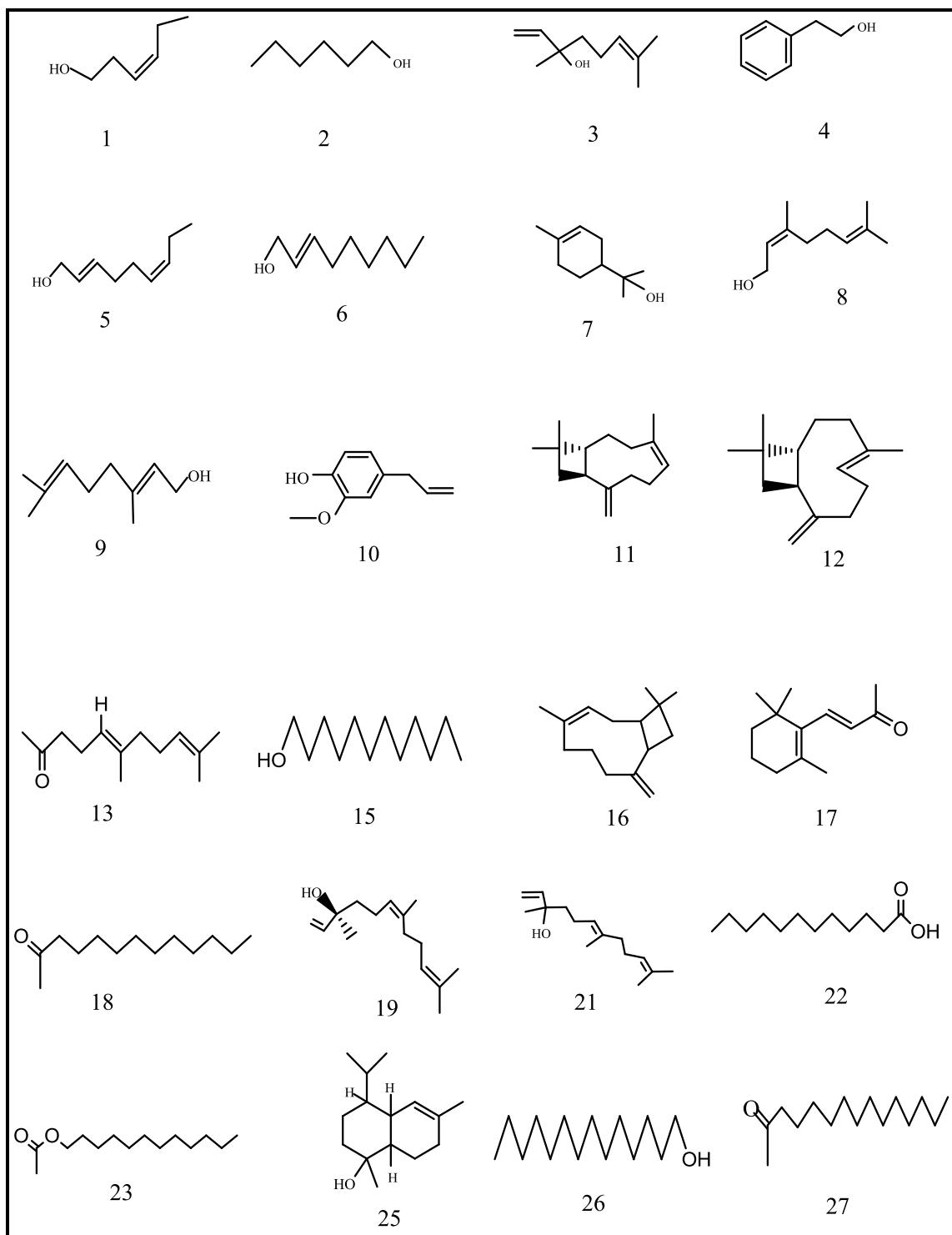
O esqualeno é um triterpeno polinsaturado que possui 6 unidades de isopreno, e é encontrado em óleo de fígado de tubarão, no amendoim, abóbora e azeite

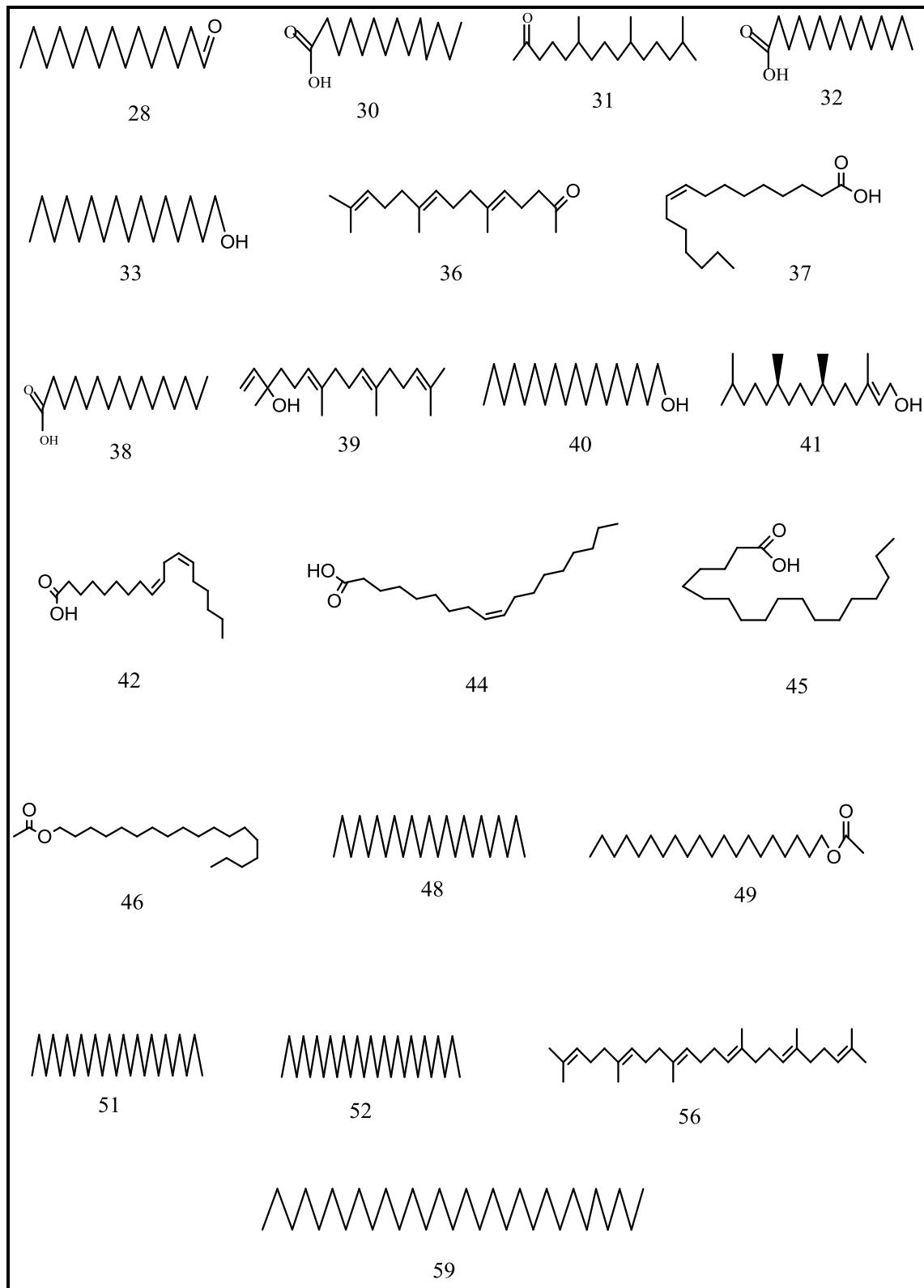
(AMAROWICZ, 2009). Apresenta propriedades preventivas no desenvolvimento do câncer e uma alta atividade antitumoral. Pesquisas edemiológicas com animais apontam que o esqualeno possui promissoras propriedades anticâncer (GUNES, 2013).

O (*E,E*)-Geranil linalool é um diterpeno oxigenado, constituinte de fragrância usada em cosméticos decorativos, fragrâncias finas, xampus, sabonetes e outros artigos de higiene pessoal. A quantidade utilizada até 2008 em todo mundo era cerca de 0,1 toneladas por ano (LAPCZYNSKI et al., 2008).

As fórmulas estruturais dos compostos identificados nos OE das diversas partes desta espécie estão representadas na Figura 23. Os números dos compostos desta figura estão de acordo com a numeração dos compostos na Tabela 8.

Figura 23. Fórmulas estruturais dos compostos identificados de *B. campestris*.





Fonte: O autor.

5.1.3. Atividades antimicrobiana e antifúngica dos óleos essenciais

A avaliação da atividade antimicrobiana de *B. campestris* foi determinada frente aos microrganismos orais aeróbios e anaeróbios, assim como sua citotoxicidade. As atividades antifúngicas foram avaliadas contra as leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. O método empregado foi o de microdiluição em caldo, e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada. Os resultados dos ensaios da atividade antimicrobiana dos OEs da flor, folha, caule e raiz são descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Atividade antimicrobiana dos OEs.

		Amostras de óleos essenciais				
		Bactéria	Concentração inibitória mínima (CIM) $\mu\text{g mL}^{-1}$			
			Flor	Folha	Caule	Raiz
Aeróbias	<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	400	>400	200	100	
	<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 49456)	200	>400	100	50	
	<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)	25	>400	50	12,5	
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (ATCC 43717)	200	>400	200	50	
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	50	200	50	25	
Anaeróbias	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	200	400	50	25	
	<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC19039	50	400	12,5	12,5	
	CC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Celulas Vero	---	89,12 ± 7,06	>512	237,76 ± 24,02	

Fonte: O autor.

Sendo:

- Controle positivo para bactérias aeróbias: Clorexidrina;
- Controle positivo para bactéricas anaeróbicas: Metronidazol.

Segundo Freires e colaboradores (2015), valores de CIM $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ considera-se uma atividade muito forte; entre 101 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ forte; de 501 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ moderada, e $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ baixa. O OE extraído das raízes da espécie *B. Campestris* apresentou inibição para todas as espécies de bactérias estudadas, de 12,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o OE proveniente do caule, obteve-se uma inibição para as bactérias *P. gingivalis*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *S. sanguinis* e *S. mitiis*, de 50 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já o OE das folhas foi o que apresentou menor atividade, $> 400 \mu\text{g mL}^{-1}$, para maior parte das bactérias investigadas. Por outro lado, o OE das flores apresentou elevada inibição contra as bactérias anaeróbias *P. gingivalis* e *A. naeslundii*, de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e moderada para *F. nucleatum*, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para as bactérias aeróbias, o OE da flor apresentou atividade muito forte contra *S. sanguinis*, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e forte para as demais. Estes resultados foram mais satisfatórios em relação ao trabalho de Nunes (2016) com a espécie *B. laevifolia* que apresentaram valores de CIM superior a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente às bactérias aeróbias e anaeróbias com OE da folha.

A atividade antimicrobiana do OE do caule e da raiz da espécie *B. campestris* pode estar relacionado a presença majoritária de ácidos graxos (ácido palmítico, linoleico e oleico) em sua composição ($>70\%$), tendo sido estas propriedades antimicrobianas reconhecidas e relatadas pela literatura (FREIRES et al., 2015; MARTINS et al., 2015; DEBOIS; SHIMITH, 2010). Outra possibilidade pode estar relacionada à presença de um metabólito em maior concentração no OE ou a associação sinérgica entre estas moléculas presentes, resultando em interações sinérgicas entre moléculas não identificadas na composição dos OEs extraídos das diversas partes de plantas (CARDOSO et al., 2016; CREVELIN et al., 2015).

A atividade citotóxica para as células Vero foi avaliada para os diferentes OE através do índice de seletividade (IS) expresso pelo logaritmo da razão entre a concentração citotóxica (CC₅₀) e CIM. O IS para o OE da folha na concentração de 400 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram de -0,65 e -0,35. Para o óleo do caule os valores de IS obtidos foram 1,61; 1,01; 0,71 e 0,41, respectivamente, para as concentrações de 12,5; 50; 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já o óleo da raiz, nas concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram obtidos, respectivamente IS de 1,27; 0,97 e 0,67.

Os resultados obtidos com os OEs do caule e das raízes apresentaram maior toxicidade aos microrganismos em relação às células Vero na mesma concentração. Os valores de IS foram positivos, sendo altamente seletivos para as bactérias aeró-

bicas e anaeróbicas. Isto resulta em uma baixa toxicidade, que pode ser atribuída a presença de álcoois, ésteres, sesquiterpeno e ácidos graxos. Para os óleos extraídos das folhas, os valores de IS foram negativos, -0,35 e -0,65, sendo tóxicos para as células Vero e representando uma baixa atividade antimicrobiana.

A partir desta classificação pode-se considerar que os óleos de *B. campestris* evidenciaram um efeito antimicrobiano entre promissor e bom, uma vez que as bactérias testadas sofreram inibição com CIM entre 12,5 a 400 µg mL⁻¹ e exibiu baixa citotoxicidade. Portanto, os OEs de *B. campestris* podem vir a ser empregados como uma alternativa natural na prevenção de doenças causadas por microrganismos, visto que os óleos apresentaram relevante atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias.

Os resultados da atividade antifúngica estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Atividade antifúngica dos OEs.

Leveduras	Amostras de óleos essenciais				
	Concentração inibitória mínima (CIM) µg mL ⁻¹	Flor	Folha	Caule	Raiz
<i>Candida albicans</i>	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000
<i>Candida tropicalis</i>	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000
<i>Candida glabrata</i>	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000
CC ₅₀ (µg mL ⁻¹) Celulas Vero	--	89,12 ± 7,06	>512	237,76 ± 24,02	

Fonte: O autor.

Sendo:

- Controle positivo para leveduras: Anfotericina.

Pela Tabela 12, observa-se que a atividade antifúngica apresentou valores de CIM superiores a 3.000 µg mL⁻¹ para as diferentes espécies de leveduras e óleos testados. Além disso, as concentrações utilizadas para os óleos não foram suficientes para inibição dos fungos, uma vez que o resultado encontrado é elevado para estudo de óleos frente à *Candida*, sugerindo o uso de concentrações bem mais elevada de OEs para obtenção de resultados satisfatórios (BUCHBAUER; LANG, 2011). Os valores de IS foram negativos, -1,5; -0,77 e -1,1, indicando a toxicidade do óleo para as células Vero, não sendo possível constatar atividades antifúngicas nos

microrganismos avaliados para os OEs obtidos da espécie *B. campestris*. Ensaios antifúngicos com óleo essencial da folha de *Banisteriopsis laevisfolia* foram encontrados CIM de 1.000 µg mL⁻¹. Também foi realizado um ensaio citotóxico frente a células Vero, que apresentou índice de seletividade negativo significando toxicidade do óleo das folhas (NUNES, 2014).

5.1.4. Atividade antileishmania dos óleos essenciais

Os OEs foram submetidos a ensaios para avaliação de atividade antileishmania em relação à *L. amazonensis* e a citotoxicidade, os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Atividade antileishmania (Cl_{50}) e citotoxicidade (CC_{50}) dos OEs.

Óleo essencial	<i>L. amazonensis</i> Cl_{50} (µ mL ⁻¹)	Celulas Vero CC_{50} (µ mL ⁻¹)	IS
Folha	294,88 ± 23,65	89,12 ± 7,06	-0,50
Caule	234,62 ± 20,54	>512	0,34
Raiz	157,30 ± 33,70	232,79 ± 24,02	0,17

Fonte: O autor.

Sendo:

- Controle positivo atividade antileishmania: Anfotericina B.

Os OEs extraídos das diferentes partes de *B. campestris* apresentaram atividade inibitória contra *L. amazonensis*. O destaque é para o OE proveniente das raízes que apresentou melhor atividade, ou seja, menor valor de Cl_{50} . Isto pode ser atribuído aos principais compostos encontrados ou a ação sinérgica de todos os constituintes. A atividade antileishmania e a citotoxicidade das células Vero foram comparadas pelo índice de seletividade (IS) (MARTINS et al., 2015). Um valor positivo indica uma maior seletividade contra protozoário *Leishmania*, e um valor negativo, indica uma maior toxicidade para as células Vero. Para os OEs extraídos do caule e das raízes, obteve-se respectivamente um IS de 0,34 e 0,17.

Estudo da atividade de *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade do OE de *M. officinalis*, erva cidreira verdadeira, nas concentrações 62,5 e 125 µg mL⁻¹ exibiram maior capacidade para impedir a replicação do protozoário. Além disto, mostrou-se

mais eficaz mesmo em concentrações menores, de toxicidade reduzida (COSTA et al., 2016).

Comparando com resultados obtidos do óleo da raiz, folha e flor de *Vermonia brasiliiana*, assa-peixe, apresentaram valores de CE₅₀ para atividade antiprotozoária 239 µg mL⁻¹ para o óleo da raiz e 210 µg mL⁻¹ para o óleo da folha (MARTINS et al., 2015). Lugo e colaboradores (2015) estudaram a composição química e a atividade antiprotozoária do OE da folha de *Diospyros hispida* testada frente ao parasita *Leishmania amazonensis*, e obtiveram o valor de CE₅₀ de 178 µg mL⁻¹.

Portanto, ao se comparar os resultados da atividade antiprotozoária com a citotóxica por meio do índice de seletividade (IS), os OEs extraídos do caule e das raízes apresentaram maior efeito inibitório para os protozoários e menor toxicidade. Isto revela a probabilidade de se encontrar novas moléculas bioativas com atividade antileishmania para o tratamento desta doença tão negligenciada.

5.1.5. Capacidade antioxidante e inibição da glicação dos óleos essenciais

O potencial antioxidante foi avaliado utilizando dois métodos diferentes: DPPH e ORAC. O ácido ascórbico foi usado como controle para ambos os métodos. Para o método DPPH, a porcentagem de inibição foi de 97,45% de ácido ascórbico e pelo método ORAC o resultado obtido para o controle foi de 2.489,5 µmol trolox eq g⁻¹. O método ORAC avalia o grau de inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil em relação a compostos de interesse, sendo bastante utilizado em análise de alimentos (HAYTOWITZ; BHAGWAT, 2010). Os resultados da atividade antioxidante e glicação são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Capacidade antioxidante e inibição da glicação dos OEs.

Amostras	DPPH %	ORAC	IG %
	µmol trolox eq g⁻¹		
Folha	13,19 ± 0,21	205,95 ± 34,58	40,81 ± 13,59
Caule	13,60 ± 5,50	702,23 ± 172,24	79,11 ± 1,18
Raiz	64,24 ± 2,02	415,60 ± 126,90	54,37 ± 10,12
Ácido Ascórbico	97,45 ± 0,35	2489,50 ± 109,60	---
Quercetina	---	---	97,5 ± 0,70

Fonte: O autor.

Pelo método de ORAC os valores obtidos foram de 702,23 e 415,60 µmol trolox eq g⁻¹ para os OEs do caule e raízes, respectivamente. Pelo método DPPH, foram obtidos 13,19 e 13,60%, respectivamente para folhas e caule, sendo que a raiz apresentou um percentual maior, 64,24%, em relação às outras partes da planta.

Carneiro e colaboradores (2017) estudaram a atividade antioxidante do OE das folhas e flores de *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae), relatando moderadas atividades quando comparadas a antioxidantes sintéticos usados em alimentos. Já Damasceno e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antioxidante do óleo da folha de *Lippia grandis* onde os valores foram 18,9 µg mL⁻¹ para DPPH e 240,4 mg TE g⁻¹. Para *B. campestris* os OEs do caule e raiz também apresentaram atividades antioxidantes promissoras para ambos os métodos, que pode ser atribuída à presença de ácidos graxos como ácido palmítico, linoleico e oleico. Já a atividade antioxidante para o óleo da folha pode ser atribuída à presença de diterpenos e monoterpenos.

A glicação é um processo em que uma molécula de glicose se liga com uma proteína, como colágeno e elastina, e que desestabiliza as proteínas podendo degradá-las. Esta ação é tão danosa quanto a dos radicais livres. As amostras de óleo da raiz e caule apresentaram uma inibição para glicação acima de 50%, com destaque para o caule com porcentagem de 79,11%.

Comparando-se os resultados da glicação com a atividade antioxidante obtida pelos métodos DPPH e ORAC dos óleos essenciais, observa-se que em ambos os ensaios os ácidos graxos saturados e insaturados estão presentes. Com isso, pode-se inferir que quanto maior o potencial de ação antioxidante ocasionado por ácidos graxos, maior será a inibição para glicação.

5.2. Extratos da raiz, caule e folhas

5.2.1. Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinando para se conhecer a quantidade de água existente na planta. Isto garante que ela não seja quantificada como produto em determinadas análises. Os resultados dos teores de umidade estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Teor de umidade nas amostras.

Amostras	Teor de umidade (%)
Raiz	9,0 ± 0,5
Caule	9,3 ± 0,7
Folha	9,3 ± 0,3

Fonte: O autor.

5.2.2. Extrato etanólico

A raiz, caule e folha foram submetidos à extração em etanol por maceração a temperatura ambiente. Os resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Massas e porcentagens dos extratos etanólicos obtidos.

Amostras	Massa do material vegetal (g)	Extrato (g)	Teor de extrato etanólico (%)
Raiz	1567,59	78,89	5,03
Caule	650,74	31,41	4,83
Folha	554,74	42,95	7,74

Fonte: O autor.

A folha apresentou maior percentagem de extrato etanólico do que o presente no caule e raiz, indicando que a folha possui uma maior quantidade de substâncias solúveis no solvente da extração. Estudos recentes com as folhas de plantas do mesmo gênero de *B. laevifolia* (NUNES, 2016) e *B. argyrophylla* (OLIVEIRA, 2016) apresentaram resultados semelhantes, respectivamente, de 11,7 e 11,63%. Já no trabalho de Martins (2018) com a espécie *B. oxyclada*, o extrato etanólico da folha, caule e raiz apresentaram, respectivamente, um rendimento de 10,34; 6,41 e 8,48%, sendo superiores aos encontrados no presente trabalho.

5.2.3. Partição líquido-líquido dos extratos em etanol

Para os extratos das folhas, caule e raiz em etanol, utilizou-se massas de 25,02; 24,97 e 46,59 g, respectivamente, e foram submetidos à partição líquido-líquido em solventes orgânicos de polaridade crescente. As partições obtidas foram hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e o resíduo remanescente foi denominado de partição metanol/água, conforme rendimento apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Rendimento da partição líquido-líquido dos extratos.

Amostras	Folha	Caule	Raiz
Hexano	2,40g – 9,59%	1,14g – 4,56%	0,66g -1,42%
Diclorometano	1,93g – 7,71%	1,12g – 4,48%	0,91- 1,95%
Acetato de etila	1,38g – 5,51%	1,46g – 5,85%	7,19 – 15,43%
<i>n</i> -butanol	5,92g – 23,66%	8,22g – 32,92%	21,51- 46,17%
Metanol/água	4,02g – 16,07%	7,32g – 29,31%	11,11- 23,84%

Fonte: O autor.

Analizando os resultados da Tabela 17, a partição com diclorometano foi a que apresentou menor rendimento para os extratos da planta. Por outro lado, a partição *n*-butanol teve o maior rendimento para as diversas partes da planta, podendo ser atribuído à presença em maior quantidade de compostos com polaridade mais elevada.

5.3. Prospecção fitoquímica, fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides

5.3.1. Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada por meio de CCD, com a utilização de duas fases móveis: uma polar e outra apolar. Os reveladores químicos empregados foram cloreto de alumínio e NP/PEG para flavonoides, iodocloro platinado e Dragen-

dorff para alcaloides, Libermann-Buchard para terpenos e esteroides, e Anisaldeído para terpenos, esteroides, fenol e açúcares. Os resultados da prospecção fitoquímica para folha, caule e raiz de *B. campestris* são apresentados na Tabela 18, não sendo verificada a presença de alcaloides em nenhuma dos extratos e partições.

Tabela 18. Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos e partições da folha, caule e raiz de *B. campestris*.

Extrato/partições	Flavonoides		Alcaloides		Terpenos e esteroides	Terpenos esteroides, fenol e açúcar
	AICI ₃	NP/PEG	Iodocloro platinado	Dragendorff		
	Folhas			Libermann-buchard	Anisaldeído	
Extrato Etanólico	+	+	-	-	+	+
Hexano	-	-	-	-	+	+
Diclorometano	-	-	-	-	+	+
Acetato etila	+	+	-	-	+	+
<i>n</i> -Butanol	+	+	-	-	+	+
Metanol/Água	+	+	-	-	-	+

Extrato/partições	Flavonoides		Alcaloides		Terpenos e esteroides	Terpenos esteroides, fenol e açúcar
	AICI ₃	NP/PEG	Iodocloro platinado	Dragendorff		
	Caule			Liberman-buchard	Anisaldeído	
Extrato Etanólico	+	+	-	-	+	+
Hexano	-	-	-	-	+	+
Diclorometano	+	+	-	-	+	+
Acetato etila	+	+	-	-	+	+
<i>n</i> -Butanol	+	+	-	-	+	+
Metanol/Água	+	+	-	-	+	+

Continuação Tabela 18.

Raiz Extrato/partições	Flavonoides		Alcaloides		Terpenos e esteroides Liebermann-buchard	Terpenos este- roides, fenol e açúcar Anisaldeído
	AICI ₃	NP/PEG	Iodocloro platinado	Dragendorff		
Extrato Etanólico	+	+	-	-	+	+
Hexano	-	-	-	-	+	+
Diclorometano	+	+	-	-	+	+
Acetato etila	+	+	-	-	+	+
n-Butanol	+	+	-	-	+	+
Metanol/Água	+	+	-	-	+	+

Fonte: O autor.

Sendo:

- Postivo (+): presente;
- Negativo (-): ausente.

O perfil apresentado da prospecção fitoquímica da folha, caule e raiz de *B. campestris* é praticamente semelhante para todas as partes da planta. Na literatura foram encontrados ensaios de prospecção fitoquímica para varias espécies do mesmo gênero entre as quais as espécies *B. laevifolia* e *B. argyrophylla* (NUNES, 2016; OLIVEIRA, 2016), conforme Figura 24.

Figura 24. Prospeção fitoquímica das folhas de (a) *B. laevifolia* e (b) *B. argyrophylla*.

(a)	Amostra	Fitoconstituientes					
		Flavonoides	Alcaloides	Alcaloides/ Nitrogênio Heterocíclico	Terpenoides/ Saponinas/ fenol e açúcar	Terpenoides/ Esteroides/ Saponinas	Terpenoides/ Flavonoides
E.E. ^a	+++	-	-	-	++	+	+
E.E. ^{**}	-	-	-	-	-	-	+
F.H. [*]	-	-	-	-	-	+	+
F.H. ^{**}	-	-	-	++	+	-	-
F.D. [*]	++	-	-	++	++	++	++
F.D. ^{**}	++	-	-	++	+	+	+
F.A. [*]	+++	-	-	+	++	++	++
F.A. ^{**}	++	-	-	++	+	-	-
F.B. [*]	+++	-	-	+	+	+	++

(b)	Amostras	Flavonoides	Terpenos e esteroides	Terpenos, esteroides fenol e açúcar	Compostos fenólicos em geral	Alcaloides	
		NP/PEG	Libermann-Burchard	Anisaldeído	Sulfato cérico	ICPt	Dragendorff
	EE	+++	+++	+++	+++	-	-
FH	++	++	+	+	+	-	-
FDCM	+	+	+	+	+	-	-
FAE	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
FB	+	+	++	+	+	-	-
FH ₂ O	+	-	+	+	+	-	-

Fonte: ^a(NUNES, 2016); ^b(OLIVEIRA, 2016).

Sendo:

- EE = extrato etanólico;
- FH = fração hexano;
- FDCM = fração diclorometano;
- FAE = fração acetato de etila;
- FB = *n*-butanol;
- FH₂O = fração água.

Os testes de prospecção das espécies de *Banisteriopsis* apresentadas na Figura 24 evidenciam a presença de terpenos, esteroides, compostos fenólicos e flavonoides. Sendo que os flavonoides foram a classe de compostos predominantes, encontrados principalmente nas frações mais polares. Comparando o perfil fitoquí-

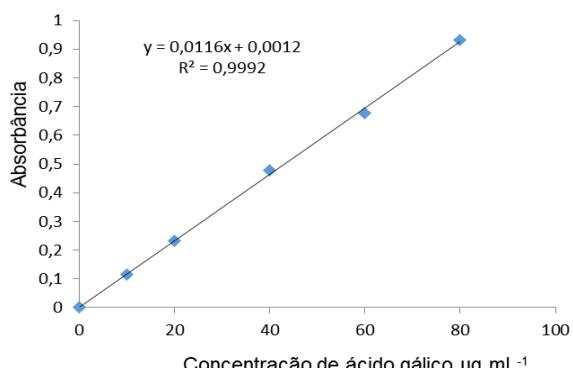
mico com os da folha de *B. campestris*, verificou-se a ausência de alcalóide e a existência de substâncias com propriedades antioxidantes, tais como, compostos fenólicos, terpenos e flavonóides nos extratos e partições. Semelhante composição foi relatada por Martins (2018) ao se avaliar diferentes extratos e partições provenientes da espécie de *B. oxyclada*, não sendo constatado a presença de alcalóides e nitrogênio heterocíclico. Já Frias e colaboradores (2011) estudaram a espécie *Banisteriopsis anisandra* e relataram a presença de alcalóides, compostos de outras classes, taninos e antraquinonas, além das classes comumente relatadas nos trabalhos anteriores. Por outro lado, o estudo de Sacramento (2014) com as folhas e caules dos extratos hidroetanólicos de *B. pubipetala*, apresentou substâncias de diferentes classes, entre os quais, taninos, flavonoides, saponinas terpenoides e esteroides (SACRAMENTO, 2014).

Portanto, os testes fitoquímicos para as diversas partes da planta de *B. campestris* apresentaram diferentes compostos em consonância com as outras espécies de *Banisteriopsis* descritos anteriormente.

5.3.2. Teores de fenóis totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais (FT) baseou-se no uso do reagente de *Folin-Ciocalteau*, que forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores (SOUZA et al., 2007). A sua quantificação foi realizada a partir da medida das absorbâncias das amostras, e os valores extrapolados em uma equação de reta obtida pela curva de calibração de concentração do ácido gálico, Figura 25.

Figura 25. Curva de calibração do ácido gálico.



Fonte: O autor.

A partir das medidas de absorbância das amostras no comprimento de onda de 760 nm, obteve-se os teores de FT, expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra. Os dados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Teor de fenóis totais (FT).

Amostras	Teor de FT (mg de EAG g ⁻¹ de amostra)		
Extrato/partições	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico	173,0 ± 2,6	314,1 ± 5,1	499,3 ± 1,4
Hexano	33,6 ± 0,6	16,1 ± 1,3	15,2 ± 2,2
Diclorometano	51,2 ± 1,1	100,2 ± 1,3	102,8 ± 9,5
Acetato de etila	382,3 ± 3,0	516,2 ± 2,3	572,8 ± 10,6
n-Butanol	390,0 ± 1,2	518,5 ± 2,7	593,5 ± 4,5
Metanol/Água	70,7 ± 4,2	99,4 ± 5,8	229,7 ± 4,1

Fonte: O autor.

A partir dos resultados obtidos, foi possível confirmar e quantificar o teor de FT nos extratos e partições testados para a folha, caule e raiz de *B. campestris*. Os maiores teores de FT foram encontrados para a raiz no extrato etanólico e nas partições acetato de etila e n-butanol, respectivamente, 499,3; 572,8 e 593,5 mg EAG g⁻¹. As partições acetato de etila e n-butanol apresentaram também elevados teores de compostos fenólicos em todas as partes da planta estudada. Os menores valores de FT foram registrados para a partição hexano da folha, caule e raiz, devido à polaridade dos compostos fenólicos.

No estudo com a planta *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae) o teor de compostos fenólicos para os extratos etanólicos e partições acetato de etila e n-butanol foram respectivamente, 425,105; 492,261 e 509,947 mg EAG g⁻¹ e a partição hexano, com o menor teor de compostos fenólicos 80,42 mg EAG g⁻¹ (ROLIM et al., 2013). De acordo com Cunha (2013), os compostos fenólicos possuem grupos hidroxila na sua estrutura conferindo caráter polar, devido a menor afinidade por solventes apolares como hexano e maior afinidade por solventes polares como etanol.

Em um estudo com a folha e caule de *Banisteriopsis pubipetala* coletada no município de Montes Claros – MG, os valores de compostos fenólicos para os extratos hidroetanólicos obtidos foram de 146,09 e 100,19 mg EAG g⁻¹ (SACRAMENTO,

2014). Portanto, os valores de FT determinados para os extratos etanólicos da folha e caule de *B. campestris* são maiores em relação à planta da mesma espécie citada anteriormente.

A Tabela 20 traz uma comparação com os teores de FT dos extratos e partições das folhas de três espécies de *Banisteriopsis*, *B. laevifolia*, *B. argyrophylla* e *B. oxyclada*, com os resultados de FT obtidos para as folhas descritas nesse trabalho.

Tabela 20. Comparação dos teores de FT das folhas entre espécies de *Banisteriopsis*.

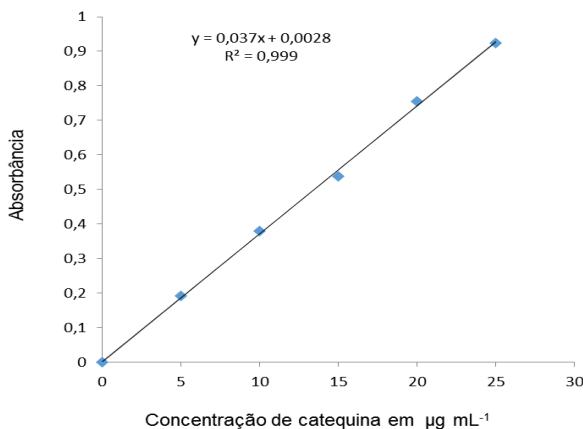
Amostras	Teor de FT (mg de EAG g ⁻¹ de amostra)			
Extrato/partições	<i>B. laevifolia</i> ^a	<i>B. argyrophylla</i> ^b	<i>B. oxyclada</i> ^c	<i>B. campestris</i>
Extrato etanólico	542,0 ± 2,1	337,13 ± 1,44	83,30 ± 1,80	173,0 ± 2,6
Hexano	66,2 ± 1,6	174,91 ± 1,93	39,80 ± 0,10	33,6 ± 0,6
Diclorometano	495,1 ± 3,7	73,10 ± 1,12	30,10 ± 0,70	51,2 ± 1,1
Acetato de etila	660 ± 1,5	405,46 ± 3,2	239,90 ± 4,00	382,3 ± 3,0
<i>n</i> -Butanol	784 ± 5,6	229,46 ± 1,07	384,30 ± 4,30	390,0 ± 1,2
Metanol/Água	-	67,48 ± 0,45	26,60 ± 3,70	70,7 ± 4,2

Fonte: ^a(NUNES et al., 2016); ^b(OLIVEIRA, 2016); ^c(MARTINS, 2018).

Pelos resultados da Tabela 20, as partições mais polares, acetato e *n*-butanol, apresentaram elevados valores de FT para a folha de todas as espécies, sendo maiores para a *B. laevifolia* em relação aos resultados obtidos para a de *B. campestris*. A partição menos polar, diclorometano, da *B. laevifolia* teve um valor mais elevado em relação aos obtidos para *B. campestris* e as demais espécies.

5.3.3. Teores de proantocianidinas

A partir da leitura de absorbâncias das amostras de catequina em concentrações conhecidas, obteve-se uma curva de calibração da absorbância pela concentração em µg mL⁻¹, conforme apresentado na Figura 26.

Figura 26. Curva de calibração da catequina.

Fonte: O autor.

Os teores de proantocianidinas variaram significativamente entre as amostras, sendo que a raiz apresentou maior teor em relação aos extratos e partições de outras partes. Nas folhas e caule de *B. campestris* a partição *n*-butanol obteve maior valor de proantocianidinas. Já para a raiz a partição acetato de etila apresentou o maior valor 742,2 mg de ECAT g^{-1} em relação as outras partições. Os valores de proantocianidinas obtidos foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina (ECAT) por grama de amostra, conforme apresentado na Tabela 21.

Tabela 21. Teor de proantocianidina obtido nas diversas partes da planta.

Amostras	Teor de proantocianidinas (mg de ECAT g^{-1} de amostra)		
Extrato/partições	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico	$121,1 \pm 2,9$	$355,1 \pm 4,5$	$713,1 \pm 2,1$
Hexano	$45,0 \pm 4,7$	$41,5 \pm 1,4$	$48,9 \pm 6,4$
Diclorometano	$66,6 \pm 0,4$	$62,3 \pm 9,7$	$45,7 \pm 1,8$
Acetato de etila	$165,5 \pm 5,2$	$318,5 \pm 4,9$	$742,2 \pm 3,7$
<i>n</i>-Butanol	$435,8 \pm 3,3$	$479,6 \pm 5,7$	$582,5 \pm 9,3$
Metanol/Água	N.I	$76,5 \pm 2,4$	$203,7 \pm 10,2$

Fonte: O autor.

Ao comparar o teor de FT e proantocianidinas de *B. campestris*, observa-se que a raiz da planta apresenta grande concentração de compostos fenólicos e proantocianidinas. Para a folha de *B. argyrophylla* foram obtidos resultados significativos principalmente para partições mais polares (OLIVEIRA, 2016), porém menores em relação ao caule e raiz de *B. campestris* que apresentaram altos teores de pro-

antocianidinas. Um valor mais alto foi encontrado por Nunes e colaboradores (2016) para folha de *B. laevifolia* de 382,1 mg de ECAT g⁻¹ para partição acetato de etila e um valor menor 18,5 mg de ECAT g⁻¹ para a partição hexano. Estes resultados são inferiores aos encontrados para a espécie *B. campestris*. Os resultados dos teores de proantocianidina para folhas, caule e raízes são comparados com espécie *B. oxyclada* na Tabela 22.

Tabela 22. Comparação dos teores de proantocianidinas das espécies *B. campestris* e *B. oxyclada*.

Extrato/partições	Teor de proantocianidinas (mg de ECAT g ⁻¹ de amostra)					
	<i>Banisteriopsis campestris</i>			<i>Banisteriopsis oxyclada</i> ^a		
	Folha	Caule	Raiz	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico	121,1 ± 2,9	355,1 ± 4,5	713,1 ± 2,1	88,70 ± 3,00	58,50 ± 8,74	406,90 ± 14,23
Hexano	45,0 ± 4,7	41,5 ± 1,4	48,9 ± 6,4	96,60 ± 4,90	37,20 ± 0,81	27,20 ± 2,90
Diclorometano	66,6 ± 0,4	62,3 ± 9,7	45,7 ± 1,8	81,20 ± 3,20	35,50 ± 1,67	38,10 ± 1,58
Acetato de etila	165,5 ± 5,2	318,5 ± 4,9	742,2 ± 3,7	397,40 ± 4,0	184,90 ± 11,86	283,20 ± 0,36
n-Butanol	435,8 ± 3,3	479,6 ± 5,7	582,5 ± 9,3	840,90 ± 10,0	720,80 ± 1,82	996,40 ± 7,40
Metanol/Água	N.I	76,5 ± 2,4	203,7 ± 10,2	39,30 ± 1,75	25,60 ± 4,35	55,20 ± 4,69

Fonte: ^a(MARTINS, 2018).

Comparando os resultados da Tabela 22, observa-se que o extrato etanólico para as diversas partes de *B. campestris* foi superior a obtida para a espécie de *B. oxyclada*. Já as partições acetato de etila e *n*-butanol foram as que mostraram maiores teores de proantocianidinas nas duas espécies. A partição *n*-butanol da *B. oxyclada* apresentou teor de proantocianidinas superior em relação à espécie deste estudo e na partição acetato de etila o valor encontrado para raiz e caule de *B. campestris* foram maiores do que o encontrado para *B. oxyclada*.

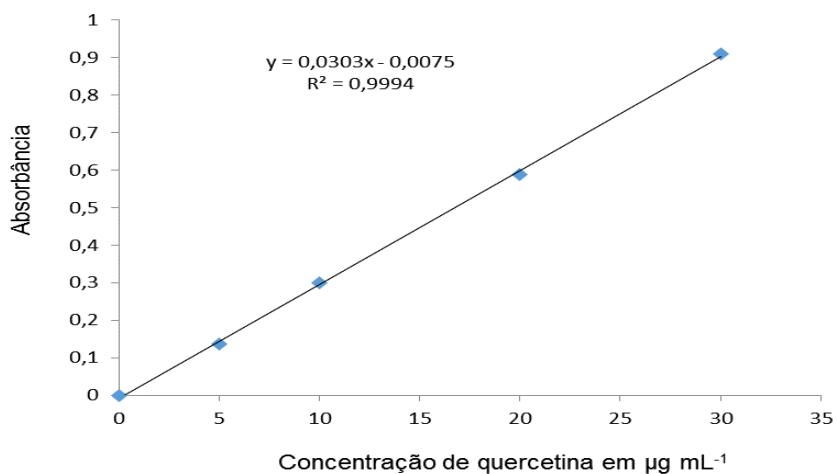
Em comparação com outras espécies do cerrado, os valores encontrados para raiz de *B. campestris* foram maiores que os valores de *Campomanesia pubscens* que apresentou teor de proantocianidinas abaixo de 20 mg de ECAT g⁻¹ para a raiz, caule, folha e fruto (CHANG et al., 2011). Em outro estudo envolvendo a espécie

Inga Laurina (Sw) Willd, para as cascas, principalmente nas partições acetato de etila e *n*-butanol apresentaram grande concentração de proantocianidinas de 467,2 e 492,4 mg de ECAT g⁻¹ (MARTINS, 2017). Porém, ao compararmos os teores de proantocianidinas do caule e raiz de *B. campestris*, estes foram superiores aos valores encontrados para as partições de *Inga Laurina*.

5.3.4. Teores de flavonoides

O teor de flavonoides foi calculado a partir da equação da reta da curva analítica construída com quercetina, obtida da reação entre a quercetina e o AlCl₃, Figura 27.

Figura 27. Curva de calibração da quercetina.



Fonte: O autor.

Os resultados foram expressos em miligrama de equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ g⁻¹ de extrato). A Tabela 23 mostra os resultados obtidos para extratos e partições da folha, caule e raiz de *B. campestris*.

Tabela 23. Teor de flavonoides obtidos para *B. campestris*.

Amostras	Teor de flavonoides (mg de EQ g ⁻¹ de amostra)		
	Folha	Caule	Raiz
Extrato/partições			
Extrato etanólico	55,6 ± 0,8	10,3 ± 0,2	4,9 ± 0,3
Hexano	13,6 ± 0,4	15,4 ± 0,6	3,4 ± 0,1
Diclorometano	41,7 ± 0,4	10,7 ± 0,1	7,2 ± 0,5
Acetato de etila	133,6 ± 2,2	12,2 ± 0,1	9,0 ± 0,1
n-Butanol	52,04 ± 0,38	9,5 ± 0,2	8,4 ± 0,6
Metanol/Água	5,8 ± 0,4	6,8 ± 0,2	2,7 ± 0,1

Fonte: O autor.

Pelos resultados, observa-se que a folha apresentou os maiores teores de flavonoides, com melhor resultado para partição acetato de etila 133,6 mg EQ g⁻¹. No caule e na raiz os teores de flavonoides determinados foram abaixo de 20 mg EQ g⁻¹. Entretanto, o caule e a raiz tiveram elevada quantidade de FT e proantocianidinas, portanto, não pode ser descartada a presença de outras classes de flavonoides nos seus extratos e partições, uma vez que podem conter compostos como flavona, flavonol, flavan-3-ol, isoflavona ou antocianinas, que não formam complexos com o alumínio (MARTINS, 2017). Também pode ocorrer a formação de um complexo do flavonoide com o cloreto de alumínio que absorva a luz em comprimento de onda diferente de 425 nm (SOUZA, 2015).

O teor de flavonoides encontrado na partição acetato de etila foi de 88,8 mg EQ g⁻¹ enquanto na partição n-butanol foi de 18,8 mg EQ g⁻¹ para as folhas de *B. laevifolia* (NUNES et al., 2016). Para as folhas de *B. argyrophylla* encontrou-se 211,85 mg EQ g⁻¹ para a partição acetato de etila e 21,40 mg EQ g⁻¹ para a n-butanol (OLIVERA, 2016). Nos testes realizados com *B. campestris*, os melhores resultados para a folha foram nas partições acetato de etila e n-butanol e o menor valor para partição metanol/água.

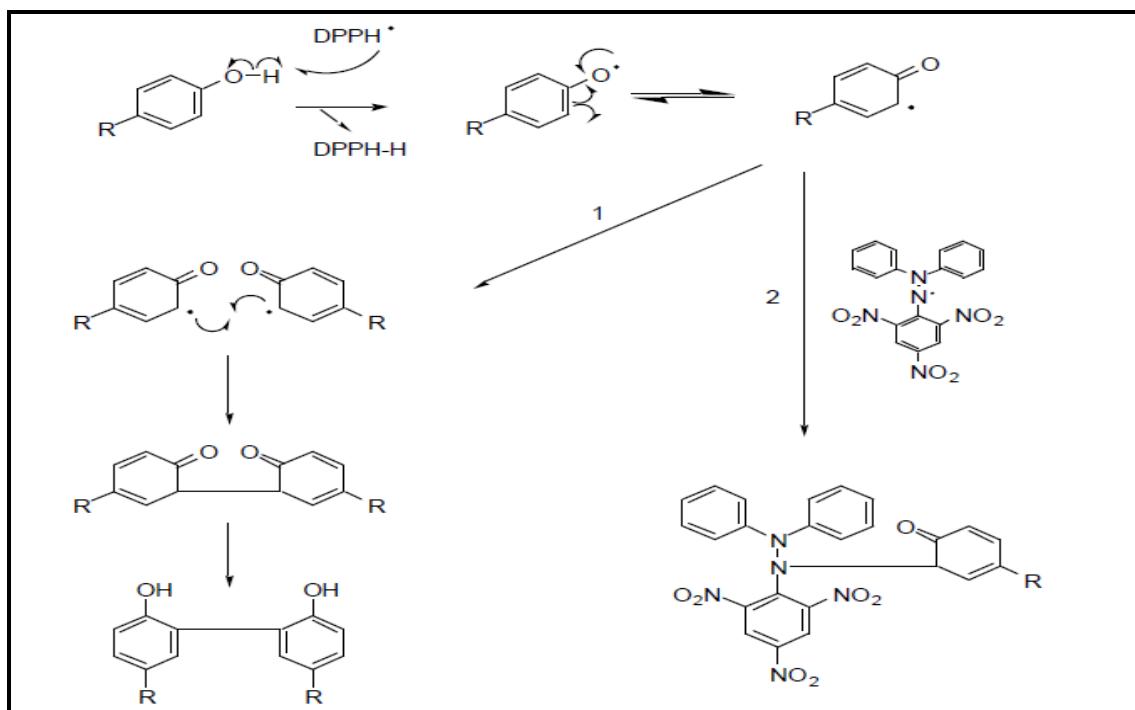
Nos extratos hidroetanólicos da folha e caule de *B. pubipetala*, os teores de flavonoides foram de 20,25 e 7,75 mg EQ g⁻¹ (SACRAMENTO, 2014). Observa-se que os valores obtidos são muitos próximos aos obtidos para o extrato da folha, caule e raiz de *B. campestris*, não sendo encontrados estudos na literatura referentes ao teor de flavonoides do extrato e partições da raiz de espécies de *Banisteriopsis* para que se possa confrontar com os dados obtidos neste trabalho.

5.4. Atividade antioxidante

5.4.1. Análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro radical livre DPPH

Um dos métodos empregados para se determinar o potencial antioxidante de uma amostra é utilizando o reagente DPPH. O teste consiste em avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres, assim, o DPPH apresenta coloração violeta intensa e ao ser reduzido, muda sua coloração para amarelo, podendo ser quantificado por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), no comprimento de 517 nm. Essa mudança de cor sinaliza o desaparecimento do radical DPPH em solução devido à formação de espécies mais estáveis, podendo ser monitorada a diminuição da absorbância, representando o consumo do radical DPPH que é consumida pelo antioxidante (OLIVEIRA et al., 2009; BRAND-WILLIAMS et al., 1995), conforme reação entre um composto fenólico e o radical DPPH, mostrado na Figura 28.

Figura 28. Reação entre composto fenólico e o radical DPPH.



Fonte: (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

O ensaio de atividade antioxidante foi expresso em CE_{50} , e equivale à concentração efetiva de amostra capaz de consumir 50% de radical DPPH. O cálculo foi realizado através da regressão linear da curva analítica do gráfico de porcentagem de DPPH sequestrado após 1 hora de reação *versus* as concentrações dos extratos e partícões. Na Tabela 24 estão as equações de reta e os valores dos coeficientes correlação obtidos através da regressão de porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas. Embora todas as amostras tenham sido testadas em triplicata, é mostrado apenas um dos resultados.

Tabela 24. Equações da reta da porcentagem de DPPH em função das concentrações de amostras.

Folha	Equação Linear $y = ax + b$	R^2
Extrato etanólico	$y = 0,4589x - 8,9859$	0,9910
Hexano	$y = 2,8058x - 18,807$	0,9984
Diclorometano	$y = 1,1437x - 18,481$	0,9956
Acetato de etila	$y = 0,1448x - 1,9546$	0,9988
<i>n</i> -Butanol	$y = 0,0993x - 1,5471$	0,9818
Metanol/Água	$y = 1,0873x - 9,8553$	0,9926
Caule	Equação Linear $y = ax + b$	R^2
Extrato etanólico	$y = 0,1942x - 2,189$	0,9902
Hexano	$y = 2,5504x - 58,811$	0,9835
Diclorometano	$y = 1,2396x - 33,892$	0,9852
Acetato de etila	$y = 0,1244x - 1,1674$	0,9995
<i>n</i> -Butanol	$y = 0,0758x - 0,6631$	0,9921
Metanol/Água	$y = 0,7812x - 10,63$	0,9931
Raiz	Equação Linear $y = ax + b$	R^2
Extrato etanólico	$y = 0,0835x - 1,2231$	0,9779
Hexano	$y = 19,25x - 126,81$	0,9886
Diclorometano	$y = 1,0327x - 26,676$	0,9398
Acetato de etila	$y = 0,0799x - 1,0196$	0,9952
<i>n</i> -Butanol	$y = 0,0737x - 0,3028$	0,9950
Metanol/Água	$y = 0,1899x - 2,1942$	0,9998

Fonte: O autor.

Substituindo o valor de “x” por 50 nas equações acima, Tabela 24, obtém-se os valores de CE_{50} em $\mu\text{g mL}^{-1}$ que estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Valores de CE₅₀ da atividade antioxidante dos extratos e partições da folha, caule e raiz de *B. campestris*.

Amostras		CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
Extrato/partições		Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico		14,39 ± 0,66	7,59 ± 0,09	2,95 ± 0,11
Hexano		121,58 ± 0,23	68,83 ± 0,81	833,59 ± 15,42
Diclorometano		39,94 ± 1,10	27,81 ± 0,24	24,96 ± 0,06
Acetato de etila		5,29 ± 0,09	5,05 ± 0,10	2,96 ± 0,03
n-Butanol		3,50 ± 0,08	3,17 ± 0,01	3,35 ± 0,04
Metanol/Água		43,52 ± 0,88	28,41 ± 0,55	7,42 ± 0,23
BHT		6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,5 ± 0,1

Fonte: O autor.

Para os resultados de CE₅₀, as partições menos polares apresentaram valores moderados, com destaque para a partição hexano em que os valores obtidos foram de 121,58; 68,83 e 833,59 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para folha, caule e raiz. Os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos com as partições acetato de etila e *n*-butanol, que tiveram valores de CE₅₀ menores que 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as partes da planta.

Os extratos e partições da folha, caule e raiz que tiveram elevados teores de FT, foram os que apresentaram menores valores de CE₅₀, mostrando que houve uma correlação positiva entre FT e atividade antioxidante.

Para Reynertson e colaboradores (2005), amostras com valores de CE₅₀ abaixo de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentam potencial antioxidante elevado, entre 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados moderados, entre 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresenta baixa atividade antioxidante e acima de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o extrato é considerado inativo. Analisando os resultados da Tabela 25 a atividade antioxidante das partes de *B. campestris* foram abaixo de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para quase todas as amostras, evidenciando valores excelentes e próximos entre si, principalmente nas partições polares onde o CE₅₀ foi melhor que BHT padrão utilizado como controle positivo.

A Tabela 26 apresenta os valores de CE₅₀ encontrado para folha, de *B. campestris* em comparação as folhas de amostras de outras espécies de *Banisteriopsis* encontrados na literatura.

Tabela 26. Comparação da atividade antioxidante entre espécies de *Banisteriopsis*.

Amostras	CE ₅₀ (μg mL ⁻¹)			
	<i>B. campestris</i>	<i>B. argyrophylla</i> ^a	<i>B. laevifolia</i> ^b	<i>B. oxyclada</i> ^c
Extrato/partições	Folha	Folha	Folha	Folha
Extrato etanólico	14,39 ± 0,66	4,27 ± 0,80	4,53 ± 0,92	25,90 ± 1,10
Hexano	121,58 ± 0,23	12,02 ± 2,00	58,17 ± 1,46	160,70 ± 3,40
Diclorometano	39,94 ± 1,10	17,03 ± 0,40	9,14 ± 0,79	100,40 ± 3,90
Acetato de etila	5,29 ± 0,09	4,10 ± 0,10	4,07 ± 0,46	6,50 ± 0,40
<i>n</i> -Butanol	3,50 ± 0,08	4,8 ± 0,10	8,39 ± 1,07	6,80 ± 0,80
Metanol/Água	43,52 ± 0,88	23,07 ± 2,30	-	119,50 ± 2,60
BHT	6,5 ± 0,10	5,31 ± 0,20	7,3 ± 0,30	7,30 ± 0,30

Fonte: ^a(OLIVEIRA, 2016); ^b(NUNES et al., 2016); ^c(MARTINS, 2018).

As diversas espécies de *Banisteriopsis* apresentaram promissoras atividades antioxidantes nas partições mais polares. Assim, estas espécies possuem elevado potencial antioxidante em função da diversidade de substâncias encontradas com estas propriedades.

Os resultados da atividade antioxidante do caule e raiz de *B. campestris* foram comparados com as da espécie *B. oxyclada* sendo apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27. Comparação da atividade antioxidante extrato/partições do caule e raiz de *B. campestris* e *B. oxyclada*.

Amostras	CE ₅₀ (μg mL ⁻¹)			
	<i>B. campestris</i>		<i>B. oxyclada</i> ^a	
Extrato/partições	Caule	Raiz	Caule	Raiz
Extrato etanólico	7,59 ± 0,09	2,95 ± 0,11	6,38 ± 1,50	7,58 ± 0,13
Hexano	68,83 ± 0,81	833,59 ± 15,42	242,43 ± 23,24	> 200,00
Diclorometano	27,81 ± 0,24	24,96 ± 0,06	81,75 ± 4,55	64,61 ± 4,65
Acetato de etila	5,05 ± 0,10	2,96 ± 0,03	35,00 ± 0,70	3,75 ± 0,60
<i>n</i> -Butanol	3,17 ± 0,01	3,35 ± 0,04	1,28 ± 0,17	3,97 ± 0,27
Metanol/Água	28,41 ± 0,55	7,42 ± 0,23	57,32 ± 3,74	22,00 ± 1,22
BHT	6,5 ± 0,10	6,5 ± 0,10	7,30 ± 0,30	7,30 ± 0,30

Fonte: ^a(MARTINS, 2018).

Pelos resultados da Tabela 27, o extrato etanólico de ambas as espécies foram próximos aos obtidos pelo padrão BHT, com destaque para a raiz de *B. campestris* com valor de CE₅₀ de 2,95 μg mL⁻¹, considerado melhor em comparação ao obtido pelo padrão. As partições do caule e da raiz de *B. campestris* apresentaram

um CE_{50} inferior aos obtidos para *B. oxyclada*, resultando em maior capacidade antioxidante para a espécie *B. campestris*. Já o extrato etanólico das folhas e caule de *B. campestris* apresentaram $CE_{50} = 14,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $CE_{50} = 7,59 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo superior aos obtidos pelo trabalho de Sacramento (2014) com a espécie *B. pubipetala* que resultaram em $CE_{50} = 25,42 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $CE_{50} = 50,73 \mu\text{g mL}^{-1}$. No trabalho de Rolim e colaboradores (2013) foi estudada a espécie *Byrsonima gardneriana*, obtendo melhores resultados para as partições de acetato de etila e *n*-butanol, onde os CE_{50} foram menores que $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, semelhante ao valor obtido para o padrão de ácido ascórbico.

5.4.2. Análise da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical peroxil (ORAC)

A determinação da atividade antioxidante pelo método de ORAC consiste na inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil iniciada por decomposição térmica do composto 2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloreto. Neste método, é utilizada a fluoresceína como sonda fluorescente, sendo que a perda de sua fluorescência é avaliada em função do tempo, na ausência e presença de antioxidante. A determinação é realizada pelo cálculo da área sob a curva.

Ao avaliar os resultados provenientes da análise de ORAC, Tabela 28, verificou-se que a partição acetato de etila apresentou elevado potencial em inibir a oxidação de moléculas e os resultados obtidos para folha, caule e raiz são superiores ao padrão ácido ascórbico utilizado. Além disso, verifica-se que quanto maior o teor de FT e proantocianidinas, maior a atividade antioxidante.

Tabela 28. Atividade antioxidante ORAC.

Amostras	ORAC ($\mu\text{mol trolox eq g}^{-1}$)		
	Folha	Caule	Raiz
Extrato/partições			
Extrato etanólico	823,71 ± 94,38	616,73 ± 79,11	3.914,53 ± 74,18
Hexano	-	66,00 ± 15,35	-
Diclorometano	642,33 ± 152,27	1.468,79 ± 12,08	1.545,58 ± 190,89
Acetato de etila	3.706,08 ± 120,26	3.784,33 ± 165,04	3.742,64 ± 269,28
n-Butanol	917,33 ± 219,34	2.093,39 ± 127,69	2.769,18 ± 94,19
Metanol/Água	737,41 ± 88,74	903,43 ± 250,18	3.473,49 ± 274,04
Ácido ascórbico	2.498,5 ± 109,60	2.498,5 ± 109,60	2.498,5 ± 109,60

Fonte: O autor.

As folhas, caule e raízes de *B. campestris* apresentaram boa atividade antioxidante pelo método ORAC, sendo que, os menores valores foram para partição hexano. A raiz apresentou melhor atividade nas partições acetato de etila, *n*-butanol, metanol/água extrato etanólico sendo que os valores obtidos foram superiores ao do padrão ácido ascórbico.

O estudo do extrato etanólico e partições orgânicas da casca de *Annona crassiflora*, araticum, comparadas com o controle, ácido ascórbico, apresentaram uma alta capacidade antioxidante pelo método ORAC de 3.355 e 2.714 $\mu\text{mol trolox eq g}^{-1}$ para as partições acetato de etila e *n*-butanol (JUSTINO et al., 2016). Em trabalho recente deste mesmo autor, com a folha da espécie *Annona muricata*, graviola, as partições acetato e *n*-butanol apresentaram propriedade antioxidante de 3.964 e 2.707 $\mu\text{mol trolox eq g}^{-1}$, sendo atribuído a várias biomoléculas conhecidas como antioxidantes potentes identificados nessas partições (JUSTINO et al., 2018).

Portanto, o extrato etanólico e suas partições de *B. campestris*, são potenciais fontes de antioxidantes uma vez que apresentaram bons resultados pelos métodos DPPH e ORAC, melhores que os padrões empregados. Na literatura não foram encontrados resultados de atividade antioxidante envolvendo método de ORAC para plantas do gênero *Banisteriopsis* para efeito de comparação com os resultados obtidos na presente tese.

5.5. Determinação da inibição da atividade de α -amilase, α -glicosidase potencial de inibição de glicação

5.5.1. Avaliação da atividade α -amilase

Para os resultados de inibição das enzimas α -amilase, determinou-se a porcentagem de inibição para os extratos e partições, sendo que as partições acetato de etila e *n*-butanol da folha, caule e raiz apresentaram alta porcentagem de inibição na concentração testada ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, para os extratos e partições, realizaram-se as analise em concentrações variadas para o cálculo da concentração inibição em 50% de atividade da enzima α -amilase (Cl_{50}), conforme apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Resultado da atividade de inibição de α -amilase para *B. campestris*.

Amostras	Folha		Caule		Raiz	
	Extrato/partições	I%	Cl₅₀	I%	Cl₅₀	I%
Extrato etanólico	$6,75 \pm 2,89$	-	-	$31,40 \pm 0,71$	-	$98,85 \pm 0,07$
Hexano	-	-	-	-	-	$6,65 \pm 9,40$
Diclorometano	-	-	-	-	-	$13,05 \pm 2,33$
Acetato de etila	$91,75 \pm 1,76$	$28,56 \pm 0,57$	$95,70 \pm 0,14$	$7,79 \pm 0,31$	$94,15 \pm 0,07$	$8,19 \pm 1,15$
<i>n</i>-Butanol	$95,40 \pm 0,14$	$13,78 \pm 0,03$	$97,35 \pm 0,63$	$1,62 \pm 0,11$	$99,25 \pm 0,07$	$1,59 \pm 0,09$
Metanol/Água	-	-	-	$53,9 \pm 1,2$	-	$96,2 \pm 0,4$
Arcabose	$99,5 \pm 0,7$	$0,013 \pm 0,003$	$99,50 \pm 0,7$	$0,013 \pm 0,003$	$99,50 \pm 0,7$	$0,013 \pm 0,003$

Fonte: O autor.

Sendo:

- I% porcentagem de inibição;
- Concentração da amostra de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- Cl₅₀: concentração inibição da α -amilase $\mu\text{g mL}^{-1}$;
- Controle positivo: Arcabose.

As partições mais polares apresentaram melhores resultados de Cl₅₀, com valores menores que $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, com destaque para as partições acetato de etila e *n*-butanol do caule e da raiz que apresentaram Cl₅₀ abaixo de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo considerados bastante promissores. Pelos resultados das análises anteriores, observa-

se que as partições com melhores resultados para compostos fenólicos, apresentam maiores atividades inibitórias.

Na literatura, há poucos estudos que relacionam a inibição da α -amilase com plantas do gênero de *Banisteriopsis*. Oliveira (2016), estudou os extratos e partições das folhas de *B. argyrophylla*, obtendo melhores resultados de inibição para as frações de acetato de etila e *n*-butanol com valores de IC_{50} 2,33 e 2,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No trabalho de Martins (2017), foram estudados os extratos e as partições das folhas e cascas de *I. laurina*, obtendo-se melhor atividade inibitória para os extratos e partições de amostras de cascas, podendo ser atribuído a alta concentração de proantocianidinas.

5.5.2. Avaliação da atividade α -glicosidase

A Tabela 30 mostra a porcentagem de inibição de α -glicosidase dos extratos e partições da folha, caule e raiz de *B. campestris*, assim como os valores de concentração capazes de inibir 50% da atividade da enzima.

Tabela 30. Resultado da inibição de α -glicosidase obtidas para *B. campestris*.

Amostras	Folha		Caule		Raiz	
	Extrato/partições	I%	Cl₅₀	I%	Cl₅₀	I%
Extrato etanólico	9,55 ± 10,67	-	16,75 ± 2,19	-	61,5 ± 3,18	491,73 ± 0,63
Hexano	20,1 ± 13,85	-	15,4 ± 1,1	-	1,6 ± 2,3	-
Diclorometano	6,15 ± 2,47	-	9,45 ± 3,32	-	11,1 ± 0,9	-
Acetato de etila	10,6 ± 3,6	-	47,3 ± 4,24	-	36,4 ± 8,34	-
<i>n</i> -Butanol	9,00 ± 4,24	-	42,6 ± 21,49	-	68,6 ± 26,16	396,09 ± 50,19
Metanol/Água	7,05 ± 1,48	-	0,5 ± 0,7	-	26,25 ± 0,49	-
Arcabose	74,4 ± 0,84	4,47 ± 1,40	74,4 ± 0,84	4,47 ± 1,40	74,4 ± 0,84	4,47 ± 1,40

Fonte: O autor.

Sendo:

- I% porcentagem de inibição;
- Concentração da amostra de 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- Cl₅₀: inibição da α -glicosidase $\mu\text{g mL}^{-1}$;
- Controle positivo: Arcabose.

O extrato etanólico e a partição *n*-butanol da raiz foram os únicos que apresentaram porcentagem de inibição superior a 60%, com valores de IC_{50} de 491,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato etanólico e 396,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a partição de *n*-butanol. Tais resultados foram melhores em relação aos obtidos por Justino e colaboradores (2016), que trabalharam com a casca do araticum, *Annona crassiflora*, obtendo valores de IC_{50} de 554,4 e 787,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para partição de acetato de etila e *n*-butanol.

Os valores encontrados de IC_{50} para α -glicosidase em relação à raiz foram superiores aos observados para a inibição da α -amilase, evidenciando que são necessárias maiores concentrações das partições provenientes da raiz para inibir a atividade da α -glicosidase em comparação a α -amilase.

5.5.3. Potencial de inibição de glicação

A proteína albumina sérica bovina foi incubada com frutose na presença e ausência das amostras, com medição da fluorescência após 72 horas de incubação, tendo seus resultados de inibição expressos em porcentagem. A concentração utilizada no ensaio para todas as amostras foi de 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o extrato etanólico apresentou baixa inibição para a folha, 3,3%, não sendo observado inibição para o caule. A partição diclorometano apresentou inibição de 11,35 e 10,55%, a partição metanol/água apresentou 18,45 e 8,45% para a folha e caule, não apresentando inibição para a partição hexano. As demais partições apresentaram inibições acima de 60%, conforme apresentado na Tabela 31.

Tabela 31. Resultado do potencial de inibição de glicação para os extratos e partições de *B. campes-tris*.

Amostras	Folha	Caule	Raiz
Extrato/partições	IG%	IG%	IG%
Extrato etanólico	3,3 ± 0,14	-	99,4 ± 0,8
Hexano	-	-	-
Diclorometano	11,35 ± 3,18	10,55 ± 2,89	-
Acetato de etila	61,35 ± 0,21	78,25 ± 2,61	99,3 ± 0,7
<i>n</i>-Butanol	99,95 ± 0,07	97,0 ± 0,5	99,9 ± 0,1
Metanol/Água	18,45 ± 3,46	8,45 ± 0,6	90,15 ± 0,49
Quercetina	97,5 ± 0,7	97,5 ± 0,7	97,5 ± 0,7

Fonte: O autor.

Sendo:

- IG% porcentagem de inibição de glicação;
- Concentração da amostra 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$;
- Controle positivo: Quercetina.

A raiz exibiu valores de IG% acima de 90%, com exceção para as partições de hexano e diclorometano em que não houve inibição. As partições etanol, acetato de etila e *n*-butanol apresentaram percentuais de inibição de glicação acima do controle utilizado de queracetina, 97,5%, sendo que a partição de *n*-butanol foi à única que teve IG% superior a 95% para todas as partes da planta. As partições que apresentaram IG% superior a controle é ricas em flavonoídes, comprovados nos ensaios anteriores. Não foi encontrado na literatura, estudos referentes ao potencial de inibição de glicação com plantas do gênero *Banisteriopsis*, podendo este estudo ser considerado pioneiro com esta espécie.

5.6. Atividades antimicrobiana e antifúngica

5.6.1. Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos e partições

Os testes de avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia aplicada (LAPEMA) da Universidade de Franca (UNIFRAN). O método de microdiluição em caldo foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e partições de *B. campestris*, sendo determinadas as CIM e apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos e partições de *B. campestris*.

		Folha CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Bactérias	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	<i>n</i> -Butanol	Metanol/Água
Aeróbias	<i>S. mutans</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	<i>S. mitis</i>	400	400	>400	400	>400	>400
	<i>S. sanguinis</i>	400	>400	>400	>400	>400	>400
	<i>Ag.actinomycetemcomitans</i>	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Anaeróbias	<i>P. gingivalis</i>	200	>400	400	50	>400	>400
	<i>F. nucleatum</i>	>400	>400	>400	200	>400	>400
	<i>Ac. naeslundii</i>	>400	>400	100	>400	>400	>400
		Caule CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
Aeróbias	Bactérias	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	<i>n</i> -Butanol	Metanol/Água
	<i>S. mutans</i>	>400	200	>400	>400	>400	>400
	<i>S. mitis</i>	400	100	400	>400	>400	>400
	<i>S. sanguinis</i>	>400	200	400	>400	>400	>400
Anaeróbias	<i>Ag.actinomycetemcomitans</i>	>400	200	>400	>400	>400	>400
	<i>P. gingivalis</i>	400	50	200	>400	>400	>400
	<i>F. nucleatum</i>	>400	25	200	>400	>400	>400
	<i>Ac. naeslundii</i>	>400	12,5	200	>400	>400	>400
Aeróbias		Raiz CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Bactérias	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	<i>n</i> -Butanol	Metanol/Água
	<i>S. mutans</i>	>400	400	>400	>400	>400	>400
	<i>S. mitis</i>	>400	200	>400	400	200	>400
Anaeróbias	<i>S. sanguinis</i>	400	>400	>400	>400	400	>400
	<i>Ag.actinomycetemcomitans</i>	>400	>400	>400	>400	400	>400
	<i>P. gingivalis</i>	400	>400	>400	400	200	400
	<i>F. nucleatum</i>	>400	>400	>400	>400	400	>400
	<i>Ac. naeslundii</i>	>400	>400	>400	400	200	>400

Fonte: O autor.

Sendo:

- Controle positivo bactérias aeróbias: Clorexidrina 0,115 a 59,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$;
- Controle positivo bactérias anaeróbias: Metronidazol 0,0115 a 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A avaliação da atividade antimicrobiana por intermédio da CIM mostrou que os extratos e partições de *B. campestris* apresentaram diferentes níveis de atividade contra cada tipo de bactéria testada. De acordo Rios e colaboradores (2005), quanto menor o valor de CIM, mais promissora é a atividade antimicrobiana das amostras.

Houve atividade de inibição em todos os extratos e partições frente aos microrganismos aeróbios e anaeróbios estudados, com valores entre 12,5 a 400 µg mL⁻¹ para todas as partes da planta.

As concentrações dos extratos e partições testados para a folha, caule e raiz variaram de 0,195 a 400 µg mL⁻¹, e os do controle foram de 0,115 a 59 µg mL⁻¹. A maior atividade foi observada para as amostras de folhas com extrato etanólico e a partição acetato de etila, exibindo melhores atividades frente às bactérias anaeróbias *P. gingivalis* e *F. nucleatum* com CIM entre 50 a 200 µg mL⁻¹, sendo que tais resultados são significativos e promissores ao compará-los com de outras espécies de *Banisteriopsis*. Nunes e colaboradores (2016) trabalharam com os extratos e partições da folha de *B. laevifolia*, apresentando valores de CIM entre 100 a 400 µg mL⁻¹. Já Pádua e colaboradores (2013), avaliaram as folhas de *B. anisandra* em comparação a *S. aureus*, obtendo-se 21,5 mg mL⁻¹ para CIM. Por outro lado, Frias e colaboradores (2011) avaliaram os extratos brutos da folha de *B. anisandra* na concentração de 1 mg mL⁻¹ com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, não sendo observado inibição significativa para o crescimento de *S. aureus* e de outras bactérias testadas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 32, observa-se que a partição hexano do caule apresentou melhor resultado em comparação com as demais partes da planta, com valores de CIM abaixo de 200 µg mL⁻¹ frente as bactérias aeróbias e anaeróbias testadas. Sendo que as anaeróbias apresentaram resultados bastante promissores, com valores de CIM menores que 50 µg mL⁻¹. A partição diclorometano do caule apresentou atividade em torno de 200 µg mL⁻¹ frente a bactérias anaeróbias.

Os resultados demonstram que os extratos e partições da raiz não apresentaram inibição para o crescimento das bactérias em concentrações menores que 200 µg mL⁻¹, apesar de ter sido encontrado valores que variam de 200 a 400 µg mL⁻¹ acima do desejado, 100 µg mL⁻¹. Isto permite inferir que o extrato e as partições da raiz apresentam atividade antimicrobiana, sendo reportado diversos trabalhos na

literatura com outras espécies de plantas. No trabalho de Cunha e colaboradores (2017), estudou-se as cascas da espécie *C. bakeriana*, obtendo-se melhor resultado para a partição diclorometano nos ensaios de atividade antimicrobiana frente as bactérias *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *B. Fragilis*, *A. naeslundii*, *F. Nucleatum* e *P. gingivalis* apresentaram valores de CIM entre 12,5 e 100 µg mL⁻¹. Já Martins (2017), avaliou os extratos e partições da folha e casca de *I. laurina*, frente as mesmas condições utilizadas nesse trabalho, apresentando valores de CIM iguais ou maiores que 400 µg mL⁻¹. Por outro lado, Lamounier e colaboradores (2012), avaliaram os extratos e partições da casca e madeira de *M. tinctoria* que foram testadas frente a diversas bactérias aeróbias e anaeróbias, apresentando valores de CIM entre 20 e 400 µg mL⁻¹.

No presente trabalho, a partição hexano do caule de *B. campestris*, apresentou melhores resultados de CIM em relação aos trabalhos descritos anteriormente, sendo necessário realizar estudos para determinar a sua citotoxicidade. Algumas partições estudadas, apresentaram CIM igual ou maior a 400 µg mL⁻¹ em relação aos microrganismos aeróbios e anaeróbios testados, sendo considerado um valor alto de inibição (ALIGIANIS et al., 2001). Tais resultados mostraram uma alta atividade antimicrobiana para os extratos e partições das diversas partes da espécie *B. campestris* frente aos microrganismos estudados, em especial a partição hexano do caule que apresentou CIM de 12,5; 25 e 50 µg mL⁻¹ frente as bactérias *A. naeslundii*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*, respectivamente.

5.6.2. Resultados da atividade antifúngica dos extratos e partições

Os ensaios empregados na atividade antifúngica para o extrato etanólico e partições da folha, caule e raiz de *B. campestris* frente às leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* estão apresentados na Tabela 33. As concentrações das amostras testadas frente às leveduras foram de 1,46 a 3.000 µg mL⁻¹.

Tabela 33. Resultado da atividade antifúngica dos extratos e partições da folha, caule e raiz de *B. campestris*.

Folha CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
Leveduras	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	<i>n</i>-Butanol	Metanol/Água
<i>Candida albicans</i>	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000
<i>Candida tropicalis</i>	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000
<i>Candida glabrata</i>	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000
Caule CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
Leveduras	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	<i>n</i>-Butanol	Metanol/Água
<i>Candida albicans</i>	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000
<i>Candida tropicalis</i>	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000
<i>Candida glabrata</i>	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000	>3.000
Raiz CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
Leveduras	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	<i>n</i>-Butanol	Metanol/Água
<i>Candida albicans</i>	187,5	375	>3.000	750	46,87	375
<i>Candida tropicalis</i>	187,5	375	>3.000	375	93,75	3.000
<i>Candida glabrata</i>	1.500	>3.000	>3.000	187,5	93,75	3.000

Fonte: O autor.

Sendo:

- Controle das leveduras: Anfotericina;
- *C. krusei* ATCC 6258 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e *C. parapsilosis* ATCC 22019 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Nos resultados apresentados na Tabela 33, o extrato etanólico e partições acetato de etila e *n*-butanol da raiz de *B. campestris* foram às amostras mais promissoras frente aos microrganismos avaliados, sendo observado que a partição *n*-butanol apresentou resultados de CIM menores que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partição *n*-

butanol apresentou melhor atividade para *C. albicans* 46,87 µg mL⁻¹, seguidos de *C. tropicalis* e *C. glabrata* com valores de CIM de 93,75 µg mL⁻¹ para ambas. A partição diclorometano da raiz foi a menos ativa com CIM >3.000 µg mL⁻¹. Para as partições metanol/água e hexano, os resultados de CIM foram de 375 µg mL⁻¹ frente as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*.

As folhas e caule não apresentaram atividade antifúngica dentro do intervalo das concentrações testadas, CIM acima de 3.000 µg mL⁻¹. Em estudos com extratos aquosos de *B. anisandra*, observaram atividade frente a *C. albicans* e *C. krusei* com concentração inibitória de 31,25 µg mL⁻¹ e *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com CIM de 62,5 µg mL⁻¹ (FREITAS et al., 2015). Na avaliação da atividade antifúngica *in vitro* realizada pelo método de difusão em placas do extrato etanólico da folha de *B. anisandra* realizado por Pádua e colaboradores (2013), foi obtido um valor alto de CIM 86 mg mL⁻¹ contra *C. albicans*. A Tabela 34 apresenta resultado de atividade antifúngica do extrato e partições das folhas das espécies *B. laevifolia* e *B. argyrophylla*.

Tabela 34. Valores comparativos da atividade antifúngica dos extratos e partições das folhas de outras espécies de *Banisteriopsis*.

Folha de <i>B. laevifolia</i> CIM (µg mL ⁻¹) ^a						
Leveduras	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	n-Butanol	Metanol/Água
<i>Candida albicans</i>	31,2	>3000	>3000	187,5	93,7	>3000
<i>Candida tropicalis</i>	62,5	>3000	>3000	375,0	187,5	>3000
<i>Candida glabrata</i>	62,5	>3000	>3000	375,0	375,0	>3000
Folha de <i>B. argyrophylla</i> CIM (µg mL ⁻¹) ^b						
Leveduras	Etanol	Hexano	Diclorometano	Ac. etila	n-Butanol	Metanol/Água
<i>Candida albicans</i>	31,25	125	31,25	31,25	31,25	500
<i>Candida tropicalis</i>	>1000	>1000	93,75	93,75	>1000	>1000
<i>Candida glabrata</i>	>1000	31,25	187,50	31,25	>1000	500

Fonte: ^a (NUNES et al., 2016); ^b (OLIVEIRA, 2016).

De acordo com os resultados da Tabela 34, constata-se que os resultados de CIM para as folhas das espécies de *Banisteriopsis* foram mais eficazes do que encontrados para folha e caule de *B. campestris* que foram maiores que 3.000 µg mL⁻¹, Tabela 33. Ao se comparar com os valores de CIM encontrados para raiz de *B. campestris* observa-se que as partições mais polares apresentaram uma maior inibi-

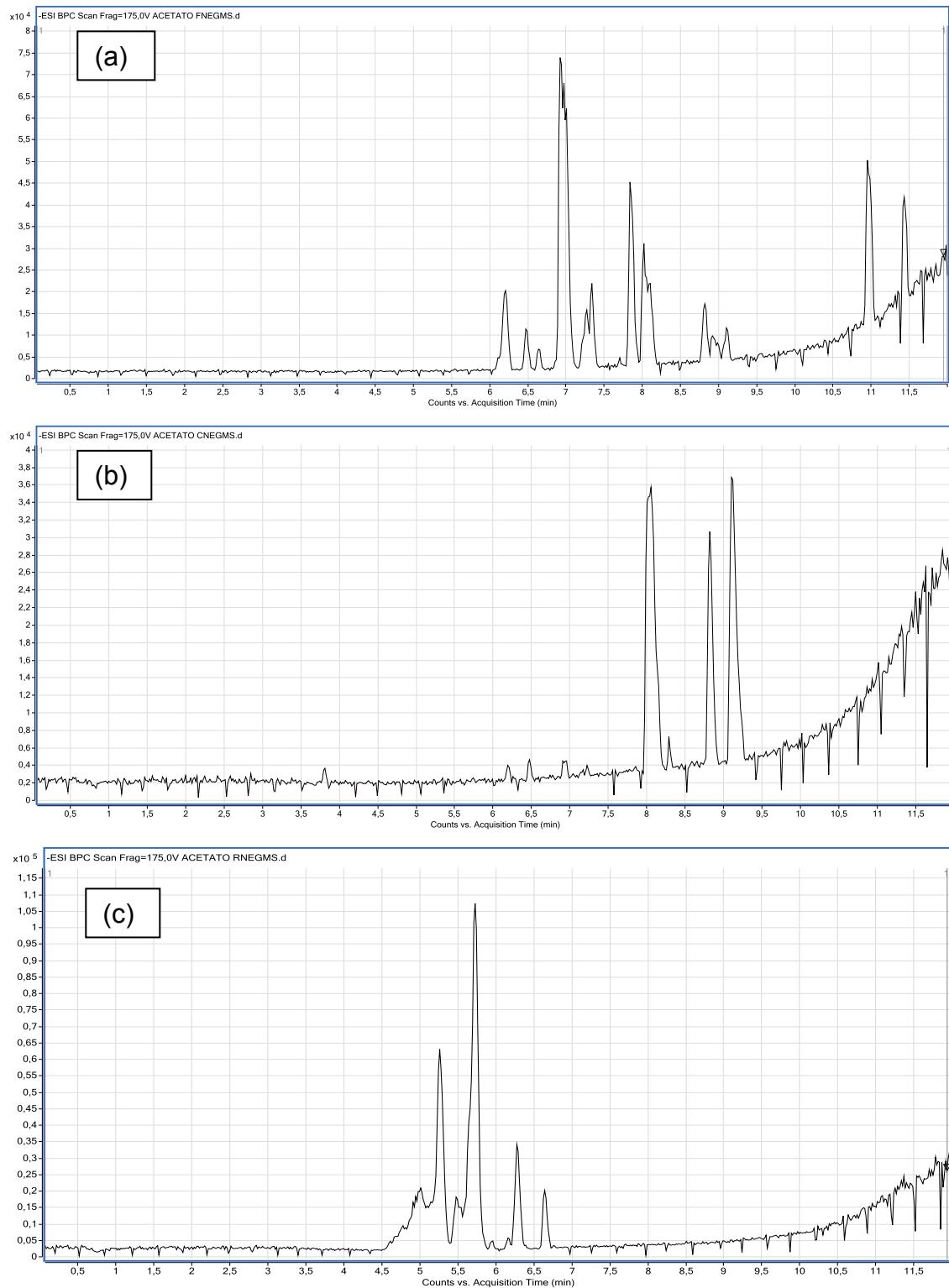
ção. A importância dos resultados antifúngicos para extrato etanólico, partição acetato de etila e *n*-butanol da raiz, de acordo com Martins e colaboradores (2015), pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos nas plantas.

5.7. Identificação dos principais constituintes por CLAE/EM da partição acetato de etila da folha, caule e raiz de *B. campestris*.

As partições acetato de etila das folhas, caules e raízes evidenciaram altos teores de FT e proantocianidinas que são responsáveis pelos bons resultados de potencial antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC. Além disto, apresentaram atividades promissoras de inibição α -amilase, α -glicosidase e potencial de glicação, demonstrando atividades biológicas promissoras para o controle dos danos causados pela diabetes. A partição acetato de etila foi submetida à análise por CLAE/EM com o objetivo de identificar moléculas bioativas, como compostos fenólicos e flavonoides que justiquem os resultados encontrados nas análises.

A Figura 29 mostra os cromatogramas referentes às partições acetato de etila provenientes do extrato etanólico da folha, caule e raiz de *B. campestris*. Os espectros de massas EM/EM da partição acetato de etila são apresentados nas Figuras complementares nos Anexos 1, 2 e 3.

Figura 29. Cromatogramas da partição acetato de etila da (a) folha, (b) caule e (c) raiz de *B. campes-tris* por CLAE/EM.



Fonte: O autor.

Através do perfil do padrão de fragmentação obtido pelos cromatogramas e com base em dados relatados na literatura, foram sugeridas propostas de composição da partição acetato de etila das partes da planta, apresentados nas Tabelas 35, 36 e 37.

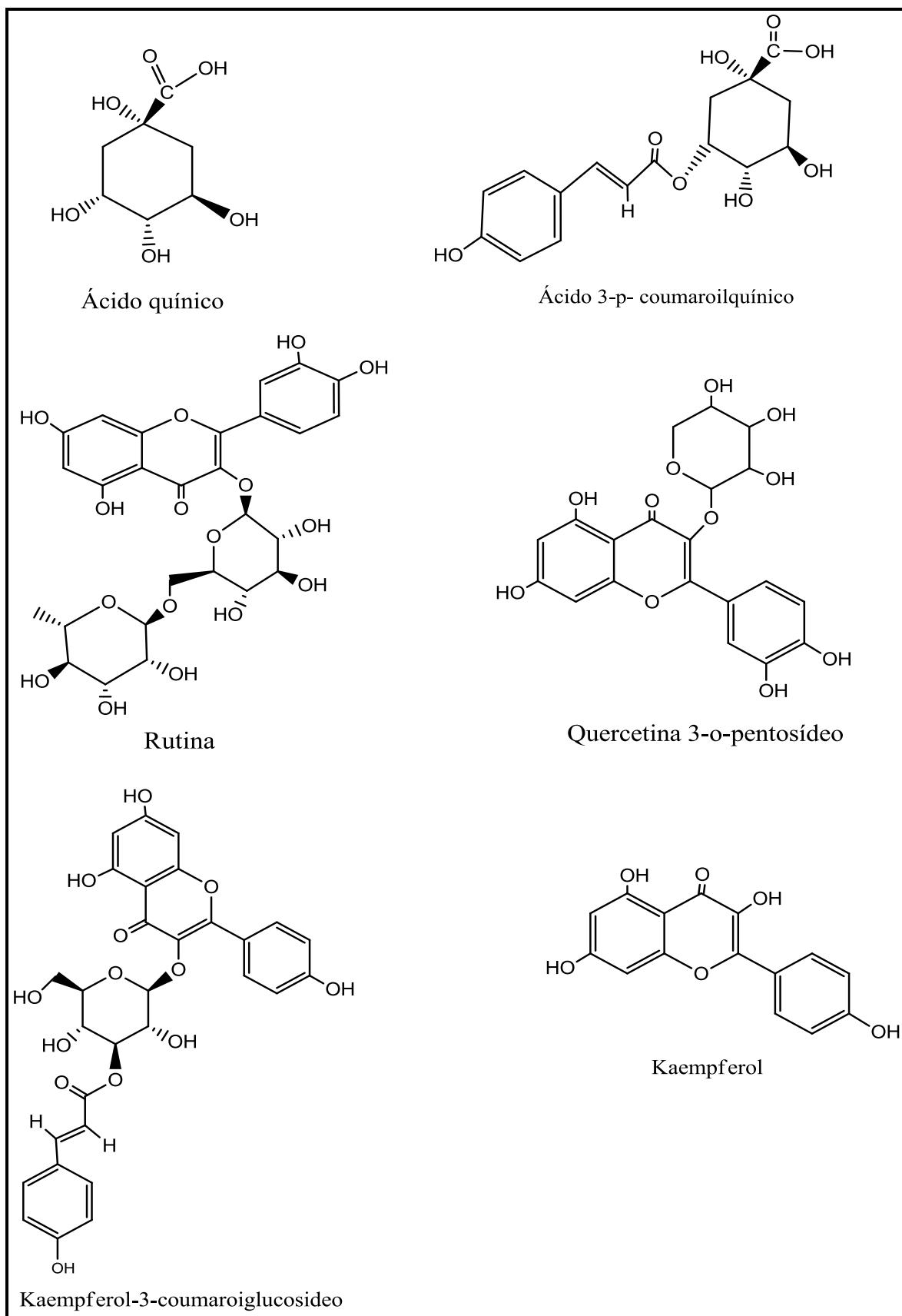
Analizando a Tabela 35, na partição acetato de etila da folha foram evidenciadas seis biomoléculas: os ácidos quínico e 3-*p*-coumaroilquínico, rutina, queracetina-3-*o*-pentosideo, kaempferol-3-coumaroilglucosideo e kaempferol. Sendo que estas moléculas possuem propriedades antioxidantes conhecidas (SANTOS et al., 2017; CARROCHO; FERREIRA, 2015). A partição de acetato das folhas de *B. argyrophylla* apresentam bons resultados para os ensaios de atividade antioxidante e inibitória frente à enzima α -amilase e a antifúngica podendo ser atribuído à presença de flavonoides identificados (OLIVEIRA, 2016). No trabalho de Nunes (2016) com as folhas de *B. laevifolia*, as partições *n*-butanol e acetato de etila foram identificados compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides, com reconhecido potencial antioxidante. As estruturas dos compostos identificados pela análise de CLAE/EM na partição acetato de etila da folha estão ilustradas na Figura 30.

Tabela 35. Proposta de composição da partição acetato de etila da folha.

Composto	TR (min)	Fórmula [M-H] ⁻	Massa calculada [M-H] ⁻	m/z de [M-H] ⁻	Erro (ppm)	m/z dos frag- mentos [M-H]	Referência
Ácido quínico	0,736	C ₇ H ₁₁ O ₆	191,0561	191,0559	1,05	173, 153, 137	a
Ácido 3- <i>p</i> -coumaroilquinico	6,510	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	337,0928	337,0927	0,29	191, 173, 163,119	b, c
Rutina	7,046	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609,1461	609,1449	1,97	301,300	a, d, e
Quercetina 3-O-pentosideo	7,364	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	433,0771	433,0781	2,30	301, 271, 255, 178	f
Kaempferol 3-coumaroilglucosideo	8,119	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1301	593,1295	1,01	285	g
Kaempferol	8,388	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,0405	285,0391	4,91	257, 229, 151	h

Fonte: ^a (LAY-KEON; LAFONTAINE; VANIER, 2004); ^b (MASIKE et al., 2017); ^c (GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, 2010); ^d (SUN et al., 2007); ^e (BASTOS et al., 2007); ^f (SANTOS et al., 2017); ^g (KAJDZANOSKA; GJAMOVSKI; STEFONOVA, 2010); ^h (KRATEVA; NICOLOV, 2008).

Figura 30. Estrutura das moléculas identificadas pela análise de CLAE/EM da partição acetato etila da folha.



Fonte: O autor.

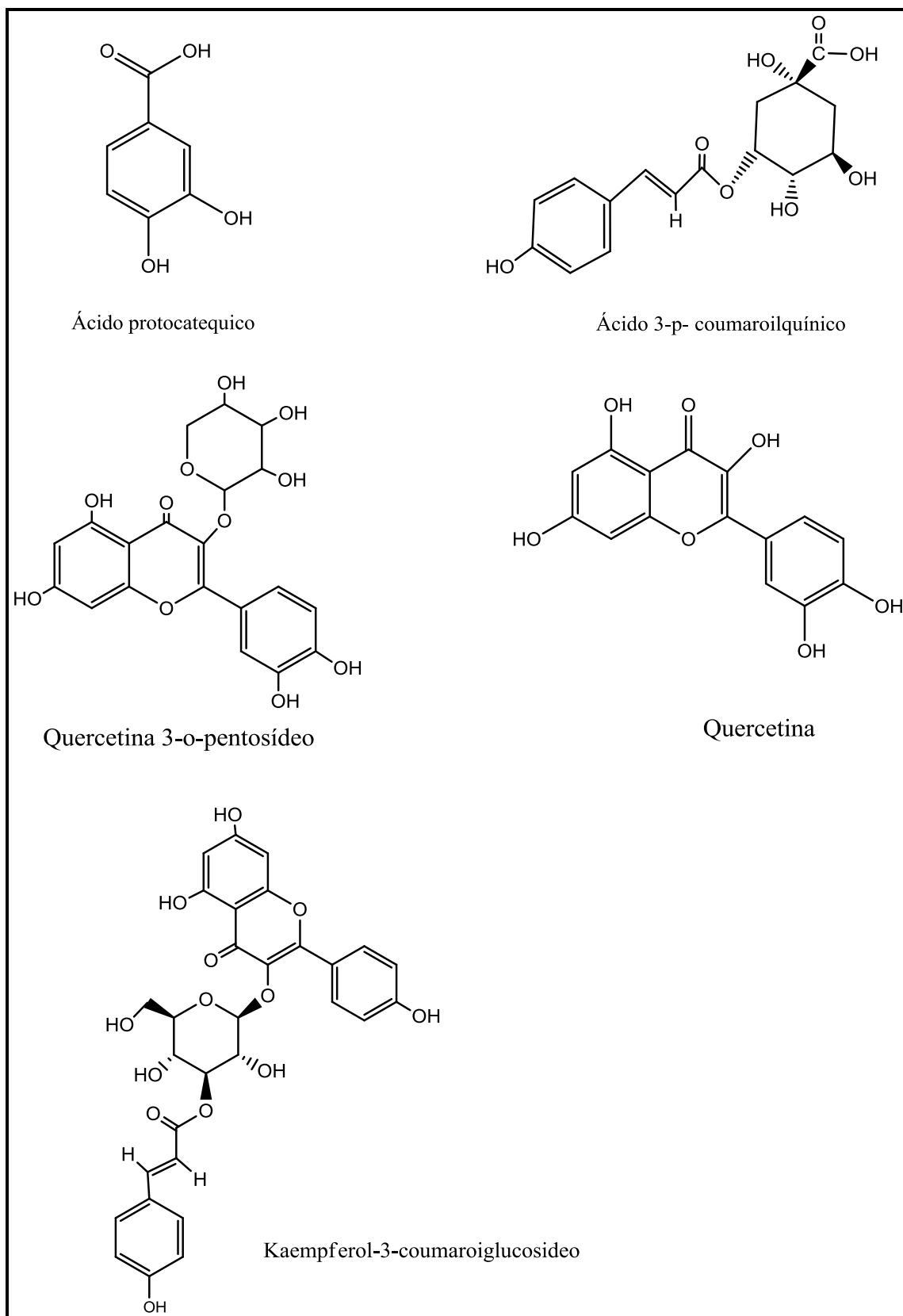
As moléculas identificadas no caule são as mesmas encontradas na partição de acetato da folha, com diferença apenas no ácido protocatequico e quercetina que não foram identificados (Tabela 36). No estudo realizado por Martins (2018) com a espécie *B. oxyclada*, foram identificados ácidos orgânicos, o flavan-3-ol, flavonóis e taninos condensados na partição acetato de etila do caule, estes compostos também foram identificados para a espécie de *B. campestris*. Na Figura 31 estão apresentados a estruturas dos compostos identificados na partição acetato de etila do caule.

Tabela 36. Proposta de composição da partição acetato de etila do caule.

Composto	TR (min)	Fórmula [M-H] ⁻	Massa calculada [M-H] ⁻	m/z de [M-H] ⁻	Erro (ppm)	m/z dos fragmentos [M-H]	Referência
Ácido protocatequico	3,791	C ₇ H ₅ O ₄	153,0193	153,0192	0,65	109	a, b
Ácido 3-p-coumaroilquinílico	6,506	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	337,0928	337,0952	-7,11	191, 173, 163, 119	a, c
Quercetin 3-O-pentosideo	7,210	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	433,0771	433,0802	-7,16	301, 271, 255,178	d
Quercetina	7,880	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,0354	301,0352	0,66	179, 151	d, e, f, g
Kaempferol 3-coumaroilglucosideo	8,119	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1301	593,1329	-4,72	285	h

Fonte: ^a (GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, 2010); ^b (CHEN et al., 2012); ^c (MASIKE et al., 2017); ^d (SANTOS et al., 2017); ^e (SUN et al., 2007); ^f (KRATEVA; NICOLOV, 2008); ^g (SOUZA et al., 2008); ^h (KAJDZANOSKA; GJAMOVSKI; STEFONOVA, 2010).

Figura 31. Estrutura das moléculas identificadas pela análise de CLAE/EM da partição acetato etila do caule.



Fonte: O autor.

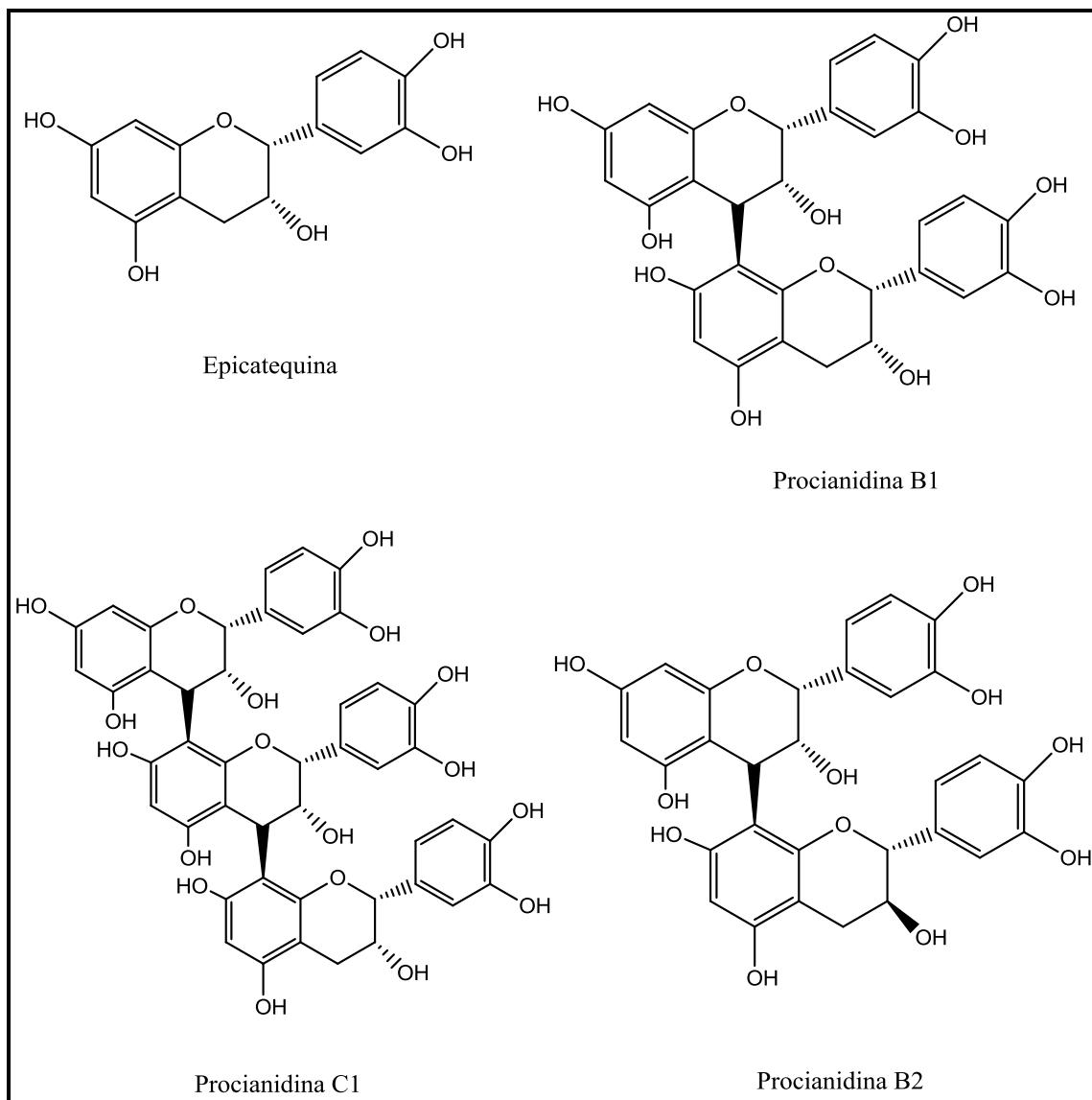
Na análise por CLAE/EM, foram identificados quatro compostos: epicatequina, procianidina B1, B2 e C1 somente na partição acetato da raiz corroborando com análise do conteúdo de FT, flavonoides e proantocianidinas da raiz (Tabela 37). Em trabalhos realizados com outras plantas do cerrado, as partições acetato de etila e *n*-butanol foram as que mostraram melhores teores de fenóis totais, proantocianidinas e atividade antioxidantes e inibição de α -amilase, sendo que esses resultados foram justificados pela presença de compostos fenólicos identificados por CLAE/EM (MARTINS, 2017; SOUSA, 2015). Na Figura 32 estão apresentadas as estruturas dos compostos identificados na partição acetato de etila da raiz.

Tabela 37. Proposta de composição da partição acetato de etila da raiz

Composto	TR (min)	Fórmula [M-H] ⁻	Massa calculada [M-H] ⁻	m/z de [M-H] ⁻	Erro (ppm)	m/z dos fragmentos [M-H]	Referência
Epicatequina	4,991	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289,0718	289,0730	-4,15	245, 205, 137	a, b, c
Procianidina B1	5,210	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577,1351	577,1355	-0,69	451, 425, 407, 289	a, c
Procianidina C1	5,528	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈	865,2058	865,2034	2,77	713, 695, 577, 425, 407, 289	b, c
Procianidina B2	6,283	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577,1351	577,1368	-2,9	451, 425, 407, 289	a

Fonte: ^a (SUN et al., 2007); ^b (JUSTINO et al., 2018); ^c (TALA et al., 2013);

Figura 32. Estrutura das moléculas identificadas pela análise de CLAE/EM da partição acetato etila raiz.



Fonte: O autor.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho ao se avaliar o estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Banisteriopsis campestris*, foi encontrado um elevado teor de fenóis totais em todas as partes da espécie, tornando-a uma excelente fonte de substâncias antioxidantes. Ao se avaliar o teor de proantocianidinas, obteve-se melhor rendimento para a partição da raiz ao se utilizar o acetato de etila como solvente extrator, sendo confirmados pelas análises de CLAE/EM que identificou a epicatequina e procianidinas como principais constituintes encontrados nesta partição.

As partições acetato de etila e *n*-butanol apresentaram melhores resultados para atividade antioxidante tanto pelo método de ORAC quanto pelo DPPH em relação aos padrões BHT e ácido ascórbico. Foram detectados compostos com elevada atividade reconhecida, entre os quais o ácido quínico e protocatequico, epicatequina, quercetina, kaempferol e procianidinas. Já a atividade inibitória frente a α -amilase, α -glicosidase e glicação apresentaram resultados satisfatórios com percentuais acima dos obtidos para o padrão em relação a estas partições.

A partição hexano do caule apresentou melhores valores de CIM (de 12,5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para os microorganismos anaeróbios. Já a partição acetato de etila da folha teve um excelente resultado (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) frente à bactéria anaeróbia de *P. gingivalis*. Por outro lado, a partição *n*-butanol da raiz apresentou atividade antifúngica muito ativa (<100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) frente a todas as leveduras avaliadas.

Os óleos essenciais provenientes de todas as partes da planta, com exceção das folhas, apresentaram atividade promissora contra patógenos orais, incluindo bactérias aeróbias e anaeróbias. Já os óleos do caule e das raízes apresentaram efeito inibitório frente a intoxicação pelo protozoário *leishmania*. Por outro lado, a atividade antioxidante e o potencial de inibição de glicação estão correlacionados em função da presença majoritária de ácidos graxos e também álcoois, terpenos e éster em todos os tipos de óleos.

Os resultados deste trabalho indicaram que a partir dos óleos essenciais de diversas partes da planta *B. campestris* podem ser isoladas substâncias com propriedades antimicrobiana e antileishmania, tornando-se uma importante fonte alternativa de substâncias com propriedades medicinais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. **Panorama do Setor.** Associação brasileira das indústrias de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria. Disponível em:

<<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2017>>. Acesso em: 18 Set. 2017.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Allured Bussiness Media**, 2007. ISBN: 978-1932633214.

AGUIAR, S.; SANTOS, I. S.; ARÊDES, N.; SILVA, S. Redes-bioma: Informação e comunicação para ação sociopolíticas em ecorregiões. **Ambiente & Sociedade**, v. 19, n. 3, p. 233-252, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4422ASOC20140004V1932016>.

AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. **Issues Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 1-7, 2014. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/7c7b/56d92626bb269418462d4067d8cebe910eae.pdf>>. Acesso em: 18 Set. 2018.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origamum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

<https://doi.org/10.1021/jf001494m>

ALVES, E. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies de vegetais e de substâncias puras de *Miconia*. **Química Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052>

AMAROWICZ, R. Squalene: A natural antioxidant. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 411-412, 2009.

<https://doi.org/10.1002/ejlt.200900102>

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007. Disponível em:

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 25 Set. 2018.

ARAÚJO, J. S. **Anatomia de espécies de Banisteriopsis c. B. Rob (Malpighiaceae) ocorrentes no Brasil.** 2014. 73 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2014. Disponível em:
<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/6621/texto%20completo.pdf?sequence=1>. Acesso em: 30 Set. 2018.

ARAÚJO, J. S.; MEIRA, R. M. S. A. Comparative anatomy of calyx and foliar glands of *Banisteriopsis* C. B. Rob. (Malpighiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, p. 112-123, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1590/0102-33062015abb0248>

BAJPAI, V. K.; RAHAMAN, A; CHOI, U. K.; YOUN, S. J.; KANG, S. C. Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Mix ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1061-1066, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.008>

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1, p. 191-203, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

BANERJEE, S.; BANERJEE, R. P.; PRADHAN, N. K. A. Comparative study on anti-microbial activity of leaf extract of five medicinal plants and commonly used antibiotics. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 2, n. 6, p. 788-795, 2014. Disponível em:

<<https://www.scientiaplена.org.br/sp/article/view/52/108>>. Acesso em: 15 Jun. 2018.

Banisteriopsis in Flora do Brasil 2020 em construção. **JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO** Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8803>>. Acesso em: 04 Nov. 2017.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. Produtos de glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**, v.22, p. 113-124, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732009000100011>

BARÔNIO, G. J.; DEL- CLARO, K. Increase in ant density promotes dual effects on bee behavior and plant reproductive performance. **Arthropod Plant Interactions**, v. 12, n. 2, p. 1-13, 2017.

<http://doi.org/10.1007/s11829-017-9573-x>

BARÔNIO, G. J.; HALEEM, M. A.; MARSAIOLI, A. J.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. Characterization of Malpighiaceae flower–visitor interactions in a Brazilian savannah: How do floral resources and visitor abundance change over time. **Flora**, v. 234, p. 126-134, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.07.015>

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÈAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 646-656, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000500017>

BASTOS, D. H.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C.; CUNHA, I. B.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. **Phenolic Antioxidant Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) Extracts**. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-432, 2007.

<https://doi.org/10.3390/12030423>

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma revisão da literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016.

<https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160139>

BHEKUMTHETHO, N.; VAN STADEN, J. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v. 20, p. 12698-12731, 2015.

<https://doi.org/10.3390/molecules200712698>

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; RESENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>

BORGES, P. P.; OLIVEIRA, K. A. F. A.; MACHADO, K. B.; VAZ, U. L.; CUNHA, H. F.; NABOUT, J. C. Trends and gaps of the scientific literature on the Cerrado biome: A scientometric analysis. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 10, p. 2-8, 2015.

<https://doi.org/10.4013/nbc.2015.101.01>

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, p. 25-30, 1995.

[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRITO, A. M. G.; DOS SANTOS, D.; RODRIGUES, S. A.; BRITO, R. G.; XAVIER-FILHO, L. Plants with anti-*Leishmania* activity: Integrative review from 2000 to 2011. **Pharmacognosy Reviews**, v.7, n.13, p. 34-41, 2013.

<https://doi.org/10.4103/0973-7847.112840>

BRUNETON, J. Pharmacognosy phytochemistry medicinal plants. **Lavoisier**, 2001. ISBN: 978-1898298632.

BUCHBAUER, G.; LANG, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 13-39, 2011.

<https://doi.org/10.1002/ffj.2082>

CABRAL, C.; PITA J. R. Alcaloides relevância na farmácia e no medicamento. Centro de Estudos Interdisciplinares do Século XX (CEIS 20) – **Grupo de História e Sociologia da Ciência e da Tecnologia**, p. 1-32, 2015. Disponível em: <https://www.uc.pt/ffuc/patrimonio_historico_farmaceutico/publicacoes/catalogosdeexposicoes/catalogo_1exp.pdf>. Acesso em: 27 Jul. 2018.

CARDOSO, N. N. R.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; ROMANOS, M. T. V.; FONSECA, B. B.; ROZENTAL, S.; RODRIGUES, I. A.; ALVIANO, D. S. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-12, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5647182>

CARNEIRO, N. S.; ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; EGEA, M. B.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, T. S.; BRETANHA, L. C.; BALLESTE, M. P.; MICKE, G. A.; SILVEIRA, E. V.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1907-1915, 2017.

<https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160652>

CAROCCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>

CARVALHO, T. C.; SIMÃO, M. R.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; HELENO, V. C. G.; COSTA, F. B. D.; GOMES, B. P. F. A.; SOUZA, M. G. M.; REIS, E. B. D.; MARTINS, C. H. G. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, v. 16, p. 543-551, 2011.

<https://doi.org/10.3390/molecules160100543>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.005>

CREVELIN, E. J.; CAIXETA, S. C.; DIAS, H. J.; GROPPО, M.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, E. M. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* against Cariogenic Bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-6, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/102317>

CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; CUNHA, L. C. S.; ROCHA, E. O.; AQUINO, F. J. T.; SOUZA, M. G. M; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, native of Brazilian cerrado. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 9, p. 1843-1848, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/279713468_Essential_oil_composition_and_antioxidant_and_antimicrobial_properties_of_Campomanesia_pubescens_O_Berg_native_of_Brazilian_Cerrado>. Acesso em: 15 Out. 2018.

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.

<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.; VLEGGAAR, R. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1200-1205, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.019>

CHINSEMBU, K. C. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. **Acta Tropica**, v. 154, p. 6-18, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.019>

CHORILLI, M.; LEONARD, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 3, n. 88, p. 113-118, 2007. Disponível em: <http://rbfarma.org.br/files/PAG_113a118_RADICAIS.pdf>. Acesso em: 12 Out. 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI Document M7-A9**. 9. ed. Wayne, 2012a. 63 p. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56466b465f7f71946b8b45f2&assetKey=AS:295464181223441@144745558839>>. Acesso em: 15 Jul. 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. CLSI Document M11-A8**. 8. ed. Wayne, 2012b. 39 p. Disponível em: <https://clsi.org/media/1468/m11a8_sample.pdf>. Acesso em: 15 Jul. 2018.

COMPEAN, K. L.; YNALVEZ, R. A. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 8, n. 5, p. 204–213, 2014. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213>

CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, G. M.; RODRIGUES, M. S. Malpighiaceae do cerrado do Parque Estadual do Mirador, Maranhão, Brasil. **Scientia Plena**, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2011. Disponível em: <<https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/52/108>>. Acesso em: 13 Set. 2017.

COSTA, A. R.; PEREIRA, P. S.; BARROS, L. M.; DUARTE, A. E.; GOMEZ, M. C. V.; ROLÓN, M.; VIDAL, C. A. S.; MAIA, A. J.; BRAGA, M. F. B. M.; COUTINHO, H. D. A citotoxicidade e a avaliação da atividade antiprotozoária de *Melissa officinalis* L (CIDRO-MELISA). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 4, p. 1-13, 2016. Disponível em: <<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/380/201>>. Acesso em: 16 Ago. 2017.

COSTA, P. S.; SOUZA, B. E.; BRITO, E. H. S.; FONTONELLE, R. O. S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158-171, 2017. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: Uma revisão de literatura. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013. <http://dx.doi.org/10.17921/2447-8938.2013v15n3p%25p>

CUNHA, L. C. S. **Estudo fitoquímico, atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da espécie *Cassia bakeriana* Craib.** 2013. 285 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17518>>. Acesso em: 14 Jun. 2017.

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; AQUINIO, F. J. T.; OLIVEIRA, A.; MORAES, T. S.; MACHADO, F. C.; SILVA, C. V.; NASCIMENTO, E. A. Chemical composition, cytotoxic and antimicrobial activity of essential oils from *Cassia bakeriana* Craib. against aerobic and anaerobic oral pathogens. **Molecules**, v. 18, p. 4588-4598, 2013.

<https://doi.org/10.3390/molecules18044588>

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; OLIVEIRA, A.; SILVA, C. V.; SOUSA, L. C. F.; BARROS, T. T.; SILVA, C. V.; NASCIMENTO, E. A. Bioassay-guided fractionation and antimicrobial and cytotoxic activities of *Cassia bakeriana* extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 91-98, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.002>

DAMASCENO, E. I. T.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; SOUSA, P. J. C.; MAIA, J. G. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 78-85, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000013>

DAVIS, C. C.; ANDERSON, W. R. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 12, p. 2031-2048, 2010.

<https://doi.org/10.3732/ajb.1000146>

DE GOUVEIA, N. M.; ALVES, F. V.; FURTADO, F. B.; SCHERER, D. L.; MUNDIN, A. V.; ESPINDOLA, F. S. An *in vitro* and *in vivo* study of the alpha-amylase activity of phaseolamin. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 8, p. 915-920, 2014.

<https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0044>

DE SOUZA, P. A. Alcaloides e o chá de ayahuasca: uma correlação dos "estados alterados da consciência" induzido por alucinógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, n. 3, p. 349-358, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000300015>

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, n. 6, p. 1629-1642, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. Wiley, 2009. ISBN: 9780470742761.

<https://doi.org/10.1002/9780470742761>

EGYDIO, A. P. M.; DOS SANTOS, D. Y. A. Fatty acid composition of seeds of three *Malpighia glabra* L. Genotypes (Malpighiaceae). **Boletim de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 1-4, 2012. Disponível em: <

<http://www.revistas.usp.br/bolbot/article/download/46895/50640/>. Acesso em: 12 Out. 2018.

FIGUEREDO-GONZALEZ, M.; GROSS, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. α-Glucosidase and α-amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p. 322-327, 2016.

<http://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.042>

FILIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

<http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>

Flora do Brasil 2020 em construção. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonC>>. Acesso em: 01 Nov. 2017.

FRABO BEM, A.; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes *mellitus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 185-191, 2006.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442006000300007>

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329-7358, 2015.

<https://doi.org/10.3390/molecules20047329>

FREITAS, E.; AIRES, A.; ROSA, E. A. S.; SAAVEDRA, M. J. Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source. **Latters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 266-273, 2013.

<http://doi.org/10.1111/lam.12105>

FREITAS, L. B. O.; D BOAVENTURA, A. M.; SANTOS, W. L.; STHEMANN, J. R.; D JUNIO, D.; LOPES, M. T. P.; MAGALHAES, T. F. F.; SILVA, D. L.; RESENDE, M. Allelopathic, cytotoxic and antifungic activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters** v.12, p. 9-16, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.02.006>

FRIAS, U. A.; COSTA, M. C. M.; TAKAHASHI, J. A. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antibacteriana e anticolinesterásica de extratos de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16, n.1, p. 60-71, 2011. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol16_1_11/pla07111.htm>. Acesso em: 23 Mar. 2018.

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.

<https://doi.org/10.6000/1927-3037/2012.01.03.02>

FURTADO, F. B.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; MARTINS, C. D. M.; MORAIAS, S. A. L.; CHANG, R.; CUNHA, L. C. S.; LEANDRO, L. F.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; SILVA, C. V.; MACHADO, F. C.; OLIVEIRA, A. Seasonal variation of the chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of the essential oils from *Inga laurina* (Sw.) Willd. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4560-4577, 2014.

<https://doi.org/10.3390/molecules19044560>

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009. Disponível em: <https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf>. Acesso em: 25 Out. 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GÓMEZ-BARRO, 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.

<https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>

GRABMANN, J. Terpenoids as plants antioxidants. **Vitamins & Hormones**, v. 72, p. 505-535, 2005.

[https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72015-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72015-X)

GUNES, F. E. Medical Use of Squalene as a Natural Antioxidant. **MÜSBED**, v. 3, n.4, p. 220-228, 2013.

<http://doi.org/10.5455/musbed.20131213100404>

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. **International Journal Molecular Sciences**, v. 8, p. 950-988, 2007.

<https://doi.org/10.3390/i8090950>

HAYTOWITZ, D. B. & BHAGWAT, S. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. **Agricultural Research Service**, v. 1, p. 1-42, 2010. Disponível em: <http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC_R2.pdf>. Acesso em: 14 Abr. 2018.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBIYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

IGNAT, I.; IRINA, V.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

IONUE, Y.; HADA, T.; SHIRAIH, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p.1770-1774, 2005.

<https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1770-1774.2005>

ISHARA, K. L.; DÉSTRO, G. F. G.; MAIMONI-RODELLA, R. C. S.; YANAGIZAWA, Y. A. N. P. Composição florística de remanescente de cerrado *sensu stricto* em Brotucatu, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 4, p. 575-586, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0100-84042008000400004>

JUSTINO, A. B.; MIRANDA, N. C.; FRANCO, R. R.; MARTINS, M. M.; SILVA, N. M.; ESPINDOLA, F. S. *Annona muricata* Linn. Leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.100, p.83-92, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; SILVA, N. M.; SOUSA, R. M. F.; OLIVERA, A.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart) as a source of antioxidant compounds with α -amilase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>

KAJDZANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 181–194, 2010.

<http://dx.doi.org/10.20450/mjcce.2010.165>

KALAYCI, S. Antimicrobial properties of various non-antibiotic drugs against microorganisms. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 8, p.142, 2016.

<https://doi.org/10.4172/1948-593X.1000e142>

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009. Disponível em: <<https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/EEE689215753>>. Acesso em: 18 Jun. 2018.

KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; TABART, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 6165-6171, 2011.

<https://doi.org/10.1021/jf201013k>

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. **Conservation of the Brazilian Cerrado**. Conservation Biology, v. 19, n.3, p. 707-713, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x>

KNEZEVIC, P.; ALEKSIC, V.; SIMIN, N.; SVIERCEV, E.; PETROVIC, A.; DUKIC, N. M. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178 p. 125-136, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.008>

KRASTEVA, I; NIKOLOV, S. Flavonoids in *Astragalus corniculatus*. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 59-60, 2008.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000100012>

LAMOUNIER, K. C.; CUNHA, L.C.S.; MORAIS, S. A.L. AQUINO, F.J.T. CHANG, R. NASCIMENTO, E. A.; SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C.H.G; CUNHA, W. R. Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

<https://doi.org/10.1155/2012/451039>

LANGE, B. M.; AHKAMI, A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes - current status and future opportunities. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, p. 169-196, 2013.

<https://doi.org/10.1111/pbi.12022>

LAPCZYNSKI, A.; BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragance material review on geranyl linalool. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 176-178, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.050>

LAY-KEOW, N. G.; 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, n. 24, p. 7251-7257, 2004.

<https://doi.org/10.1021/jf040203x>

LIMA, L. F. **Biologia reprodutiva de Banisteriopsis (Malpighiaceae) no jardim botânico de Brasília – DF**. 2005. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2005. Disponível em: <<http://www.pgeclunb.net.br/pt-br/dissertacoes-defendidas/2004-2006/551-laudice-ia-f-lima-2005/file>>. Acesso em: 10 Nov. 2018.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. IST Press, Lisboa, 2007. ISBN: 9789728469504.

LORDAN, S.; SMYTH, T. I.; SOLER-VILA, A.; STANTON, C.; ROSS, R. P. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2170-2176, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.123>

LOURENÇO, H. A. O.; SALES, J. F.; SILVA, F. G.; RIBEIRO, N. L.; SOUZA, J. L. F.; PEREIRA, P. S. Content and chemical composition of the essential oil from *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex a. Juss. collected in different seasons and times of day. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 12, p. 412-418, 2015.

<https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5692>

LUGO, Y. O. **Estudo da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e proantocianidinas do extrato etanólico e composição química do óleo essencial de *Diospyros hispida* A. DC.** 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17453>>. Acesso em: 13 Nov. 2018.

MACHADO, K. E.; CECHINEL, V.; TESSAROLO, M. L.; MALLMANN, R.; MEYRE-SILVA, C.; BELLA, C. A. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 636–639, 2005.

<https://doi.org/10.1080/13880200500303817>

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S. 2007. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Edições UFC, 2007. ISBN: 978-85-7282-251-0.

MAMEDE, M. C. H.; SEBASTIANI, R.; ALMEIDA, R. F.; FRANCENER, A.; AMORIM, A. M. A. Malpighiaceae. **Lista de espécies da flora do Brasil** 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em 01 nov. 2017

MARTINS, C. M. **Prospecção fitoquímica e caracterização dos compostos bioativos de *laurina* (Sw) Willd (Fabaceae)**. 2017. 293 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/19563>>. Acesso em: 12 Jul. 2018.

MARTINS, C. M.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; OLIVEIRA, A.; CHANG, R.; CUNHA, L. C. S.; MARTINS, M. M.; MARTINS, C. H. G.; MORAES, T. S.; RODRIGUES, P. V.; SILVA, C. V.; AQUINO, F. J. T. Chemical Constituents and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Essential Oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-9, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/842047>

MARTINS, M. M. **Estudo fitoquímico e atividades antioxidante, antimicrobiana, antiprotozoária e citotóxica da espécie *B. oxyclada* (A.Juss) B. Gates**. 2018. 118f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia – MG, 2018.

<http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.45>

MARTINS, M. M.; AQUINO, F. J. T.; OLIVEIRA, A.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; BORGES, M. S.; MELO, G. B.; SILVA, C. V.; MACHADO, F. C.; MORAIS, S. A. L. Chemical composition, antimicrobial and antiprotozoal activity of essential oils from *Vernonia brasiliiana* (Less) Druce (Asteraceae). *Journal of Essen Oil-Bearin Plans*, v. 18, n. 3, p.561-569, 2015.

<https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895683>

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, v. 74, p. 648-670, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.067>

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.

<https://doi.org/10.1186/s13065-017-0262-8>

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on phytol. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 59-63, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.012>

MICKYMARAY, S.; ALABOODY, M. S.; RATH, P. K.; ANNAMALAI, P.; NOORUD-DIN, T. Screening and antibacterial efficacy of selected Indian medicinal plants.

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 6, n. 3, p. 185-191, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.005>

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. Ministério do meio ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomass/cerrado>>. Acesso em: 29 de Mar. 2017.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, p. 213-220, 2016.

<http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>

MONTE, J.; ABREU, A. C.; BORGES, A.; SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M. Antimicrobial activity of selected phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and their biofilms. *Pathogens*, v. 3, p. 473-498, 2014.

<https://doi.org/10.3390/pathogens3020473>

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 diferentes graus de torra. **Química Nova**, v. 32, n. 2, 237-331, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200011>

NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da terapia antifúngica de leveduras, Norma aprovada. Documento M27-A2 do NCCLS. NCCLS, Wayne, 2002. 51 p. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosaudes/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2.pdf>. Acesso em: 14 Ago. 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NIST. **Standard Reference Data**. Disponível em:
<<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>>. Acesso em: 21 Mar. 2017.

NUNES, B. C. **Prospecção química e avaliação biológica de *Banisteriopsis laevis* (Malpighiaceae)**. 2014. 182 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17676>>. Acesso em: 12 Abr. 2018.

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.; AMBROSIO, M. A. L. V.; MARTINS, C. H. G.; AQUINO, F. J. T. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevis* (A. Juss.) B. Gates leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 277-289, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.016>

OKI, Y. **Interações entre larvas de Lepidóptera e as espécies de Malpighiaceae em dois fragmentos de Cerrado do Estado de São Paulo**. 2005. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciência Filosofia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2015.
<https://doi.org/10.11606/T.59.2005.tde-26042006-110331>

OLIVEIRA, A. C.; 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.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>

OLIVEIRA, A. M. F.; CUNHA, E. V. L.; WANDERLEY, F. T. S.; TAVARES, J. F.; AS-SIS, T. S.; ROLIM, T. L. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonia gardneriana* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 524-527, 2013.

<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 (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2016. Disponível em:

<<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17808>>. Acesso em: 15 Jun. 2018.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>

OZCAN, T. Phenolics in Human Health. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 5, p. 393-396, 2014.

<https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.416>

PÁDUA, M. S.; MENDES-COSTA, M. C.; FERREIRA, J. M. S.; MAGALHÃES, J. C.; CASTRO, A. H. F. Assessment of antimicrobial activity in vitro of ethanolic extracts of *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 3, p. 431-437, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000300017>

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174-187, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>

PIRES, A. P.S.; OLIVEIRA, C. D. R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 15-23, 2010.

PRAZERES, R. M.; SANTOS, K. T.; MELO JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, D. A.; MENEZES, E. V.; SAMPAIO-JUNIOR, J. B.; FONSECA, F. S. A.; ROYO, V. A. Perfil de ácidos graxos e propriedades físico-químicas do óleo extraído das sementes de *Banisteriopsis pubipetala* (A. Juss.) Cuatrec. (Malpighiaceae). **Periódico Tchê Química**, v. 14, n. 27, p. 105-112, 2017. Disponível em:

<<http://www.deboni.he.com.br/Periodico27.pdf>>. Acesso em: 15 Out. 2018.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D. OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

<https://doi.org/10.1021/jf0262256>

REGNAULT– ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNARSON, J. T. Essential oils in insect control: Low-r products in a high-stakes world. **Annual Review Entomology**, v. 57, p. 405-24, 2012.

<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J. B; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 25-35, 2005.

<https://doi.org/10.17348/era.3.0.25-36>

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 80-84, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102–123, 2001. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/FLO_Etnob_Cerrado_MGID-0zWHItLEGY.pdf>. Acesso em: 11 Nov. 2017.

ROLIM, T. L.; WANDERLEY, F. T. S.; CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, A. M. F.; ASSIS, T. S. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 524-527, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400007>

ROSA, G. S. **Planejamento e síntese de híbridos pirazol-imidazolinas com potencial atividade antiprotozoária**. 2017. 166 f. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá – MG, 2017. Disponível em: <<http://repositorio.unifei.edu.br/xmlui/handle/123456789/891>>. Acesso em: 18 Ago. 2018.

RYU, K. R.; CHOI, J. Y.; CHUNG, S.; KIM, D.H. Anti-scratching behavioral effect of the essential oil and phytol isolated from *Artemisia princeps* Pamp. in mice. **Planta Medica**, v. 77, n. 1, p. 22-26, 2011.

<https://doi.org/10.1055/s-0030-1250119>

SACRAMENTO, V. M. Identificação e quantificação de metabólitos secundários presentes nos extratos hidroetanólicos de folhas e caules de *Banisteriopsis pubipetala* (Malpighiaceae). 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros – MG, 2014.

<http://www.ppgb.unimontes.br/index.php/dissertacoes-novo>

SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D; OJHA, S.; KUMAR, J. K.; CHAMOTYA, C. S.; SHANKE, K.; NEGI, A. S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 508-512, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.107>

SANTOS, C. C. M. P.; SALVADORI, M. S.; MOTA, V. G.; COSTA, L. M.; ALMEIDA, A. A. C.; OLIVEIRA, G. A. L.; COSTA, J. P.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo Models. **Neuroscience Journal**, v. 9, p. 1-9, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/949452>

SANTOS, S. V.T.; TEIXEIRA, R. R.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO – MADURRO, A. G.; ESPINDOLA, F. S. **Bioeletrode for detection of human salivary amylase. Materials Scince and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.082>

SANTOS, V. S. D.; NASCIMENTO, T. V.; FELIPE, J. L.; BOARETTO, A. G.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; SILVA, D. B.; TOFFLII-KADRI, M. C.; CAROLLO, C. A. Nutraceutical potential of *Byrsonima cydoniifolia* fruits based on chemical composition, anti-inflammatory, and antihyperalgesic activities. **Food Chemistry**, v. 237, p. 240-246, 2017.

<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.082>

SCHENBERG, E. E.; ALEXANDRE, J. F. M.; FILEV, R.; CRAVO, A. M.; SATO, J. R. MUTHUKUMARASWAMY, S. D. Acute biphasic effects of Ayahuasca. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1-27, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137202>

SHAHIDI, F.; AMBIGAIAPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of functional foods**, v.18, p. 820–897, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>

SHAN, X.; LIU, X.; HAO, J.; CAI, C.; FAN, F.; DUN, Y.; ZHAO X.; LIU, X.; LI, C.; YU, G. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 249-255, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.036>

SHARMA, S. H.; THULASINGAN, S.; NAGARAJAN, S. Terpenoids as anti-colon cancer agents – A comprehensive review on its mechanistic perspectives. **European Journal of Pharmacology**, n. 795, p. 169-178, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.12.008>

SILVA, E. A.; DEL-CLARO, K. Effect of post-fire resprouting on leaf fluctuating asymmetry, extrafloral nectar quality, and ant–plant–herbivore interactions. **Naturwissenschaften**, v. 100, p. 525-532, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s00114-013-1048-z>

SILVA, F. F. **Compostos voláteis de plantas e interações entre inimigos naturais e insetos herbívoros**. Disponível em:

<<https://portalnemip.wordpress.com/2012/06/16/compostos-volatéis-de-plantas-e-interações-entre-inimigos-naturais-e-insetos-herbívoros>>. Acesso em: 29 de Mar. 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. R.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFSC, 2004. ISBN: 9788570256171.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136- 141, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>

SONBOLI, A.; BABAKAHANI, B.; MEHRABIAN, A. R. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from Salvia. **Z. Naturforsch**, v. 61, p. 160-164, 2006.

<https://doi.org/10.1515/znc-2006-3-401>

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, C. C.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, 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.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

SOUSA, R. M. F. **Estudo químico de *Eugenia calycina Cambess* e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase.** 2015. 222 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17290>>. Acesso em: 22 Ago. 2018.

SOUSA, R. M. F.; MORAIS, S. A. L.; VIEIRA, R. B. K.; NAPOLITANO, D. R.; GUZMAN, V. B.; MORAES, T. S.; CUNHA, L. C. S.; MARTINS, C. H. G.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina Cambess.* leaves against oral bactéria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71-78, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.050>

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. M. T. 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, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000300011>

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Pericarp structure in *Banisteriopsis* C. B. Rob. and *Diplopterys* A. Juss. (Malpighiaceae): new data supporting generic segregation. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 527-536, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000300003>

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 59-67, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.008>

SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEREDO, S. L.; MARTINS, E. R. **Oleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis.** Encyclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, v. 6, n. 10, p. 1-11, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010b/oleos.pdf>>. Acesso em: 10 Jun. 2018. SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática.** Instituto Plantarum, 2008. ISBN: 978-85-86714-39-9.

SPEZIALI, M. G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do “cheiro”. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 861-864, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000400038>

SRI HARSHA, P. S.; LAVELLI, V.; SCARAFONI, A. Protective ability of phenolics from white grape vinification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. **Food Chemistry**, v. 156, p. 220-226, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.104>

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679-693, 2007.

<https://doi.org/10.3390/12030679>

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. Disponível em: <<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla07111.pdf>>. Acesso em: 24 Jun. 2018.

TALA, V. R.; SILVA, V. C.; RODRIGUES, C. M.; NKENGFACK, A. E.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; Characterização of Proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by Flow Injection Analysis – Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 18, p. 2803-2820, 2013.

<https://doi.org/10.3390/molecules18032803>

TAYLOR, V. M.; CEDEDENO, D. L.; ROBLEDO, S. M. Phototherapy in treatment of cutaneous leishmaniasis. **Infectio**, v. 15, n. 4, p. 277-288, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v15n4/v15n4a10.pdf>>. Acesso em: 13 Out. 2018.

TIWARI, R.; RANA, C. S. Plants secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 3, n. 5, p. 661-670, 2015.

[https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70742-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70742-1)

TOMA, A.; MAKONNEM, E.; MEKONNEM, Y.; DEBELLA, A.; ADDISAKWATTANA, A. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-5, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-180>

TRAESSEL, G. K.; MENEGATI, S. E. L. T.; DOS SANTOS, A. C.; SOUZA, R. I. C.; VILLAS BOAS, G. R.; JUSTI, P. N.; KASSUYA, C. A. L.; ARGANDONA, E. J. S.; OESTERREICH, S. A. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb) pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 224-231, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.018>

VERDAM, M. C. D. S; GUILHON-SIMPLICIO, F.; ANDRADE, K. C.; FERNANDES, K. L. M.; MACHADO, T. M.; SILVA, F. M. A.; SOUZA, M. P.; KOOLEN, H. H. F.; PAULA, C. S.; HIROTA, B. C. K.; OLIVEIRA, V. B.; MIYAZAKI, C. M. S.; KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; STUEL-P-CAMPELO, P. M.; MIGUEL, O. G. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae). **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-9, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/8367042>

VETTER, W.; SCHIRODER, M.; LEHNERT, K. Differentiation of refined and virgin edible oils by means of the trans- and cis-phytol isomer distribution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 6103–6107, 2012.

<https://doi.org/10.1021/jf301373k>

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>

VIEIRA, D. R. P.; AMARAL, F. M. M.; MACIEL, M. C. G.; NASCIMENTO, F. R. F.; LIBÉRIO, A. S. Plantas e constituintes químicos empregados em Odontologia: revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em patógenos orais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 135-167, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000100020>

VINING, L. C. Functions of secondary metabolites. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 395-427, 1990.

<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002143>

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plantdrug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlin: Springer, 1996. 384p.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids – overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 47, p. 95–106, 2003.

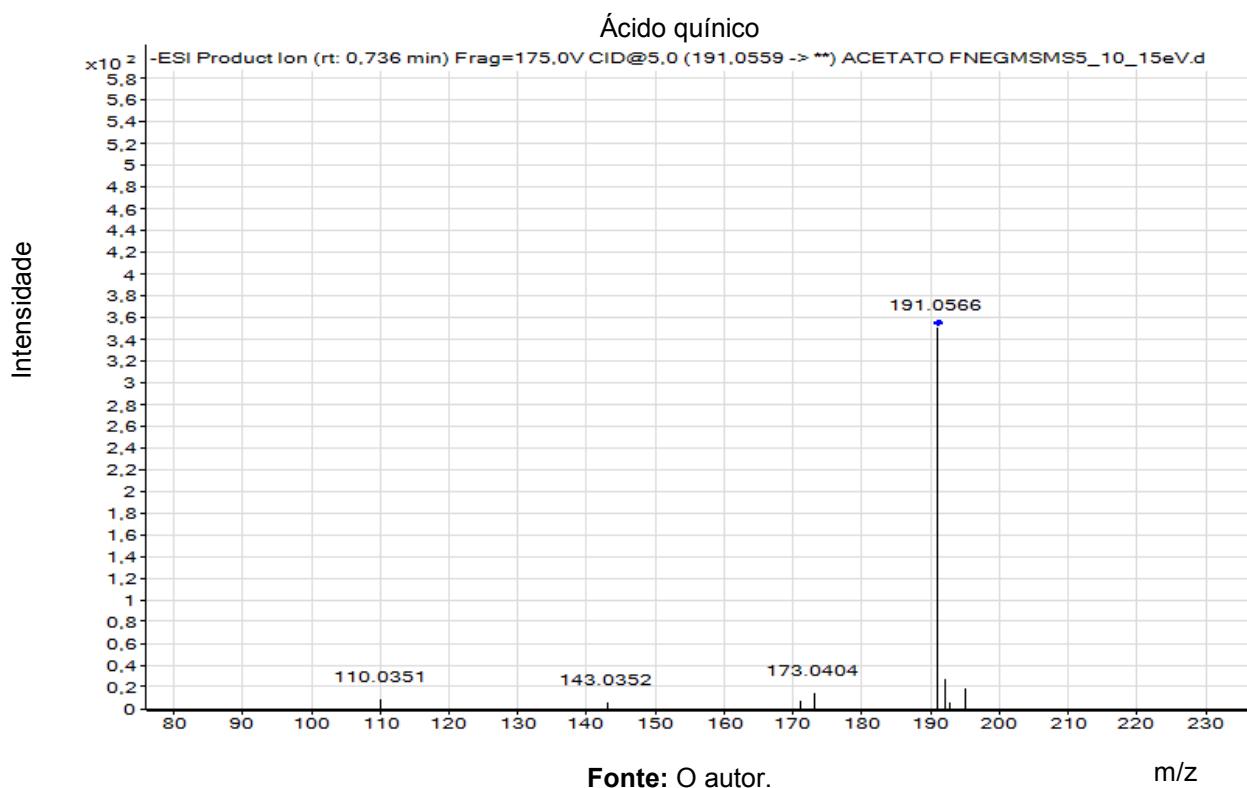
<https://doi.org/10.1159/000070030>

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

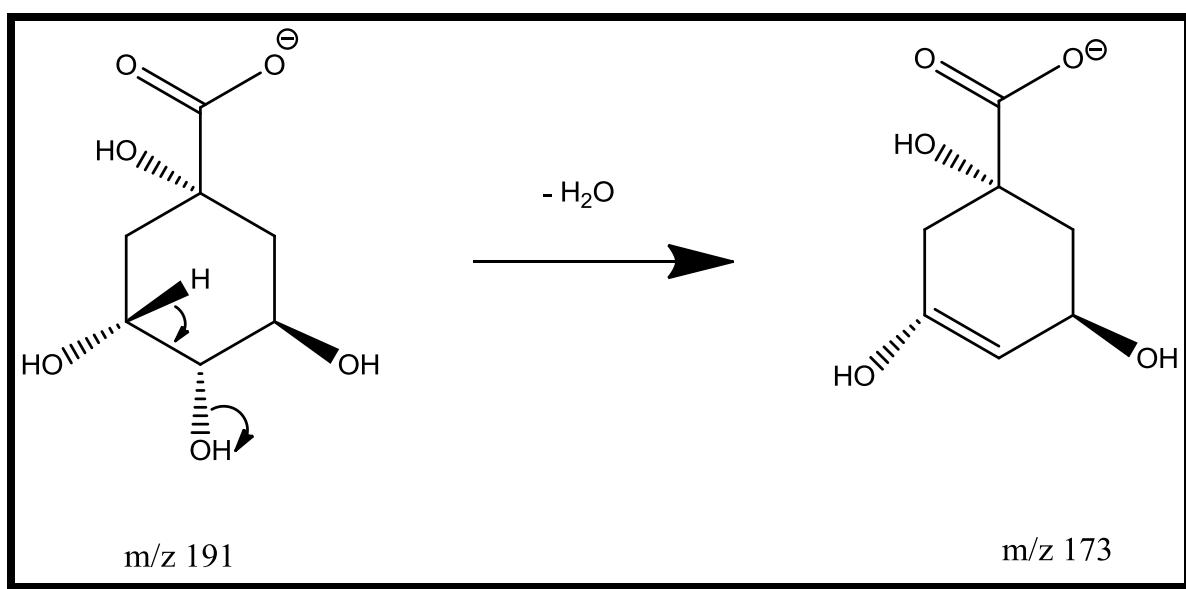
<https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

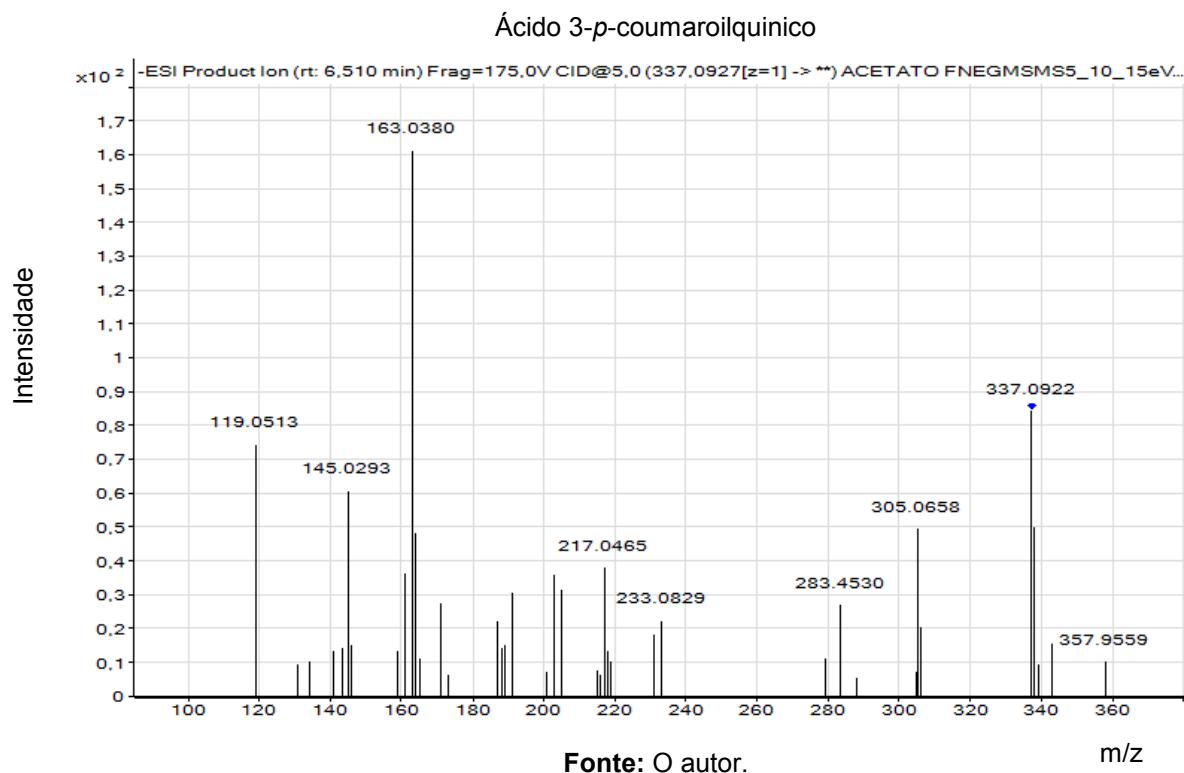
ANEXOS

Anexo 1. Espectros de EM/EM dos compostos identificados na partição acetato de etila folha.

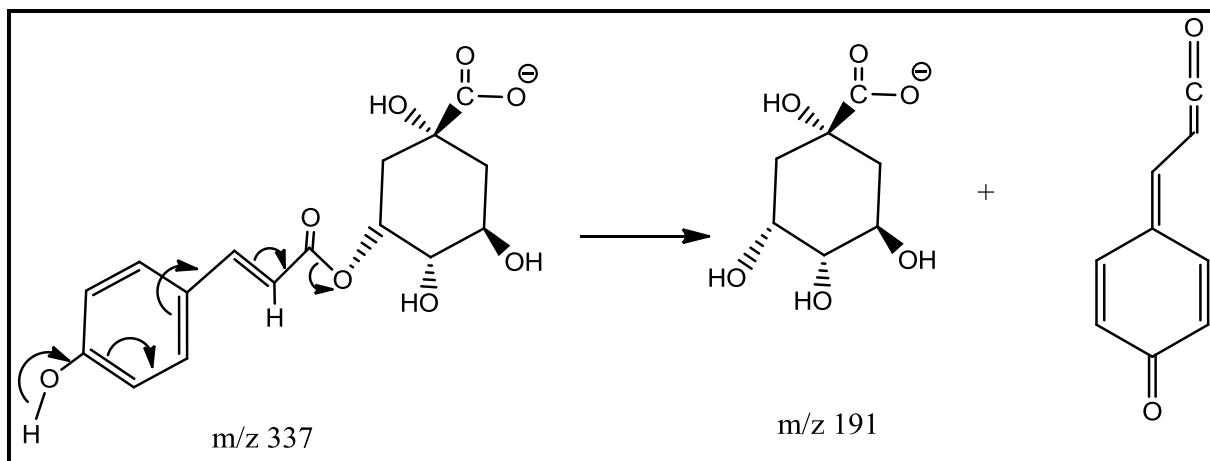


Proposta de fragmentação para o ácido quínico.

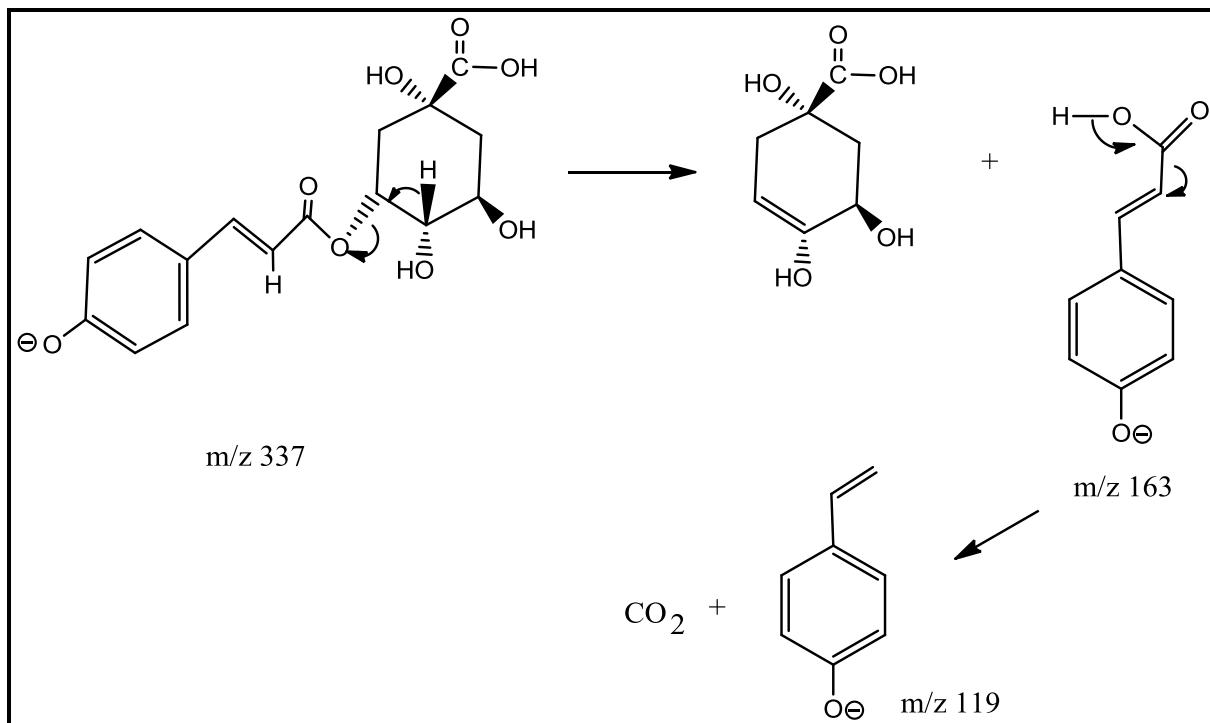




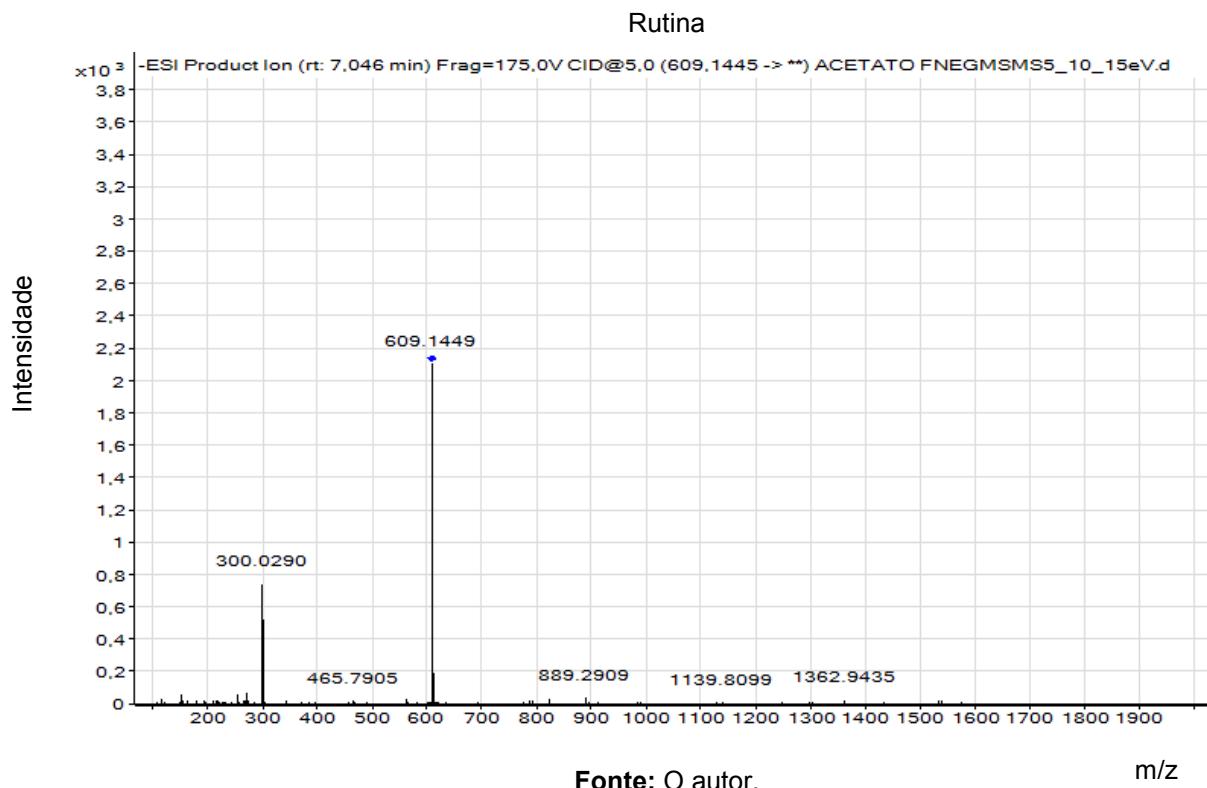
Proposta de fragmentação para o ácido 3-*p*-coumaroilquinico.



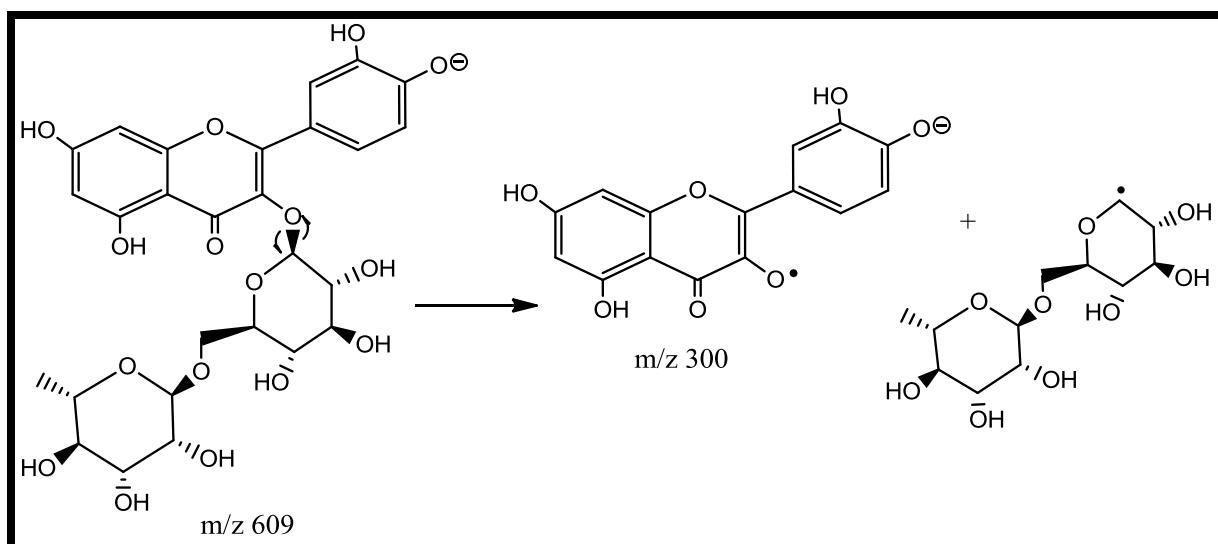
Continuação da proposta de fragmentação para o ácido 3-*p*-coumaroilquinico.



Fonte: (MARTINS, 2018).

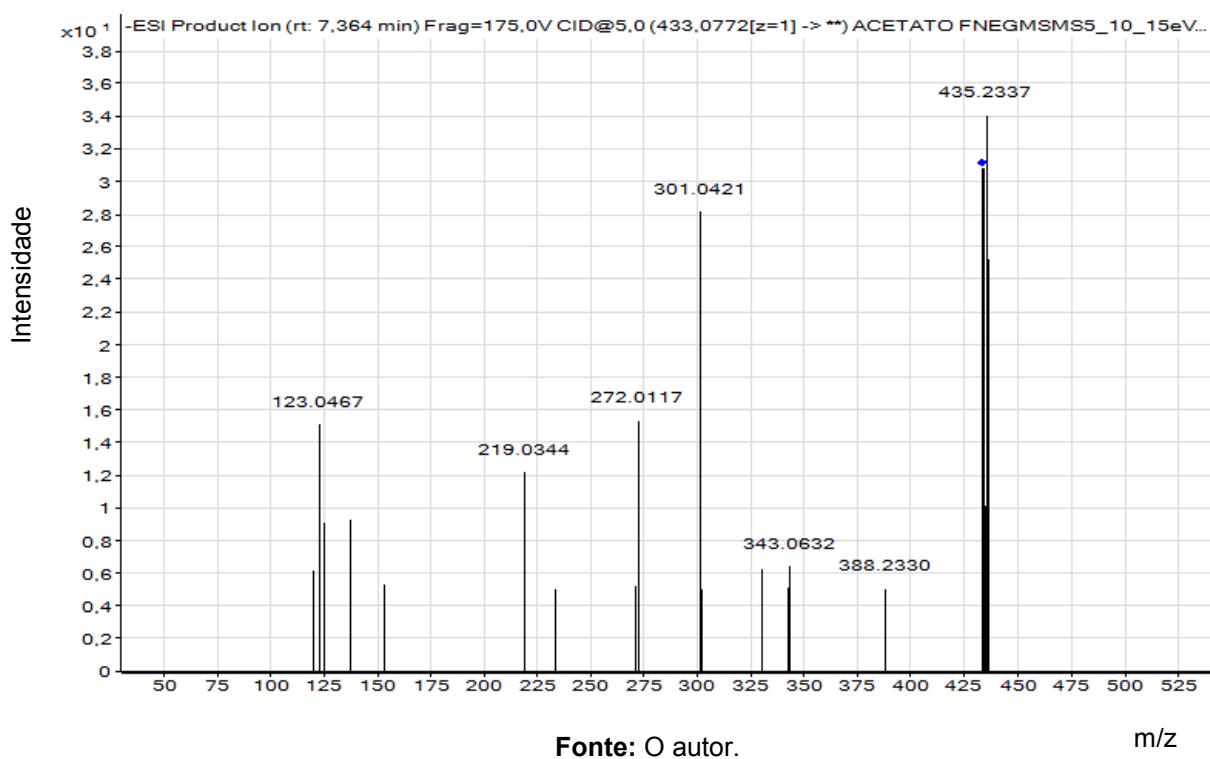


Proposta de fragmentação para rutina.



Fonte: (MARTINS, 2018; SOUSA, 2015).

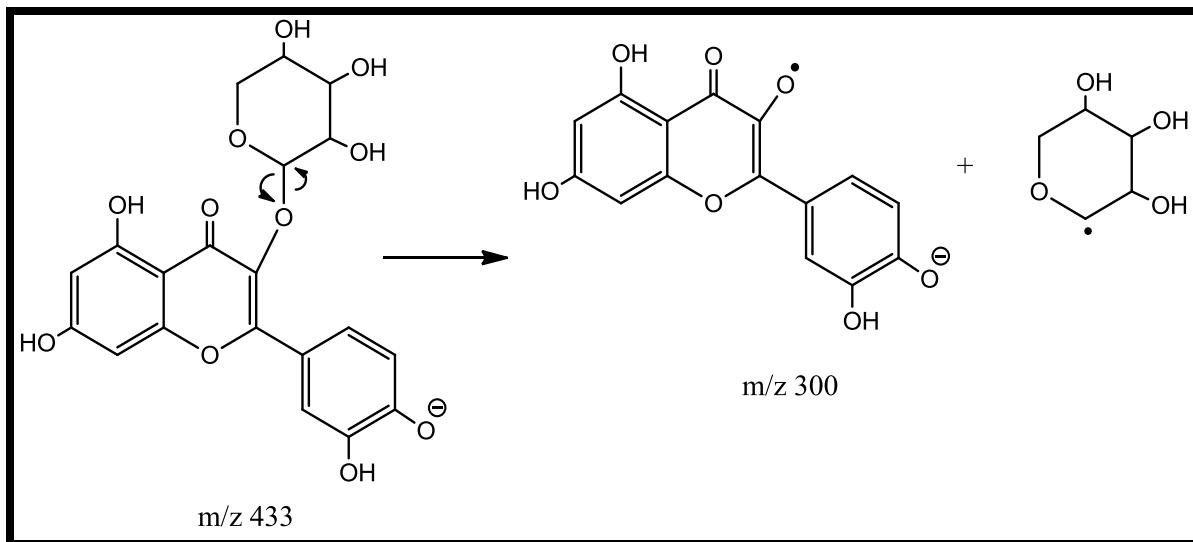
Quercetina 3-o-pentosideo.



Fonte: O autor.

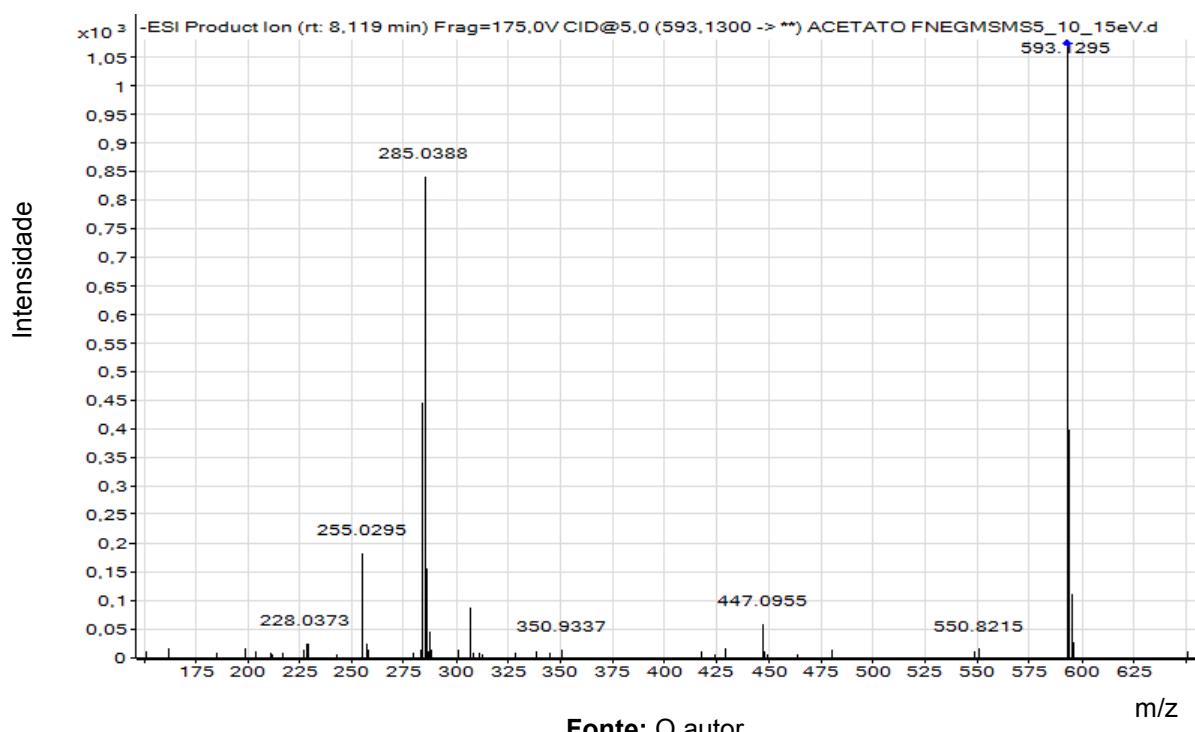
m/z

Proposta de fragmentação para quercetina 3-o-pentosideo.



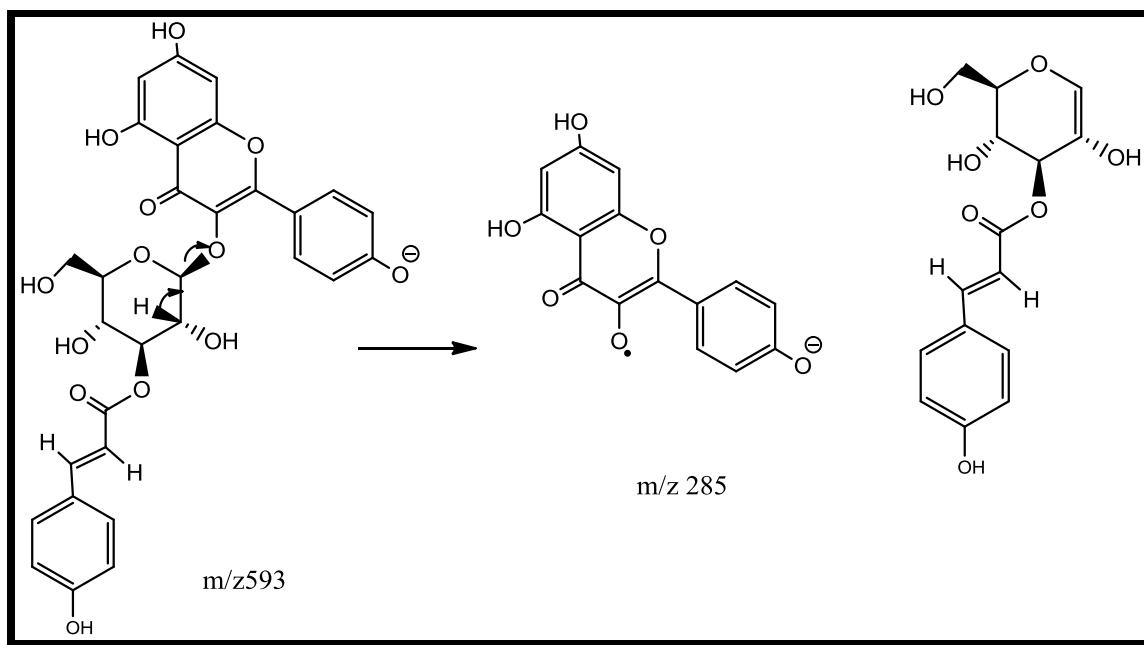
Fonte: O autor.

Kaempferol 3-coumaroilglucosideo.

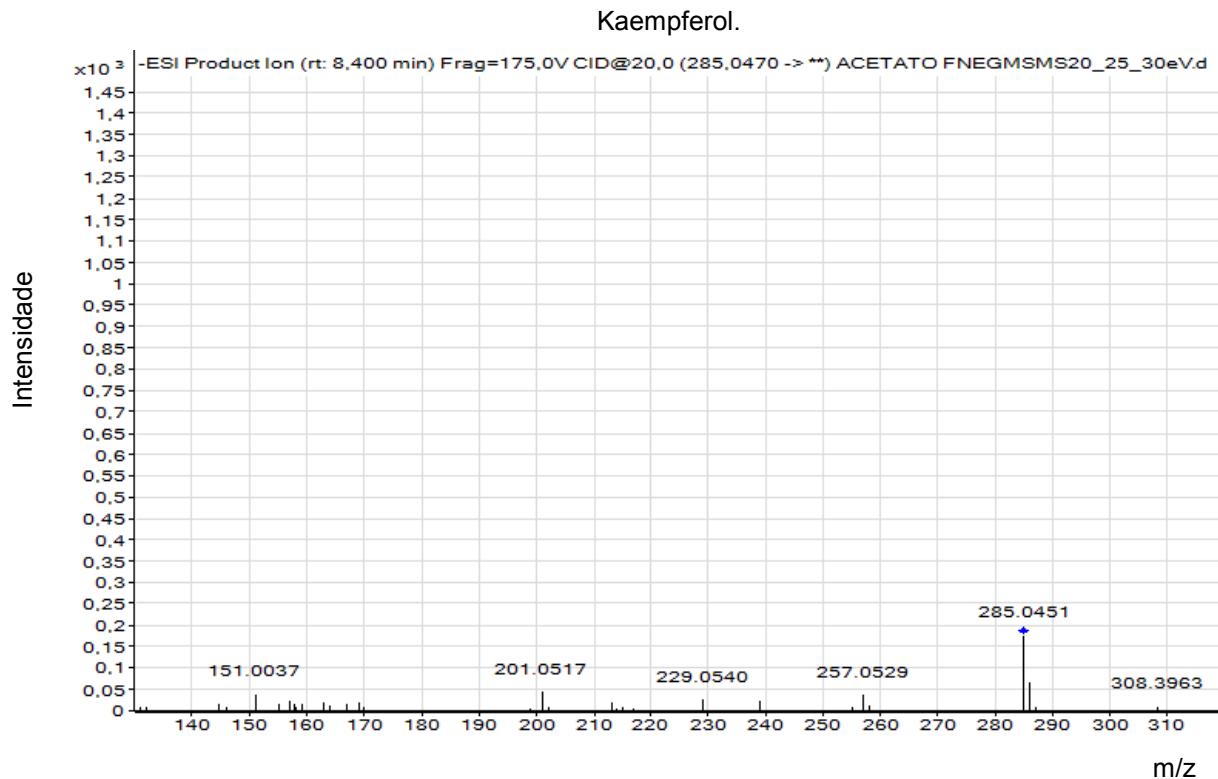


Fonte: O autor.

Proposta de fragmentação para kaempferol 3-coumaroilglucosideo.

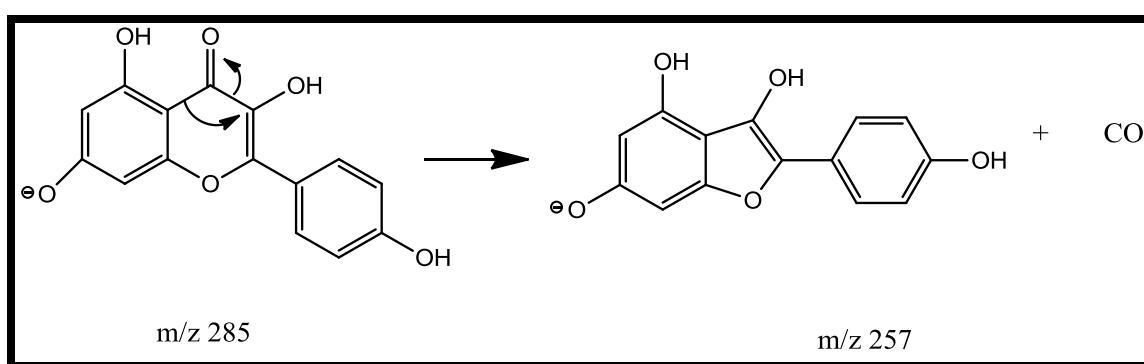


Fonte: (MARTINS,2018).

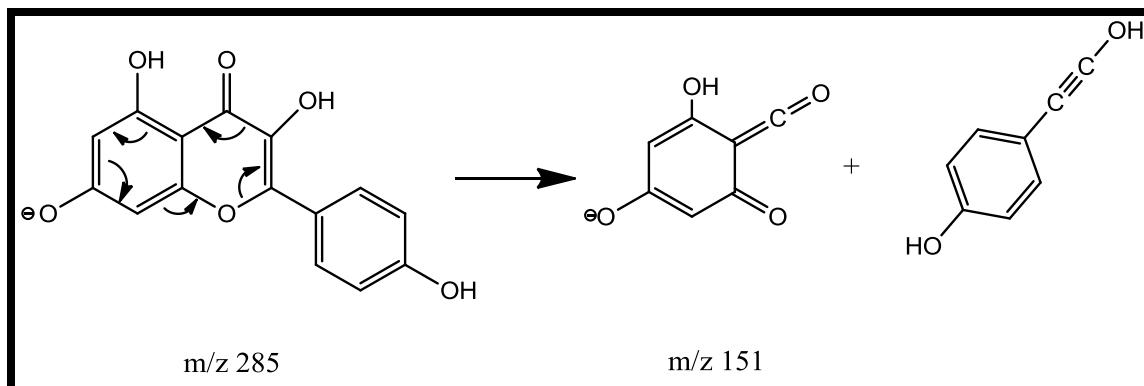


Fonte: O autor.

Proposta de fragmentação para kaempferol

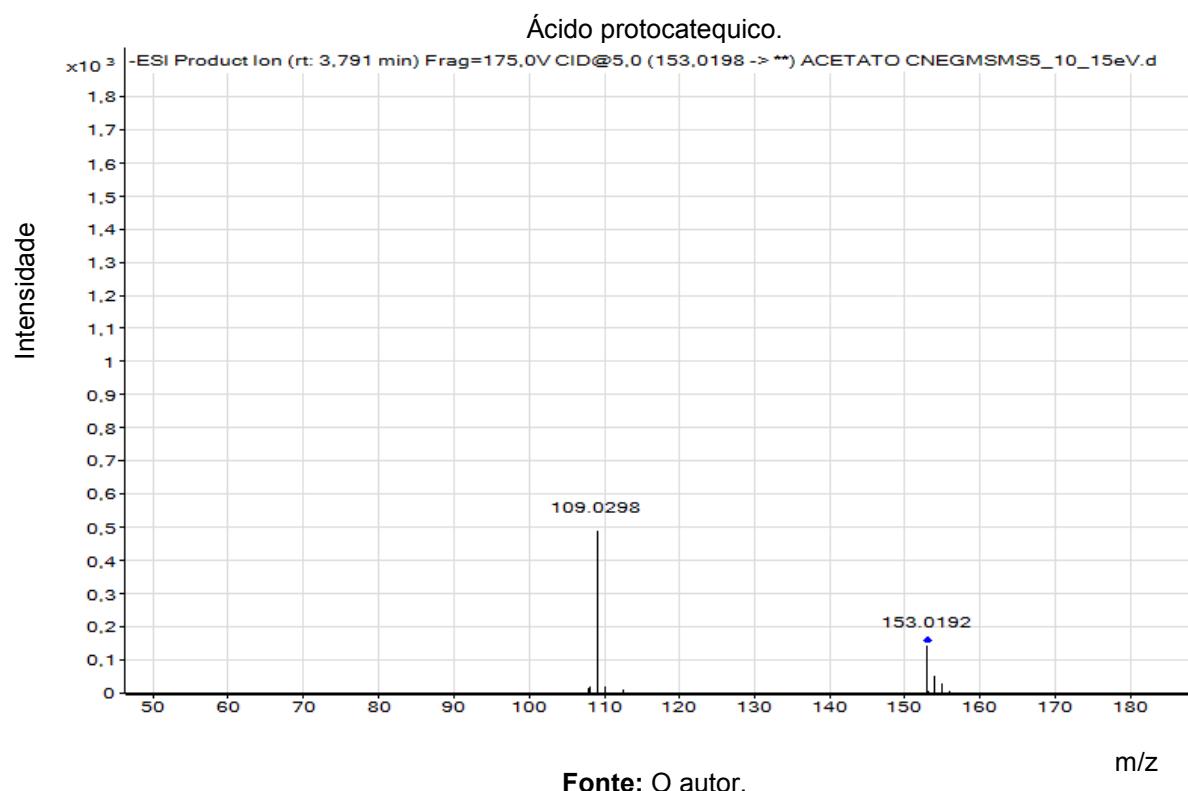


Fonte: O autor.



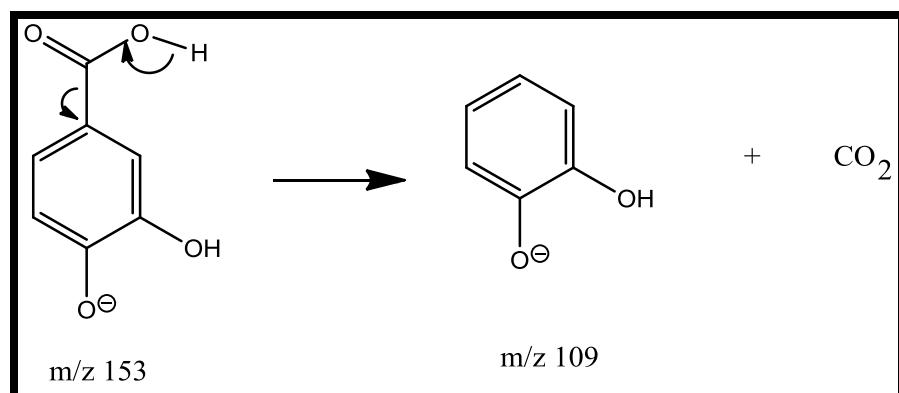
Fonte: O autor.

Anexo 2. Espectros de EM/EM dos compostos identificados na partição acetato de etila caule.



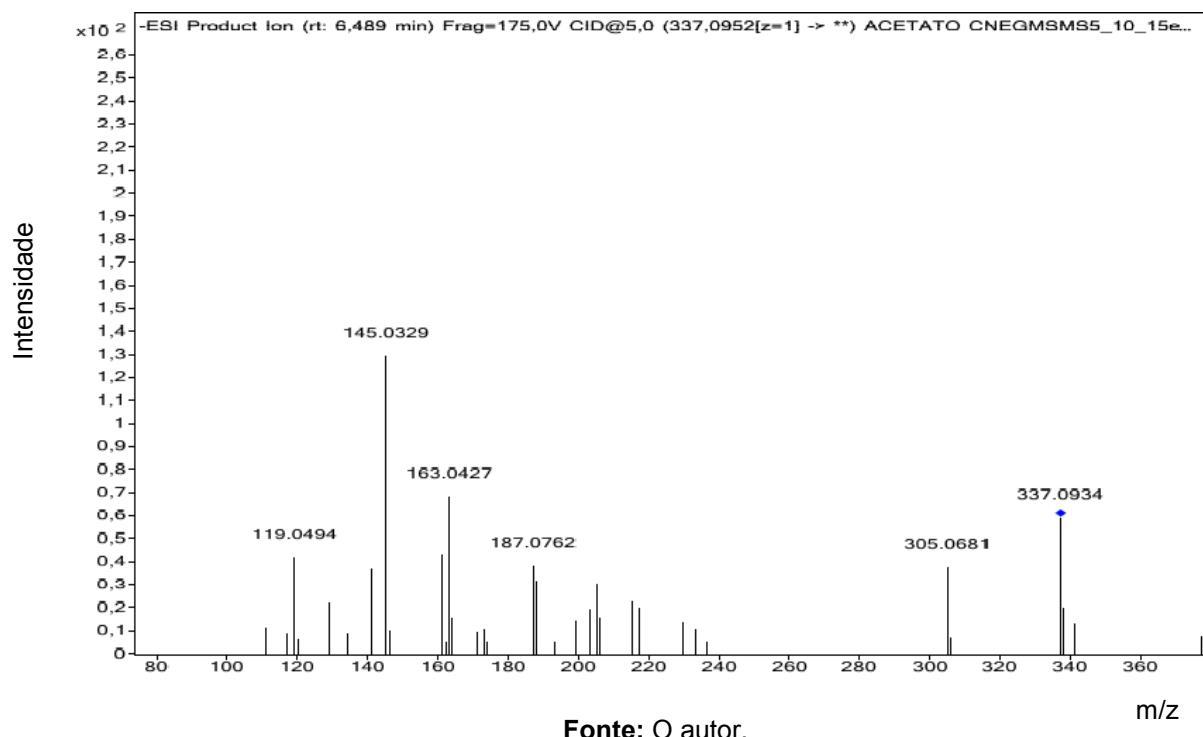
Fonte: O autor.

Proposta de fragmentação para ácido protocatequico.

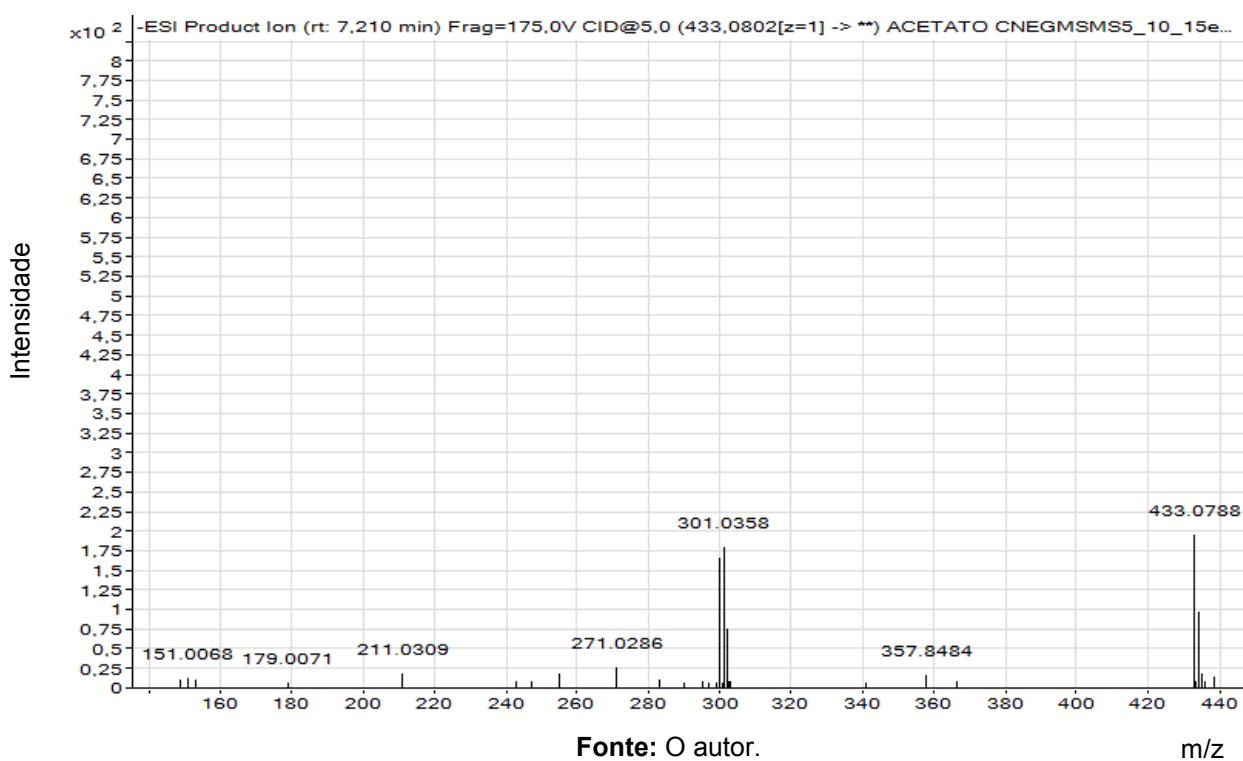


Fonte: O autor.

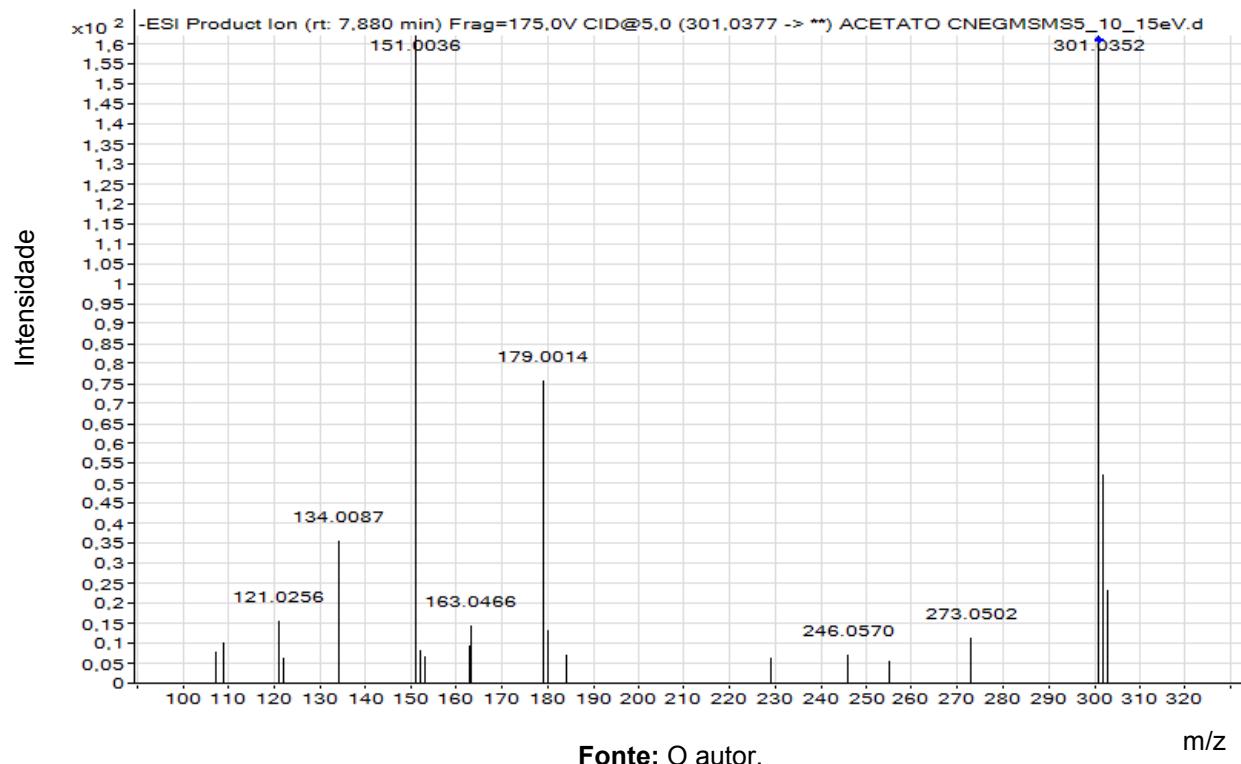
Ácido 3-p-coumaroilquinico.



Quercetin 3-O-pentosideo.

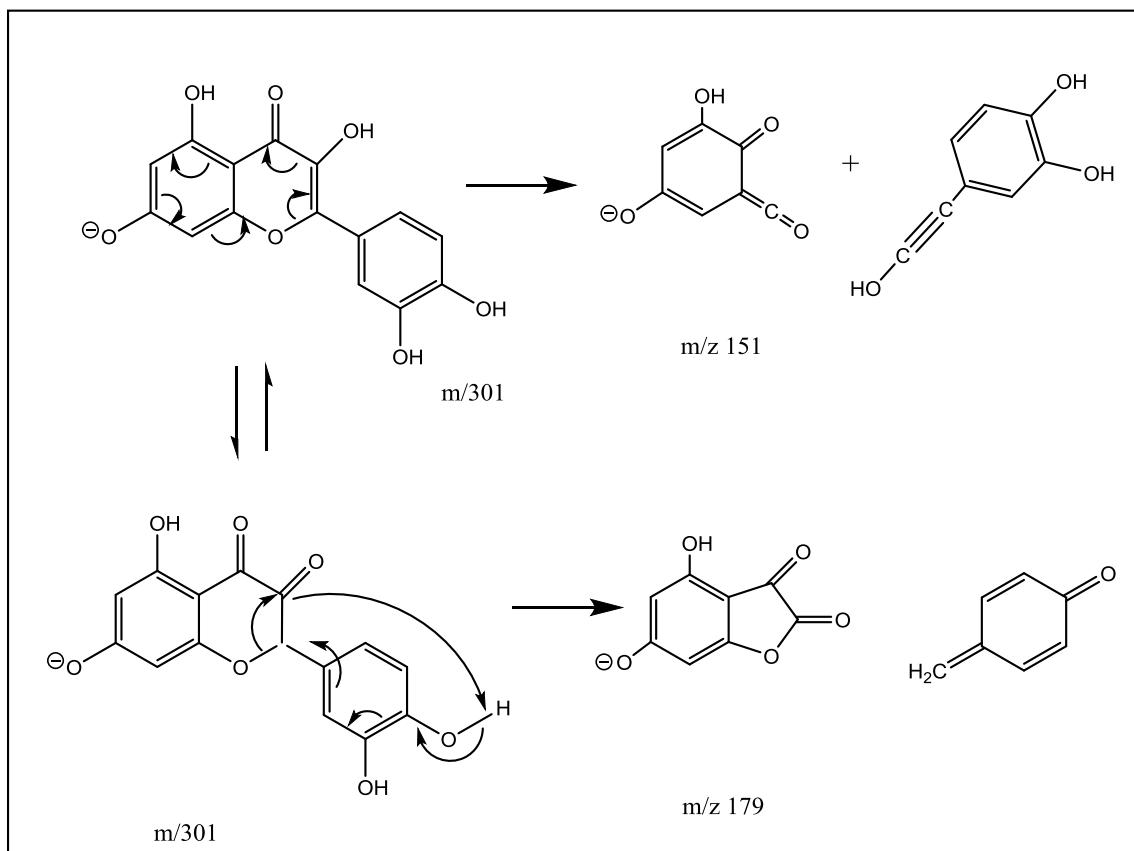


Quercetina.



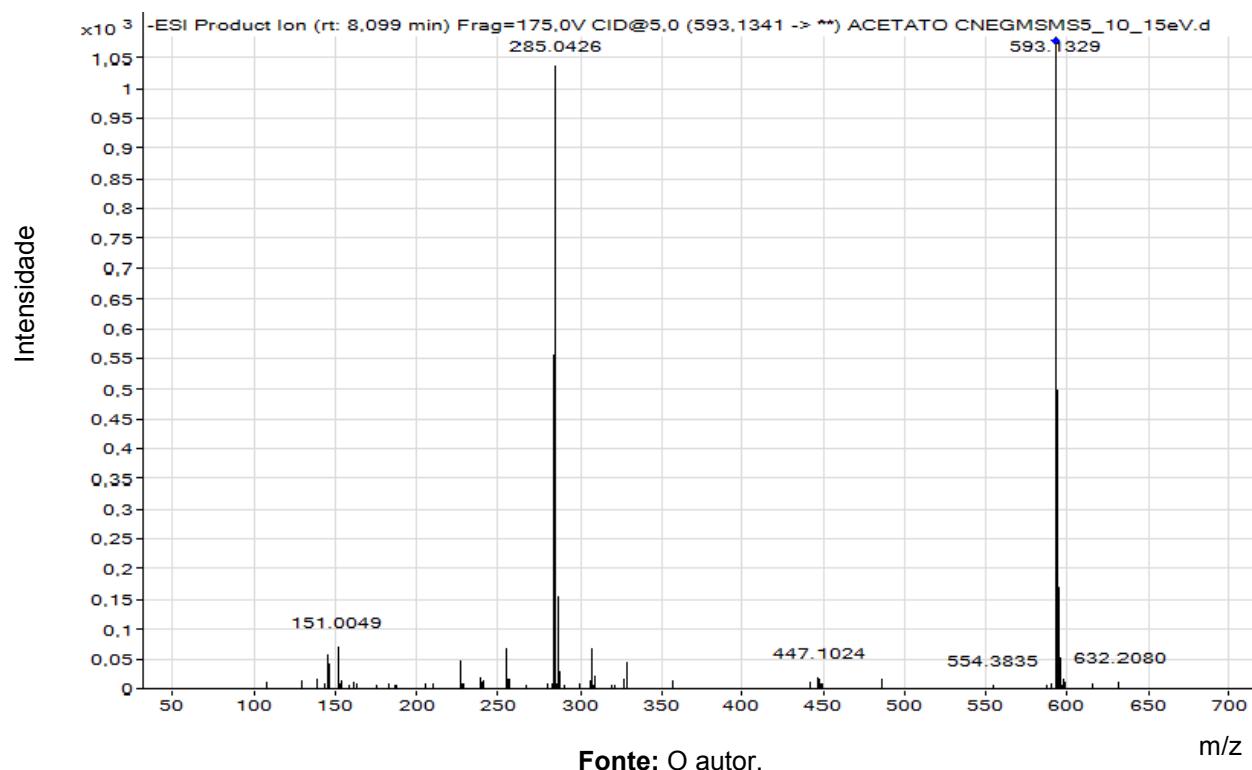
Fonte: O autor.

Proposta de fragmentação para quercetina.



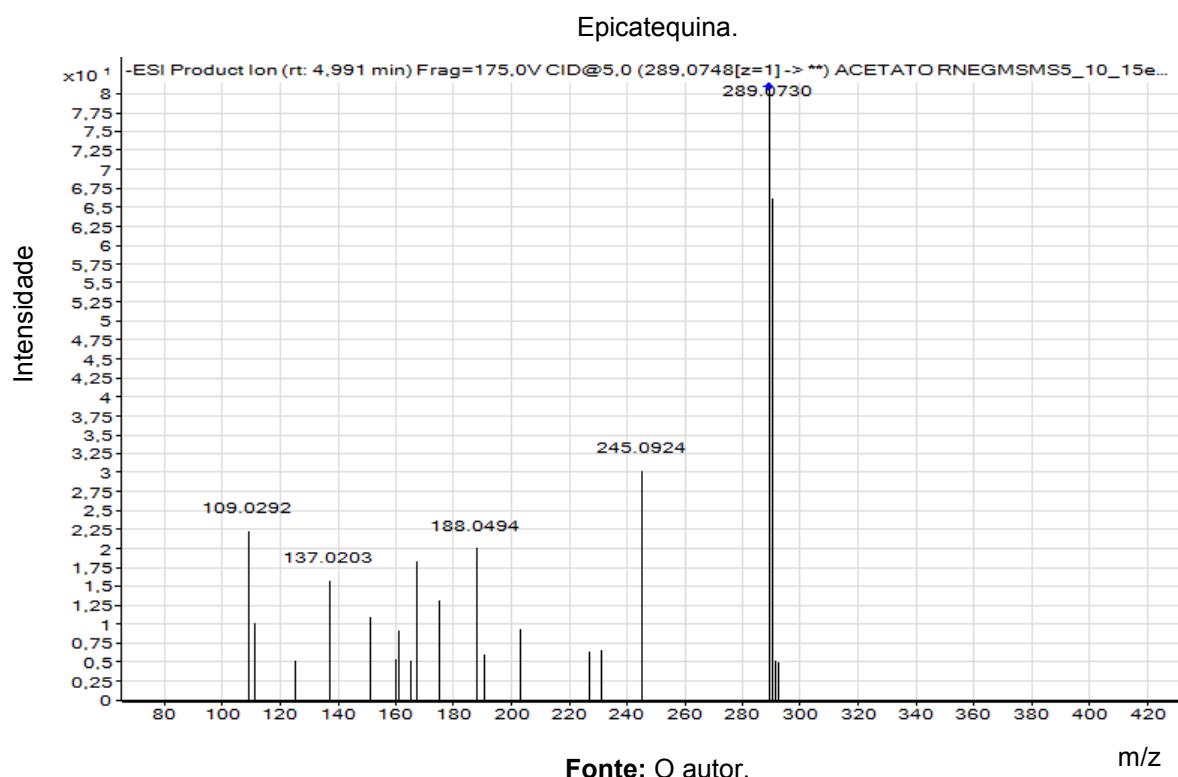
Fonte: (MARTINS, 2017).

Kaempferol 3-coumaroilglucosideo.

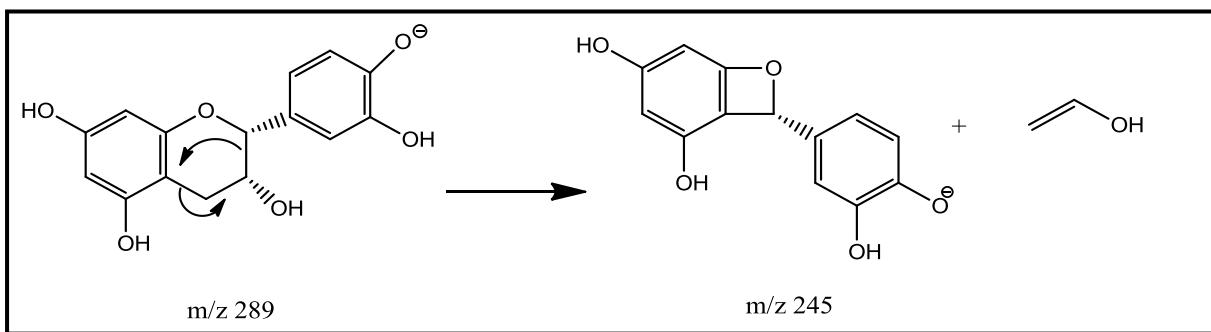


Fonte: O autor.

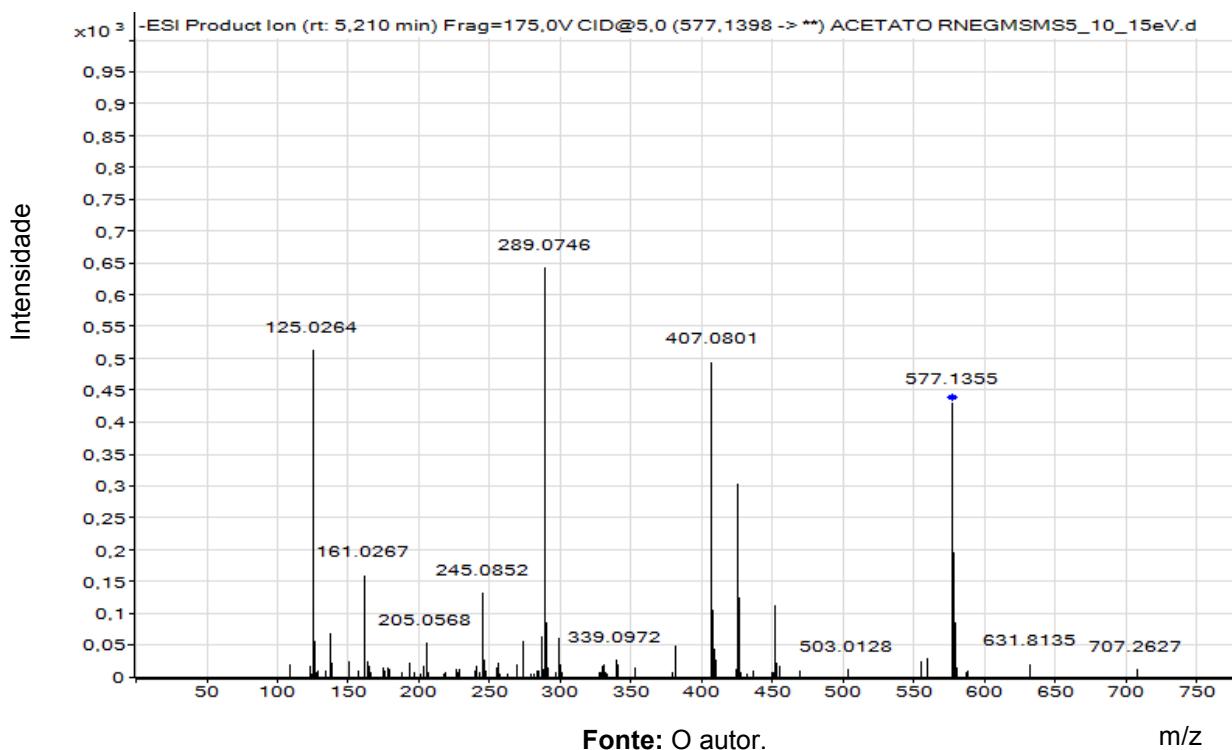
Anexo 3. Espectros de EM/EM dos compostos identificados na partição acetato de etila raiz.



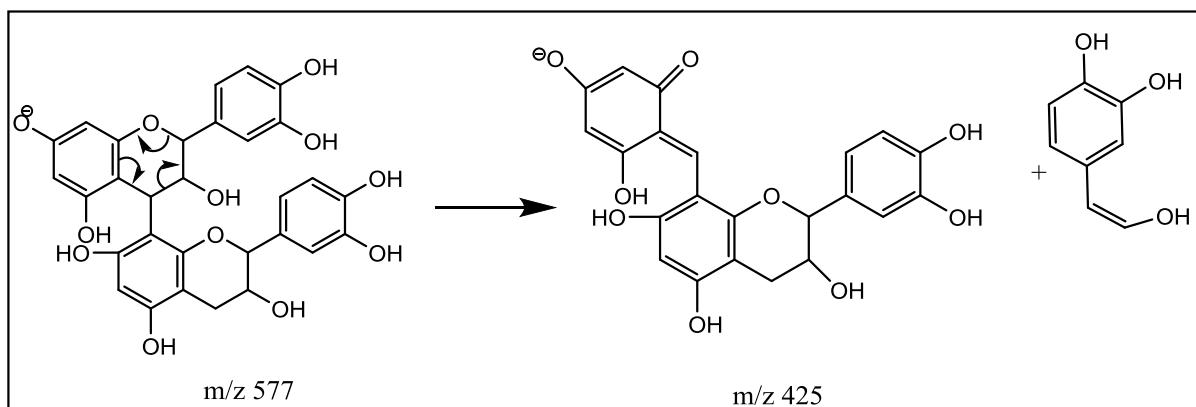
Proposta de fragmentação para epicatequina.



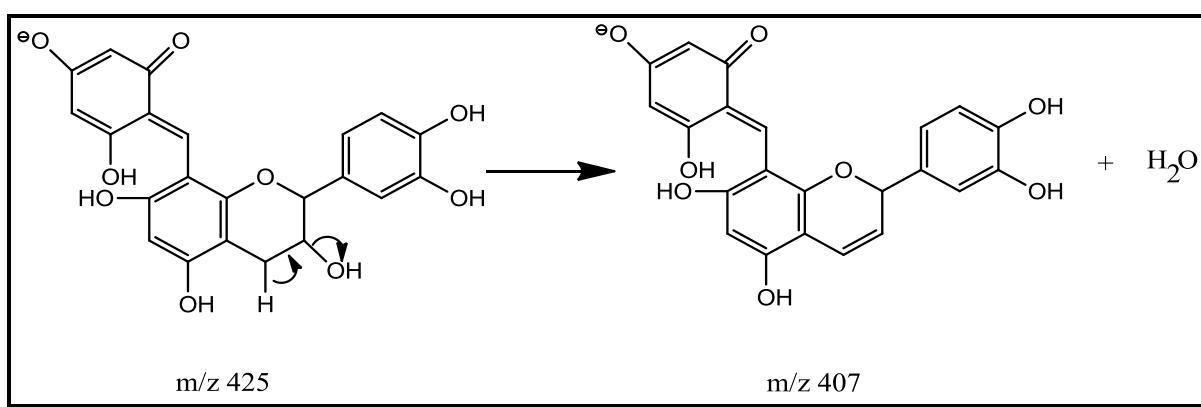
Procianidina B1.



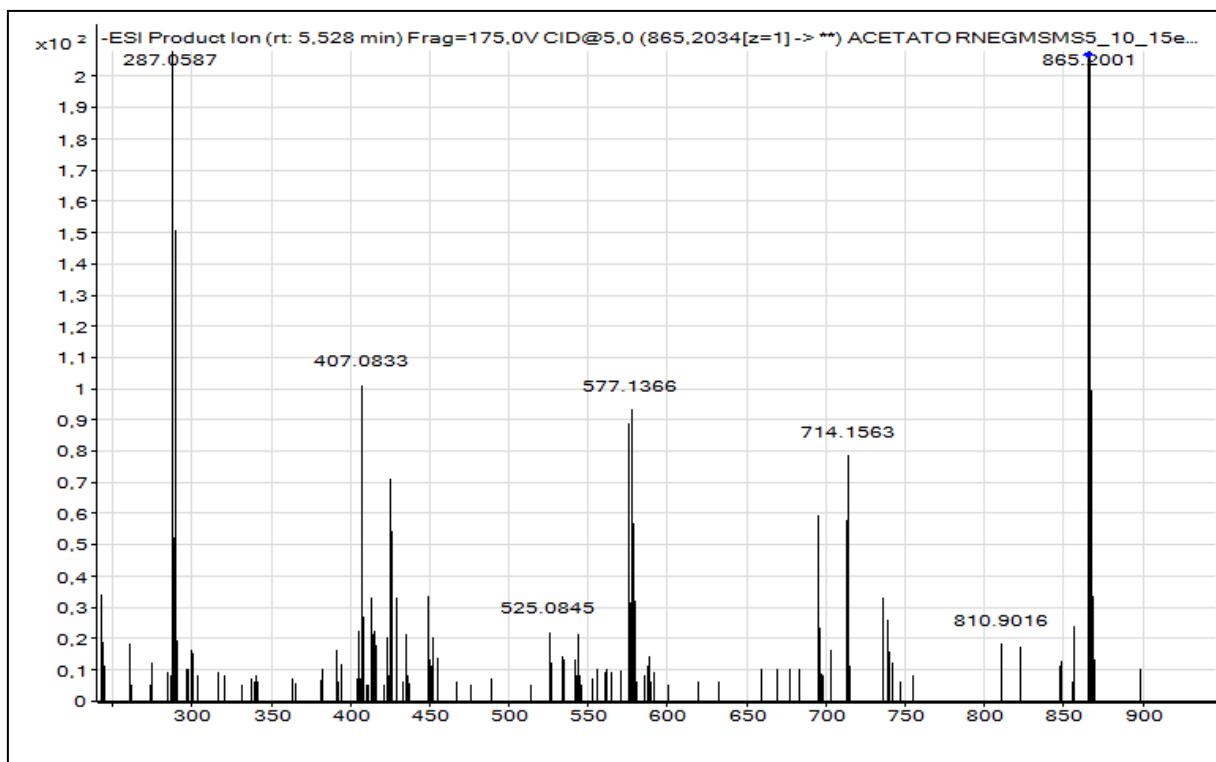
Proposta de fragmentação para procianidina B1.



Fonte: (MARTINS, 2018).



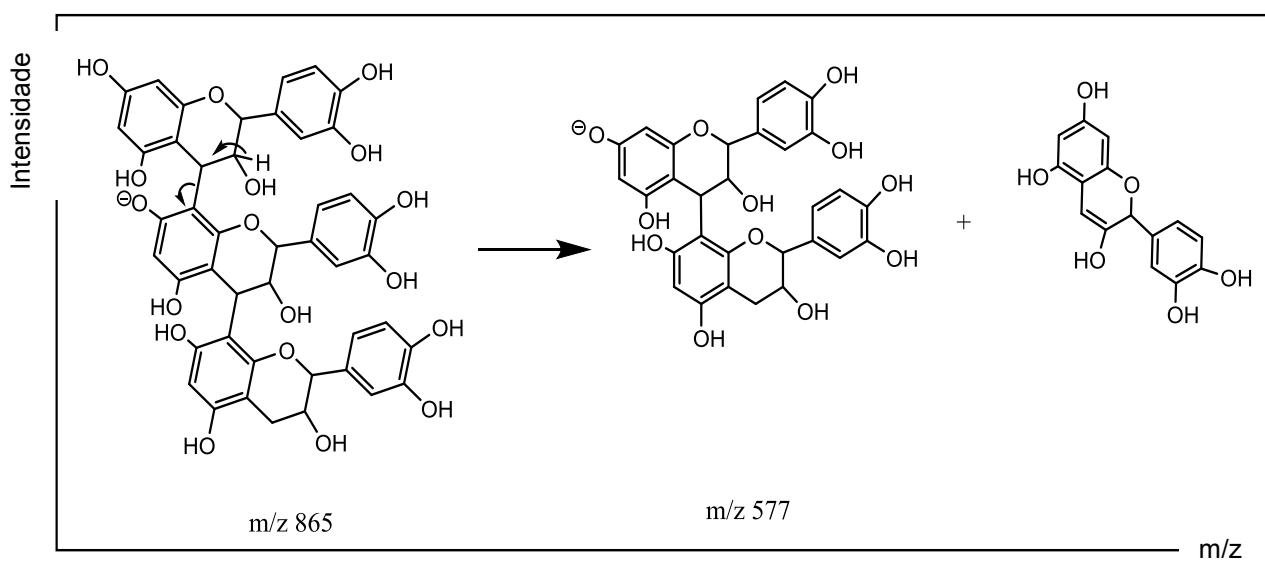
Fonte: (MARTINS, 2018).



Prochanidina C1.

Fonte: O autor.

Proposta de fragmentação para procianidina C1.



Fonte: (MARTINS, 2018).

