

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

VANESSA ELLEN XAVIER MARTINS

**Estudo químico e avaliação biológica da *Banisteriopsis
malifolia* (Ness & Mart) B. Gates (Malpighiaceae)**

UBERLÂNDIA-MG

Fevereiro - 2019

VANESSA ELLEN XAVIER MARTINS

Estudo químico e avaliação biológica da *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart) B. Gates (Malpighiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientação: Prof. Dr. Francisco José Tôres de Aquino.

UBERLÂNDIA-MG

Fevereiro - 2019

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

M386e Martins, Vanessa Ellen Xavier, 1993-
2019 Estudo químico e avaliação biológica da *Banisteriopsis malifolia*
(Ness & Mart) B. Gates (Malpighiaceae) [recurso eletrônico] / Vanessa
Ellen Xavier Martins. - 2019.

Orientador: Francisco José Tôres de Aquino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.366>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. 2. *Banisteriopsis*. 3. Essências e óleos essenciais. I.
Aquino, Francisco José Tôres de, 1961- (Orient.) II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
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 DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 301/PPQUI.

DATA: 28/02/2019

DISCENTE: Vanessa Ellen Xavier Martins

MATRÍCULA: 11712QMI011

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo químico e avaliação biológica da *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart) B. Gates (Malpighiaceae).

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo fitoquímico e avaliação biológica de óleos, extratos e partições de folhas da *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart) B. Gates (Malpighiaceae)

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e dezenove, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira, Universidade Federal de Uberlândia, Prof^a Dra. Carla de Moura Martins, Instituto Federal Goiano e Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino, 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 A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA BANISTERIOPSIS MALIFOLIA (NESS & MART) B. GATES (MALPIGHIACEAE)

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 12 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Carlos Alberto de Oliveira Carla de Moura Martins

Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Prof^a Dra. Carla de Moura Martins

Francisco José Tôrres de Aquino
Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Franciangela (in memoriam) e Clindomar.
Obrigada por serem fonte de inspiração, apoio e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade de vida, saúde, forças e coragem durante toda esta longa caminhada.

Ao meu amado pai Clindomar, que sempre esteve apoiando-me nas minhas decisões e que sem dúvida, foi a pessoa que deu o maior incentivo para conseguir concluir este trabalho. Ao meu querido irmão, Lucas Hiago, que sempre me encorajou a chegar até o final.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia-UFU, por tornar possível a realização deste trabalho de Mestrado em Química de Produtos Naturais.

Ao professor Dr. Francisco José Tôrres de Aquino pela orientação e confiança.

Ao professor Dr. Luis Carlos Scalon Cunha do Núcleo de Bioprospecção em Produtos Naturais do IFTM e ao professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da UNIFRAN, pelos ensaios de atividade antimicrobiana realizados.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, pela disponibilidade do seu aluno Ms. Allisson Benatti Justino, pela realização do ensaio de atividade enzimática.

Ao professor Dr. Claudio Vieira da Silva, do Laboratório de Tripanossomatídeos da UFU, pela disponibilidade do seu aluno Ms. Cassiano Costa Rodrigues, pela realização dos ensaios antiprotozoários e citotóxicos.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPEN) pelos ensinamentos que contribuíram na realização desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Tiara, Marília, Thamires, Michelle, Flávia, Karina, Gáveni, Paola, Érica, John, Mário, Rafael, Diego, Raul, pelo convívio, apoio e amizade, deixando essa etapa mais leve e agradável.

A FAPEMIG pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro aos projetos. E a todos que de forma direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa, o meu muito obrigada!

RESUMO

A *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart.) B. Gates, conhecida como flor-do-dia ou rama-de-moço, pertence à família Malpighiaceae e ao gênero *Banisteriopsis*. Este gênero é rico em metabólitos biologicamente ativos e apresenta importantes atividades farmacológicas. O objetivo deste trabalho foi estudar a composição química sazonal do óleo essencial, extratos e partições de folhas da *B. malifolia*, bem como a avaliação biológica. A composição química sazonal do óleo essencial obtido por hidrodestilação foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os principais compostos identificados no óleo essencial do período seco (PS) foram: fitol (15,80%), (Z)-hex-3-enol (17,99%), hexaidrofarnesil-acetona (9,39%), ácido palmítico (10,62%) e o hexatriacontano (18,43%). Já para o período chuvoso (PC) foram identificados: fitol (52,70%) e o (Z)-hex-3-enol (26,22%). Este é o primeiro relato da composição química do óleo essencial das folhas da *B. malifolia*. O óleo do PC apresentou atividade moderada contra todas as bactérias bucais testadas, com concentração inibitória mínima (CIM) de 100 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O óleo do PS mostrou atividade moderada somente para as bactérias aeróbias *S. mitis* e *A. actinomycetemcomitans* e para a bactéria anaeróbia *A. naeslundii* (CIM = 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os óleos não apresentaram atividade significativa contra as leveduras do tipo *Candida* nas concentrações testadas. Os resultados de inibição enzimática da α -amilase e α -glicosidase não foram satisfatórios para o óleo do PS e PC. O estudo sazonal dos óleos, extratos e partições contribuiu para o conhecimento do gênero e revelou mudanças na composição química, na quantidade e na avaliação biológica. Os extratos e partições apresentaram atividade antibacteriana moderada para as bactérias aeróbias e anaeróbias testadas. Os resultados de inibição enzimática da α -amilase e α -glicosidase não foram satisfatórios para os extratos e partições. Pode-se observar que as amostras mais polares apresentaram melhores atividades antifúngicas, com destaque para a partição acetato de etila (CIM's entre 93,75 e 11,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A partição acetato de etila (PA) apresentou a menor concentração inibitória (CI₅₀) com 195,5±0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para atividade antileishmania e alta citotoxicidade para a Célula Vero com concentração citotóxica de (CC₅₀ 84,15±0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O extrato etanólico (EE) e as partições acetato de etila (PA) e residual aquosa (PR) apresentaram elevada atividade antioxidante com concentração eficiente de (CE₅₀ 5,82 ± 0,18; 2,91 ± 0,02; 3,64 ± 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) no sequestro do radical DPPH. A partição residual aquosa (PR) foi a que mostrou ser mais ativa e foi submetida a análise de cromatografia líquida de alta

eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (CLAE-EM-IES), em que foram identificados compostos fenólicos, como ácido quínico; (epi)-catequina; 3-*O*- β -galactopiranosilquercetina; rutina; luteolina-4'-*O*-ramnosil (1 \rightarrow 2) glicosídeo; isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo e o dímero (epi)-catequina-(epi)-catequina, justificando assim a boa atividade antioxidante. Todos estes compostos foram encontrados pela primeira vez na espécie. Entretanto, os compostos luteolina-4'-*O*-ramnosil (1 \rightarrow 2) glicosídeo e isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo foram encontrados somente nesta espécie dentro do gênero *Banisteriopsis*. Desta forma, este estudo contribuiu para o conhecimento químico e biológico da *B. malifolia*.

Palavras-chave: Óleo essencial, extratos e partições, *Banisteriopsis malifolia*, atividade biológica.

ABSTRACT

Banisteriopsis malifolia (Ness & Mart.) B. Gates known as “flor-do-dia” or “rama-de-moço” belongs to the family Malpighiaceae and to the genus *Banisteriopsis*. This genus is rich in biologically active metabolites and presents important pharmacological activities. The objective of this work was study the seasonal chemical composition of the leaves essential oil, extracts and partitions of *B. malifolia* as well as the biological evaluation. The seasonal chemical composition of the essential oil obtained by hydrodistillation was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The major compounds identified in the essential oil of the dry period (PS) were: Fitol (15.80%), (Z)-hex-3-enol (17.99%), Hexahydrofarnesyl-acetone (9.39%), palmitic acid (10.62%) and Hexatriacontane (18.43%). For the rainy season (PC), Fitol (52.70%) and (Z)-hex-3-enol (26.22%) were identified. The PC oil showed moderate activity against all bacterial bacteria tested, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 100 and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. And the PS oil showed moderate to weak activity only for the aerobic bacteria *S. mitis* and *A. actinomycetemcomitans* and for the anaerobic bacterium *A. naeslundii* (MIC = 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The oils did not present significant activity against *Candida* type yeasts at the concentrations tested. The results of enzymatic inhibition were not satisfactory. The seasonal study of the oils, extracts and partitons contributed to the knowledge to the genus and reveled changes in chemical composition, quantity and biological evaluation. The extracts and partitions presented moderate antibacterial activity for the aerobic and anaerobic bacteria tested. The ethyl acetate partition showed the lowest inhibitory concentration (IC₅₀) with $195.5 \pm 0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the activity antileishmania and high cytotoxicity for the Vero Cell cytotoxic concentration (CC₅₀ $84.15 \pm 0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$). It was observed that the more polar samples had better antifungal activities, especially the ethyl acetate partition (MICs between 93.75 and 11.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The ethanolic extract and ethyl acetate and residual aqueous partitions showed high antioxidant activity with efficient concentration (EC₅₀ 5.82 ± 0.18 , 2.91 ± 0.02 , $3.64 \pm 0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) in the DPPH radical scavenging. The aqueous residual partition was the one that showed more active and was submitted to analysis of high efficiency liquid chromatography coupled to electron spray ionization mass spectrometer (HPLC-MS-ESI), in which the phenolic compounds quinic acid; (epi)-catechin; 3-O- β -galactopyranosylquercetin; rutin; luteolin-4'-O-rhamnosyl (1 \rightarrow 2) glycoside; isorhamnetin-3-O-rutinoside and dimer (epi)-catechin-

(epi)-catechin justifying good antioxidant activity. All of these compounds were identified for the first time in the specie. Nevertheless, the compounds luteolin-4'-*O*-rhamnosyl (1→2) glycoside and isorhamnetin-3-*O*-rutinoside were found only in this species within the genus *Banisteriopsis*. In this way, this study contributed to the chemical and biological knowledge of *B. malifolia*.

Keywords: Essential oil, extracts and partitions, *Banisteriopsis malifolia*, biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da Penicilina G.	20
Figura 2	Estruturas químicas bioativas isoladas de plantas.	20
Figura 3	Distribuição de classes de fármacos antibacteriais, antifúngicos e antiparasitários lançados entre 1981-2014.	21
Figura 4	Estruturas químicas de metabólitos com atividades antibacteriana (5), antiprotozoária (6) e antifúngica (7) mencionados por NEWMAN e CRAGG (2016).	22
Figura 5	Estruturas químicas de produtos naturais endêmicos no Brasil.	24
Figura 6	Estruturas químicas de flavonoides encontrados na polpa da fruta acerola (<i>Malpighia glabra</i>).	26
Figura 7	Estruturas químicas de flavonoides isolados da folha de <i>Byrsonima intermedia</i> .	27
Figura 8	Estruturas químicas de alcaloides isolados dos ramos da <i>Banisteriopsis caapi</i> .	28
Figura 9	Estruturas químicas de esteroides isolados da <i>Banisteriopsis caapi</i> .	28
Figura 10	Estruturas químicas de compostos isolados da <i>Banisteriopsis anisandra</i> com ação antifúngica.	29
Figura 11	Estruturas químicas de alguns compostos presentes em extratos de <i>Banisteriopsis laevifolia</i> .	30
Figura 12	Estruturas químicas do composto pentosideo-purasina (37) isolado da fração n-butanol dos caules da <i>Banisteriopsis oxyclada</i> .	30
Figura 13	Fotografias do arbusto (A) e da flor de morfotipo rosa escuro (B) da espécie <i>Banisteriopsis malifolia</i> (Ness & Mart.) B. Gates encontrada no Clube Caça e Pesca Itororó, em Uberlândia/MG.	31
Figura 14	Fluxograma simplificado das rotas metabólicas para terpenoides, compostos fenólicos e nitrogenados.	33
Figura 15	Esquema do mecanismos de formação das unidades isoprênicas ativas DMAPP e IPP pela via do ácido mevalônico.	35
Figura 16	Esquema da biossíntese responsáveis pela produção de terpenoides, a partir da junção dos isoprenoides DMAPP e IPP.	36
Figura 17	Exemplos de estruturas químicas de compostos terpênicos.	37

Figura 18	Estrutura do composto fenol.	39
Figura 19	Estrutura básica dos compostos flavonoides.	41
Figura 20	Estruturas químicas de alguns exemplos de compostos flavonoides.	42
Figura 21	Estrutura química de um tanino hidrolisável e de um tanino condensado.	43
Figura 22	Reação da redução da resazurina.	44
Figura 23	Fotografia da exsicata da planta <i>Banisteropsis malifolia</i> em estudo.	52
Figura 24	Fluxograma do processo de partição líquido-líquido.	55
Figura 25	Estrutura da placa para o teste de antileishmania.	65
Figura 26	Estrutura da placa para o teste de citotoxicidade.	67
Figura 27	Cromatograma de CG-EM do óleo essencial no PS.	71
Figura 28	Cromatograma de CG-EM do óleo essencial no PC.	71
Figura 29	Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos das folhas da fase seca e chuvosa da <i>B. malifolia</i> .	70
Figura 30	Espectro de massas do CG-EM do composto (Z)-hex-3-enol.	73
Figura 31	Esquema de fragmentação o composto (Z)-hex-3-enol por CG-EM.	74
Figura 32	Espectro de massas do CG-EM do composto fitol.	74
Figura 33	Esquema de fragmentação o composto fitol por CG-EM	75
Figura 34	Reação do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu).	80
Figura 35	Curva de calibração do padrão de ácido gálico para determinação do teor de fenóis totais.	81
Figura 36	Reação da vanilina sulfúrica com um tanino catéquico.	81
Figura 37	Curva de calibração do padrão de catequina para determinação do teor de proantocianidinas.	83
Figura 38	Complexação de um flavonoide com $AlCl_3$.	84
Figura 39	Curva de calibração do padrão de quercetina para determinação do teor de flavonoides	84
Figura 40	Reação do radical DPPH• com o antioxidante BHT.	86
Figura 41	Reação do fenol com o DPPH em metanol.	87
Figura 42	Curva de calibração da análise de DPPH com diferentes concentrações de DPPH.	88
Figura 43	Cromatograma da análise por CLAE-EM da partição residual aquosa das folhas da <i>B. malifolia</i> .	100

Figura 44	Estruturas químicas dos compostos identificados na partição residual aquosa.	103
Figura 45	Espectro de EM-EM do dímero (epi)catequina-(epi)catequina.	104
Figura 46	Propostas de fragmentação para o do dímero (epi)catequina-(epi)catequina.	104
Figura 47	Espectro de EM-EM do ácido quínico.	105
Figura 48	Proposta de fragmentação para o ácido quínico.	105
Figura 49	Espectro de EM-EM da (epi)catequina.	106
Figura 50	Proposta de fragmentação para a (epi)catequina.	106
Figura 51	Espectro de EM-EM do 3- <i>O</i> -β-galactopiranosilquercetina.	107
Figura 52	Proposta de fragmentação da 3- <i>O</i> -β-galactopiranosilquercetina.	107
Figura 53	Espectro de EM-EM da rutina.	108
Figura 54	Proposta de fragmentação da rutina.	108
Figura 56	Espectro de EM-EM da luteolina-4'- <i>O</i> -ramnosil (1→2) glicosídeo	109
Figura 56	Proposta de fragmentação para a luteolina-4'- <i>O</i> -ramnosil (1→2) glicosídeo.	109
Figura 57	Espectro de EM-EM do isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosídeo.	110
Figura 58	Proposta de fragmentação do isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosídeo.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Faixa de concentração dos extratos/partições das folhas utilizadas na análise da atividade antioxidante pelo sequestro de radical DPPH.	58
Tabela 2	Teor de umidade e rendimento (%) das folhas dos óleos coletados na PS e PC.	69
Tabela 3	Composição química do óleo essencial das folhas no período de seca (PS) e no período de chuva (PC) da <i>B. malifolia</i> .	71
Tabela 4	Classificação, por grupos funcionais, dos componentes dos óleos essenciais das folhas de <i>B. malifolia</i> no período de seca e chuvoso.	72
Tabela 5	Rendimentos dos extratos e partições das folhas da <i>B. malifolia</i> .	77
Tabela 6	Prospecção fitoquímica dos extratos e partições das folhas de <i>B. malifolia</i> .	78
Tabela 7	Teor de fenóis totais dos extratos e partições de folhas da <i>B. malifolia</i> .	80
Tabela 8	Comparação do teor de fenóis totais do extrato etanólico e da partição acetato de etila das folhas da <i>B. oxyclada</i> a <i>B. laevifolia</i> e a <i>B. argyrophylla</i> .	81
Tabela 9	Teor de proantocianidinas dos extratos e partições de folhas da <i>B. malifolia</i> .	82
Tabela 10	Comparação do teor de proantocianidinas do extrato etanólico e da partição acetato de etila das folhas da <i>B. oxyclada</i> a <i>B. laevifolia</i> e a <i>B. argyrophylla</i> .	83
Tabela 11	Teor de flavonoides dos extratos e partições de folhas da <i>B. malifolia</i> .	84
Tabela 12	Correlação entre os valores de CE ₅₀ e a intensidade da atividade antioxidante CE ₅₀ (µg mL ⁻¹).	87
Tabela 13	Resultados de CE ₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH dos extratos e partições de folhas da <i>B. malifolia</i> .	87
Tabela 14	Concentração inibitória mínima (µg mL ⁻¹) dos óleos essenciais das folhas de <i>B. malifolia</i> nos períodos seco e chuvoso frente às bactérias aeróbias e anaeróbias.	90
Tabela 15	Concentração inibitória mínima (µg mL ⁻¹) dos extratos e partições das folhas de <i>B. malifolia</i> .	92

Tabela 16	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de leveduras da espécie <i>Candida</i> de óleos essenciais das folhas de <i>B. malifolia</i> nos períodos seco e chuvoso.	93
Tabela 17	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de leveduras da espécie <i>Candida</i> de extratos e partições das folhas de <i>B. malifolia</i> .	94
Tabela 18	Porcentagem de inibição enzimática das hidrolases glicosídicas e glicação dos óleos essenciais da <i>B. malifolia</i> .	95
Tabela 19	Porcentagem de inibição enzimática das hidrolases glicosídicas e glicação dos extratos e partições das folhas da <i>B. malifolia</i> .	96
Tabela 20	Atividade antileishmania e citotoxicidade dos extratos e partições das folhas de <i>B. malifolia</i> .	97
Tabela 21	Índice de seletividade (IS) para extratos e partições para as atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante e antileishmania.	101
Tabela 22	Proposta de composição para a partição residual aquosa das folhas da <i>B. malifolia</i> .	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGEs – Produtos de glicação avançada

IA – Índice aritmético

ARL – Área de Reserva Legal

ATCC – (do inglês) “American Type Culture Collection”

BSA – Albumina sérica bovina

CCPIU – Clube Caça e Pesca do Itororó de Uberlândia

CE₅₀ – Concentração efetiva média

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas

CI₅₀ – Concentração inibitória de 50%

CIM – Cocentração Inibitória Mínima

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

DM – Diabete Mellitus

DMAPP - Dimetil-alil-pirofosfato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazila

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

EGTA – Ácido egitálico

eV - Elétron volts

f-AG – Fração enriquecida da enzima α -glicosidase

FPP – Pirofosfato de farnesila

GAL-G2- α -CNP– substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo

GGPP – Pirofosfato de geranil-geranila

GPP – Pirofosfato de geranila

HUFU – Herbário da Universidade Federal de Uberlândia

IG – Índice de glicação

IPP – Isopentil-pirofosfato

IS - Índice de seletividade

LaPeMa – Laboratório de pesquisa em Microbiologia Aplicada

m/v – massa/ volume

m/z – massa/ carga

MEP – Fosfato de metileritritol

MES – tampão ácido-2-(*N*-morfolino)- etanossulfônico

MVA – Ácido mevalônico

N – Fonte natural

N.I – Não identificado

ND – Derivado semissintético de produto natural

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

NuPPeN – Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORAC – (do inglês) “Oxygen radical absorbance capacity”

PC – Período chuvoso

pH – Potencial hidrogeniônico

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

PS – Período seco

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

S - Sintético

S* - Grupo farmacofórico baseado em produto natural

TIC – (do inglês) “Total Ion Chromatogram”

TR – Tempo de retenção

UFC – Unidade formadora de colônia

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

v/v - volume/volume

α – alfa

β - beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	19
1.2	FAMÍLIA MALPIGHIACEAE.....	24
1.3	<i>BANISTERIOPSIS MALIFOLIA</i> (NESS & MART.) B. GATES.....	31
1.4	ÓLEO ESSENCIAL: METABÓLITOS ESSENCIAIS.....	32
1.5	ÓLEO ESSENCIAL: EFEITOS EDÁFICOS E DA SAZONALIDADE.....	37
1.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
1.6.1	Compostos fenólicos.....	39
1.6.2	Flavonoides.....	40
1.6.3	Taninos.....	42
1.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	43
1.8	INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	46
1.9	ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA.....	48
1.10	CITOTOXIDADE.....	48
2	OBJETIVO GERAL.....	50
2.1	Objetivos Específicos.....	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	51
3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	51
3.3	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	52
3.4	TEOR DE UMIDADE.....	52
3.5	ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS.....	53
3.5.1	Extração do óleo essencial.....	53
3.5.2	Análise qualitativa do óleo essencial.....	53
3.6	EXTRATOS E PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO DAS FOLHAS.....	54
3.6.1	Preparação dos extratos por maceração.....	54
3.6.2	Partição líquido-líquido dos extratos.....	54
3.6.3	Prospecção fitoquímica dos extratos e partições.....	55
3.6.4	Determinação do teor de fenóis totais.....	56
3.6.5	Determinação do teor de proantocinidinas.....	57
3.6.6	Determinação do teor de flavonoides.....	57

3.6.7	Determinação da atividade antioxidante.....	57
3.6.7.1	Método do sequestro do radical DPPH.....	58
3.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	58
3.7.1	Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos/partições frente as bactérias aeróbias e anaeróbias.....	59
3.7.2	Determinação da atividade antifúngica do óleo essencial e extratos/partições frente às leveduras <i>Candida ssp.</i>	59
3.8	DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DAS HIDROLASES GLICOSÍDICAS E GLICAÇÃO.....	60
3.8.1	Inibição da atividade da α -amilase.....	61
3.8.2	Inibição da atividade da α -glicosidase.....	61
3.8.3	Determinação do potencial de inibição de glicação.....	63
3.9	ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	63
3.9.1	Preparo dos meios de cultura.....	64
3.9.2	Cultivo dos protozoários.....	64
3.9.3	Preparo das amostras.....	65
3.9.4	Teste de viabilidade celular.....	65
3.10	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	65
3.10.1	Preparo do meio de cultura.....	65
3.10.2	Cultura de células.....	66
3.10.3	Preparo das amostras.....	66
3.10.4	Teste de viabilidade celular.....	66
3.10.5	Índice de seletividade.....	66
3.11	ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	68
4.1.1	Determinação do teor de umidade e do rendimento percentual do óleo essencial.....	69
4.1.2	Identificação dos compostos voláteis do óleo essencial.....	69
4.1.3	Efeitos da sazonalidade sobre a composição do óleo essencial	69
4.2	EXTRATOS E PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	69
4.2.1	Rendimento percentual dos extratos e partições.....	75

4.2.2	Prospecção fitoquímica.....	78
4.2.3	Determinação do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides.....	78
4.2.4	Avaliação do potencial antioxidante.....	79
4.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	80
4.3.1	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.....	86
4.3.2	Atividade antibacteriana dos extratos e partições.....	89
4.4	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	89
4.4.1	Atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	92
4.4.2	Atividade antifúngica dos extratos e partições.....	94
4.5	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E GLICAÇÃO.....	94
4.5.1	Inibição enzimática dos óleos essenciais.....	95
4.5.2	Inibição enzimática dos extratos e partições.....	97
4.6	ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA E CITOTOXIDADE DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES.....	98
4.7	ANÁLISE DE CLAE-EM-IES.....	100
5	CONCLUSÃO.....	111
6	REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Planta medicinal é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como todo e qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos ou como precursora de fármacos semissintéticos (PINTO, MACIEL e JUNIOR, 2005).

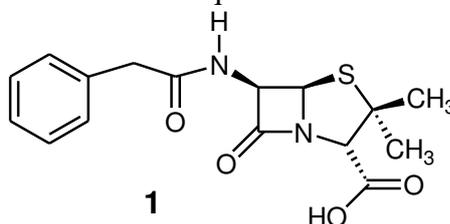
A história da utilização de plantas como recursos naturais para a sobrevivência, é tão antiga quanto a história da humanidade (PINTO, 2008). Na época de colonização, a utilização de plantas medicinais para tratamento das patologias era de conhecimento somente dos índios e de seus pajés (ELDIN e DUNFORD, 2001). O uso de remédios à base de ervas era destinado para as mulheres das tribos primitivas, e tinha o papel de extrair das plantas os princípios ativos para utilizá-los na cura das doenças (SIMON, 2001). Com o passar dos anos, os países europeus começaram a utilizar as especiarias ou óleos de plantas importadas como produto medicinal. Mesmo assim, não era conhecido o correto armazenamento das plantas, a fim de preservar suas propriedades medicinais, ou seja, seus princípios ativos (MARTINS et al., 2000).

No século XVI, Paracelso surgiu como o médico que iria revolucionar a história da medicina, ao introduzir aspectos da química e mineralogia na cura de doenças. O primórdio do entendimento das substâncias responsáveis pela atividade farmacológica e a resposta terapêutica como potencial característico de uma certa espécie vegetal se deve a ele (ALMEIDA, 2011). Repudiava também as pílulas milagrosas, receitas para qualquer doença, assim como infusões, bálsamos, unguentos e fumigações usadas indiscriminadamente. Foi o primeiro a usar venenos em pequenas doses para curar, e criou a quimioterapia, preparando medicamentos com enxofre, ferro, cobre e mercúrio (ALMEIDA, 2011).

Somente no final do século XVII foi possível estabelecer uma proposta científica sólida para o uso de fitofármacos. Com isso, iniciaram os estudos de isolamento dos metabólitos secundários presentes nas plantas (ALMEIDA, 2011). Em 1928, Alexander Fleming (1881-1955) descobriu a penicilina G (**1**) (Figura 1), composto isolado de fungo do gênero *Penicillium*, utilizado em casos de cura de doenças infecciosas e foi responsável pela redução expressiva do número de mortes na Segunda Guerra Mundial.

O surgimento da penicilina representou um marco na história dos antibióticos (REZENDE, 2009).

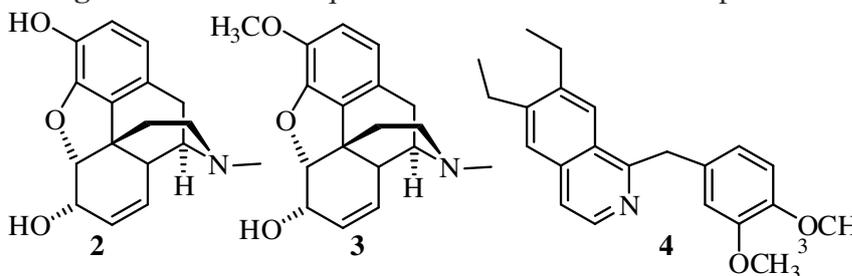
Figura 1: Estrutura química da Penicilina G.



Fonte: autora.

As substâncias bioativas, isoladas de extratos vegetais, começaram a ser estudadas, aumentando a visão de aplicabilidade terapêutica das plantas. Vários outros compostos no século XIX foram isolados e estudados, como o analgésico morfina (**2**) presente no ópio, obtido da planta *Papaver somniferum* (papoula); a codeína (**3**) (antitussígeno) e a papaverina (**4**) (Figura 2) (vasodilatador), isolados da mesma planta (PINTO et al., 2002). Dessa forma, a farmacologia e os produtos naturais começaram a se estabelecer dentro do estudo das plantas medicinais e seus potenciais terapêuticos (ALMEIDA, 2011).

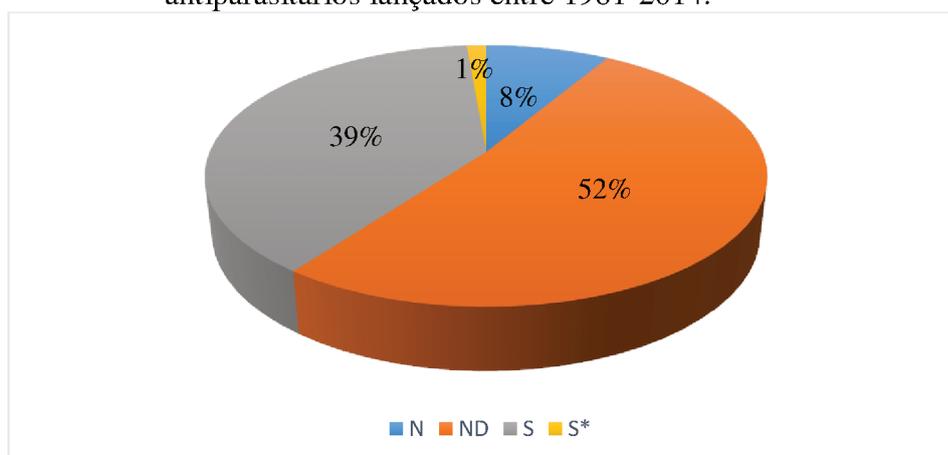
Figura 2: Estruturas químicas bioativas isoladas de plantas.



Fonte: autora.

A importância dos produtos naturais é destacada em recente estudo realizado por Newman e Cragg (2016), sobre a origem dos medicamentos lançados entre 1981 e 2014. Neste trabalho, os fármacos antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários foram classificados da seguinte forma: produto natural (isolado de fonte natural) (N), derivado semissintético de produto natural (ND), sintético (S), sintético com grupo farmacofórico baseado em produto natural (S*) (Figura 3). Assim, é possível constatar que 60% desses fármacos, em 34 anos de estudos, apresentam sua origem em produtos naturais e de derivados de produtos naturais.

Figura 3: Distribuição de classes de fármacos antibacteriais, antifúngicos e antiparasitários lançados entre 1981-2014.

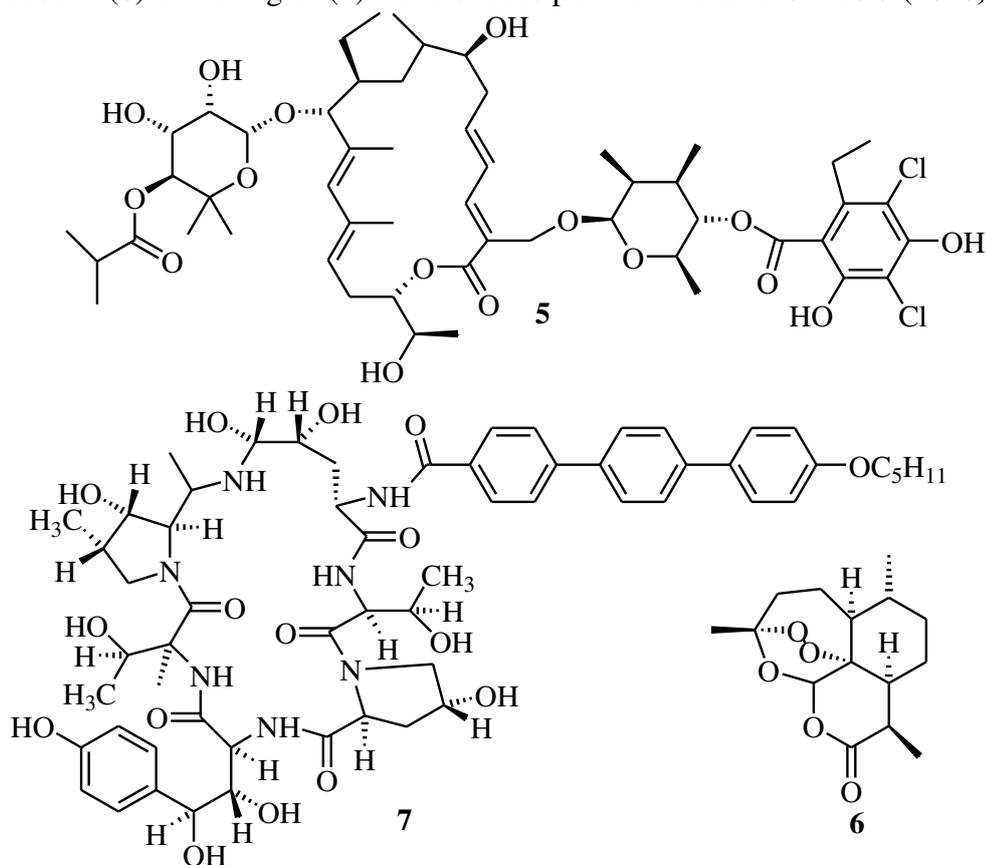


Nota: N - produto natural (isolado de fonte natural), ND - derivado semissintético de produto natural, S – sintético, S* - sintético com grupo farmacofórico igual ao de produto natural.

Fonte: adaptado de Newman e Cragg (2016).

A fidaxomicina (**5**), medicamento aprovado para uso desde de 2011, é um antibiótico macrocíclico de origem natural com potente atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias do trato gastrointestinal. Este composto é produzido a partir da fermentação da bactéria endofítica actinomiceto *Dactylosporangium aurantiacum* isolada de solos (NEWMAN e CRAGG, 2016; STRANGE, HUTTON e COLLINS, 2013). A artemisinina (**6**) um agente antimalárico sintetizados a partir de princípios ativos naturais extraídos da *Artemisa annua* (Artemisia), aprovado desde 2005. A anidulafungina (**7**) (Ecalta®) (Figura 4), aprovado desde de 2006, é um antifúngico usado para o tratamento contra candidíase. Este fármaco é derivado de produto natural fermentado do fungo *Aspergillus nidulans* (PFIZER, 2014; NEWMAN e CRAGG, 2016).

Figura 4: Estruturas químicas de alguns metabólitos com atividades antibacteriana (5), antiprotozoária (6) e antifúngica (7) mencionados por NEWMAN e CRAGG (2016).



Fonte: autora.

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais como especiarias, madeira, cana-de-açúcar, seringueira e café, que motivaram a sua colonização, as disputas de terras e o povoamento do país. Os corantes naturais brasileira e morina extraídos respectivamente do lenho de *Cesalpinia echinata* (pau-brasil) e *Chlorophora tinctoria*, (pau-amarelo) foram por muito tempo a base do comércio português do Brasil colônia para a Europa (VIEGAS JR., BOLZANI e BARREIRO, 2006).

A maioria das plantas medicinais no Brasil são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Porém a falta de conhecimento dos componentes químicos presentes e a toxicidade deles, podem trazer sérios riscos à saúde dos usuários. Um melhor conhecimento sobre as plantas medicinais seria de vital importância para a proteção de pacientes submetidos com seu tratamento (PINTO, MACIEL e JUNIOR, 2005).

Sendo assim, o Brasil é o país com a maior diversidade de espécies vegetais, com mais de 43.020 conhecidas. Essa biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias

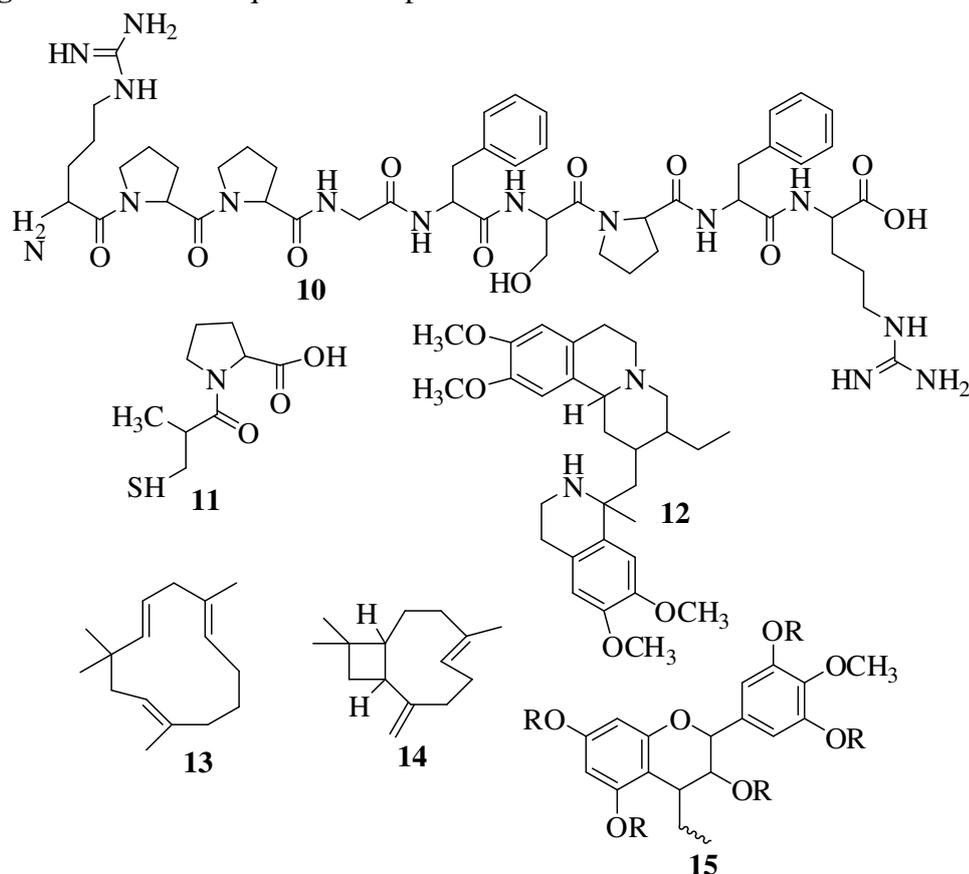
biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Suas diferentes zonas climáticas favorecem a formação de biomas biogeográficos como a floresta Amazônica, o Pantanal, o Cerrado, a Caatinga, os campos dos Pampas e a Mata Atlântica. Estamos inseridos no bioma Cerrado, conhecido por sua vasta extensão de terras que possui uma flora riquíssima que apresenta uma grande carga de propriedades farmacológicas promissoras (CARVALHO e RODRIGUES, 2007).

Algumas descobertas representativas de produtos naturais endêmicos do Brasil foram: o peptídeo bradicinina (**10**) (Figura 5), isolado do veneno de *Bothrops jararaca*, inibidor de uma enzima que atua na circulação pulmonar causando a sua falência. Ela se tornou um importante alvo para a terapia de doenças hipertensivas, sendo a base estrutural para a síntese de fármacos anti-hipertensivos como o captopril® (**11**) (BOLZANI et. al., 2012); o alcaloide emetina (**12**) extraído de *Carapichea ipecacuanha* (poaia), usado como antidiarreico e antiemético, está presente em várias farmacopeias da OMS (SIMÕES et al., 2004a, 2017b).

Outros como os sesquiterpenos α -humuleno (**13**) e *trans*-cariofileno (**14**), presentes no óleo extraído de *Cordia verbenaceous* (erva-baleeira), são componentes ativos do antiinflamatório tópico Acheflan®; a mistura de derivados fenólicos (**15**) (fenóis totais e taninos) estão presentes no extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) com ação cicatrizante, antimicrobiana e antisséptica e estão no fitofármaco Fitoscar®, o primeiro originalmente obtido de uma planta endêmica do Cerrado (BOLZANI et. al., 2012; DAVID, WOLFENDER e DIAS, 2015; DIAS, URBAN e ROESSNER, 2012).

Figura 5: Estruturas químicas de produtos naturais endêmicos no Brasil.



Fonte: autora.

A maioria dos compostos isolados de plantas do Cerrado, tradicionalmente usados pelas populações locais, tem ação relatada mas sem comprovação médica de sua eficácia. Por isso, estudos fitoquímicos com essas plantas têm se multiplicado pelo país e também no exterior em diversos laboratórios farmacêuticos e universidades, dentre eles a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), por meio do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPEn) (NUNES, 2016; MARTINS, 2018).

Algumas plantas do gênero *Banisteriopsis* da família Malpighiaceae são comumente encontradas no Cerrado e, com isso, estão cada vez mais sendo estudadas pelo NuPPEn por apresentarem importantes propriedades químicas e biológicas.

1.2 FAMÍLIA MALPIGHIACEAE

A família Malpighiaceae possui muita relevância nas florestas e Savanas de todo o Brasil, e é uma das famílias mais presentes no Cerrado. Sua distribuição é tropical com hábitos variados (espécies arbóreas, arbustivas, herbáceas e trepadeiras) (VOGEL, 1990). Já foram descritos aproximadamente 77 gêneros e 1.300 espécies em todo o mundo

(DAVIS e ANDERSON, 2010). No Brasil, existem 45 gêneros e 570 espécies, sendo estas nativas, algumas endêmicas e encontradas em todos os domínios fitogeográficos, especialmente no bioma Cerrado, onde 28 gêneros e 237 espécies são estimadas (MAMEDE et al., 2015).

As plantas da família Malpighiaceae são caracterizadas por apresentarem folhas perenes e simples, opostas ou alternadas, muitas apresentam nectários extraflorais na base das folhas ou nas brácteas. As flores são hermafroditas, pentâmeras unguiculadas e com pétalas e sépalas separadas entre si, há glândulas de óleo nas sépalas (elaióforos) na base da face abaxial, uma pétala diferenciada denominada estandarte, simetria zigomorfa e estames diplostêmones como citado em seus estudos morfológicos, sendo que esses são os mais realizados na área da Biologia (ANDERSON, 1979; VOGEL, 1990).

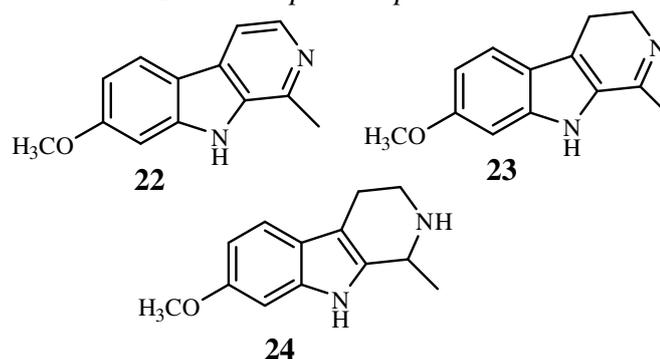
Além desse, existem os estudos fenológicos, que avaliam as interações entre a planta e os seus visitantes que podem evidenciar a estrutura, o funcionamento e regeneração das comunidades (TOREZAN-SILINGARDI, 2007). Isso acontece para que o florescimento dos indivíduos de uma espécie ocorra de forma sincronizada, favorecendo o fluxo de pólen e a reprodução cruzada por concentrar no tempo e espaço a oferta dos recursos florais e também a atratividade dos polinizadores (PEDRONI, SANCHEZ e SANTOS, 2002).

Dentro da família, têm-se as espécies arbustivas e arbóreas dos gêneros *Byrsonima*, *Banisteriopsis* e *Heteropteris* que são comuns em todo o Brasil (SILVA, 2006). Dentre esses gêneros, destaca-se o gênero *Banisteriopsis*, por possuir 92 espécies que podem ser encontradas no Brasil, Peru, Equador e Colômbia (MABBERLEY, 1997). E também, por várias dessas espécies de *Banisteriopsis* possuírem compostos capazes de apresentarem importantes atividades farmacológicas (FRIAS et al., 2012).

No Brasil, o representante mais conhecido é a acerola (*Malpighia glabra*), de polpa rica em vitamina C. Hoffmann-Ribani, Huber e Rodriguez-Amaya (2009) relataram em seu trabalho os teores dos flavonoides quercetina (**16**) e kaempferol (**17**) (Figura 6) encontrados nessa fruta fresca e em polpas congeladas.

utilizada em rituais desde a era pré-Colombiana, atualmente chamada bebida do Santo Daime. Após a fervura são liberados ingredientes psicoativos, os alcaloides tipo β -carbonílicos como harminas (**22**), harmalinas (**23**) e a tetrahydroharmina (**24**) (Figura 8), que atuam no sistema nervoso central (KAPLAN et al., 1994; WANG et al., 2010; FRIAS et al., 2012).

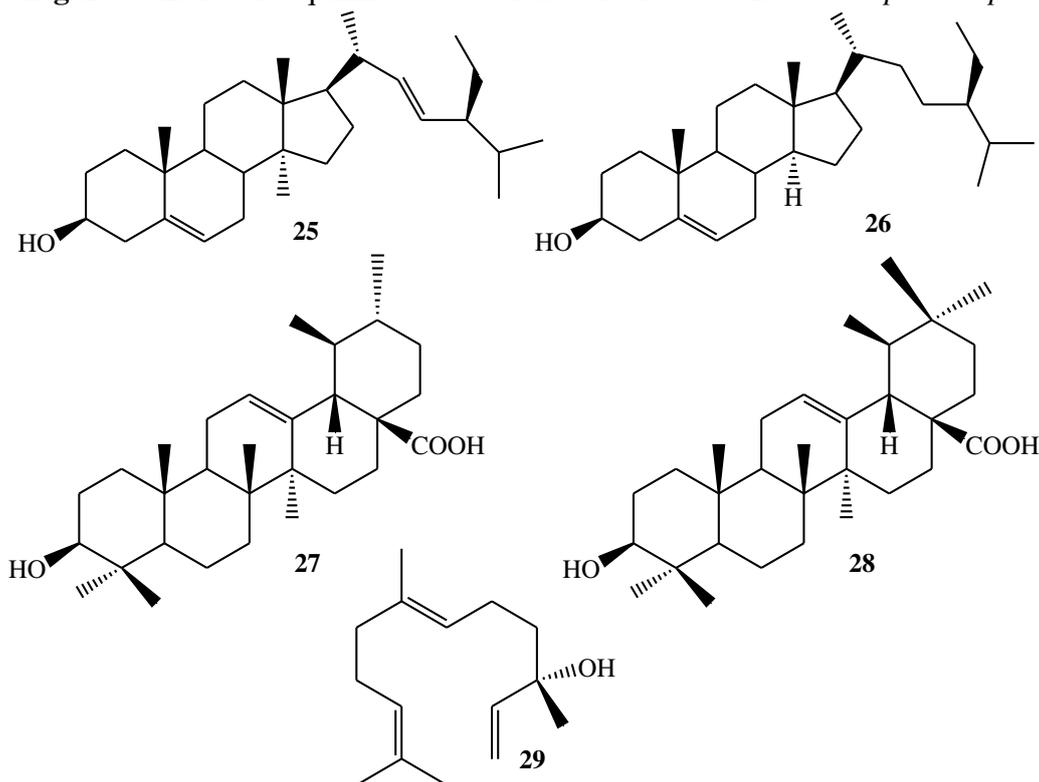
Figura 8: Estruturas químicas de alcaloides isolados dos ramos da *Banisteriopsis caapi*.



Fonte: autora.

Da mesma espécie, isolaram de extratos etanólicos das folhas esteroides como: estigmasterol (**25**) e β -sitosterol (**26**); triterpenos como: ácido ursólico (**27**) e ácido oleanólico (**28**); e sesquiterpenos como o nerolidol (**29**) (Figura 9). E para a espécie *Banisteriopsis anisandra*, as folhas e raízes apresentaram compostos que na medicina popular são usados para o tratamento de infecções fúngicas (AQUINO, CRESCENZO e SIMONE, 1991).

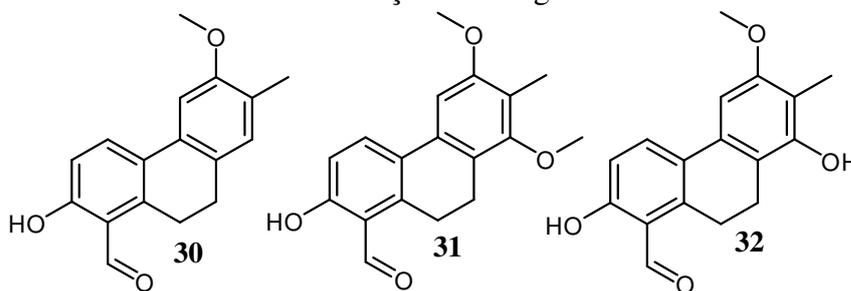
Figura 9: Estruturas químicas de esteroides isolados da *Banisteriopsis caapi*.



Fonte: autora.

No estudo químico das folhas da *B. anisandra* foram isolados os compostos: o 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**30**), o 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**31**) e o 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**32**) (Figura 10) (FREITAS, 2015).

Figura 10: Estruturas químicas de compostos isolados da *Banisteriopsis anisandra* com ação antifúngica.



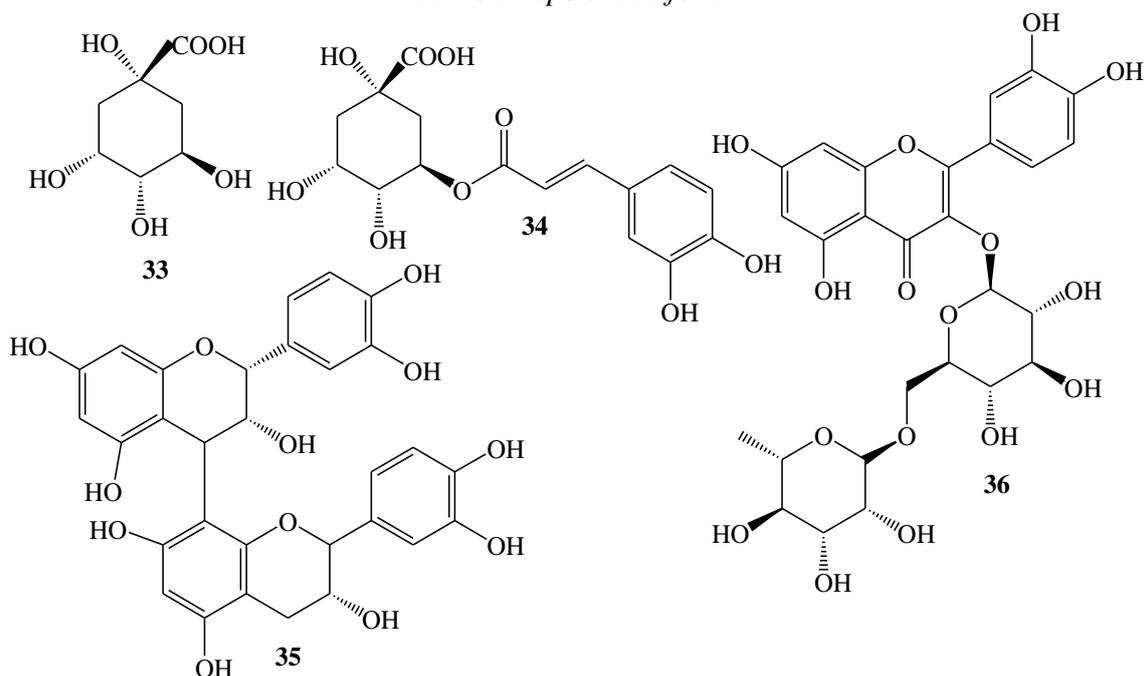
Fonte: autora.

A *Banisteropsis argyrophylla* é outra espécie importante que contém compostos com potencial antioxidante que podem estar relacionados aos usos tradicionais como anti-inflamatório, problemas renais (FRIAS, COSTA e TAKAHASHI, 2011), agentes antifúngicos e com inibição contra a enzima α -amilase. Sendo esses, os flavonoides (+)-

catequina (**18**) (Figura 7), quercetina-3-O- β -D-Glicose, quercetina-3-O- β -D-Xilose, quercetina-3-O- α -L-Rhamnose, kaempferol-3-O- α -L-Rhamnose, quercetina-3-O-(2"-galoil)- α -L-Rhamnose e kaempferol-3-O-(2"-galoil)- α -L-Rhamnose, sendo estes flavonoides glicosilados derivados da quercetina (**16**) e kaempferol (**17**) (Figura 6) (OLIVEIRA, 2016). A *Banisteriopsis megaphylla* popularmente conhecida como videira prata, possui atividade antipirética sendo descrita para o tratamento de doenças pulmonares (FRIAS, COSTA e TAKAHASHI, 2011). E a *Banisteriopsis campestris* apresentou compostos no óleo essencial de flores com boa e moderada atividade antimicrobiana da cavidade bucal e também usada na cultura popular com propriedades diurética (ROCHA et al., 2018). Em que, a atividade antimicrobiana é considerada boa para concentração inibitória mínima (CIM's) abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e moderada entre 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HOLETZ et al., 2002; RIOS e RECIO, 2005).

O extrato etanólico e o óleo essencial das folhas da espécie *Banisteriopsis laevifolia* apresentaram atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida* (NUNES, 2016). No extrato etanólico e de acetato de etila das folhas foram identificados compostos como o ácido quínico (**33**), ácido cafeoilquínico (**34**), proacnidina B1 (**35**), procianidina B2, (+)-catequina (**18**), (-)-epicatequina (**19**), rutina (**36**), quercetina-3-O-glucuronideo, quercetin-3-O-alfa-L-rhamnopiranosideo, 3-O-B-galactopiranosil quercetina, sendo esses flavonoides glicosilados derivados da quercetina (**16**) (NUNES et. al., 2016) (Figura 11).

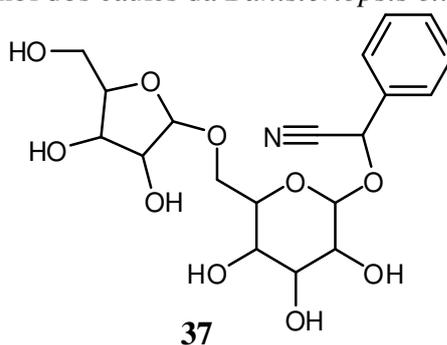
Figura 11: Estruturas químicas de alguns compostos presentes em extratos de *Banisteriopsis laevifolia*.



Fonte: autora.

Nas frações *n*-butanol e acetato de etila das folhas da espécie *Banisteriopsis oxyclada* foram identificados compostos como: ácidos orgânicos, flavan-3-ol, flavonóis e taninos condensados. A fração mais ativa foi a *n*-butanol do caule, na qual o composto pentosídeo-purasina (37) (Figura 12) apresentou boa atividade antifúngica, principalmente para a *Candida tropicalis* (MARTINS, 2018).

Figura 12: Estrutura química do composto pentosídeo-purasina (37) isolado da fração *n*-butanol dos caules da *Banisteriopsis oxyclada*.



Fonte: autora.

Como pôde ser observado, a família Malpighiaceae é rica em metabólitos biologicamente ativos. Desta forma, foi proposto neste trabalho um estudo químico e biológico da espécie *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart.) B. Gates conhecida como flor-do-dia ou rama-de-moço.

1.3 *Banisteriopsis malifolia* (NESS & MART.) B. GATES

Banisteriopsis malifolia é uma espécie comumente conhecida como flor-do-dia ou rama-de-moço. Apresenta porte arbustivo crescente nas savanas tropicais ou nas margens das matas ciliares, possui folhas pilosas com disposição alternada, inflorescências paniculadas e terminais, principalmente nas axilas superiores e flores completas de simetria zigomórfica (GATES, 1982). As plantas da família Malpighiaceae oferecem aos insetos o óleo e o pólen, como recurso floral. Suas flores são coloridas e atraem insetos especializados principalmente na coleta de óleo, em especial, abelhas da tribo Centridini, Tapinotaspidini e Tetrapediini, possuindo síndrome floral do tipo melitofilia (DAVIS et al., 2014).

No estudo morfológico da planta, as flores apresentam cinco pétalas unguiculadas e fimbriadas, sendo uma delas a pétala estandarte com coloração, espessura, tamanho e ângulo diferentes das outras quatro pétalas. O ovário é súpero, tricarpelar e trilocular, com apenas um óvulo por lóculo, dez estames circundam o pistilo, a corola apresenta cinco pétalas e o cálice é formado por cinco sépalas com geralmente dois elaióforos em cada uma (GATES, 1982). A planta *B. malifolia* apresenta dois morfotipo de arbustos que variam quanto á coloração das flores, sendo um deles com morfotipo rosa escuro (Figura 13) e outro de morfotipo rosa claro (FERREIRA, 2013).

Figura 13: Fotografias do arbusto (A) e da flor de morfotipo rosa escuro (B) da espécie *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart.) B. Gates encontrada no Clube Caça e Pesca Itororó, em Uberlândia/MG.



Fonte: autora.

Os estudos fenológicos sobre a espécie, mostraram especificações quanto à área da pétala das flores, número total de grão de pólen por flores, viabilidade polínica, quantidade e cor dos elaióforos, porcentagem de flores danificadas, identificação de perfume e localização dos osmóforos (glândulas de odor). Além deste, foi realizado também estudos das interações de insetos nas flores, sendo atrativo para 42 espécies de abelhas, em que a *B. malifolia* do morfotipo rosa claro foram visitadas por 36 espécies e 20 espécies as flores do morfotipo rosa escuro. Esse estudo evidenciou que a preferência dos polinizadores é dependente da atratividade floral e da qualidade de seus recursos da planta, sendo que apenas o odor não explica a preferência das abelhas pelo morfotipo rosa claro segundo Ferreira (2013).

Até o momento, somente estudos fenológicos e morfológicos foram realizados com a espécie *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart.) B. Gates, despertando grande interesse no estudo dos seus componentes químicos e atividades biológicas dos extratos e óleos essenciais.

1.4 ÓLEO ESSENCIAL: METABÓLITOS ESSENCIAIS

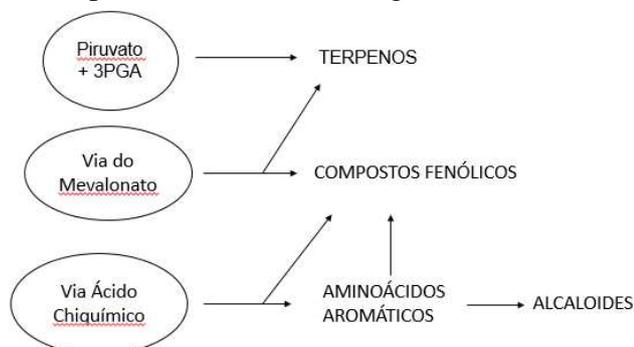
As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, ou seja, apresentam constituintes químicos que exercem atividades sobre o metabolismo de outros organismos (SANDES e DI BLASE, 2000). Tais constituintes podem ser classificados em metabólitos primários e secundários.

Os metabólitos primários são frequentemente citados como compostos diretamente ligados à sobrevivência da planta, tais como: proteínas, lipídeos, RNA, DNA, aminoácidos e açúcares (KERBAUY, 2004); enquanto os metabólitos secundários têm sua importância relacionada à sobrevivência e propagação das plantas, seja pela defesa da planta contra herbívoros, patógenos ou competidores; como proteção à radiação solar; ou ainda como fator de contribuição para a dispersão de pólen e sementes (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001; ALVES, 2001).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos de acordo com a via biossintética de origem: terpenoides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinatos e cianidrinas). Os terpenoides são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (3PGA) (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são biossintetizados a partir do ácido chiquímico e

do ácido malônico e os compostos nitrogenados são sintetizados a partir dos aminoácidos aromáticos (Figura 14) (TAIZ e ZEIGER, 2004; PERES, 2004).

Figura 14: Fluxograma simplificado das rotas metabólicas para terpenoides, compostos fenólicos e nitrogenados.



Fonte: adaptado de PERES, (2004).

Os metabólitos secundários proporcionam uma interface química entre a planta e o ambiente. Assim, conforme a natureza e a magnitude do estímulo ambiental, uma espécie vegetal poderá sintetizar diferentes compostos devido ao redirecionamento de rotas metabólicas. Dentre os estímulos ambientais associados a alterações qualitativas de metabólitos secundários, ressaltam-se as interações bióticas: planta/microrganismos, planta/insetos, planta/planta; e os fatores abióticos: luminosidade, temperatura, pluviosidade, sazonalidade, radiação ultravioleta, composição atmosférica (MORAIS, 2009; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Apesar da existência de um controle genético, as variações temporais e espaciais no conteúdo e nas proporções relativas de metabólitos secundários em plantas podem sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. A sazonalidade é um dos fatores mais expressivos com relação às variações na quantidade e natureza dos constituintes ativos nos órgãos das plantas. São relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Os óleos essenciais são compostos produzidos nos órgãos das plantas, na forma de metabólitos secundários, com as funções de atração de insetos para a polinização, de proteção contra herbívoros, como reguladores da taxa de decomposição da matéria orgânica do solo e como agentes antimicrobianos, dentre outros (CASTRO et al., 2004; GONÇALVES et al., 2003). Muitas vezes, as substâncias sintetizadas em um ou vários

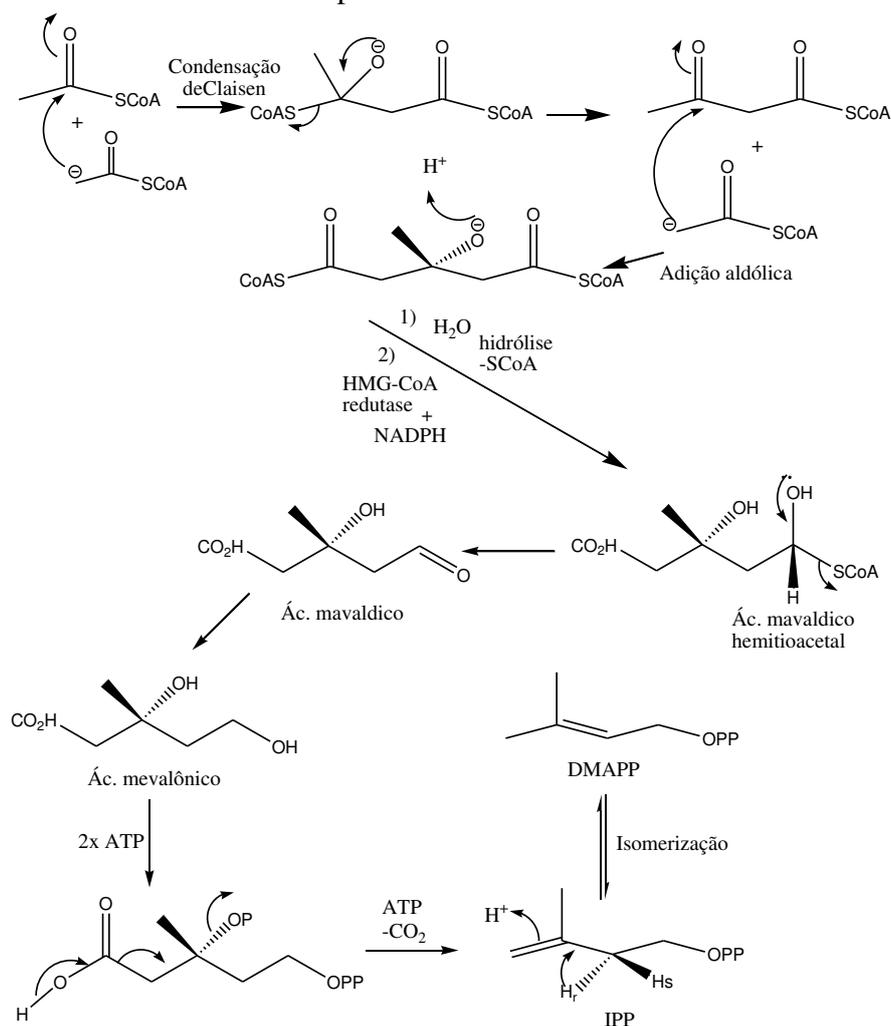
órgãos da planta podem expressar potencialidades terapêuticas, ou seja, atuarem como fitoterápicos (OLIVEIRA e AKISUE, 2003).

Esses óleos são constituídos por misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, etc (SIMÕES e SPITZER, 1999; SANTURIO et al., 2007). Dentro da composição dos óleos essenciais, os terpenos são a classe de metabólitos de maior interesse, com mais de 35 mil substâncias identificadas (COUTINHO-NETO e SILVA, 2017). Os terpenos são formados por unidades de isopreno (**38**) com C5 (Figura 17), e são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (u.i.) como, monoterpenos (C10, duas u.i.), sesquiterpenos (C15, três u.i.), diterpenos (C20, quatro u.i.), triterpenos (C30, seis u.i.) e tetraterpenos (C40, oito u.i.) (CASTRO et al., 2004).

O composto isopreno (**38**) (Figura 17) era conhecido como um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos naturais, bioquimicamente as suas unidades ativas foram subsequentemente identificadas como o dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) e o isopentil-pirofosfato (IPP) sendo estas, unidades básicas dos terpenos. As unidades bioquímicas de isopreno podem ser derivadas por dois caminhos: por meio de intermediários como o ácido mevalônico (MVA) ou o fosfato de metileritritol (MEP) (DEWICK, 2009).

Na rota do ácido mevalônico, ocorre à condensação de Claisen seguida de adição aldólica de três moléculas e acetil-CoA, a partir de uma várias etapas, ocorre a formação do ácido mevalônico. Esse intermediário é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, para produzir o isopentil-pirofosfato (IPP). O IPP por meio de reações de isomerização é convertida em dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) (Figura 15) (DEWICK, 2009).

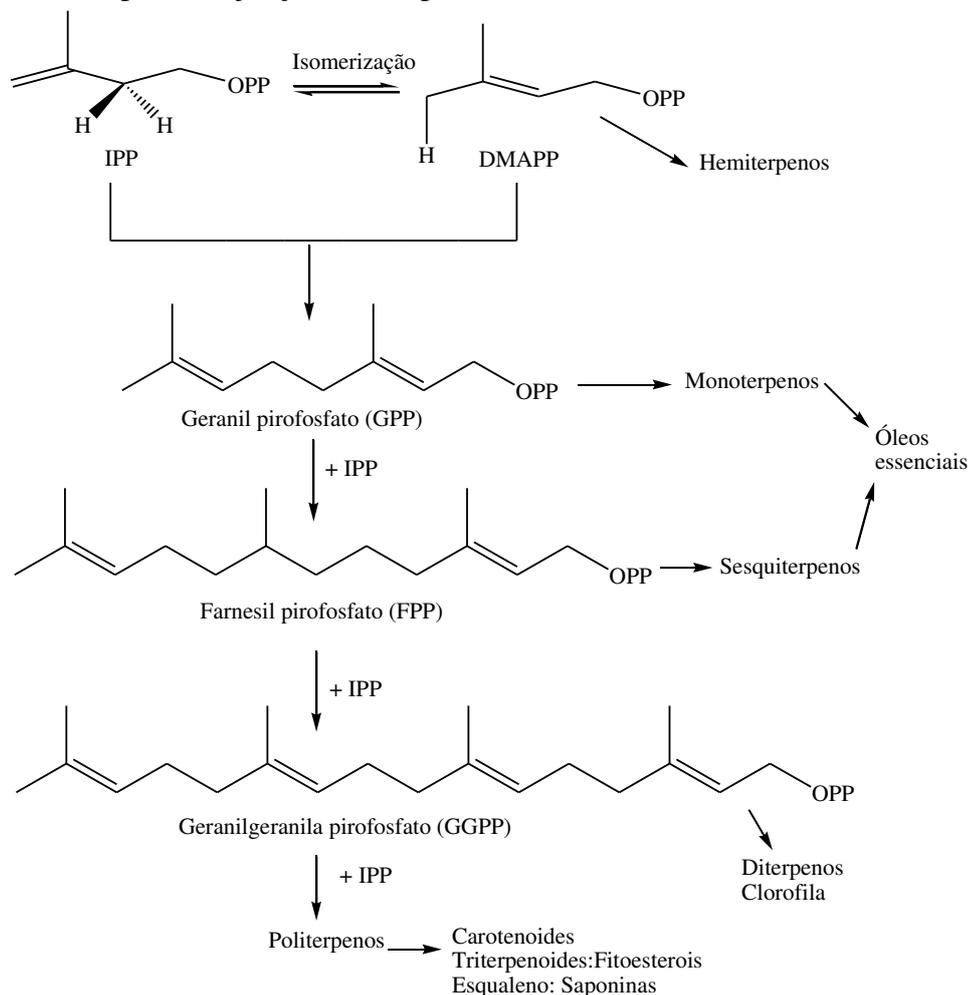
Figura 15: Esquema de mecanismos de formação das unidades isoprênicas ativas DMAPP e IPP pela via do ácido mevalônico.



Fonte: Adaptado do (DEWICK, 2009).

Como as moléculas de IPP e DMAPP se isomerizam no final de cada rota, a molécula de IPP sintetizada na rota do MVA e seu isômero DMAPP sintetizado na rota do MEP, unem-se para formar terpenos maiores, por meio do modelo “cabeça-cauda. As unidades de IPP e DMAPP reagem por condensação, pela ação da enzima prenil-transferase, formando o intermediário pirofosfato de geranila (GPP, C10), que condensa com outra unidade IPP, fornecendo o pirofosfato de farnesila (FPP, C15). Por último, a junção de FPP com outra unidade de IPP conduz a produção de pirofosfato de geranil-geranila (GGPP, C20), precursor dos diterpenos (Figura 16) (DEWICK, 2009).

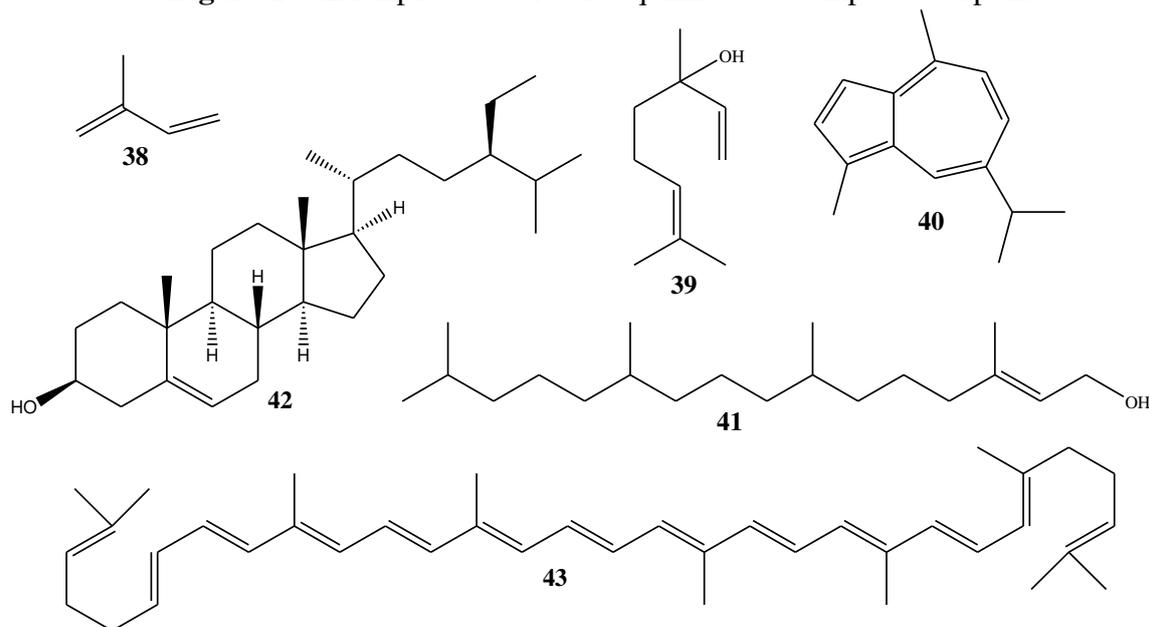
Figura 16: Esquema da biossíntese responsável pela produção de terpenoides, a partir da junção dos isoprenoides DMAPP e IPP.



Fonte: Adaptado de DEWICK, (2009).

Alguns exemplos de compostos terpênicos encontrados com frequência nos óleos essenciais são classificados como monoterpene, sesquiterpene, diterpene, triterpene e tetraterpene (Figura 17), como o monoterpene linalol (**39**); sesquiterpene guaiazuleno (**40**); diterpene fitol (**41**), triterpene β -sitosterol (**42**) e o tetraterpene licopeno (**43**) (CASTRO et al., 2004).

Figura 17: Exemplos de estruturas químicas de compostos terpênicos.



Fonte: autora.

1.5 ÓLEO ESSENCIAL: EFEITOS EDÁFICOS E DA SAZONALIDADE

Os compostos presentes nos óleos essenciais podem ser influenciados por fatores abióticos, genéticos, climáticos (temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal) e edáficos. Observa-se que grande parte das espécies popularmente utilizadas são encontradas próxima ao estado silvestre, mantendo uma forte interação com o ambiente (MORAIS, 2009). Com isso, a composição química e o teor de óleo essencial podem sofrer alterações durante as estações do ano, assim como a temperatura e a luminosidade, que também apresentam um papel relevante na fotossíntese, devido a interação destes fatores (SOUZA et al., 2008).

Estudos mostraram que compostos químicos presentes nas espécies do Cerrado também estão diretamente relacionados com a sazonalidade (SÁ et al., 2016; CRUZ et al., 2014). Isso evidencia que diferentes períodos como a seca e a precipitação (chuva), são alguns fatores que mais influenciam na composição química em óleos voláteis (SOUZA et al., 2008).

Exemplos de estudos do óleo essencial das folhas e cascas com *Inga laurina* demonstraram que a composição química de ácidos graxos, terpenoides e ésteres foram diferentes no período chuvoso e seco. O óleo apresentou bons resultados biológicos contra bactérias bucais com CIM 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no período chuvoso e CIM 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no período seco, evidenciando que a sazonalidade é um fator importante para ser

avaliado nesses estudos (FURTADO et al., 2014). Outro trabalho com a *Salvia officinalis* demonstrou que a composição química do seu óleo essencial de folhas foi diferente nas estações da primavera e verão (PUTIEVSKY, 1986). E também, para o óleo essencial das folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf mostrou melhor atividade antimicrobiana com o óleo do período chuvoso do que no período seco, em que os teores dos compostos identificados foram diferentes em cada período (SANTOS et al., 2009). No estudo do óleo essencial das folhas *H. marrubiodes* demonstrou maior quantidade de monoterpenoides nos períodos de chuvas do que no período seco (BOTREL et al., 2010).

Assim, os óleos essenciais possuem uma rica variedade de compostos que podem apresentar atividades antioxidante, antibacteriana, antiparasitária e antifúngica promissora (BHAVANANI e BALLOW, 1992; SAMPAIO et al., 2000; BRITO, 2007).

1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O organismo humano produz em defesa de fatores exógenos (alimentação, álcool, poluição, tabagismo, entre outros), espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem ser chamados de radicais livres, que são átomos ou moléculas que tem elétrons desemparelhados em sua camada externa. Sendo estes, substâncias altamente instáveis e quimicamente muito reativas. São exemplos de ERO: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^*), radical hidroperoxila (HOO^*) e radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esses compostos podem estar presentes na composição de alimentos na saúde humana (BARBOSA et al., 2010).

Alimentos como frutas e verduras, produtos de fonte natural, são recomendados para a diminuição e/ou prevenção de várias doenças, como artrite, disfunção cerebral, cardiopatias, diabetes, câncer, doenças do sistema imune, etc. Estes alimentos contém substâncias capazes de bloquear os danos oxidativos do DNA, proteínas, lipídeos e são chamados de “antioxidantes” (DIPLOCK et al., 1998; ROESLER et al., 2007).

As plantas durante a biossíntese também produzem compostos antioxidantes que são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas E e C, compostos fenólicos, carotenoides e enzimas (CASTRO et al., 2004). Os principais compostos fenólicos, encontrados em extratos de plantas, são os ácidos fenólicos, os flavonoides, os compostos polifenóis e taninos, que possuem alta atividade antioxidante e outras importantes propriedades farmacológicas (IGNAT, 2011).

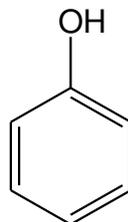
Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, para permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas complexas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos, destaca-se o de sequestro de radicais livres, utilizando o radical DPPH, que é baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Por este método há um descoloramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta, quando ocorre a adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio radicalar a cor muda para a amarela (HUANG et al., 2005).

Entender a atuação desses compostos, isolados de plantas, pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de importantes problemas enfrentados no mundo todo, como a resistência microbiana aos antibióticos, a cura de doenças infecciosas e também pela toxicidade desses compostos perante a células tumorais (BEZERRA, 2008).

1.6.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam estruturas químicas que lhes permitem o sequestro ou neutralização de radicais livres e /ou a quelatação de metais de transição, e possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH⁻) (Figura 18) (BARBOSA et al., 2010). Esses compostos podem englobar moléculas simples, como os derivados do ácido hidroxibenzóico e os catecóis, assim como polímeros de cadeia longa como os taninos condensados e hidrolisáveis de alto peso molecular (PRAIA, SILVA e QUEIROZ, 2014).

Figura 18: Estrutura do composto fenol.



Fonte: autora.

Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na biossíntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Figura 14). Na rota do ácido chiquímico são biossintetizados a maior parte dos fenóis secundários, e a rota do

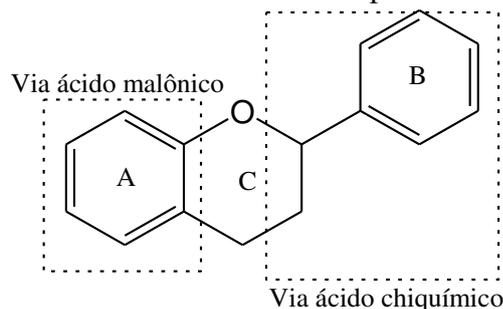
ácido malônico é menos significativa, embora seja uma fonte importante de metabólitos secundários fenólicos em fungos e bactérias. Grande parte dos compostos fenólicos é derivada da fenilalanina, um produto da rota do ácido chiquímico por meio da eliminação da molécula de amônia para formar o ácido cinâmico (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos estão distribuídos nas frutas e vegetais que fazem parte da alimentação humana e desempenham um papel importante nos vegetais. As antocianinas atribuem cor em diversas frutas e verduras, as flavonas são responsáveis pelo amargor apresentado em frutas cítricas. A sensação adstringente apresentada pelas frutas como caju, caqui, romã e uva se deve a presença de taninos. O estudo desses compostos tem apresentado atividades biológicas como: anti-inflamatória, antitumorais, atividade estrogênica, antioxidante e no tratamento de doenças coronárias (PRAIA, SILVA e QUEIROZ, 2014).

1.6.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos sintetizados pelas plantas e atuam nos organismos vegetais atraindo polinizadores e disseminadores de sementes, apresentam funções importantes na fertilidade de algumas espécies, agem como antimicrobianos e protegem as plantas contra a radiação ultravioleta. Sua estrutura básica apresenta dois anéis fenólicos A e B que são unidos por três átomos de carbonos formando o anel heterocíclico C como mostra a Figura 19 (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Esses compostos são formados a partir da combinação de derivados da rota do ácido chiquímico e ácido malônico. Na rota do ácido chiquímico é produzido o ácido *p*-cumárico que é transformado em *p*-cumaril-SCoA do qual são sintetizadas a estrutura fenilpropanóica dos anéis B e C. O anel A é derivado da rota do ácido malônico, 3 unidades malonil-CoA se condensam ao ácido *p*-cumaril-SCoA formando uma chalcona a partir da qual todos os flavonoides são formados (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Figura 19: Estrutura básica dos compostos flavonoides.

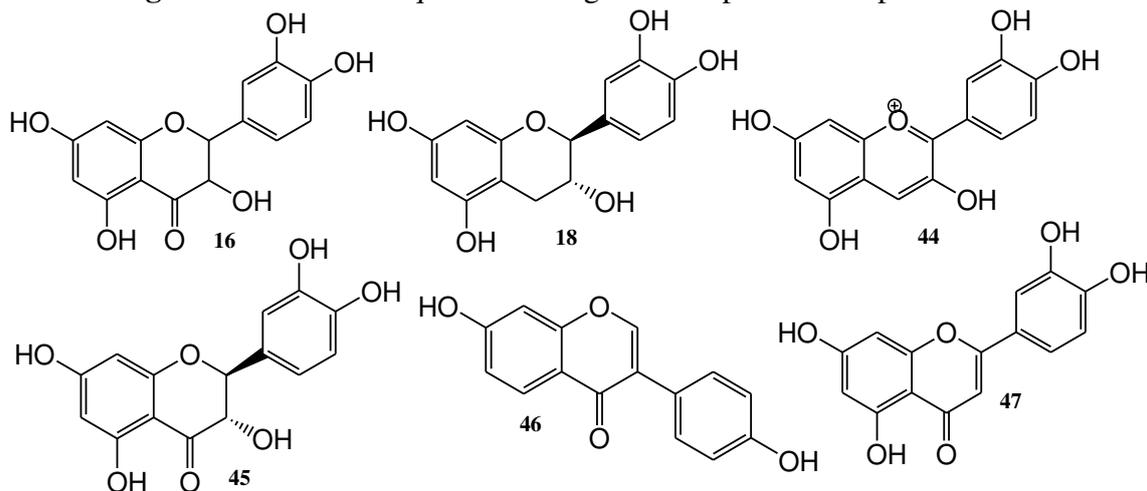
Fonte: TAIZ e ZEIGER (2004).

A estrutura básica dos flavonoides pode sofrer diferentes modificações, tais como, glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras alterações que vão diferenciar esses compostos em relação à polaridade, toxicidade e atividade biológica (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Nesse sentido os flavonoides se diferenciam no nível de oxidação e o padrão de substituição do anel C, e os compostos dentro de uma classe se diferem no padrão de substituição nos anéis A e B (KUMAR e PANDEY, 2013).

Dentro dos flavonoides, têm-se alguns exemplos de compostos como os flavonóis o composto quercetina (**16**), dos flavanois o composto catequina (**18**), das antocianidinas o composto cianidina (**44**), das flavanonas o composto taxifolina (**45**), das isoflavonas o composto daidzeina (**46**) e das flavonas o composto luteolina (**47**), conforme está apresentada na Figura 20.

As antocianidinas representam um grupo de flavonoides pigmentado, que são responsáveis pela coloração de flores e frutos, atraindo animais polinizadores e dispersores de sementes. As flavonas e flavonóis estão presentes nas folhas e flores das plantas, se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e caules protegendo as células contra o excesso de radiação UV-B (280-320 nm) enquanto permitem a passagem da luz visível necessária para realização da fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Contudo, os flavonoides possuem capacidade antioxidativa, atividade anti-inflamatória, ação antialérgica, atividade antitumorais e antimicrobiana (LOPES et al., 2000), mostrando assim a importância de se estudar essa classe de compostos presentes nos produtos naturais.

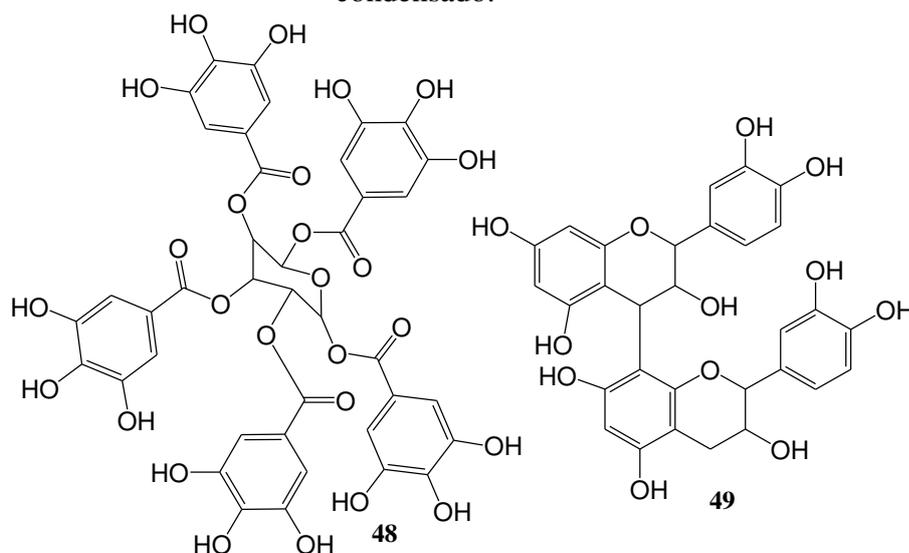
Figura 20: Estruturas químicas de alguns exemplos de compostos flavonoides.

Fonte: Huber e Rodriguez-Amaya (2008).

1.6.3 Taninos

Assim como os flavonoides, os taninos são metabólitos secundários da classe dos compostos fenólicos e apresentam grande interesse econômico e ecológico. Com peso molecular entre 500 e 3000 Dalton (unidade de massa atômica). Os taninos são classificados segundo sua estrutura química e podem se dividir em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com ácidos fenólicos (**48**) (Figura 21). Os taninos condensados ou proantocianidinas são formados pela polimerização de unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (**49**) (Figura 21) (MONTEIRO et al., 2005).

Figura 21: Estrutura química de um tanino hidrolisável e de um tanino condensado.



Fonte: MONTEIRO et al. (2005).

Os taninos são toxinas que têm a função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações os frutos, folhas, sementes e demais partes das plantas tornam-se não comíveis para uma diversidade de animais, atuando em defesa da planta. A classe dos compostos de proantocianidinas, apresentam capacidade antioxidante maior que a vitamina C e E, além de atuar também como efeito antidiarrético, anti-séptico, antifúngico e bactericida (MONTEIRO et al., 2005; WANG et al., 2011). Por isso é muito importante o estudo dessa classe, já que possuem variadas atividades que são benéficas a saúde humana.

1.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

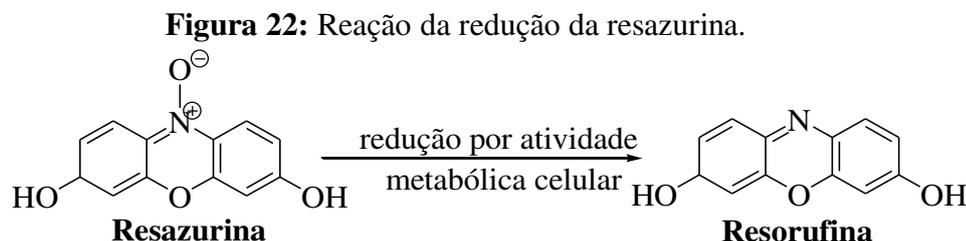
A indústria farmacêutica há muito tempo, tenta mudar as estruturas moleculares dos antibióticos existentes para melhorar sua eficiência, para evitar que as bactérias adquiram resistência. Como as moléculas sintetizadas também podem produzir reações adversas e apresentarem resistência microbiana, é essencial investigar novas drogas terapêuticas. Atualmente, as plantas são uma fonte importante de novos agentes preventivos e terapêuticos para várias doenças, incluindo aquelas causadas por microrganismos patogênicos (SILVA e FERNANDES, 2010).

Nos últimos anos, estudos intensivos foram direcionados para examinar as possibilidades no uso de extratos de plantas e óleos essenciais em tratamentos contra bactérias e fungos patogênicos. Existem muitos compostos químicos isolados de plantas,

tais como ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e alcaloides, que demonstraram atividade antimicrobiana (DUBRAVKA e BUCHBAUER, 2015).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e óleos essenciais. Os mais conhecidos são os métodos de difusão em ágar, macro e microdiluição. No método de macro e microdiluição, a atividade antimicrobiana pode ser avaliada determinando-se a menor quantidade de extrato ou óleo necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. Esse valor é conhecido como concentração inibitória mínima (CIM) (PINTO, KANEKO e OHARA, 2003).

Nesse método, é utilizada a resazurina para facilitar a leitura da viabilidade dos microrganismos (CASTILHO et al., 2015). A resazurina é um corante redox que apresenta mudança de coloração na presença de atividade metabólica celular. Na forma oxidada a resazurina não é fluorescente e apresenta coloração azul, quando é reduzida para resorufina, a forma fluorescente, apresenta coloração rosa (Figura 22) (VEGA et al., 2012; ELSHIKH et al., 2016).



Fonte: adaptado de ELSHIKH et al., (2016).

Os agentes antibacterianos e antifúngicos estão presentes numa grande variedade de plantas (HOLETZ et al., 2002), estima-se que 74% dos medicamentos utilizados tem alguma origem vegetal, com isso, suas atividades antimicrobianas podem representar excelentes ferramentas no combate aos microrganismos (KING, 1991; ANDRADE et al., 2010) como por exemplo no combate a bactérias da cavidade bucal e os fungos do gênero *Candida* ssp.

A microbiota da cavidade bucal é composta por mais de 300 espécies de bactérias, que se mantêm em equilíbrio, mas são responsáveis por doenças orais e respiratórias (GIBBSON, 1989; SCANNAPIECO, STEWART e MYLOTTE, 1992). Entretanto, existem alguns fatores que interferem de acordo com o seu hospedeiro, como: interações físico-químicas entre enzimas e microrganismos, redução de saliva e de imunoglobulinas, níveis elevados das enzimas proteases e neuraminidases associadas a uma higiene bucal

precária e gengivites, promovendo a colonização por bactérias Gram-negativas (SILVEIRA et al., 2010).

A placa dental é formada por bactérias que aderem às superfícies dentais, gengivas, língua e próteses dentárias (SILVEIRA et al., 2010). Pacientes em estado crítico apresentam elevados níveis da protease, a enzima que remove das superfícies dos dentes uma substância protetora denominada fibronectina (glicoproteína inibidora da aderência de bacilos Gram-negativos à orofaringe). A perda dessa substância reduz o mecanismo de defesa intermediado pelas células reticuloendoteliais (GIBBSON, 1989; SILVEIRA et al., 2010), facilitando a fixação dos Gram-negativos (bactérias mais resistentes devido a dupla camada celular) e alterando a microbiota normal, inclusive aumentando a presença de *Pseudomonas aeruginosa* nas células epiteliais faríngeas e orais (MEDEIROS, MENEZES e VALLE, 2005), podendo aumentar os riscos à pneumonia.

Alguns resultados apresentados por Furtado et al., (2014) sugerem que os princípios de origem vegetal podem ser uma alternativa no controle de bactérias da cavidade bucal, uma vez que, apresentaram compostos capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas.

Além da avaliação das bactérias, existem outros microrganismos que geralmente são mais resistentes, como por exemplo, os fungos. Estes fungos estão muito presentes em alimentos, que desde a sua coleta, manipulação e armazenagem de forma inapropriada podem ocorrer uma proliferação e apresentarem resistência a alguns fungicidas. É importante salientar que a segurança alimentar, passa por riscos de contaminação e estes devem ser controlados (CONTI, GUIMARAES e PUPO, 2012).

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos, podendo ser unicelulares, como as leveduras ou pluricelulares, sendo conhecidas cerca de 100.000 espécies (SCHUEFFLER e ANKE, 2014). Eles não produzem clorofila, com isso em alguns casos dependem da associação com outros seres vivos, como as plantas, ocorrendo a chamada simbiose. Existem associações mutualísticas que são harmônicas e as parasitárias no qual o fungo é prejudicial à planta, pois vive no seu interior de onde obtém proteção e nutrientes. Com isso o hospedeiro tende a produzir substâncias, metabólitos secundários, para se proteger (CONTI, GUIMARAES e PUPO, 2012).

Os fungicidas são usados na agricultura e na área de veterinária, porém seu uso indiscriminado fez com que alguns organismos desenvolvessem certa resistência (SOARES et al., 2015). Isso se deve a sua alta toxicidade, e a redução deste parâmetro seria a redução de produtos químicos tanto para a conservação do meio ambiente quanto

para a saúde humana (JUNIOR et al., 2014). Os fungos da espécie de *Candida*, por exemplo, fazem parte da microbiota normal no organismo e estão presentes na superfície de mucosas, como a cavidade bucal, pele e órgãos genitais. A *Candida albicans* é o principal agente etiológico das candidíases, entretanto, outras espécies de *Candida* tais como *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, são também considerados patógenos em humanos (HORN et al., 2009; SILVA et al., 2012; BRUNKE e HUBE, 2013).

1.8 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E GLICAÇÃO

A diabetes mellitus (DM), é uma doença metabólica crônica, que pode induzir muitos tipos de complicações diabéticas, como a aterosclerose, uma variedade neuropatias, cegueira e insuficiência renal terminal (SIMPSON e MORRIS, 2014). Cerca de 95% dos casos de diabetes, são considerados alterando o nível de glicose no sangue devido à resistência à insulina. No Brasil entre 2006 e 2016, o número de brasileiros com diabetes aumentou 61,8%. Isso significa que a doença passou de atingir 5,5% da população e, agora atinge 8,9% das pessoas (TAHA et al., 2018). A doença geralmente se manifesta como a elevação persistente em ambos níveis de glicemia, em jejum e pós-prandial (após refeições), o que resulta em distúrbios do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (CHEN et al., 2016).

Inibir enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, como a α -amilase e a α -glicosidase, torna-se uma abordagem promissora para controlar a hiperglicemia, um fator de risco para as complicações micro e macro vasculares no diabetes (TAHA et al., 2018). A α -amilase é uma enzima encontrada na saliva sendo responsável pela conversão de amido em oligossacarídeos menores, e a enzima α -glicosidase encontrada no intestino delgado, catalisa o passo final das ligações glicosídicas em carboidratos hidrolisados para libertar os monossacáridos absorvíveis (glicose) para entrar na corrente sanguínea (ANDRADE-CETTO; CABELLO-HERNANDEZ e CARDENAS-VAZQUEZ, 2013).

Assim, os inibidores de α -amilase e α -glicosidase podem retardar a absorção de glicose e prevenir elevação do nível de glicose no sangue pós-prandial (TRINH et al., 2016). Entre esses inibidores, têm-se a acarbose que pode melhorar sensibilidade à insulina e diminuir a hiperglicemia pós-prandial. Contudo, os efeitos colaterais observados com a terapia com acarbose possui sintomas gastrointestinais como gastrites (DINICOLANTONIO, BHUTANI e O'KEEFE, 2015).

As complicações vasculares relacionadas ao DM são a principal causa de morbimortalidade, especialmente devido à hiperglicemia crônica conduzir danos celulares e teciduais (ZIMMET, ALBERTI e SHAW, 2001). Muitas vezes, esses danos às estruturas moleculares do organismo são ocasionados pela formação e ação dos produtos finais de glicação avançada, também denominados AGEs (BROWNLEE, 2001).

A reação de glicação das proteínas ocorre por uma adição nucleofílica entre um grupo amino livre de uma proteína e um grupo carbonil de um açúcar redutor para formar uma base de Schiff reversível denominada reação de Maillard. Essa reação não-enzimática ocorre durante um período de horas e, uma vez formada, a base de Schiff se reorganiza para formar uma cetoamina mais estável ou um produto de Amadori. A formação de produtos de Amadori ocorre em um período de dias e, após formados, são praticamente irreversíveis (AHMED, 2005; TORRES et al., 2018).

Os intermediários formados sofrem reações de enolização, desidratação e hidrólise, formando espécies dicarbonílicas altamente reativas, que reagem com as proteínas glicadas formando a 3-desoxiglicossoma, dando origem aos AGEs (AHMED, 2005; TORRES et al., 2018). Os AGEs são moléculas complexas e heterogêneas e os seus efeitos patológicos estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas, por meio da formação de ligações cruzadas com proteínas, geração de radicais livres e interações com receptores celulares (JAKUS e RIETBROCK, 2004).

Os AGEs podem danificar as células por meio de três mecanismos moleculares: modificação de estruturas intracelulares; modificação de proteínas e lipídeos sanguíneos e fatores de crescimento (BROWNLEE, 2001). As proteínas glicadas perdem a sua funcionalidade e aumentam a sua resistência à remoção por enzimas proteolíticas. A ligação de AGEs com seus receptores mediam a sinalização intracelular e promove o estresse oxidativo, causando assim danos teciduais, além de levar a uma redução de óxido nítrico e uma degradação dos fatores de crescimento (ENGELLEN, STEHOUWER e SCHALKWIJK, 2013). Assim, a descoberta de inibidores de glicação dentro dos recursos da biodiversidade poderá levar à produção de princípios naturais farmacologicamente ativos que poderiam ser adquiridos por meio da dieta.

1.9 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

Existem também doenças infecciosas e parasitárias que estão ligadas às condições precárias de moradia, alimentação e higiene. Dentro das doenças parasitárias pode-se destacar a doença de Chagas e a leishmaniose. Só a leishmaniose afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo (RANGEL, 2010).

A leishmaniose ou leishmaniose tegumentar possui vários tipos de agentes etiológicos, que são protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, sendo estes transmitidos pelas fêmeas de flebotomíneos. São parasitas obrigatórios do sistema monuclear com duas formas principais: uma flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto denominada promastigota, e uma forma sem flagelo, chamada amastigota, encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (NEVES et al., 2009).

A doença apresenta três manifestações clínicas: a forma cutânea, a mucocutânea e a visceral. Cada uma dessas formas é associada a espécies particulares do gênero *Leishmania*, já que o próprio sistema imune do hospedeiro também tem um papel importante no desenvolvimento da doença (AMEEN, 2010; OLIANI, 2012). No Brasil, há por volta de 230 espécies de flebotomíneos (RANGEL e LAINSON, 2010). Anualmente cerca de dois milhões de pessoas são infectadas pelo parasita *Leishmania*, entre elas, em torno de 500 mil casos evoluem para a forma visceral da doença (MURRAY et al., 2005).

Com isso, a oferta do uso de produtos naturais na forma de extratos, compostos isolados e/ou óleos essenciais de plantas, como alternativa ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças, incluindo as parasitárias, têm-se aumentado anualmente em vista do grande potencial farmacológico desses compostos (AFFONSO et al. 2012; LEITE et al. 2010). O Cerrado, um enorme patrimônio natural com alta diversidade e endemismo de espécies biológicas, é uma importante fonte de novas substâncias naturais com diferentes propriedades biológicas (SILVA et al. 2015).

1.10 CITOTOXIDADE

O câncer é atualmente a terceira doença que tem a maior taxa de mortalidade nos países subdesenvolvidos. O tratamento depende do tipo e da gravidade da doença, podendo ser realizado com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas (FACINA, 2011).

O uso de agentes anticancerígenos é complicado, porque essas drogas, por um lado, têm o efeito desejado nas células tumorais, mas, por outro lado, produzem um grande número de efeitos colaterais tóxicos e também podem ser fatais para o usuário de drogas (DUBRAVKA e BUCHBAUER, 2015). Alguns estudos demonstram que existem aproximadamente 700 espécies de plantas, que apresentam atividades sobre tumores malignos (FLORES, 2003).

Os ensaios de letalidade em organismos simples é uma boa ferramenta na identificação de drogas com atividade anticâncer, a utilização desses testes simples e rápidos para a avaliação de atividades biológicas, vem sendo utilizados para obtenção de melhores indicações na utilização das plantas (SAID et al., 1998).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* têm como objetivo avaliar a sobrevivência de indivíduos expostos a um agente ou amostra a ser analisada, por um determinado período de tempo. Sendo que, após a constatação da não toxicidade dos materiais, estes podem ser encaminhados para teste com animais (GRINEVICIUS, 2006).

A partir de ensaios *in vitro* é possível calcular a concentração que determina 50% de concentração citotóxica (CC_{50}), e a relacionar com valores de CIM para o cálculo do índice de seletividade (IS). O IS é calculado pelo logaritmo da razão entre a CC_{50} e o valor de CIM ($IS = \log [CC_{50}] / [CIM]$). Um valor positivo representa maior seletividade contra microrganismos do que toxicidade celular, e um valor negativo, menor seletividade pelos microrganismos e maior citotoxicidade (CASE et al., 2006).

2 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos químicos e avaliação biológicas de sazonalidade do óleo essencial, e também dos extratos brutos e partições do período seco das folhas da *Banisteriopsis malifolia* (Ness & Mart.) B. Gates.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar a extração e identificação do óleo essencial das folhas em diferentes períodos sazonais;
- Avaliar as atividades antimicrobiana, antiprotozoária, citotoxicidade e inibição enzimática do óleo essencial dos diferentes períodos sazonais;
- Preparar os extratos e partições por maceração e realizar a prospecção química;
- Avaliar a atividade antioxidante por capacidade de sequestro do radical livre DPPH e quantificar o teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides dos extratos brutos e partições;
- Avaliar as atividades antimicrobiana, antiprotozoária, citotoxicidade e inibição enzimática dos extratos brutos e partições de folhas.
- Analisar as amostras que apresentaram melhor atividade biológica por CLAE-EM-IES.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550
- Manta de aquecimento
- Aparelho tipo Clevenger
- Funil de separação
- Pipetas graduadas e volumétricas
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo QP2010
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE-EM) marca Agilent modelo Infinity 1260 acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES)
- Evaporador rotativo IKA RV 10 e banho maria IKA HB 10
- Liofilizador modelo LS3000 Terroni
- Espectrofotômetro Genesys 10S UV-VIS Thermo scientific

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os solventes utilizados nas extrações do óleo/extratos/partições e soluções foram das marcas Merck, Synth e Vetec. Resazurina, substrato α -(2-cloro-4-53 nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- α -CNP), dicloridrato de clorexidina (CHD), dimetilsulfóxido (DMSO), tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) da Sigma-Aldrich.

3.3 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Banisteriopsis malifolia* foram coletadas em dois períodos distintos, Julho/2017 no período seco (PS) e Fevereiro/2018 no período chuvoso (PC), dentro da Área de Reserva Legal (ARL) do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), localizado a 18° 59' S e 48° 18' W, e altitude de 863 m com área total de 127, 1 hectare. Para identificação da espécie, estas foram consultadas no herbário Uberlandense HUFU00013446 depositada por Mamede em 1994 (Figura 23). Após a identificação, as folhas foram transportadas para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPEN) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) onde foi dado procedimento ao trabalho.

Figura 23: Fotografia da exsicata da planta *Banisteriopsis malifolia* em estudo.



Fonte: Herbário HUFU (<http://www.portal.ib.ufu.br/node/73>).

3.4 TEOR DE UMIDADE

A umidade das folhas foram determinadas pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha. A análise foi realizada com cerca de 1,0 g de material vegetal sob temperatura de 105 ± 5 °C, até que o teor de umidade permanecesse constante. O valor obtido foi subtraído para o cálculo de rendimento do óleo essencial.

3.5 ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

3.5.1 Extração do óleo essencial

Cerca de 150,0 g das folhas frescas, coletadas no período da manhã, foram trituradas e colocadas em um balão de fundo redondo 2,0 L e adicionado cerca de 1,0 L de água destilada. A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação com o auxílio de um aparelho tipo Clevenger, através de um refluxo por 4 horas. Após esse período, o óleo essencial foi removido por extração líquido-líquido com 3 vezes de 5 mL diclorometano (CH_2Cl_2), posteriormente foi colocado para secar com o auxílio de ventiladores e em seguida armazenado em frasco de vidro a $-18 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.2 Análise qualitativa do óleo essencial

O óleo essencial foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) em um equipamento SHIMADZU, modelo GC17A/QP5010 para a identificação dos compostos. Foi utilizada uma coluna capilar do tipo DB-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, J & W, USA - 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A análise foi realizada pelo método proposto por Adams (2007). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL min^{-1} . A temperatura do detector e injetor foi de 220 e 240 $^\circ\text{C}$, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 μL de solução (5 mg mL^{-1}) em CH_2Cl_2 . Foi utilizado o modo split (1:20) de injeção. A temperatura do forno foi programada para aquecer de 60 a 240 $^\circ\text{C}$ com velocidade de 3 $^\circ\text{C min}^{-1}$. O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram registrados os fragmentos de 40 a 650 m/z. Os compostos foram identificados comparando com as bibliotecas virtuais do espectrômetro de massas do equipamento CG, os resultados foram comparados com a literatura, e adotou-se uma similaridade dos espectros acima de 90% e diferença de Índice aritmético (AI) de no máximo 15 unidades.

3.6 EXTRATOS E PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO DAS FOLHAS

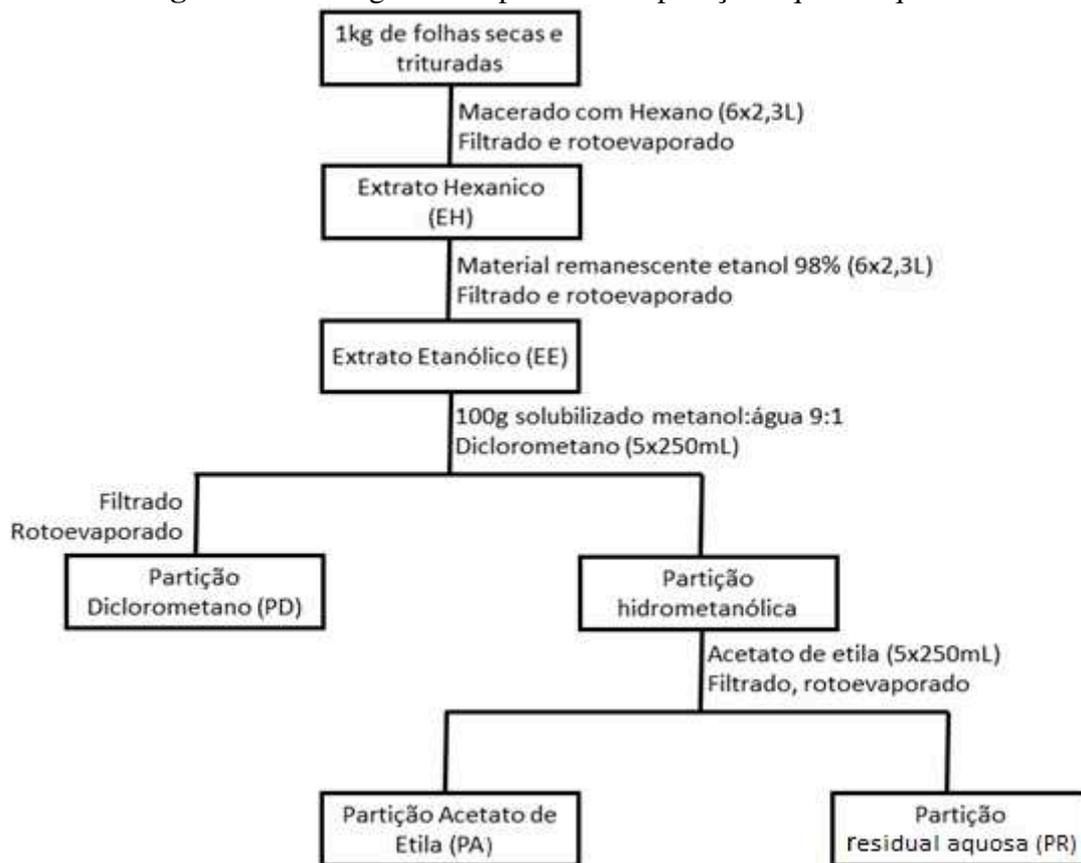
3.6.1 Preparação dos extratos por maceração

Os extratos hexânico e etanólico do material vegetal foram obtidos através do processo de maceração à temperatura ambiente, utilizando erlenmeyer de 2,0 L protegido da luz. Foram utilizados cerca de 1,1 kg de folhas, previamente secas em estufa e em

seguida trituradas. Estas folhas foram coletadas no período seco Julho/2017. Em seguida, as folhas secas foram em seguida, trituradas. A maceração das folhas foi realizada utilizando hexano e etanol como solvente. Cerca de 2,0 L de solvente foram adicionados aos erlenmeyers das folhas. O material vegetal foi deixado em maceração durante 2 dias. Após este período, a solução com os extrativos foi filtrada, o solvente foi removido em um evaporador rotativo sob pressão reduzida, a 40 °C. O extrato foi liofilizado para remoção da água. O processo de maceração com o material vegetal filtrado foi repetido até a exaustão da extração (5 vezes de hexano e posteriormente 5 vezes de etanol). Os extratos foram armazenados em frascos de vidro a -18 ± 5 °C.

3.6.2 Partição líquido-líquido dos extratos

Cerca de 100g do extrato etanólico foi solubilizado em 500,0 mL de solução metanol:água (9:1). Com o auxílio de um funil de extração, a partição líquido-líquido foi realizada com solventes de polaridade crescente. Inicialmente foram obtidas as frações em diclorometano e acetato de etila. O solvente da fração metanol:água foi removido por evaporação rotatória e o material resultante liofilizado, formando a partição residual (aquosa). Os solventes das frações foram removidos por rotoevaporação sob pressão reduzida e banho a 40 °C, sendo as frações submetidas à liofilização para remoção da água remanescente. As frações foram armazenadas em frascos de vidro a -18 ± 5 °C. O fluxograma mostrado na Figura 24 representa o processo de partição líquido-líquido do extrato etanólico e as siglas atribuídas para cada partição obtida.

Figura 24: Fluxograma do processo de partição líquido-líquido.

Fonte: autora.

3.6.3 Prospecção fitoquímica dos extratos e partições

Para a análise da classe de compostos presentes nos extratos e partições foram preparadas soluções em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} . As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) com fase estacionária de sílica gel (60G) e indicador de fluorescência. Foram utilizados dois tipos de eluentes (WAGNER e BLADT, 1996):

I) acetato de etila:água:ácido fórmico (5:2,6:1); II) ácido fórmico:ácido acético: acetato de etila:água (1,1:1,1:10:2,6). Abaixo é descrita a metodologia, de acordo com Wagner e Bladt (1996), para o preparo dos reveladores utilizados na análise:

a) Detecção de terpenos, esteroides, fenol e açúcares

- anisaldeído-ácido sulfúrico: Preparou-se uma solução contendo anisaldeído 5% ($v v^{-1}$) em ácido acético glacial. A esta solução foi adicionado 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. A placa CCD foi borrifada com o revelador e aquecida a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 a 10 min.

b) Detecção de terpenos e esteroides

-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 por 5 a 10 min. A placa foi observada em câmara luz UV (365 nm).

c) Detecção de terpenos, taninos, flavonoides e saponinas

-Vanilina: Foi preparada uma solução A contendo vanilina 1% em etanol ($m v^{-1}$) e uma solução B contendo ácido sulfúrico 5% em etanol ($v v^{-1}$). A placa CCD foi borrifada com a solução A seguida da B e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min.

d) Detecção de alcaloides

- Dragendorf: Foi preparada uma solução A dissolvendo 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adicionados 40,0 mL de água destilada sob aquecimento; e uma solução B dissolvendo cerca de 8,0 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água. Preparou-se uma solução estoque misturando a solução (a) e (b) na mesma proporção. A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução estoque; 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água.

- Iodocloroplatinado: Foi preparada uma solução A contendo ácido hexacloroplatínico (IV) 5% em água ($m v^{-1}$) e uma solução B contendo iodeto de potássio 10% em água ($m v^{-1}$). A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução A, 9,0 mL da solução B estoque e 10,0 mL de água.

e) Detecção de flavonoides

- NP/PEG: Foi preparada uma solução A contendo difenilboriloxietilamina (NP) 1% ($m v^{-1}$) em metanol; e uma solução B contendo polietileno glicol-4000 (PEG4000) 5% ($m v^{-1}$) em etanol. A solução reveladora foi preparada com 10,0 mL da solução A e 8 mL da solução B. Após a borrifação, a placa CCD foi observada em câmara de luz UV (365 nm).

- Cloreto de alumínio: Preparou-se uma solução contendo $AlCl_3$ 1% ($m v^{-1}$) em metanol. A placa CCD foi borrifada com o revelador e observada em luz visível.

3.6.4 Determinação do teor de fenóis totais

Utilizando-se a metodologia proposta por Morais et al. (2008), o teor de fenóis totais foi determinado para os extratos e partições das folhas. Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de solução metanólica do extrato ($500 \mu g mL^{-1}$), 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10% ($v v^{-1}$) e 2,0 mL de uma solução recém preparada de carbonato de sódio 7,5% ($m v^{-1}$). A mistura foi mantida por 5 min em

banho a 50 °C. Em um espectrofotômetro, a absorvância da mistura foi medida em 760 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado utilizando 0,5 mL de metanol. O resultado foi expresso em *mg* de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato. Para isto, o ácido gálico, em variadas concentrações (5 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foi reagido com o Folin-Ciocalteu, sendo construída uma curva analítica da absorvância obtida *versus* concentração de ácido gálico utilizada.

3.6.5 Determinação do teor de proantocianidinas

Utilizando-se a metodologia proposta por Moraes et al. (2008), o teor de proantocianidinas foi determinado para os extratos e partições das folhas. Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução metanólica do extrato (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3,0 mL de solução de vanilina (10 mg mL^{-1}) em ácido sulfúrico 70% (m mL^{-1}). A mistura foi mantida por 15 min em banho a 40 °C. Em um espectrofotômetro, a absorvância da mistura foi medida em 500 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado utilizando 2,0 mL de metanol. O resultado foi expresso em *mg* de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato. Para isto, a catequina, em variadas concentrações (1 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foi reagida com a vanilina, sendo construída uma curva analítica da absorvância obtida *versus* concentração de catequina utilizada.

3.6.6 Determinação do teor de flavonoides

Utilizando-se a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998), o teor de flavonoides foi determinado para os extratos e partições das folhas. Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução em metanol do extrato e frações (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m mL^{-1}) e 2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada em repouso por 30 min a temperatura ambiente. Em um espectrofotômetro, a absorvância da mistura foi registrada em 425 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a amostra por metanol. O resultado foi expresso em *mg* de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato e material vegetal. Para isto, a quercetina, em variadas concentrações (40 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foi reagida com a solução de AlCl_3 , sendo construída uma curva analítica da abs vc [quercetina].

3.6.7 Determinação da atividade antioxidante

3.6.7.1 Método do sequestro do radical DPPH

O procedimento foi realizado segundo Morais et al. (2008) pelo método espectrofotométrico em 517 nm. Inicialmente foi preparada uma solução de DPPH em metanol na concentração de 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (apresentando absorvância 0,99 em 517 nm). Em tubos de ensaio, protegidos da luz, foram adicionados 0,3 mL de solução dos extratos/partições e 2,7 mL DPPH. As soluções dos extratos/partições foram preparadas em metanol nas faixas de concentrações mostradas na Tabela 1 (concentração calculada na cubeta). A mistura contendo extrato/partição e DPPH foi deixada em repouso, a temperatura ambiente, durante 1 hora. Após esse intervalo, a absorvância foi medida no espectrofotômetro em 517 nm. O controle foi realizado substituindo 0,3 mL de extrato/partição por metanol. O branco foi realizado substituindo 2,7 mL de DPPH por metanol. O BHT foi utilizado como controle positivo.

Tabela 1: Faixa de concentração dos extratos/partições das folhas utilizadas na análise da atividade antioxidante pelo sequestro de radical DPPH.

Concentração de amostra na cubeta (ppm)	
Amostras	Folhas
Extrato hexano (EH)	30,0-200,0
Extrato etanol (EE)	0,0-10,0
Partição diclorometano (PD)	3,8-25,0
Partição acetato de etila (PA)	1,4-9,0
Partição residual (PR)	1,5-10,0
BHT	3,8-25,0

Fonte: autora.

Para o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante (AA) que corresponde à porcentagem de DPPH sequestrado foi determinada pela Equação 1:

$$AA = DPPH \text{ seq } (\%) = \left(\frac{Abs \text{ controle} - (Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco})}{Abs \text{ controle}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Sendo: *Abs controle* é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH, *Abs amostra* é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra) após 1 hora de reação, *Abs branco* é a absorvância da amostra em metanol.

As medidas da concentração eficiente (CE50), que representam a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, foram calculadas através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado após 1 hora de reação *versus* as concentrações de extrato/partições.

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios biológicos das amostras de óleos/extratos/partições para verificação da atividade antimicrobiana foram realizados determinando a CIM. As análises foram feitas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca/SP sob coordenação do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, seguindo o método da microdiluição em caldo contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias e leveduras de diferentes espécies de *Candida* utilizando cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC).

3.7.1 Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos/partições frente às bactérias bucais aeróbias e anaeróbias

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2012a) e aeróbios (CLSI, 2012b). A análise da atividade antibacteriana foi realizada em microplacas contendo 96 poços. O inóculo, o caldo e a amostra foram adicionados em cada poço, obtendo-se um volume final de 100,0 μL para as bactérias aeróbicas e 200,0 μL para as anaeróbicas. O volume de inóculo adicionado nos orifícios da microplaca foi de 20,0 μL para os testes com bactérias aeróbicas e 40,0 μL para os testes com bactérias anaeróbicas. O inóculo foi preparado e padronizado por comparação com o tubo 0,5 para bactérias na escala McFarland.

As concentrações das amostras testadas frente às bactérias aeróbias e anaeróbias foram de 0,195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (dicloridrato de clorexidina) foram de 0,115 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 59,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Metronidazol foi utilizado como controle positivo no intervalo de concentrações 0,0115

$\mu\text{g mL}^{-1}$ a $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente as cepas *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 2974) para validação do método. Como controle negativo foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração de 5,0% a 1,0% v/v). Foram ainda realizados os controles de esterilidade do controle positivo, do meio de cultura e das amostras.

Para os microrganismos aeróbios, as microplacas foram incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 h. Após o período de incubação, foram adicionados $30,0 \mu\text{L}$ do indicador resazurina (0,01% m/v) em cada orifício. Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 72 h em câmara de anaerobiose (atmosfera contendo: 5 - 10% de H_2 , 10% CO_2 , 80-85% N_2), a $36 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo revelado com o mesmo indicador. A coloração azul resultante após a adição do indicador representa a ausência de crescimento bacteriano, enquanto a coloração rosa indica a presença do crescimento bacteriano.

3.7.2 Determinação da atividade antifúngica do óleo essencial e extratos/partições frente às leveduras *Candida* ssp.

Os ensaios foram realizados utilizando o método da microdiluição em caldo conforme recomendado pelo CLSI (2008). Os microrganismos utilizados neste ensaio foram *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126). Soluções de estoque foram inicialmente preparadas dissolvendo as amostras dos óleos em DMSO na concentração $192.000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Diluições com as soluções com as soluções de estoque foram realizadas utilizando meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 tamponado a pH 7,2 com $0,165 \text{ mol L}^{-1}$ do ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico (MOPS) a $12.000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. O inóculo foi preparado usando método espectrofotométrico e comparado com a 0,5 escala de McFarland para se obter o valor de $6,0 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$. Em seguida foram realizadas as diluições padrão em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $1,2 \times 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$.

A análise da atividade antifúngica foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde as diluições seriadas foram realizadas com as concentrações finais das amostras variando entre $1,46$ a $3000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada poço recebeu $100,0 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo e o volume final em cada poço foi de $200,0 \mu\text{L}$. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo, sendo diluída em caldo para concentrações entre

0,031 e 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O controle negativo DMSO foi testado com concentrações variando de 1% a 10% v/v e não foi influenciado no crescimento de levedura.

Para validar os ensaios, a anfotericina B foi utilizada como controle positivo frente as leveduras de referência *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) com valores de CIM variando entre 0,25 e 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se os valores de CIM obtidos para estas leveduras estiverem dentro desse intervalo, os resultados para as demais leveduras testadas estarão validados de acordo com o protocolo de referência M27-A3 CLSI (2008). Após o período de incubação, por 48 horas, foram adicionados 30 μL de uma solução aquosa de resazurina (Sigma) a 0,02% a cada poço e as microplacas foram novamente incubadas por mais 30 minutos para posterior revelação.

A CIM calculada corresponde à concentração mínima de amostra que é capaz de inibir o crescimento das leveduras. A resazurina permite a observação imediata do crescimento microbiano. As cores azul e vermelha representam a ausência e a presença de crescimento microbiano, respectivamente (GOUGHENOUR, BALADA-LLASAT e RAPPLEYE, 2015). Foram realizados ainda os controles de esterilidade do meio de cultura dos óleos essencial e do inóculo.

3.8 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DAS HIDROLASES GLICOSÍDICAS E GLICAÇÃO

Os ensaios para as atividades inibitórias dos óleos/extratos/partições frente à α -amilase, α -glicosidase e glicação foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola.

3.8.1. Inibição da atividade da α -amilase

As amostras foram analisadas em relação à sua capacidade em inibir a atividade da α -amilase e pelo método GALG2CNP modificado, utilizando o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo(GAL-G2- α CNP) e uma fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase(f-AS) (SANTOS et al., 2012; DE GOUVEIA et al., 2014). Para o preparo da f-AS, saliva humana foi coletada pelo método de cuspe e armazenada a -20°C por 48h (parecer do comitê de ética no. 407.597). Após esse período, a saliva foi descongelada e centrifugada a $12000\times g$ por 10min a 20°C . O sobrenadante foi

fracionado e numa coluna de Q-Sepharose utilizando como fase móvel um tampão contendo 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (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 (5019 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 foram dissolvidas em DMSO e incubadas com af-AS (proporção de 1:10) durante 30 min 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 min, com intervalo de 1 min, a 37°C. O controle foi realizado substituindo o óleo/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 4. As Equações 2 e 3 determinam a atividade da enzima em U mL⁻¹ e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (Equação 3).

$$\text{Atividade de } \alpha - \text{amilase } \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\left[\left(\frac{\Delta Abs}{min} \right) \times Vf \times Fd \right]}{\varepsilon \times Vs \times l} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase } (\%) = \left(\frac{A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

$$\begin{aligned} \text{Inibição da } \alpha - \text{amilase } (\%) \\ = 100 - (\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase em } \% \text{ em } \%) \end{aligned} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde: $\Delta Abs/min = [(Abs_3 - Abs_1)/2]$ é a diferença de absorbância por minuto (Abs = absorbância; 1 e 3 = minutos); Vf é o volume total da reação (328 µL); Vs é o volume de amostra (óleo/extrato/fração mais enzima α-amilase, 8 µL); Fd é o fator de diluição da saliva (50); ε é o coeficiente de absorvância do 2-cloro-*p*-nitrofenol; l é o comprimento do percurso da luz (0,97); $A \text{ controle}$ é a atividade da α-amilase e $A \text{ amostra}$ é a atividade da α-amilase na presença do óleo/extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de concentração inibitória CI_{50} .

3.8.2. Inibição da atividade da α -glicosidase

As amostras foram analisadas em relação à sua capacidade em inibir a atividade da α -glicosidase utilizando o substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) (SHAN et al., 2016) e uma fração enriquecida da enzima α -glicosidase (f-AG) (Sigma-AldrichI-1630) (TOMA et al., 2014). Para o preparo da f-AG, 200 mg de pó cetônico de intestino de rato foi homogeneizado em 3 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% $m v^{-1}$). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 xg por 30min e o sobrenadante (f-AG) foi utilizado no ensaio. As amostras de extrato/partições foram dissolvidas em DMSO e foram incubadas com af-AG e 1,5 $mmol L^{-1}$ de glutathiona reduzida (diluída em tampão fosfato a 50 $mmol L^{-1}$, pH 6,8) durante 20 min a 37°C. A reação foi iniciada pela adição do substrato *p*-NPG (4 $mmol L^{-1}$, em tampão fosfato de sódio a 50 $mmol L^{-1}$, pH 6,8) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 30 min, com intervalo de 5 min, a 37°C. O controle foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão fosfato. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O resultado é dado em porcentagem de inibição da α -glicosidase, calculado por meio da Equação 5.

$$\begin{aligned} \text{Inibição de } \alpha - \text{glicosidade} \\ = \left(\frac{(ASC \text{ controle} - ASC \text{ amostra})}{ASC \text{ controle}} \right) \times 100 \end{aligned} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde: *ASC controle* é a área sob a curva na ausência de óleo/extrato/partição, e *ASC amostra* é a área sob a curva na presença de óleo/extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para adeterminação dos valores de CI_{50} .

3.8.3 Determinação do potencial de inibição de glicação

Para este ensaio, foram adicionados em tubos de ensaio 50 $mg mL^{-1}$ de BSA (Albumina Sérica Bovina) diluída em tampão fosfato (200 $mmol L^{-1}$, pH 7,4), 1,25 $mol L^{-1}$ de frutose diluída em tampão fosfato (200 $mmol L^{-1}$, pH 7,4) e as amostras 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 tricloro acético 20% ($m v^{-1}$) foi adicionado em cada tubo. Em

seguida, os tubos foram centrifugados a 10000xg por 10 min e o *pellet* foi ressuspensionado em 1,6 mL de tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4). A redução da fluorescência do BSA quando se liga ao açúcar (frutose) foi avaliada em espectro fluorímetro, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm (SRI HARSHA; LAVELLI; SCARAFONI, 2014). O controle foi realizado substituindo o óleo/extrato/partição por DMSO. O branco foi realizado substituindo a frutose por tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4), e o óleo/extrato/partição por DMSO. A quercetina foi usada como controle positivo. A porcentagem de inibição de glicação (IG) é calculada por meio da Equação 6.

$$IG (\%) = 100 - \left(\frac{IF \text{ amostra} - IF \text{ branco}}{IF \text{ controle} - IF \text{ branco}} \right) \times 100 \quad Eq. 6$$

Sendo: *IF amostra* a intensidade de fluorescência na presença de óleo/extrato/partição, *IF branco* a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e óleo/extrato/partição, e *IF controle* a intensidade de fluorescência na ausência de óleo/extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de CI₅₀.

3.9 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Os ensaios para determinar a atividade antileishmania e citotóxica dos óleos essenciais/extratos/partições foram realizados no Laboratório de Biologia Celular de Tripanossomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva.

3.9.1 Preparo dos meios de cultura

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

3.9.2 Cultivo dos protozoários

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

3.9.3 Preparo das amostras

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

3.9.4 Teste de viabilidade celular

Este teste foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, a partir da solução estoque, sendo feitas as diluições com o BHI suplementado, e obtendo-se as concentrações a serem testadas ($512 \mu\text{g mL}^{-1}$ à $4 \mu\text{g mL}^{-1}$). O volume final de cada poço foi de $100 \mu\text{L}$, sendo $20 \mu\text{L}$ de inóculo (solução com 1×10^6 parasitas em $2,0 \text{ mL}$) com $80 \mu\text{L}$ das soluções das amostras. Também foram realizados os controles de crescimento do inóculo, solvente (metanol 3%), de inibição (Anfotericina B $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$), meio de cultura e das amostras. A estrutura da placa de 96 poços é apresentada na Figura 25.

Figura 25: Estrutura da placa para o teste de antileishmania.



Fonte: MARTINS, 2018.

A placa de *L. amazonensis* foi incubada por 48 horas, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, foram adicionados $2 \mu\text{L}$ em cada poço de uma solução de resazurina a 3 mM em tampão fosfato (PBS) (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006), e novamente incubado nas mesmas condições, por 24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a partir dos valores das absorbâncias. A viabilidade celular foi calculada em função do controle de crescimento. A partir desses resultados, foi construído um gráfico de dose-resposta com regressão não linear utilizado no cálculo do CI_{50} (concentração em que 50% dos parasitas foram inibidos) (CHIBALE et al., 2007).

3.10 ATIVIDADE CITOTÓXICA

3.10.1 Preparo do meio de cultura

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

3.10.2 Cultura de células

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

3.10.3 Preparo das amostras

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

3.10.4 Teste de viabilidade celular

Para avaliação da citotoxicidade, utilizou-se o método de microdiluição em placa 96 poços. Na realização de cada teste foi preparada uma solução contendo 1x10⁴ células, em 10,0 mL de meio DMEM suplementado, desta foram transferido 100 µL para cada poço da microplaca, que foi então incubada por 6 horas, a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Na sequência, o meio de cultura de cada poço foi retirado e adicionado as soluções das amostras nas concentrações testadas (512 µg mL⁻¹ à 4 µg mL⁻¹). O volume final de cada poço foi de 100 µL, e a quantidade de células presentes em cada poço foi de 5x10⁴. Foram preparados os controles de crescimento celular, solvente (metanol 3% (v v⁻¹)), negativo (0% de

viabilidade celular), meio DMEM suplementado e amostras. A estrutura da placa de 96 poços com as concentrações e os controles está apresentada na Figura 26.

Figura 26: Estrutura da placa para o teste de citotoxicidade.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Controles				
512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	← crescimento
256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	← metanol 3%
128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	← DMSO 30%
64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	← meio de cultura
32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	← Amostra 1
16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	← Amostra 2
8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	← Amostra 3
4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ →	○	○	○	○	○	○	○	

Fonte: MARTINS, 2018.

Após ser preparada, a placa foi incubada por 48 horas, a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 10 μL de uma solução de resazurina a 3 mM em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006). Novamente foi incubada por 24 horas nas mesmas condições. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm, em um espectrofotômetro de microplaca. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A partir das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle crescimento. Foi construindo um gráfico de dose-resposta com regressão não linear para o cálculo da concentração citotóxica CC50 (concentração em que se tenha 50% de viabilidade celular) (CHIBALE et al., 2007).

3.10.5 Índice de seletividade

Os dados de CC₅₀ foram comparados com os dados de atividades biológicas promissoras através da equação do índice de seletividade (IS) (CASE et al., 2006) (Equação 7).

$$IS = \log \frac{CC50 \text{ (amostra)}}{IC50 \text{ ou } CE50 \text{ ou } CIM \text{ (amostra)}} \quad \text{Eq. 7}$$

3.11 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

As amostras de extratos/partições com melhores resultados biológicos, foram analisadas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE-EM), realizadas em um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução

tipo Q-TOF, da marca Agilent®, modelo 6520 B, com fonte de ionização por electrospray (IES). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU) aos cuidados do Dr. Mário Machado Martins.

Os parâmetros do cromatógrafo utilizados foram: coluna Agilent modelo Zorbax C18, 2,1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm; a fase móvel continha: água acidificada com ácido fórmico (0,1 % (v v⁻¹)) (A) e metanol (B); gradiente utilizado foi: 10% de B (0 min), 98% de B (0 - 10 min); 100% de B (10 - 17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L min⁻¹, a uma temperatura de 220 °C, e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KVa. Para as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) as energias de colisões foram ajustadas de acordo com cada íon molecular. Através da razão massa carga (*m/z*) obtida nos espectros em alta resolução foi possível identificar os compostos. A partir da massa experimental e da massa exata dos respectivos compostos, foi possível calcular o erro (em ppm) envolvido na identificação dos compostos, aplicando a Equação 8.

$$E_{ppm} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] 10^6 \quad \text{Eq. 8}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

4.1.1 Determinação do teor de umidade e do rendimento percentual do óleo essencial

A umidade das folhas coletadas foi medida afim de determinar o rendimento das extrações dos óleos essenciais do período seco (PS) e período chuvoso (PC) obtidos por hidrodestilação. Estes resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Teor de umidade e rendimento (%) das folhas dos óleos coletados no PS e PC.

Amostras	Umidade(%)	Rendimento(%)
Óleo PS	17,00 ± 0,42	0,01 ± 0,001
Óleo PC	57,40 ± 4,24	0,02 ± 0,010

Período seco (PS), Período chuvoso (PC).

Fonte: autora.

As folhas para a extração do óleo essencial são geralmente coletadas no período da manhã, devido a maior taxa de umidade pela formação de nevoeiros e orvalhos, indicando que podem haver produção de compostos diferentes em cada período (COUTINHO, 2000). A partir dos resultados obtidos, é possível observar que não houve diferença significativa no rendimento dos óleos extraídos das folhas com relação ao período de coleta. Os pequenos valores dos rendimentos obtidos confirmam uma característica da família, pois as plantas *Banisteriopsis laevifolia*, *Banisteriopsis oxyclada* e a *Byrsonima sericea* também apresentaram valores muito baixos de rendimento dos óleos das folhas: 0,06%, 0,02% e 0,05%, respectivamente (NUNES, 2016; MARTINS, 2018; NEVES et al., 2010).

4.1.2 Identificação dos compostos voláteis do óleo essencial

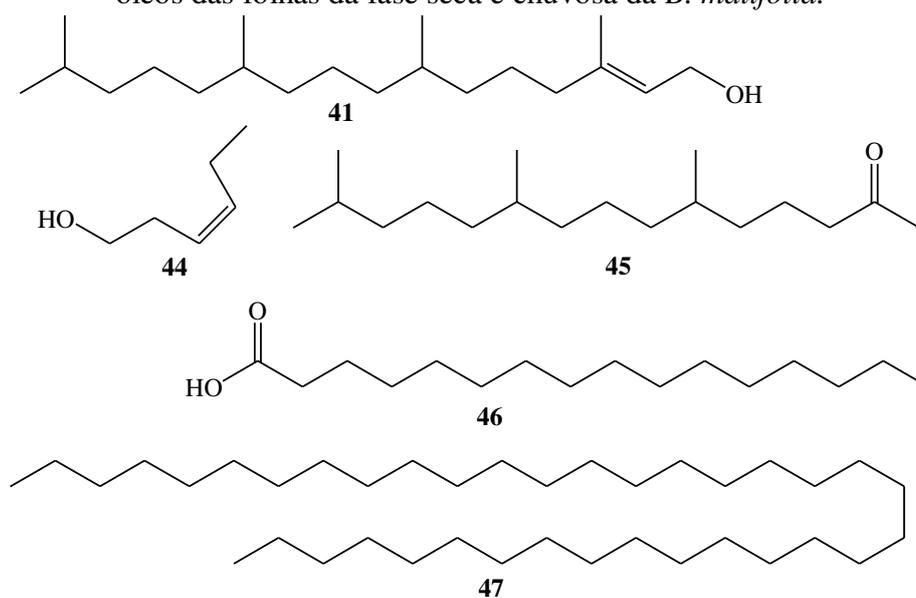
A composição química dos óleos essenciais foi identificada por CG-EM. Os cromatogramas do período seco (PS) e do período chuvoso (PC) (Figuras 27 e 28, respectivamente) foram analisados utilizando as bibliotecas do espectrômetro de massas e o cálculo do AI.

Os resultados da identificação dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais das folhas estão apresentados na Tabela 3.

No óleo do período seco das folhas da *B. malifolia* apresentou uma maior quantidade de compostos do que no período chuvoso. No PS foram identificados 13 compostos, sendo que os majoritários foram o fitol (**41**) (15,80%), (*Z*)-hex-3-enol (**44**) (17,99%), hexaidrofarnesil-acetona (**45**) (9,39%), ácido palmítico (**46**) (10,62%) e o hexatriacontano (**47**) (18,43%). No PC foram identificados 6 compostos, sendo o fitol (**41**) (52,70%) e o (*Z*)-hex-3-enol (**44**) (26,22%) os que compõem 78,92% do óleo extraído. As estruturas destes compostos estão apresentadas na Figura 29.

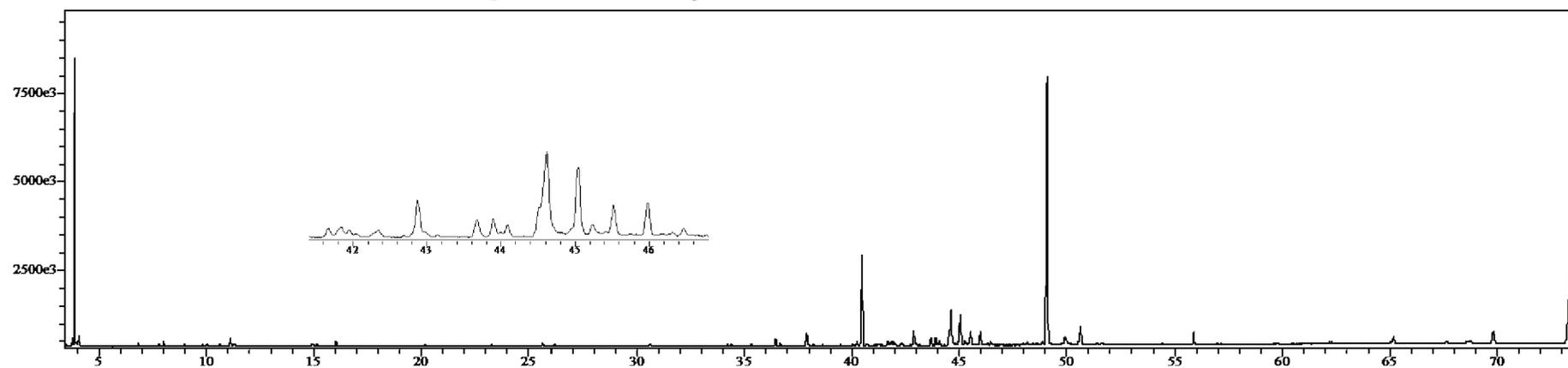
A *B. oxyclada* apresentou os compostos **44** (15,26%) e **41** (10,06%) também como os majoritários na fase seca (MARTINS, 2018), bem como a *B. laevifolia* (19,4% e 9,8%, repectivamente) (NUNES, 2016). Este comportamento parece ser uma característica do gênero estudado.

Figura 29: Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos das folhas da fase seca e chuvosa da *B. malifolia*.

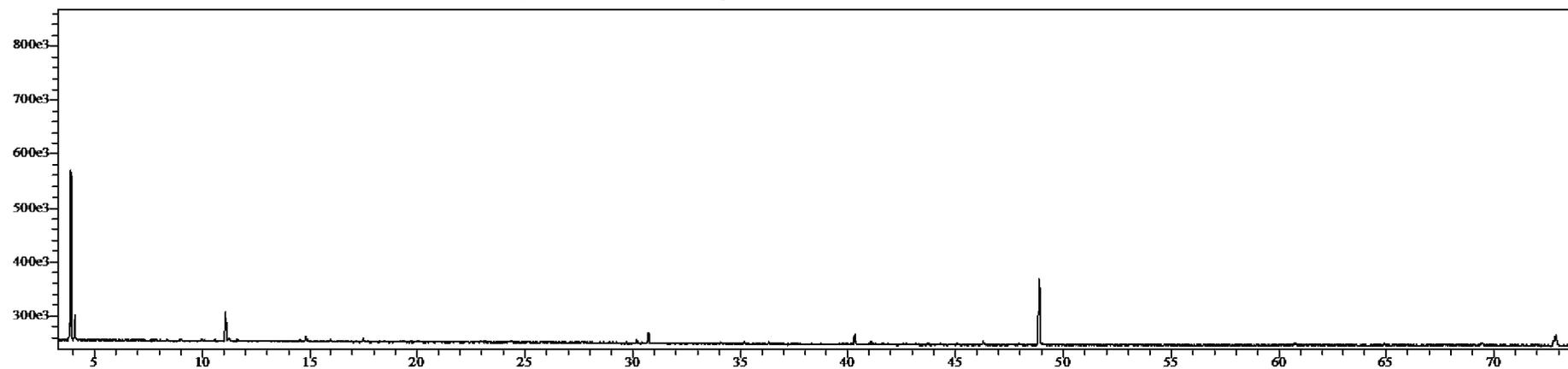


41: fitol; **44:** (*Z*)-hex-3-enol; **45:** hexaidrofarnesil-acetona; **46:** ácido palmítico; **47:** hexatriacontano.

Fonte: a autora.

Figura 27: Cromatograma de CG-EM do óleo essencial no PS.

Fonte: a autora.

Figura 28: Cromatograma de CG-EM do óleo essencial no PC.

Fonte: a autora.

Tabela 3: Composição química do óleo essencial das folhas no período de seca (PS) e no período de chuva (PC) da *B. malifolia*.

T _R	COMPOSTO	IA _{calculado}	AI _{teórico}	Composição, TIC (%)	
				PS	PC
3.792	(<i>E</i>)-hexen-2-al	845	846 ^a	1,48	2,55
3.879	(<i>Z</i>)-hex-3-enol	851	850 ^a	17,99	26,22
4.087	1-hexanol	866	863 ^a	2,49	3,64
11.120	Linalool	1097	1095 ^a	1,22	3,31
30.735	N.I	1580	-	-	1,14
37.959	Ácido mirístico	1776	1775 ^b	2,80	-
40.474	Hexaidrofarnesil-acetona	1849	1850 ^b	9,39	2,79
43.878	(<i>E,E</i>)-7,11,15-Trimetil-3-metileno-hexadeca-1,6,10,14-tetraeno	1922	1922 ^b	1,82	-
44.570	Ácido Palmítico	1973	1971 ^b	10,62	-
45.046	N.I	1988	-	3,82	-
46.282	N.I	2031	-	-	1,79
49.064	Fitol	2119	2114 ^b	15,80	52,70
49.819	Ácido Linoleico	2144	2159 ^b	2,61	-
50.626	N.I	2171	-	2,81	-
55.875	5-Metil-5-(4,8,12-trimetiltridecil)diidro-2(3 <i>H</i>)-furanona	2357	2364 ^b	1,01	-
69.818	Esqualeno	2907	2833 ^b	2,09	-
72.862	N.I	2890	-	-	5,86
73.403	Hexatriacontano	2987	3000 ^b	18,43	-
Total				94,38%	100,0%

Nota: N.I: não identificado; Período seco (PS); Período chuvoso (PC); IA: índice aritmético; T_R: tempo de retenção (min); TIC: total ions chromatogram; ^aAdams (2007); ^bBanco de dados da NIST na web (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>).

Fonte: a autora.

A distribuição por classes dos compostos identificados nos óleos essenciais estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Classificação, por grupos funcionais, dos componentes dos óleos essenciais das folhas de *B. malifolia* no período seco e chuvoso.

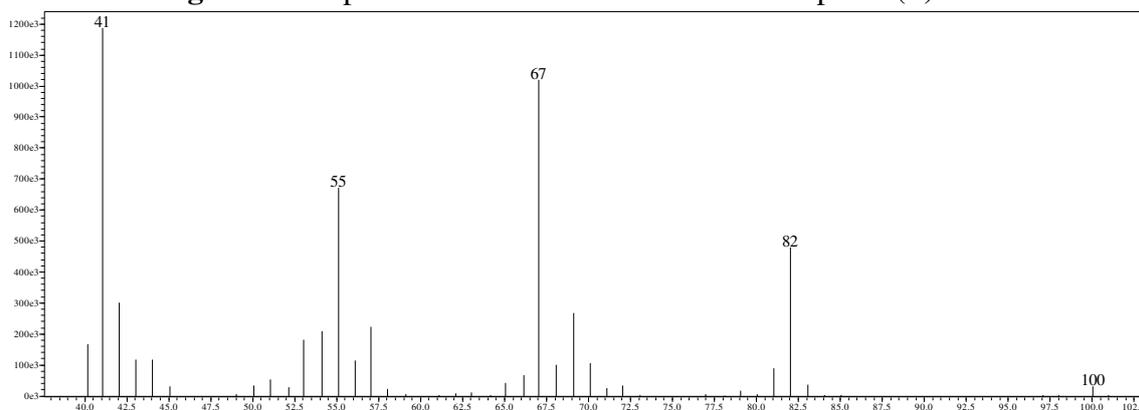
Classes de compostos	PS (%)	PC (%)
Ácidos carboxílicos	16,03 (3)	-
Alcanos de cadeia longa	18,43 (1)	-
Álcool alifático	20,48 (2)	29,86 (2)
Aldeídos	1,48 (1)	2,55 (1)
Cetonas	1,01 (1)	-
Diterpenos	27,01 (3)	55,49 (2)
Monoterpenos oxigenados	1,22 (1)	3,31 (1)
Triterpenos	2,09 (1)	-
N.I	6,63 (2)	8,79 (3)
Total	94,38	100,00

N.I: não identificado; Período seco (PS); Período chuvoso (PC). Números em parênteses representam a quantidade de compostos em cada classe.

Fonte: autora.

As Figuras 30 e 31 mostram o espectro de massas e mecanismo de fragmentação do composto majoritário comum, o (Z)-hex-3-enol, dos óleos essenciais do PS e PC das folhas de *B. malifolia*.

Figura 30: Espectro de massas do CG-EM do composto (Z)-hex-3-enol.

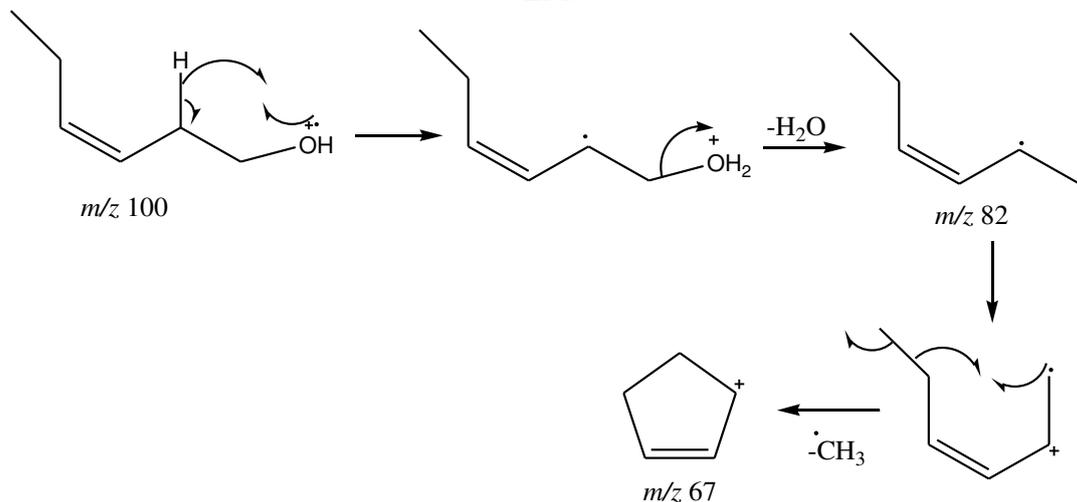


Fonte: autora.

O espectro de massas do (Z)-3-hexen-1-ol apresentou picos referentes às seguintes fragmentações: m/z 82 [M-18] referente à perda de água pelo íon molecular m/z 100; m/z

67 [M-18-15] referente à perda de um radical metila pelo fragmento m/z 82 pela formação do anel de cinco membros (NUNES, 2016). Na Figura 31 está apresentado o mecanismo proposto para algumas fragmentações (m/z) observadas no espectro de massas do (Z)-3-hexen-1-ol.

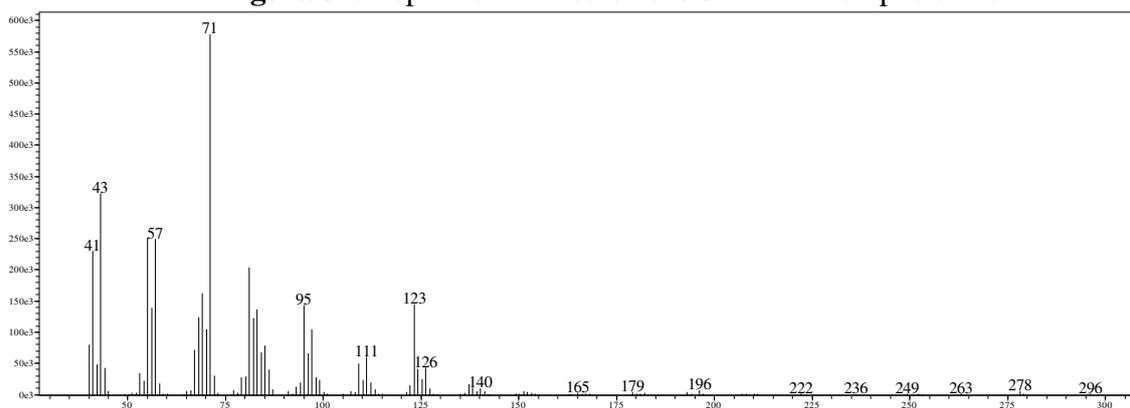
Figura 31: Esquema de fragmentação para o composto (Z)-hex-3-enol por CG-EM.



Fonte: autora.

As Figuras 32 e 33 mostram o espectros de massas e mecanismo de fragmentação do composto majoritário comum, o fitol, dos óleos essenciais do PS e PC extraído das folhas de *B. malifolia*.

Figura 32: Espectro de massas do CG-EM do composto fitol.

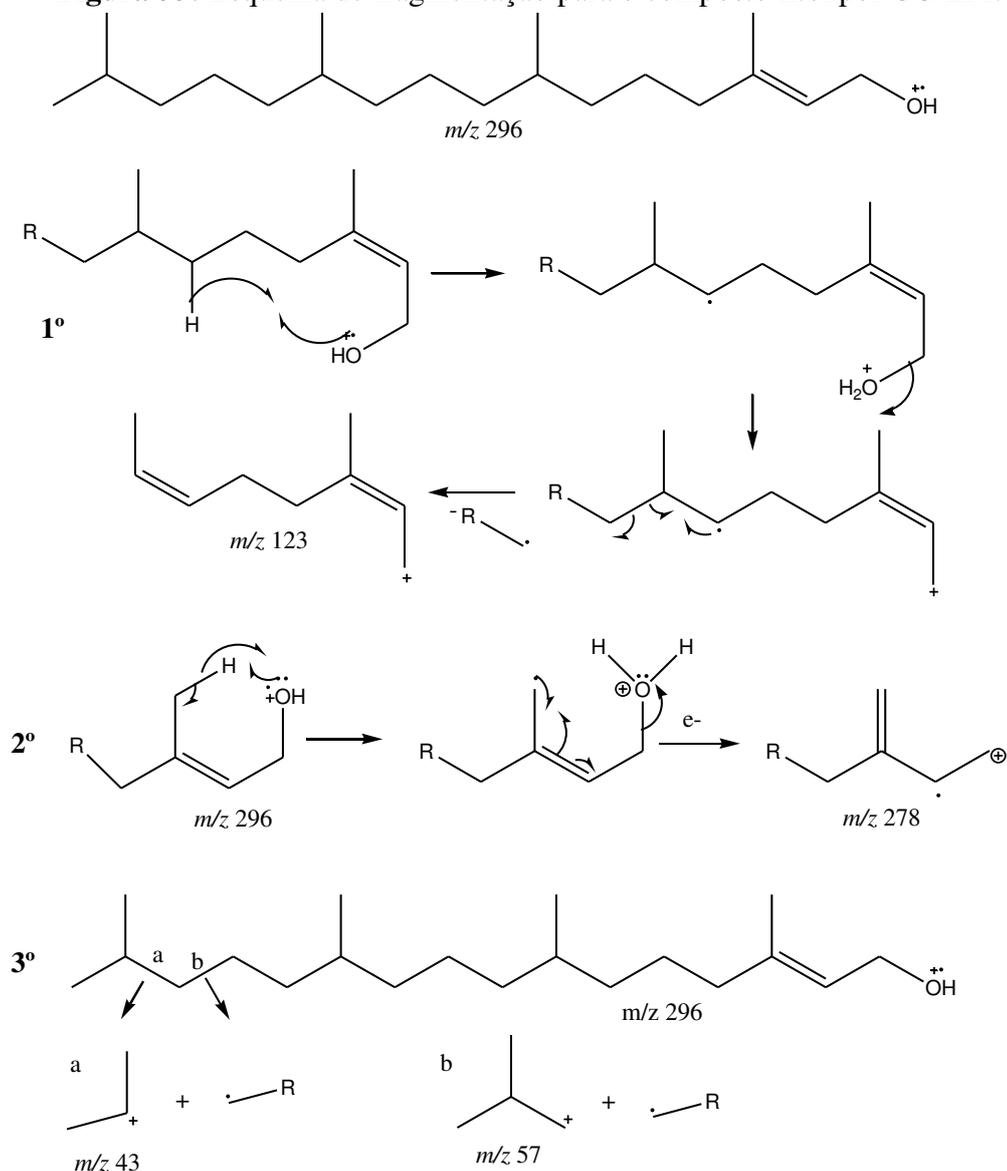


Fonte: autora.

O espectro de massas do fitol apresentou picos referentes às seguintes fragmentações: m/z 278 [M-18], devido à perda de água pelo íon molecular m/z 296 por meio de uma desidratação térmica seguida de uma ionização por elétrons; m/z 123 [M-

18-155], referente à perda de dois radicais de isopreno pelo fragmento m/z 278; fragmentos referente a diferentes pontos de clivagem α genéricas no íon molecular m/z 296 gerando os fragmentos m/z 43 e m/z 57 (ALTOÉ, 2014), conforme está apresentado na Figura 33.

Figura 33: Esquema de fragmentação para o composto fitol por CG-EM.



Fonte: ALTOÉ (2014).

4.1.3 Efeitos da sazonalidade sobre a composição do óleo essencial

A interferência de fatores abióticos no rendimento e na composição dos óleos essenciais de diversas plantas também foi revista por Moraes (2009). Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), são relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas

as classes de metabólitos secundários, em decorrência de fatores como estresse hídrico e a escassez de chuva, que acarretam alterações fisiológicas nas plantas.

De acordo com esses dois parâmetros, foi observado que o óleo do PS, apresentou aproximadamente 21% de compostos terpenoides (Tabela 3), sendo o fitol **41** (15,80%) o mais abundante (Figura 29). No óleo do PC, o fitol **41** também foi o mais abundante com (52,70%). Segundo Nunes (2016), o óleo das folhas da *B. laevifolia*, apresentou (9,85%) do composto **41** no período da seca e (14,9%) no período das chuvas, corroborando com os resultados da *B. malifolia* devido ao aumento da concentração do diterpeno majoritário identificado decorrente da variação sazonal.

Além de ser encontrado em plantas do mesmo gênero, o fitol **41** também foi encontrado em grande proporção em outras famílias, como por exemplo, nas folhas da *Inga laurina* Willd., onde foi identificado majoritariamente (33%) no óleo essencial coletado no período chuvoso (FURTADO et al., 2014). O fitol é um dos principais constituintes dos óleos essenciais derivados de plantas e muita pesquisa tem sido feita para provar que a atividade antimicrobiana ou citotóxica observada para esses óleos essenciais está relacionada ao conteúdo de fitol. Uma revisão recente sobre as propriedades farmacológicas do fitol demonstraram efeitos ansiolíticos, moduladores do metabolismo, citotóxicos, antioxidantes, autofágicos e apoptóticos, antinociceptivos, anti-inflamatórios, imunomoduladores e antimicrobianos (ISLAM et al., 2018).

Outros estudos, como o de Phutdhawong et al. (2004) mostraram que o óleo essencial de folhas frescas da espécie *Streblus asper* é constituído por 45,1% do composto fitol, que apresentou atividade anticâncer quando testado em ratos com leucemia linfocítica. Segundo Pejín et al. (2015), o fitol está presente livremente em vários produtos alimentares com atividade anti-quorum (redução de virulência e patogenicidade de bactérias resistentes) melhorada contra *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, este composto também apresenta bom potencial citotóxico contra linhagens de células cancerígenas em mamas, adenocarcinomas de próstata, cervical, pulmão, colón-retal, melanomas e atividade antimicrobiana contra bactérias bucais (LANG e BUCHBAUER, 2012; PEJIN, KOJIC e BOGDANOVIC, 2014).

A quantidade de álcoois alifáticos presentes no PS e PC também foram significativas, (20,48%) e (29,86%), respectivamente, evidenciando que a chuva também influenciou na produção destes compostos, sendo o (Z)-hex-3-enol (**44**) (17,99%/PS; 26,22%/PC) o mais abundante para os dois períodos (Tabela 3). Este composto é conhecido popularmente como “álcool folha”, um óleo incolor com aroma de grama

recém-cortada, produzido em pequenas quantidades em maioria das plantas, possuindo papel de proteção contra bactérias devido a parte que é cortada se regenerar (GARRET et al., 2013).

Na classe de aldeídos o composto (*E*)-hexen-2-al está presente no PS (1,48%) e no PC (2,55%), em pouca quantidade no óleo dos dois períodos coletados. Na espécie *B. oxyclada* o mesmo composto foi encontrado com 9,73% no óleo das folhas no período da seca (MARTINS, 2018), porém neste estudo não foi avaliada a sazonalidade do óleo. A quantidade de compostos não identificados (N.I) nos dois períodos de coleta dos óleos não foi muito expressiva (6,93%/PS; 8,79%/PC).

O composto hexaidrofarnesil-acetona (**45**) ou fitona (Tabela 3) foi identificado tanto no óleo do PS e PC, (9,39%) e (2,79%) respectivamente. Neste caso, o composto **45** foi mais produzido na período da seca do que na chuvosa, mostrando que o estresse hídrico nem sempre favorece a produção de alguns compostos. No estudo da *B. laevifolia* o mesmo composto apresentou (2,1%) na seca, evidenciando que nesse período para esta espécie a produção do composto foi menor podendo ser justificado pelos fatores abióticos em que a planta se encontra (NUNES, 2016). Óleos que apresentam este composto como majoritário geralmente apresentam boa atividade antimicrobiana (LANG E BUCHBAUER, 2012; RADULOVIC, STOJANOVIC e PALIC, 2006; LIOLIOS et al., 2007) e alelopática (RAZAVIA e NEJAD-EBRAHIMIB, 2010).

Os ácidos carboxílicos só foram encontrados no período da seca, com um total de (16,03%), dentre eles o ácido palmítico (**46**) como majoritário (10,62%), o ácido linoleico e o ácido mirístico. Estes composto possuem reconhecida atividade antimicrobiana (LANG e BUCHBAUER, 2012). Os ácidos carboxílicos de cadeia longa fazem parte da composição de ceras e tem a função de barreira protetora contra a perda de água, por transpiração excessiva, entre outras, nas plantas (HEREDIA et al., 1998).

Somente no PS foi identificado um alcano de cadeia longa, o hexatriacontano (**47**) com (18,43%) um de seus compostos majoritários. Este alcano participa também da constituição de ceras epicuticulares. No estudo do óleo da *B. laevifolia*, foi encontrado um dos principais constituintes de ceras naturais, o alcano de cadeia longa untriacontano (7,54%; NUNES, 2016). Os principais constituintes químicos das ceras epicuticulares são n-alcenos, ésteres, álcoois e ácidos graxos de cadeia longa (CHACHALIS, REDDY e ELMORE, 2001). Essas ceras naturais, devido a sua composição na atuação de patógenos, na entrada de produtos químicos e contaminantes, atuando assim na defesa da planta (HEREDIA et al., 1998).

A alteração dos compostos majoritários nos óleos essenciais, seja por fatores genéticos, técnicos (coleta, estabilização e armazenamento), bióticos ou abióticos, pode influenciar diretamente na qualidade e, conseqüentemente, nos resultados de tratamentos e de testes biológicos sobre patógenos humanos ou fitopatógenos (MORAIS, 2009). Nesta espécie, *B. malifolia*, é importante ressaltar, que esses resultados de óleo essencial são inéditos. Adicionalmente, os resultados obtidos podem ser relacionados ao fenótipo da planta, pois se sabe que as características das espécies e suas constituições químicas irão variar de acordo com a sua origem.

4.2 EXTRATOS E PARTIÇÕES LÍQUIDO-LÍQUIDO

4.2.1 Rendimento percentual dos extratos e partições

O EH foi obtido inicialmente a fim de remover compostos de natureza apolar como clorofilas. Em seguida foi obtido o EE, e uma parte deste foi usado para a realizar as partições líquido-líquido, sendo essas a PD, PA e PR. Na Tabela 5 estão representados os valores de rendimentos dos extratos e partições obtidas.

Tabela 5: Rendimentos dos extratos e partições das folhas da *B. malifolia*.

Massa de folhas secas (Kg)	Amostras	Massa obtida de extrato (g)	Rendimento (%)
1.1	EH	43,75	3,94
	EE	150,32	13,54
	Total	194,07	17,50
	Filtro	7,91	7,86
	PD	9,11	10,02
	PA	39,06	42,01
	PR	33,76	36,00

EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: autora.

A PA foi a que apresentou maior rendimento, sugerindo que tenha uma maior presença de compostos polares no extrato. Um alto rendimento na PR, pode ser justificado pelo não uso do solvente n-butanol, que seria utilizado para extração antes de restar essa fração hidroalcoólica residual. Não foi possível utilizá-lo pois o mesmo estava em falta no momento da extração.

4.2.2 Prospecção fitoquímica

Foi realizada a prospecção dos extratos e partições a fim de identificar as classes de metabólitos presentes. Como pode ser visto na Tabela 6, a presença de alcaloides não foi identificada. Os reveladores gerais apresentaram forte intensidade indicando a presença de terpenos, esteroides, taninos, fenóis, flavonoides e saponinas. A presença de flavonoides foi identificada no EE e nas partições.

Tabela 6: Prospecção fitoquímica dos extratos e partições das folhas de *B. malifolia*.

Fitoconstituintes (reativos)	AMOSTRAS				
	EE	EH	PA	PD	PR
Alcaloides (IC, DF)	-	-	-	-	-
Antraquinonas (KE)	-	-	-	-	-
Antronas (KE)	-	-	-	-	-
Flavonoides (NP)	+++	-	+++	+	+
Terpenos/Flavonoides//Taninos/Saponinas (VS)	+++	-	+++	+	++
Terpenos/Fenóis (SC, AD)	++	-	++	+	++
Terpenos/Esteroides (LB)	+	-	+++	++	++

Nota: +: positivo, -: negativo. Reativos: NP/PEG (NP), Lieberman (LB), Vanilina sulfúrica (VS), Anisalaldeído (AD), KOH 5% etanol (KE), Sulfato cérico (SC), Iodocloroplatinato (IC), Dragendorf (DF); EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: autora.

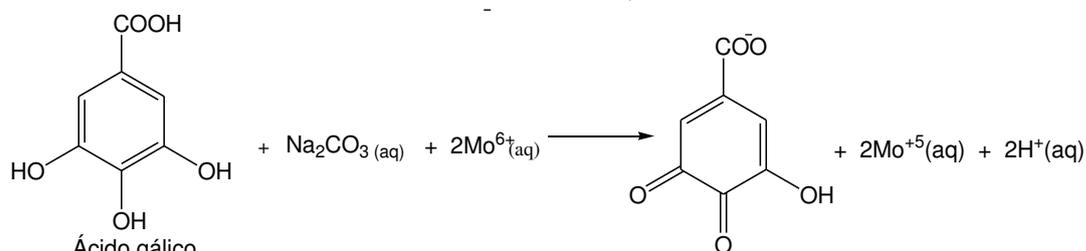
Em outras espécies do gênero foram encontrados os mesmos perfis fitoquímicos. Nos extratos e partições de folhas da *B. laevifolia* foi encontrado flavonoides, terpenoides, saponinas, propilpropanoides e esteroides (NUNES et al., 2016). Também no estudo das folhas da *B. argyrophylla* seus extratos e frações apresentaram flavonoides, terpenoides, saponinas, propilpropanóide e esteroides (OLIVEIRA et al., 2018). Outro estudo recente da *B. oxyclada* apresentou em extratos e frações de caules, folhas e raízes substâncias como flavonoides, terpenos, saponinas e propilpropanoides (MARTINS, 2018).

Como o perfil fitoquímico é parecido, as amostras da *B. malifolia* possuem grande oportunidade de ser promissora em relação a atividades biológicas como antifúngica e antioxidante, visto que nestes trabalhos foram descritas também estas atividades.

4.2.3 Determinação do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides

A determinação de fenóis totais (FT) foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, que se fundamenta na redução sofrida pelos ácidos fosfomolibdídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotungstístico ($H_3PW_{12}O_{40}$) em presença de substâncias fenólicas. Neste processo de redução ocorre a mudança da coloração da solução de amarelo para azul. Esta mudança pode ser acompanhada em espectrofotômetro permitindo a quantificação dos compostos fenólicos, um exemplo desta reação está apresentado na Figura 34 (MESSERSCHMIDT et al., 2011).

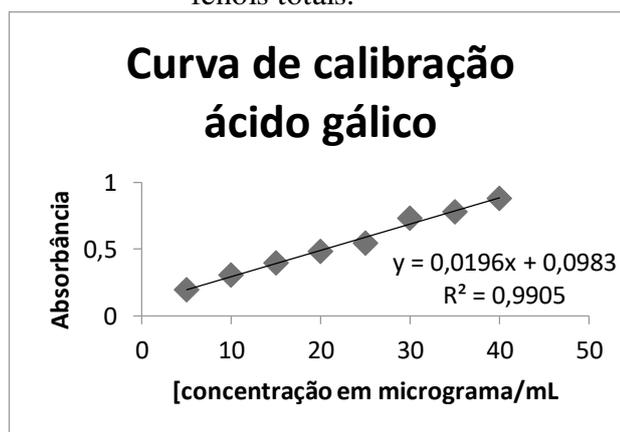
Figura 34: Reação do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu).



Fonte: MARTINS, 2018.

Para quantificar o teor de FT foi construída uma curva analítica com padrão de ácido gálico, que está representada pela Figura 35.

Figura 35: Curva de calibração do padrão de ácido gálico para determinação do teor de fenóis totais.



Fonte: autora.

O teor de FT foi dado em *mg* de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (*mg* EAG *g* extrato⁻¹). Quanto maior este valor, maior o teor de FT. Na Tabela 7 estão representados os resultados para os extratos e partições das folhas da *B. malifolia*.

Tabela 7: Teor de fenóis totais dos extratos e partições de folhas da *B. malifolia*.

Amostras	Fenóis totais (mg de EAG/g)
EE	261,9 ± 3,7
EH	6,4 ± 1,2
PA	483,2 ± 4,9
PD	81,3 ± 4,8
PR	25,5 ± 5,0

Nota: EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: autora.

De acordo com os resultados de FT na Tabela 7, os maiores valores de fenóis foram encontrados no extrato etanólico e na partição acetato de etila, como foi indicado na prospecção fitoquímica, estas foram as que apresentaram maior intensidade de flavonoides. Estes fatos indicam que a maior parte da composição dos extratos é de compostos fenólicos.

Outras espécies do gênero também apresentaram teores significativos de FT no mesmo extrato etanólico e na partição acetato. Neste sentido, foi feito um comparativo com espécies do mesmo gênero (Tabela 8), em que as folhas das espécies *B. laevifolia*, *B. argyrophylla* e *B. malifolia* apresentaram um maior teor desses FT em relação a *B. oxyclada*. Com isso, os resultados da espécie em estudo *B. malifolia* corroboram com as espécies já estudadas.

Tabela 8: Comparação do teor de fenóis totais do extrato etanólico e da partição acetato de etila das folhas da *B. oxyclada* a *B. laevifolia* e a *B. argyrophylla*.

Amostras	<i>B. laevifolia</i> ¹	<i>B. argyrophylla</i> ²	<i>B. oxyclada</i> ³	<i>B. malifolia</i>
	mg de EAG/g			
EE	542,0 ± 2,1	337,1 ± 1,4	83,3 ± 1,8	261,9 ± 3,7
PA	660,0 ± 1,5	405,5 ± 3,2	239,9 ± 4,0	483,2 ± 5,0

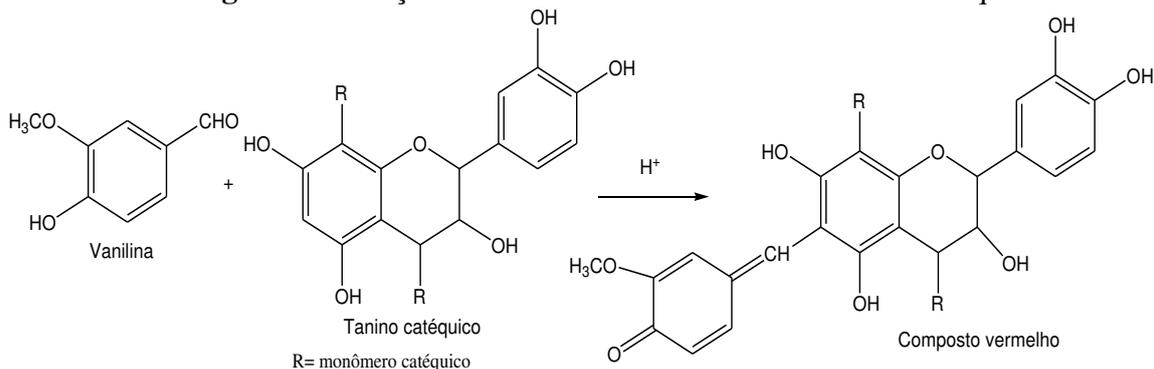
Nota: EE: extrato etanólico, PA: partição acetato de etila.

Fonte: (NUNES, 2016)¹; (OLIVEIRA, 2016)²; (MARTINS, 2018)³.

Os taninos condensados são polímeros de monômeros de catequina com várias hidroxilas fenólicas, que possuem importantes atividades biológicas como a antioxidante. A determinação do teor de taninos ou proantocianidinas foi realizada pelo método da vanilina sulfúrica. Nesse método a vanilina em meio ácido reage com a molécula de

tanino condensado formando um composto vermelho cuja intensidade aumenta linearmente a 500 nm com aumento da sua concentração (SCHOFIELD, MBUGUA e PELL, 2001). A Figura 36 mostra a reação da vanilina com um tanino catéuico que ocorre por meio de uma substituição eletrofílica no anel aromático A do monômero da catequina.

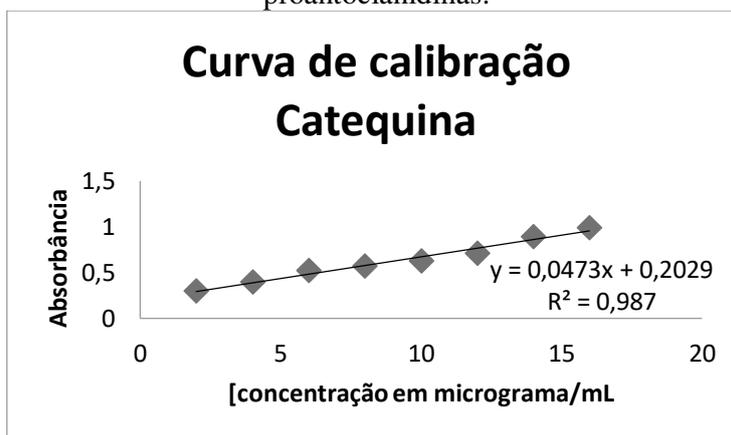
Figura 36: Reação da vanilina sulfúrica com um tanino catéuico.



Fonte: adaptado de SCHOFIELD, MBUGUA e PELL (2001).

O teor de proantocianidinas é dado em *mg* de equivalente de catequina por grama de extrato (*mg EC g extrato*⁻¹). Foi construído uma curva analítica com o padrão de catequina conforme mostra a Figura 37.

Figura 37: Curva de calibração do padrão de catequina para determinação do teor de proantocianidinas.



Fonte: autora.

Quanto maior o valor (*mg EC g extrato*⁻¹), maior o teor de proantocianidinas nas amostras. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Teor de proantocianidinas dos extratos e partições de folhas da *B. malifolia*.

Amostras	Proantocianidinas (mg de EC/g)
EE	283,1 ± 37,3
EH	37,0 ± 2,4
PA	1.119,9 ± 5,9
PD	315,4 ± 15,5
PR	319,2 ± 73,6

Nota: EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: autora.

De acordo com os resultados na Tabela 9, a partição de acetato de etila, partição diclorometano e a partição residual aquosa foram as que apresentaram maiores teores de proantocianidinas. Como a PA também apresentou um maior teor de FT, sugere-se que a classe de compostos fenólicos presentes em predominância nesta partição seja a de taninos condensados.

Outras espécies do gênero apresentaram o mesmo perfil de maiores teores de proantocianidinas para o extrato etanólico e a partição de acetato de etila. Neste mesmo sentido, foi feito um comparativo do teor de proantocianidinas presentes nas folhas destas espécies em relação com a espécie *B. malifolia* em estudo (Tabela 10). Os resultados mostraram que o teor de taninos na PA da *B. malifolia*, foi muito superior em comparação com as outras espécies. Isso pode indicar que a *B. laevifolia*, *B. argyrophylla* e *B. oxyclada* possuem outras classes de compostos fenólicos predominantes, como por exemplo, os flavonoides.

Tabela 10: Comparação do teor de proantocianidinas do extrato etanólico e da partição acetato de etila das folhas da *B. oxyclada* a *B. laevifolia* e a *B. argyrophylla*.

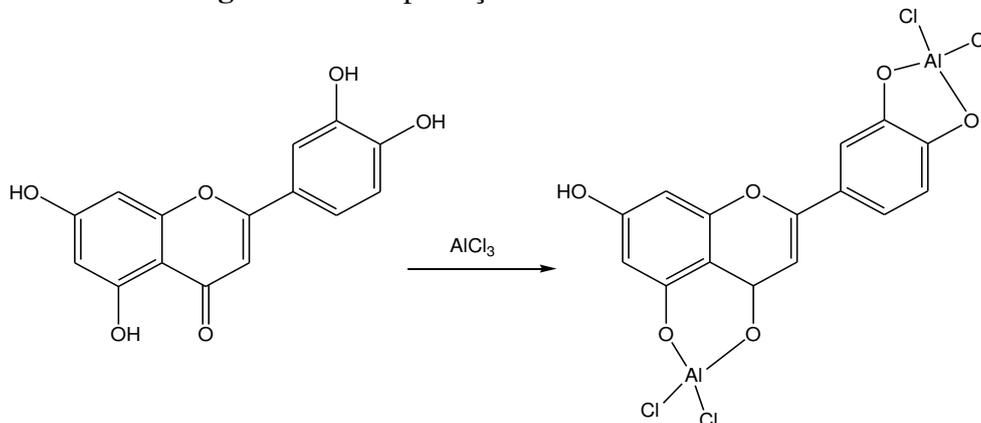
Amostras	<i>B. laevifolia</i> ¹	<i>B. argyrophylla</i> ²	<i>B. oxyclada</i> ³	<i>B. malifolia</i>
	mg de EAG/g			
EE	274,6 ± 8,2	272,5 ± 0,3	88,7 ± 3,0	283,1 ± 37,3
PA	268,9 ± 3,3	268,90 ± 1,1	397,4 ± 4,0	1.119,9 ± 5,9

Fonte: (NUNES, 2016)¹; (OLIVEIRA, 2016)²; (MARTINS, 2018)³.

O método de quantificação do teor de flavonoides foi realizada pela reação com solução de AlCl₃ (WOISKY e SALATINO, 1998). Nesta análise, o cátion alumínio (Al³⁺) forma complexos estáveis com os flavonoides, conforme está mostrado na Figura 38. O

complexo formado apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não complexado denominado efeito batocrômico, assim o monitoramento dessa complexação é realizada em espectrofotômetro de UV com absorção em 425 nm.

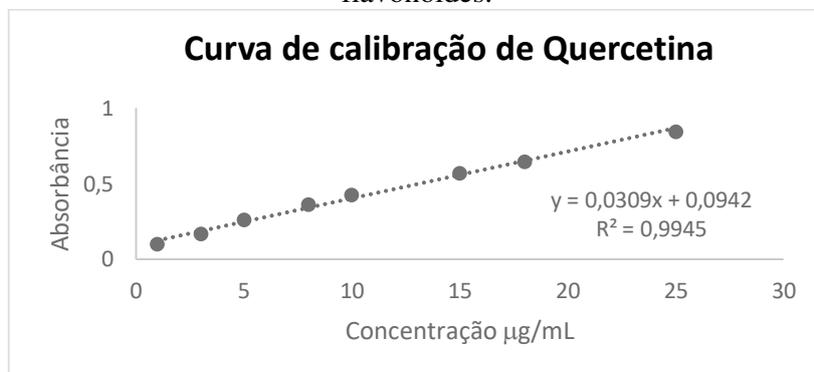
Figura 38: Complexação de um flavonoide com AlCl_3 .



Fonte: WOISKY e SALATINO (1998).

A quantificação do teor de flavonoides foi realizada através da construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de quercetina (Figura 39).

Figura 39: Curva de calibração do padrão de quercetina para determinação do teor de flavonoides.



Fonte: a autora.

O teor de flavonoides foi calculado através da regressão linear da curva de calibração do gráfico da absorbância obtida da reação entre a quercetina e o AlCl_3 versus a concentração de quercetina. O resultado foi dado em mg de equivalente de quercetina por g de extrato ($\text{mg EQ}_{\text{extrato}}^{-1}$) e por g de material vegetal seco ($\text{mg EQ}_{\text{vegetal}}^{-1}$), este último considera o rendimento de extração. Quanto maior esse valor maior o teor. Os resultados para teor de flavonoides estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11: Teor de flavonoides dos extratos e partições de folhas da *B. malifolia*.

Amostras	Flavonoides (mg de EQ/g)
EE	32,7 ± 1,3
EH	18,2 ± 1,2
PA	26,8 ± 2,2
PD	47,1 ± 1,5
PR	25,3 ± 0,4

Nota: EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: autora.

De acordo com os resultados na Tabela 11, as amostras PD, EE, PR e PA apresentaram maiores teores de flavonoides (47,1 ± 1,5; 32,7 ± 1,3; 25,3 ± 0,4 e 26,8 ± 2,2 mg de EQ/g), respectivamente. Estes resultados são diferentes para fenóis e proantocianidinas, em que a PA apresentou maiores teores. O indica que os compostos flavonoides presentes na PA, não complexam com o AlCl₃ ou não apresentam hidroxilas como substituintes capazes de complexar com AlCl₃ ou o comprimento de onda do flavonoide complexado com AlCl₃ não absorve no comprimento de onda usado na análise.

Esse fato está relacionado com a estrutura dos possíveis flavonoides, pois alguns determinados flavonoides não apresentam a carbonila no carbono C4 e/ou dupla ligação entre os carbonos C2 e C3, o que pode influenciar na absorção, em que cada parte do flavonoide absorve em uma banda diferente no UV/vis. Assim, cada classe de flavonoide vai apresentar bandas de absorção diferentes antes e após a complexação com AlCl₃, devido a posições diferentes dos substituintes hidroxilas presentes na estrutura de cada flavonoide (SOUSA, 2015).

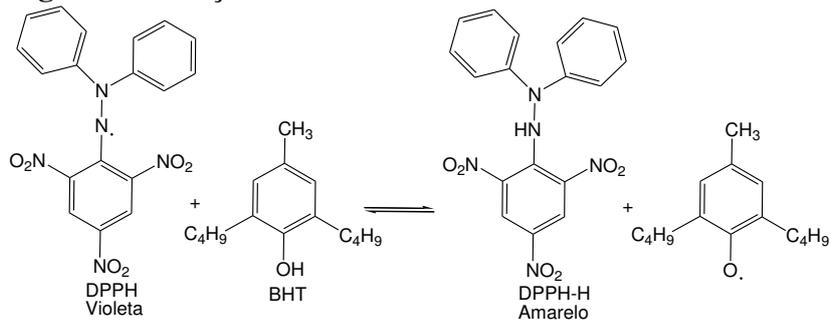
Outras espécies do gênero apresentaram o mesmo perfil de maiores teores de flavonoides para PA e PD. Na espécie *B. laevifolia*, os teores foram de (88,8 ± 3,5; 77,2 ± 1,8 mg de EQ/g), respectivamente. E para a *B. argyrophylla* apresentou maior teor para a PA (211,8 ± 2,9 mg de EQ/g), estes resultados diferenciam para a *B. malifolia* conforme apresentado na Tabela 11.

4.2.4 Avaliação do potencial antioxidante

O método utilizados para essa avaliação foi o de sequestro do radical DPPH•. Esse método consiste na avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH• que possui

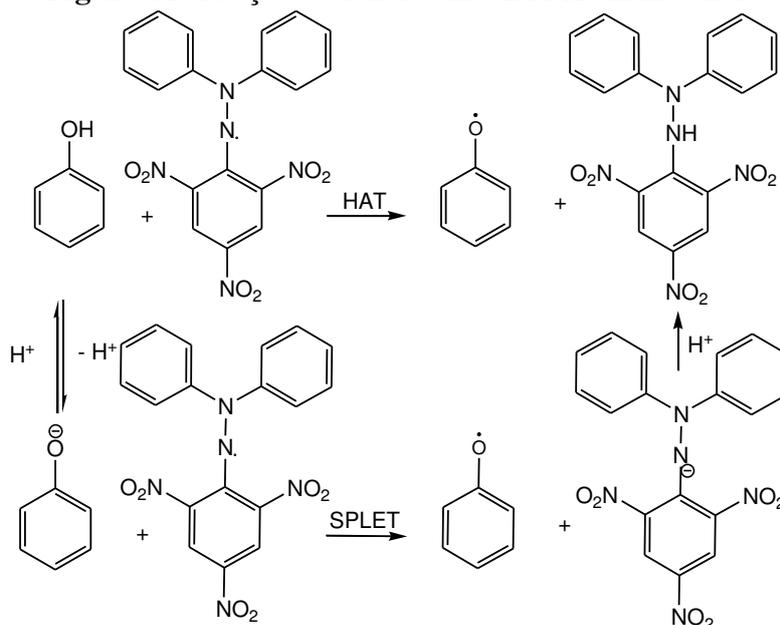
coloração púrpura, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\bullet$), este é reduzido formando 2,2-difenilpicrilidrazina (DPPH-H) de coloração amarela, que absorve a luz em 517 nm no espectrofotômetro do UV-Visível (OLIVEIRA et al., 2009). Na Figura 40 está representada a reação química entre o radical DPPH• e o BHT, um antioxidante sintético usado como controle positivo nesse teste.

Figura 40: Reação do radical DPPH• com o antioxidante BHT.



Fonte: adaptado de OLIVEIRA et al., (2009).

Na reação do composto fenólico com o radical DPPH o mecanismo pode ocorrer de duas maneiras (em metanol): transferência de hidrogênio atômico (HAT – “hydrogen atom transfer”) ou por perda sequencial de próton na transferência de elétron (SPLET – “sequential proton loss electron transfer”). Estes dois mecanismos estão representados na Figura 41 (LIU, 2010).

Figura 41: Reação do fenol com o DPPH em metanol.

Fonte: adaptado de LIU (2010).

As reações HAT e SPLET podem ocorrer paralelamente em um sistema. As reações SPLET dependem do solvente e do pH das soluções. Em solventes que estabeleçam fortes ligações de hidrogênio como metanol e etanol, o mecanismo de reação é baseado na transferência de elétrons, pois o sequestro do radical pelo ArOH (mecanismo HAT) será lento (MAGALHÃES et al., 2008).

O resultado obtido da avaliação da atividade antioxidante da *B. malifolia* foi expresso em concentração eficiente, CE₅₀, que é a concentração de extrato ou partição necessária para reagir com 50% do radical DPPH•. Portanto, quanto menor esse valor, melhor é a atividade antioxidante (REYNERTSON, BASILE e NENNELY, 2005). O valor da porcentagem de consumo do radical DPPH•, foi obtido a partir da Equação 1 do Item 3.6.7.1.

Segundo Reynertson, Basile e Nennely (2005), a intensidade da atividade antioxidante pode ser correlacionada com o valor obtido de CE₅₀ conforme mostrado na Tabela 12.

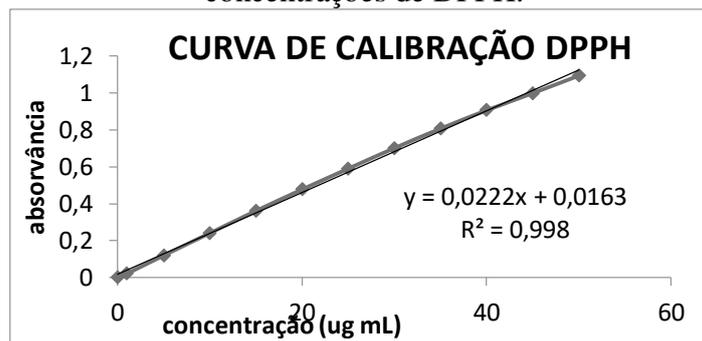
Tabela 12: Correlação entre os valores de CE₅₀ e a intensidade da atividade antioxidante CE₅₀ (µg mL⁻¹).

CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Intensidade da atividade antioxidante
<50	Elevada
50-100	Moderada
100-200	Baixa
>200	Inativa

Fonte: Reynertson, Basile e Nennely (2005).

A quantificação do CE₅₀ foi realizada através da construção da curva de calibração do DPPH com diferentes concentrações do padrão BHT conforme apresentado na Figura 42. Os resultados obtidos de CE₅₀ para os extratos e partições da *B. malifolia* e o CE₅₀ do BHT usado como controle positivo estão expostos na Tabela 13.

Figura 42: Curva de calibração da análise de DPPH com diferentes concentrações de DPPH.



Fonte: a autora.

Tabela 13: Resultados de CE₅₀ da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH dos extratos e partições de folhas da *B. malifolia*.

Amostras	DPPH µg/mL (CE ₅₀)
EE	5,82 ± 0,18
EH	104,81 ± 0,38
PA	2,91 ± 0,02
PD	16,70 ± 0,03
PR	3,64 ± 0,10
BHT	13,92 ± 1,52

Nota: EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: autora.

As amostras de EE, PA e PR foram as que apresentaram o menor valor de CE₅₀, sendo ($5,82 \pm 0,18$; $2,91 \pm 0,02$; $3,64 \pm 0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente, evidenciando que a atividade antioxidante é elevada pelo sequestro do radical testado. O extrato hexano apresentou atividade baixa ($104,81 \pm 0,38 \mu\text{g mL}^{-1}$), pois não apresentou compostos fenólicos suficientes para reagirem com o radical testado.

Os testes de fenóis totais (Tabela 7), taninos condensados (Tabela 9) e flavonoides (Tabela 11), indicaram uma maior concentração destes compostos para a partição acetato de etila, o que mais uma vez explica o melhor potencial antioxidante para esta fração, já que estes compostos estão em altas concentrações, e suas capacidades antioxidantes já foram descritas em vários estudos dentro do gênero. Para a *B. laevifolia*, *B. argyrophylla* e *B. oxyclada*, as amostras de PA apresentaram atividade elevada com valores de CE₅₀ de ($4,10 \pm 0,50$; $4,10 \pm 0,10$; $6,50 \pm 0,40 \mu\text{g/mL}$), respectivamente (NUNES, 2016; OLIVEIRA, 2016; MARTINS, 2018). Isto indica que esta fração possui compostos com característica fenólica muito promissora para estudos aprofundados em relação à busca de novos antioxidantes naturais.

4.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.3.1 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Os resultados da atividade antibacteriana contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias dos óleos essenciais das folhas de *B. malifolia* em diferentes períodos sazonais, período de seca (PS) e período de chuva (PC), estão apresentados na Tabela 14.

As bactérias foram testadas nas concentrações de 0,195 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O óleo obtido no PS não apresentou atividade contra as bactérias aeróbias e anaeróbias *S. mutans*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* dentro do intervalo das concentrações testadas. Atividade moderada foi observada para as bactérias aeróbias *S. mitis* e *A. actinomycetemcomitans* e para a anaeróbia *A. naeslundii* (CIM = 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O óleo essencial no PC apresentou atividade moderada para todas as bactérias aeróbias e anaeróbias testadas, com os valores de CIM entre 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A atividade antimicrobiana é considerada boa para CIM's abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e moderada entre 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HOLETZ et al., 2002; RIOS e RECIO, 2005).

O óleo essencial no PC apresentou melhor atividade em comparação com o PS. Isto pode estar relacionado com as diferenças observadas dentro da composição

composição química e com a porcentagem dos compostos majoritários identificados nos óleos. O diterpeno fitol (**41**) (Figura 29) apresentou uma maior quantidade no óleo no PC (52,70%) do que no PS (15,80%), enquanto que, o composto (Z)-hex-3-enol (**44**) apresentou 26,22% no PC e 17,99% no PS. O composto hexaidrofarnesil-acetona (**45**) foi identificado tanto no óleo do PS e PC, (9,39%) e (2,79%), mas em maior quantidade no PS. Geralmente as propriedades biológicas dos óleos essenciais são determinadas pelas características dos compostos majoritários (BAKKALI et al., 2008).

A atividade antibacteriana do diterpeno **41** foi relatada por (INOUE et al., 2005; LEANDRO et al., 2012; FURTADO et al., 2014) e terpenos por (LANG e BUCHBAUER, 2012). Álcoois, como os compostos **41** e **44**, possuem atividade bactericida atuando potencialmente como agentes desnaturantes de proteínas, que combinados podem aumentar a atividade (PELCZAR et al., 1988; DORMAN e DEANS, 2000). Em geral, o efeito antimicrobiano de misturas de terpenos, álcoois e ácidos, como nos óleos da *B. malifolia*, resultam das interações sinérgica, antagonística e aditiva com compostos de alta lipofilicidade na atividade bacteriana (BASSOLÉ e JULIANI, 2012).

Tabela 14: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos óleos essenciais das folhas de *B. malifolia* nos períodos seco e chuvoso frente às bactérias aeróbias e anaeróbias.

	Bactérias	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		PS	PC	CP*
Aeróbias	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	>400	400	0,922
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	400	200	3,688
	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	>400	100	0,922
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	400	400	0,460
Anaeróbias	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	>400	200	-
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	>400	100	-
	<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	400	400	-

*CP: controle positivo dicloridrato de clorexidina; O valor de CIM > 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ correspondeu a ausência de atividade antibacteriana dentro do intervalo das concentrações testadas. Método validado com metronidazol: *Bacteroides fragilis* (CIM = 0,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (1,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$). PS: período seco, PC: período chuvoso.
Fonte: autora.

O composto hexaidrofarnesil-acetona **45** também apresenta boa atividade antimicrobiana e alelopática quando majoritário em óleos essenciais (LANG e BUCHBAUER, 2012; RAZAVIA e NEJAD-EBRAHIMIB, 2010). Com os óleos essenciais das folhas de *B. malifolia* foi evidenciada situação contrária. O óleo coletado no PC apresentou menor quantidade do composto hexaidrofarnesil-acetona (2,79%) que no PS (9,39%), evidenciou melhores resultados de atividade antibacteriana. A presença dos compostos **46** e **47**, um ácido graxo e um alcano linear, identificados no óleo do PS, podem ter sido importantes para a atividade moderada de algumas bactérias aeróbias e anaeróbias. Esses compostos com grupos hidrofóbicos exercem grande influência na atividade antimicrobiana (BRANEN, DAVIDSON e KATZ, 1980) porque permitem interação com proteínas hidrofóbicas e lipídios da superfície bacteriana (WANG e JOHNSON, 1992). A atividade antibacteriana dos ácidos graxos pode ser influenciada pelo comprimento da cadeia de carbono e presença, número, posição e orientação das duplas ligações (DESBOIS e SMITH, 2010).

Uma série de bactérias são responsáveis pelas doenças periodontais, como as placas dentárias. Na superfície dos dentes, por exemplo, os principais colonizadores precoces ou primários são *Streptococcus* e *Actinomyces* (HOW, SONG e CHAN, 2016). Alguns estudos demonstraram que os principais agentes etiológicos da doença periodontal são geralmente bastonetes Gram-negativos, incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *P. gingivalis* (BARDAJÍ et al., 2016). Nenhuma dessas espécies microbianas causam os eventos destrutivos envolvidos na progressão da doença sozinhos, porque a etiologia requer interação concertada entre esses membros para que eles possam estabelecer seus nichos na cavidade bucal (HOW, SONG e CHAN, 2016).

Destaca-se portanto, a importância dos resultados encontrados com o óleo coletado no PC deste estudo, uma vez que o mesmo foi ativo contra todas as bactérias aeróbias e anaeróbias testadas. Os óleos essenciais das folhas e casca de *Inga laurina* Willd. também exibiram atividade antibacteriana relevante contra esses microrganismos bucais com valores de CIM inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FURTADO et al., 2014). Para as mesmas bactérias testadas, o óleo essencial das flores da *B. campestris* apresentou CIM's 25 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ROCHA et al., 2018). Esses resultados mostraram que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, podem estar relacionados com compostos em maior concentração ou interação sinérgica entre maiores e menores compostos na mistura.

Sendo assim, os óleos essenciais podem vir a ser constituintes de vários agentes antimicrobianos já existentes, pois estes interferem diretamente na interação entre microrganismos bucais, impedindo assim a formação de placas dentárias. Essa associação pode também minimizar os efeitos colaterais dos produtos de bochechos e ainda melhorar sua ação antimicrobiana (BARDAJÍ et al., 2016).

4.3.2 Atividade antibacteriana dos extratos e partições

Os resultados da atividade antibacteriana dos extratos e partições das folhas da *B. malifolia*, estão apresentados na Tabela 15. As bactérias foram testadas nas concentrações de 0,195 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os extratos e partições apresentaram atividade antibacteriana moderada para as bactérias aeróbias e anaeróbias testadas, com CIM variando de 100 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HOLETZ et al., 2002; RIOS e RECIO, 2005). Esse resultado se deve a presença de compostos da classe de terpenos, esteroides, fenóis e flavonoides identificados na prospecção fitoquímica, por já apresentarem promissora atividade antibacteriana contra bactérias bucais na literatura (NUNES et al., 2016; MARTINS, 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

Tabela 15: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos e partições das folhas de *B. malifolia*.

		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Bactérias	EE	EH	PA	PD	PR	CP*
Aeróbias	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	>400	>400	>400	>400	>400	0,922
	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	200	400	400	200	>400	3,688
	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	400	400	400	400	200	0,922
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	>400	>400	>400	400	>400	0,460
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	400	>400	>400	200	200	-
Anaeróbias	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	200	400	200	100	>400	-
	<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	200	>400	400	200	>400	-

*Controle positivo: dicloridrato de clorexidina; O valor de CIM $> 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ correspondeu a ausência de atividade antibacteriana dentro do intervalo das concentrações testadas. Método validado com metronidazol: *Bacteroides fragilis* (CIM = $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Bacteroides thetaiotaomicron* ($1,47 \mu\text{g mL}^{-1}$). EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.
Fonte: autora.

O extrato etanólico e a partição acetato de etila apresentaram melhores atividade antibacteriana com CIM 200 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as bactérias aeróbias e com CIM 100 a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para bactérias anaeróbias, classificadas como moderadas. A partição diclorometano apresentou atividade antibacteriana para todas as bactérias testadas com CIM 100 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, exceto para a aeróbia *S. mutans*. Enquanto as demais amostras apresentaram atividade moderada para algumas bactérias aeróbias e anaeróbias.

O estudo das partições hidroalcoólica, diclorometano e acetato de etila das folhas de *B. laevifolia* apresentaram atividade antibacteriana moderada contra bactérias bucais para a *P. gingivalis* com CIM 200 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, e o extrato etanólico e essas mesmas partições apresentaram atividade moderada para *F. nucleatum* CIM 100 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (NUNES, 2016). No estudo da *B. oxyclada*, os extratos e frações da folha, raiz e caule apresentaram atividade boa e moderada com CIM 25 a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a bactéria *P. gingivalis*. Enquanto para as outras bactérias algumas frações apresentaram atividade moderada com CIM = $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MARTINS, 2018). Em comparação com estes resultados, a *B. malifolia* apresentou melhores resultados contra as bactérias bucais testadas.

4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.4.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais

Os óleos essenciais da *B. malifolia* também foram avaliados com relação à atividade anti-*Candida*, com concentrações entre 1,46 a $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados de CIM dos ensaios de atividade antifúngica contra leveduras da espécie *Candida* em diferentes períodos sazonais (seca e chuvosa) estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de leveduras da espécie *Candida* de óleos essenciais das folhas de *B. malifolia* nos períodos seco e chuvoso.

Leveduras	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	PS	PC
<i>Candida albicans</i> ATCC 28366	>3000	>3000
<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126	>3000	>3000
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	>3000	>3000

*Controle Anfotericina; -: não testadas; O valor de MIC > 3000 mg mL^{-1} correspondeu a ausência de atividade antifúngica. Método validado com anfotericina: *Candida krusei* (CIM = 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Candida parapsilosis* (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). PS: período de seca, PC: período de chuva.

Fonte: autora.

Os óleos do PS e PC não apresentaram atividade contra as leveduras do tipo *Candida*, dentro do intervalo de concentrações testadas. Os valores de CIM foram maiores que 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Neste caso, a variação qualitativa e quantitativa na composição do óleo promovida pela sazonalidade, não influenciou na inibição destas leveduras. É possível sugerir que a ausência de atividade observada esteja relacionada com uma concentração não suficiente de ácidos orgânicos, terpenos e compostos fenólicos que possam contribuir para a inibição dessas espécies de fungo (SILVA et al., 2012; LANG e BUCHBAUER, 2012).

Até o momento, somente o estudo do óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* exibiram atividade antifúngica com CIM = 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Candidas* (NUNES, 2016). Entretanto, outro estudo com óleo essencial de flores da *B. campestris*, contra as mesmas espécies de *Candida* não apresentaram atividade, com CIM >3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SOUSA, 2018). Estudos de óleos essenciais contra fungos da espécie *Candida* com (CIM \leq 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) podem ser considerados relevantes (LANG e BUCHBAUER, 2012).

4.4.2 Atividade antifúngica dos extratos e partições

Os resultados da atividade anti-*Candida* para os extratos e partições das folhas da *B. malifolia* estão apresentados na Tabela 17, foram testadas com concentrações entre 1,46 a 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 17: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de leveduras da espécie *Candida* de extratos e partições das folhas de *B. malifolia*.

Amostras	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 28366	<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803
EE	46,87	23,43	93,74
EH	>3000	>3000	>3000
PA	46,87	187,50	93,74
PD	93,74	93,74	46,87
PR	46,87	11,72	46,87

*Controle Anfotericina; O valor de MIC > 3000 mg / mL correspondeu a ausência de atividade antifúngica. Método validado com anfotericina: *Candida krusei* (CIM = $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Candida parapsilosis* ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: autora.

Pode-se observar que as amostras EE, PA, PD e PR apresentaram melhores resultados de CIM. Segundo Kuete (2010) os extratos de vegetais podem ser classificados como significantes, quando o valor da CIM é inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; moderados para CIM entre 100 a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$ e fracos quando CIM é superior a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, todas as amostras apresentaram atividade significativa para todas as espécies de *Candida* testadas com CIM 11,72 a $187,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, exceto o extrato hexânico que não inibiu na concentração do teste com CIM $>3000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Diferentes metabólitos secundários mostraram bons resultados contra espécies de *Candida* como terpenos, saponinas, alcaloides, ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas e taninos (NEGRI et al., 2014; TEODORO et al., 2015; LU et al., 2017). As amostras PA, PD e PR deste estudo apresentaram compostos como terpenos, esteroides, fenóis, flavonoides e taninos condensados, que podem ser responsáveis pela promissora atividade antifúngica.

As amostras EE e PR mostraram resultados muito significantes contra *C. glabrata* com CIM 23,43 e $11,72 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estudos com extratos etanólicos das folhas de *B. laevifolia* apresentaram CIM 31,2 a $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; CIM 187,5 a $375,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a partição acetato de etila e CIM 93,7 a $375,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a partição *n*-butanol para todas as espécies de *Candida* testadas (NUNES, 2016).

A partição acetato de etila das folhas da *B. argiophylla* mostrou bom potencial antifúngico contra todas as espécies testadas com CIM's entre 93,75 e $11,72 \mu\text{g mL}^{-1}$,

sendo este efeito relacionado com a presença de compostos flavonoides (OLIVEIRA, 2016). Outro estudo de extrato, em que a partição *n*-butanol do caule *B. oxyclada*, que possui taninos condensados, apresentou atividade antifúngica promissora principalmente para *Candida tropicalis* (CIM = 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (MARTINS, 2018).

4.5 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

4.5.1 Inibição enzimática dos óleos essenciais

A Tabela 18 mostra a porcentagem de inibição da α -amilase, α -glicosidase e anti-glicação dos óleos do PS e PC. Os resultados não foram satisfatórios, pois a porcentagem de inibição foi muito baixa.

Tabela 18: Porcentagem de inibição enzimática das hidrolases glicosídicas e glicação dos óleos essenciais da *B. malifolia*.

Amostras	% Inibição (1 mg mL^{-1})		
	α -amilase	α -glicosidase	anti-glicação
Ác. Ascórbico*	-	-	100 \pm 0,0
Acarbose*	99,9 \pm 1,2	87,4 \pm 4,8	-
PS	14,3 \pm 3,0	9,3 \pm 3,1	NI
PC	7,9 \pm 3,6	6,6 \pm 1,6	NI

*Controle positivo; NI: não inibiram; Período seco (PS); Período chuvoso (PC).

Fonte: a autora.

Estudos com o óleo essencial da *Sabina chinensis* cv. Kaizuca (SCK), produziu uma inibição da α -amilase dependente da concentração. As taxas inibitórias nas concentrações de 2 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram 4,5 e 6,6%, respectivamente. Quando a concentração foi de 1 mg mL^{-1} , a taxa inibitória atingiu 86,2% que indicou que possuía potencial atividade inibitória da α -amilase. O óleo apresentou maior teor de compostos sesquiterpenoides que podem ser responsáveis pela atividade (GUA et al., 2018). Foi utilizada a mesma concentração da amostra da *B. malifolia*, porém o óleo essencial da espécie não conseguiu inibir as enzimas em estudo. Um dos principais fatores da não inibição, poderia ser pelo óleo não apresentar compostos sesquiterpenoides.

4.5.2 Inibição enzimática dos extratos e partições

Os resultados da inibição da α -amilase, α -glicosidase e anti-glicação de extratos e partições de folhas da *B. malifolia* estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Porcentagem de inibição enzimática das hidrolases glicosídicas e glicação dos extratos e partições das folhas da *B. malifolia*.

Amostras	% Inibição (1 mg mL ⁻¹)		
	α -amilase	α -glicosidase	anti-glicação
Ác. Ascórbico*	-	-	100 ± 0,0
Acarbose*	99,9 ± 1,2	87,4 ± 4,8	-
EE	5,4 ± 4,5	8,9 ± 1,5	92,2 ± 0,1
EH	3,0 ± 1,2	11,1 ± 6,0	NI
PA	15,6 ± 11,9	5,9 ± 5,3	91,4 ± 0,6
PD	17,8 ± 8,3	0,4 ± 0,6	45,6 ± 2,0
PR	37,3 ± 14,8	13,5 ± 1,7	94,8 ± 0,3

*Controle positivo; NI: não inibiram; EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: a autora.

Os resultados de extratos e partição para inibição das hidrolases glicosídicas foram muito baixos, com isso não foi possível calcular o CI₅₀ dessas amostras. Entretanto os valores para anti-glicação foram significantes para EE, PA e PR, pois apresentaram porcentagem de glicação acima de 90% próximos do valor do controle ácido ascórbico (100 ± 0,0), porém o CI₅₀ não foi determinado para essas amostras.

Estudos do extrato etanólico das folhas da *B. argyrophylla*, que possui uma maior quantidade de compostos fenólicos, apresentou inibição acima de 90% sobre a α -amilase (CI₅₀ = 2,89 ± 0,1 µg mL⁻¹), em relação ao controle positivo acarbose (CI₅₀ = 0,08 ± 0,1 µg mL⁻¹), e baixa atividade sobre a α -glicosidase (OLIVEIRA, 2016). Estes resultados podem ser justificados devido a estrutura destas biomoléculas, que apresentam muitos grupos fenólicos, que podem contribuir para a inibição enzimática, uma vez que a diminuição da atividade enzimática depende do número e da posição da hidroxila nesses grupos (ROHN, RAWEL e KROLL, 2002).

4.6 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA E CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES

É muito importante o estudo da descoberta de novos princípios ativos para o tratamento das doenças negligenciadas. Outro fator de grande relevância quando buscase novos compostos para princípios ativos de novos fármacos é a toxicidade destas substâncias. O ensaio inicial é a citotoxicidade *in vitro*, que têm como objetivo colocar a substância em contato direto com a cultura de células, permitindo avaliar a toxicidade do material (MARTINS, 2012).

Por isto, foram testados os extratos e partições das folhas da *B. malifolia* frente ao protozoário *Leishmania amazonensis* e para a citotoxicidade frente à cultura de células Vero. Estas avaliações foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo, com utilização como agente revelador a resazurina. Os resultados antileishmania foram expressos em valor de CI_{50} (concentração inibitória de 50% dos protozoários) e os de células foram expressos em CC_{50} (concentração citotóxica de 50%), estes estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Atividade antileishmania e citotoxicidade dos extratos e partições das folhas de *B. malifolia*.

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	<i>Leishmania amazonensis</i>	Célula Vero
EE	>512	259,4 \pm 0,01
EH	>512	156,3 \pm 0,02
PA	195,5 \pm 0,12	84,15 \pm 0,03
PD	>512	147,1 \pm 0,02
PR	>512	492,7 \pm 0,04
Anfotericina B	0,29 \pm 0,01	-

EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: a autora.

Para a atividade antileishmania, quanto menor o valor de CI_{50} (concentração inibitória de 50% dos protozoários) melhor a atividade (CHIBALE et al., 2007). Isto significa que é necessária uma menor concentração das substâncias para inibir 50% dos protozoários. Neste sentido, a partição acetato de etila foi a que apresentou o melhor resultado, com uma concentração de 195,5 \pm 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, para as outras amostras o resultado determinado atingiu a máxima concentração de 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em que nestas concentrações já estavam causando morte de 100% dos protozoários.

Outros estudos dentro do gênero, as frações hexano do caule, diclorometano da raiz e do caule da *B. oxyclada* apresentaram altos valores de ($CI_{50} = 270 \pm 36 \mu\text{g mL}^{-1}$; $370 \pm 15 \mu\text{g mL}^{-1}$; $453 \pm 26 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) contra leishmania (MARTINS, 2018). Para a *B. laevifolia* a partição acetato de etila e hexano também apresentam valores altos de CI_{50} 346 ± 11 e $362 \pm 24 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente contra leishmania (NUNES, 2016). Estes resultados mostraram que ainda não são promissores, devido a alta concentração inibitória necessária para inibir 50% desse protozoário.

Na determinação da concentração citotóxica, quanto maior o valor de CC_{50} menor é a toxicidade das amostras. Desta forma analisando os dados da Tabela 20, a fração mais tóxica encontrada é a partição acetato de etila ($CC_{50} = 84,15 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto a partição residual aquosa apresentou baixa toxicidade ($CC_{50} = 492,7 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esta alta toxicidade indica que elas são candidatas menos promissoras para possíveis isolamentos de substâncias, visto que suas composições apresentam citotoxicidade.

Foi feita uma comparação entre as atividades biológicas com a citotoxicidade para calcular o índice de seletividade (IS), em que nos permite classificar as amostras testadas em mais ativas ou mais citotóxicas. Nessa análise, considera-se que quanto mais positivo for o IS a amostra é mais ativa do que citotóxica, e quanto mais negativo for o IS a amostra é mais citotóxica do que ativa (CASE et al., 2006). Desta maneira, o IS foi calculado para as amostras que apresentaram melhores atividades (Tabela 21).

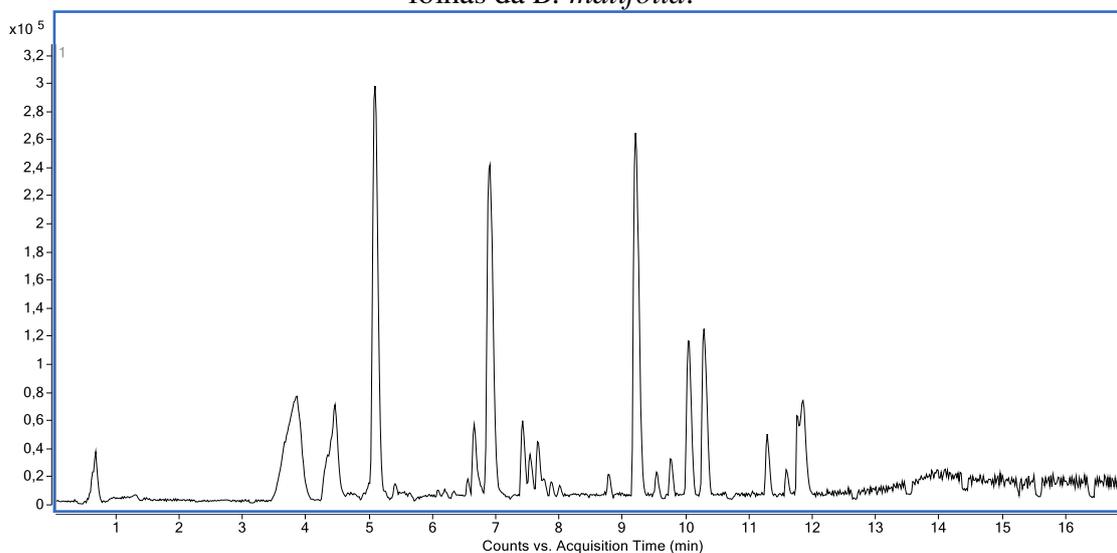
De acordo com a Tabela 21, na atividade contra *C. glabrata* a amostra que demonstrou ser mais ativa foi a partição residual aquosa. Para a atividade contra *F. nucleatum* a amostra mais ativa foi à partição diclorometano, porém as frações estavam com valores muito próximos da PD. No sequestro do radical DPPH, a amostra de maior potencial foi à partição residual aquosa. E para a atividade antileishmania, as amostras não demonstraram atividade pois os resultados foram negativos o que sugerindo que são mais citotóxicas que ativas.

Sendo assim, e de forma geral, a partição residual aquosa apresentou boa atividade antifúngica ($CIM = 11,72 \mu\text{g mL}^{-1}$) e menor citotoxicidade ($CC_{50} = 492,7 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$). Enquanto a partição acetato de etila apresentou melhor atividade antioxidante ($CE_{50} = 2,91 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, melhor atividade antileishmania ($CI_{50} = 195,5 \pm 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$), porém essa amostra mostrou alta toxicidade ($CC_{50} = 84,15 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$). Com isso, a PR é a mais indicada para as análises de fracionamento e isolamento de substâncias ativas do que a PA, mesmo que tenha apresentado bons resultados nas atividades leishmania e antioxidantes testadas.

4.7 ANÁLISE DE CLAE-EM-IES

A partição residual (PR) aquosa apresentou um melhor resultado para a atividade antifúngica e baixa citotoxicidade. Assim, esta partição foi analisada por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e sugerida uma proposta de composição desta partição. Seus cromatogramas estão apresentados na Figura 43, e as propostas de composição na Tabela 22.

Figura 43: Cromatograma da análise por CLAE-EM da partição residual aquosa das folhas da *B. malifolia*.



Fonte: a autora.

Na Figura 44 estão apresentados as estruturas dos compostos identificados nas partição residual aquosa das folhas da *B. malifolia*.

Tabela 21: Índice de seletividade (IS) para extratos e partições para as atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante e antileishmania.

Amostra	Citotoxicidade (Célula Vero; CC50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Atividade antifúngica (<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126)		Atividade antibacteriana (<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586)		Atividade antioxidante (DPPH)		Atividade antileishmania (<i>Leishmania amazonenses</i>)	
		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IS	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IS	CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IS	CI ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IS
		EE	259,40 \pm 0,01	23,43	1,04	200,00	0,13	5,82 \pm 0,18	1,65
EH	156,30 \pm 0,02	>3000	-1,28	400,00	-0,41	104,81 \pm 0,38	0,17	>512,00	-0,51
PA	84,150 \pm 0,03	187,50	-0,34	200,00	-0,38	2,91 \pm 0,02	1,46	196,00 \pm 0,12	-0,36
PD	147,10 \pm 0,02	93,74	0,19	100,00	-0,17	16,70 \pm 0,03	0,94	>512,00	-0,54
PR	492,70 \pm 0,04	11,72	1,62	>400,00	0,10	3,64 \pm 0,10	2,13	>512,00	-0,02

Nota: EE: extrato etanólico, EH: extrato hexano, PA: partição acetato de etila, PD: partição diclorometano, PR: partição residual aquosa.

Fonte: a autora.

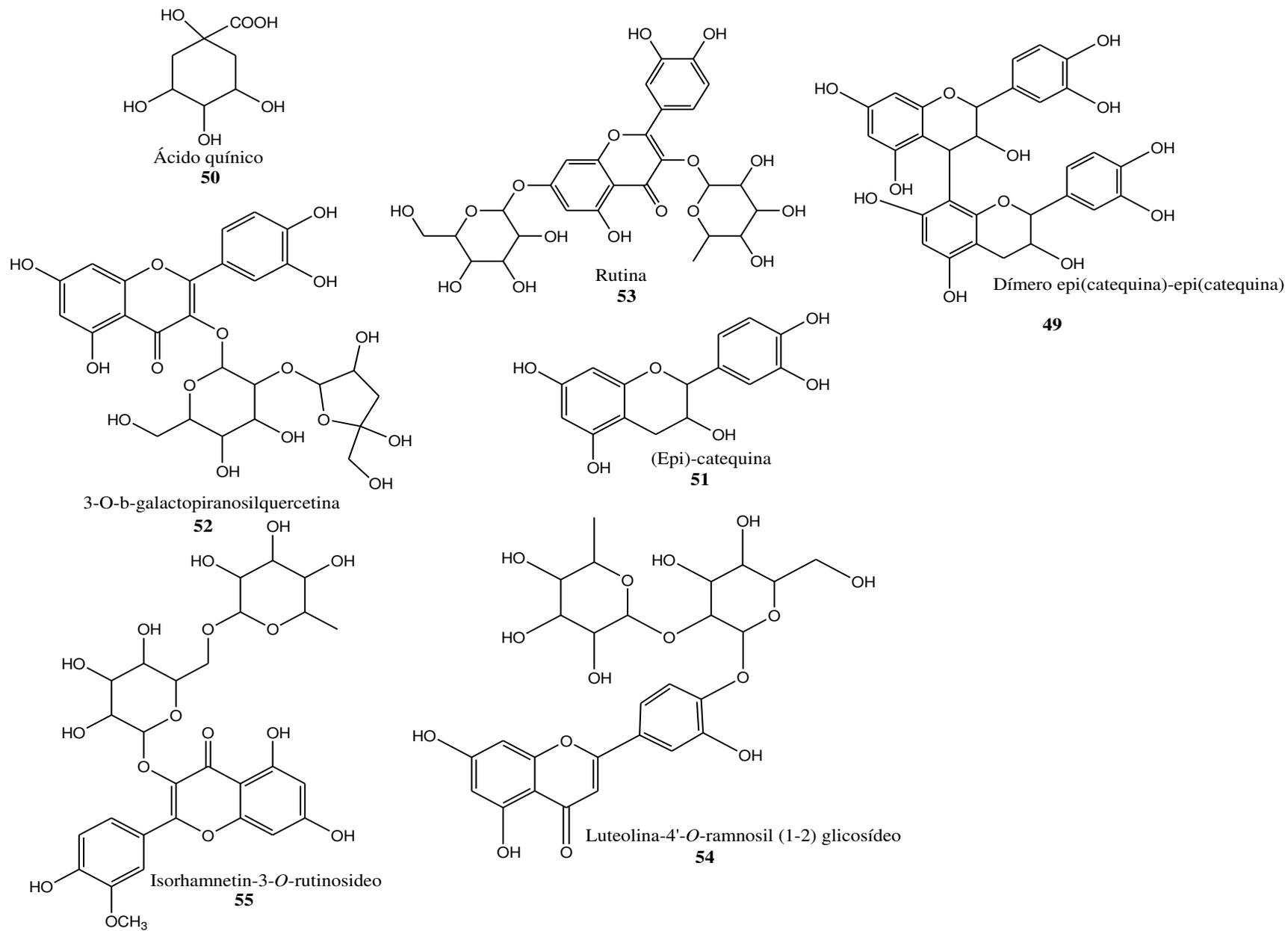
Tabela 22: Proposta de composição para a partição residual aquosa das folhas da *B. malifolia*.

Número	T _R (min)	[M-H] ⁻	Compostos	Fragmentos (m/z) MS ²	Δ _m (ppm)	Referência
48	0,685	377,0878	N.I	341,191(100),179	-	-
49	3,548	577,1343	Dímero (epi)-catequina-(epi)-catequina	425,407,289(100),125	-1,38	2
50	4,297	191,0560	Ácido quínico	173,127(100)	-0,52	1
49	4,497	577,1349	Dímero (epi)-catequina-(epi)-catequina	425,407,289(100),125	-0,35	2
51	5,213	289,0721	(Epi)-catequina	245(100),203,179,151	1,04	3
52	6,694	595,1318	3- <i>O</i> -β-galactopiranosilquercetina	451,417,341,300(100)	2,18	4,5
53	6,961	609,1467	Rutina	300(100),301	0,98	6
54	7,477	593,1505	Luteolina-4'- <i>O</i> -ramnosil (1→2) glicosideo	285(100)	-1,84	7
55	7,560	623,1620	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosideo	315(100),271	0,32	8,9
56	7,693	667,2412	N.I	505(100),381,341,289	-	-
57	9,208	667,2395	N.I	505(100),381,	-	-
58	10,057	1045,4103	N.I	883(100),721	-	-
59	10,290	1045,4096	N.I	883(100),721	-	-
60	11,305	1045,4104	N.I	883(100),721	-	-
61	11,572	1197,4199	N.I	1027,865,169(100)	-	-
62	11,905	1045,4096	N.I	883(100),721	-	-

Nota: N.I: não identificado; **1-** (MASIKE et al., 2017); **2-** (GOUVEIA et al., 2013); **3-** (ABU-REIDAH et al., 2015); **4-** (SILVA et al 2015); **5-** (NUNES, 2016); **6-** (SONIBARE et al., 2018); **7-** (ZHAO et al., 2014); **8-** (JIA et al., 2017); **9-** (CHEN et al., 2015).

Fonte: a autora.

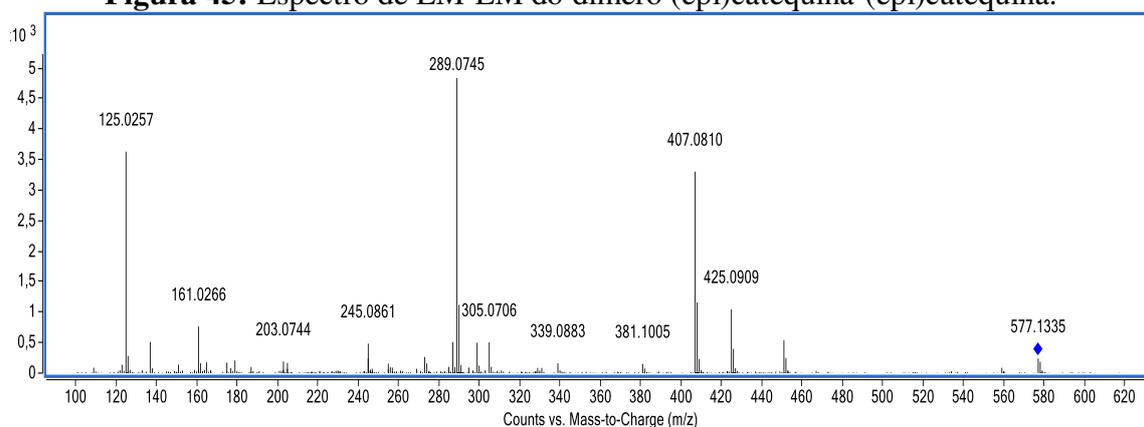
Figura 44: Estrutura dos compostos identificados na partição residual aquosa.



Fonte: a autora.

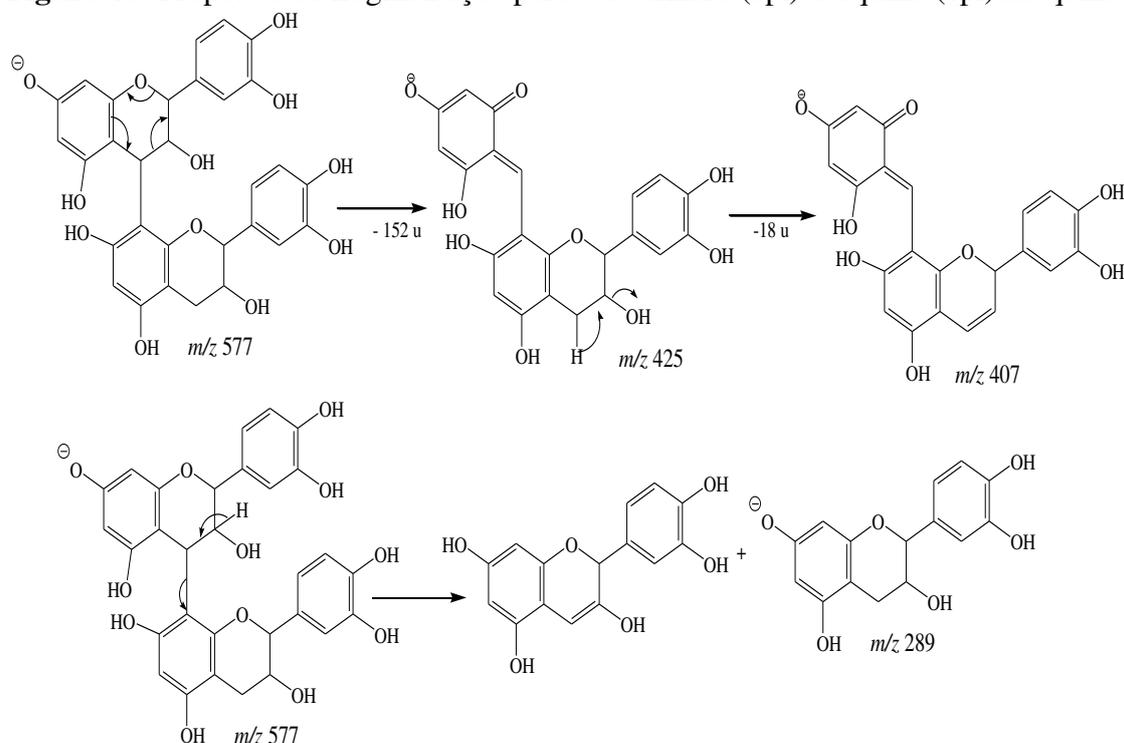
De acordo com os dados da Tabela 22 observa-se a presença de ácidos orgânicos como o ácido quínico (**50**); compostos na classe dos flavonoides, como o flavan-3-ol ((epi)-catequina (**51**)); flavonóis como 3-*O*- β -galactopiranosilquercetina (**52**), rutina (**53**), luteolina-4'-*O*-ramnosil (1 \rightarrow 2) glicosídeo (**54**) e o isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo (**55**), e taninos condensados como o dímero (epi)-catequina-(epi)-catequina (**49**). Para a identificação dos compostos foram realizados os espectros de EM-EM e propostos os mecanismos de fragmentação, apresentados nas Figuras 45 a 58.

Figura 45: Espectro de EM-EM do dímero (epi)catequina-(epi)catequina.



Fonte: a autora.

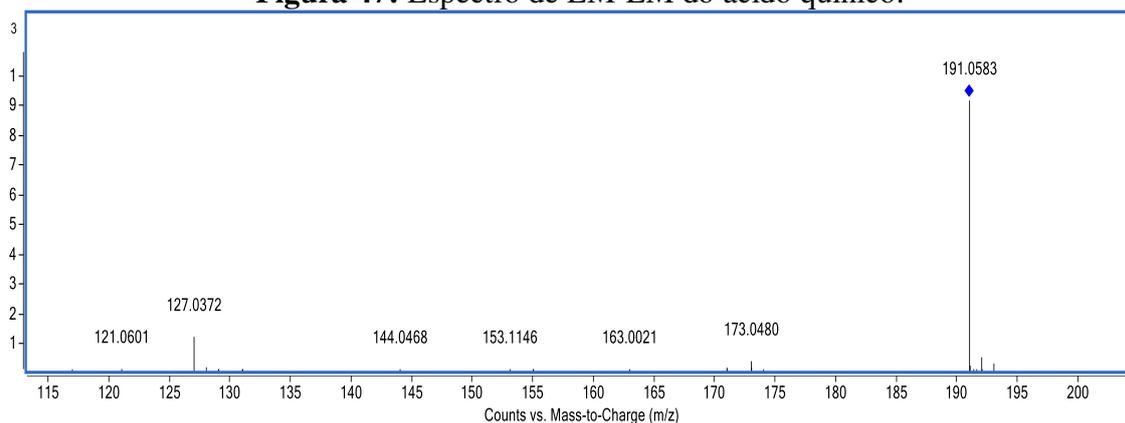
Figura 46: Propostas de fragmentação para o do dímero (epi)catequina-(epi)catequina.



Fonte: (GOUVEIA et al., 2013).

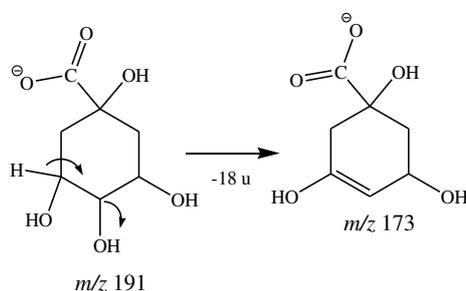
O mecanismo da fragmentação por RDA (retro-Diels-Alder) do dímero m/z 577 (Figura 46) produziu majoritariamente íons com m/z 425 ($[M - H - 152]^-$) e o íon com m/z 407 ($[M - H - 152 - 18]^-$), que resultam da eliminação de uma molécula de água a partir dos íons com m/z 425. O íon com m/z 289 ($[M - H - 288]^-$) resulta da eliminação de uma molécula de (epi)catequina (GOUVEIA et al., 2013).

Figura 47: Espectro de EM-EM do ácido quínico.



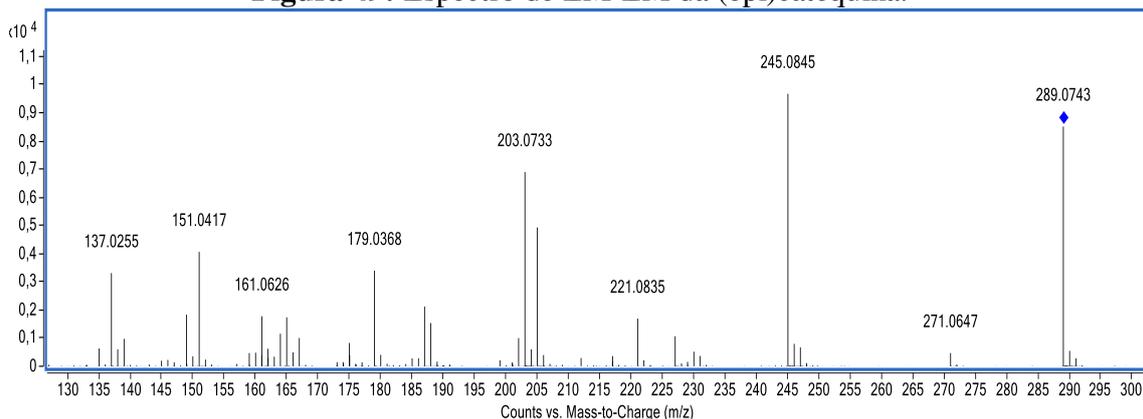
Fonte: a autora.

Figura 48: Proposta de fragmentação para o ácido quínico.

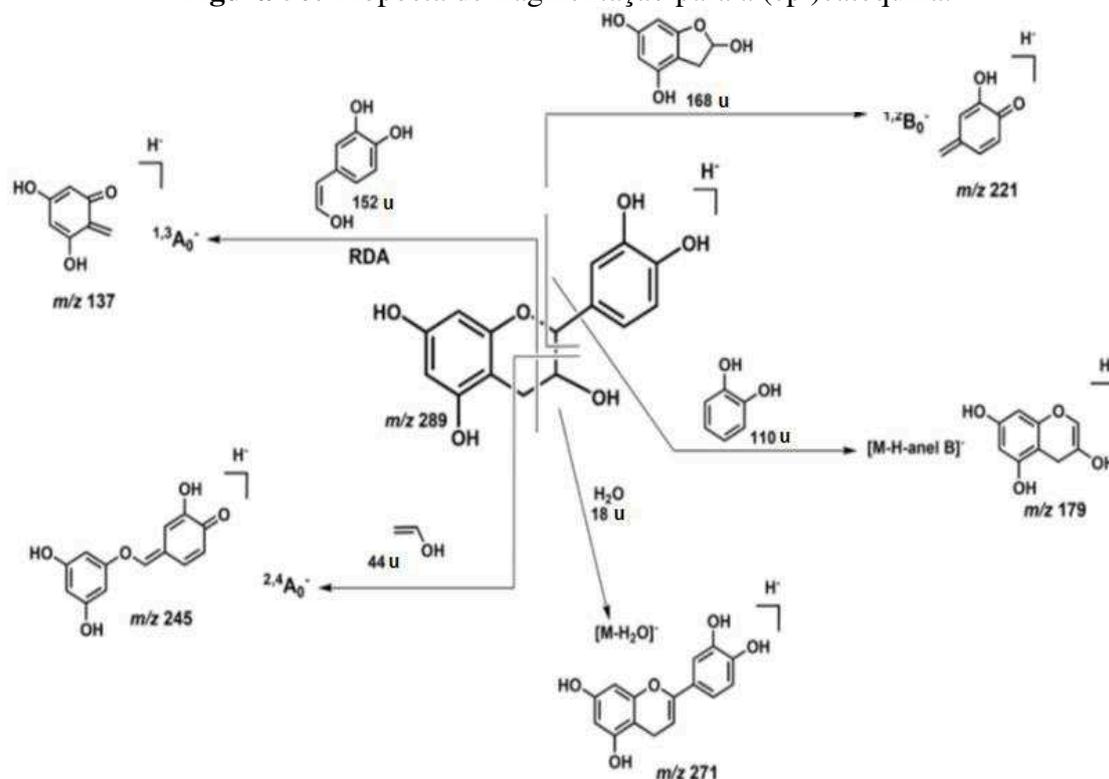


Fonte: MASIKE et al. (2017).

O íon molecular m/z 191 sugere a presença de ácido quínico pois apresenta íons adicionais, sendo o íon m/z 127 o pico base, diferenciando-o de outros ácidos com espectro parecido (MASIKE et al., 2017).

Figura 49: Espectro de EM-EM da (epi)catequina.

Fonte: a autora.

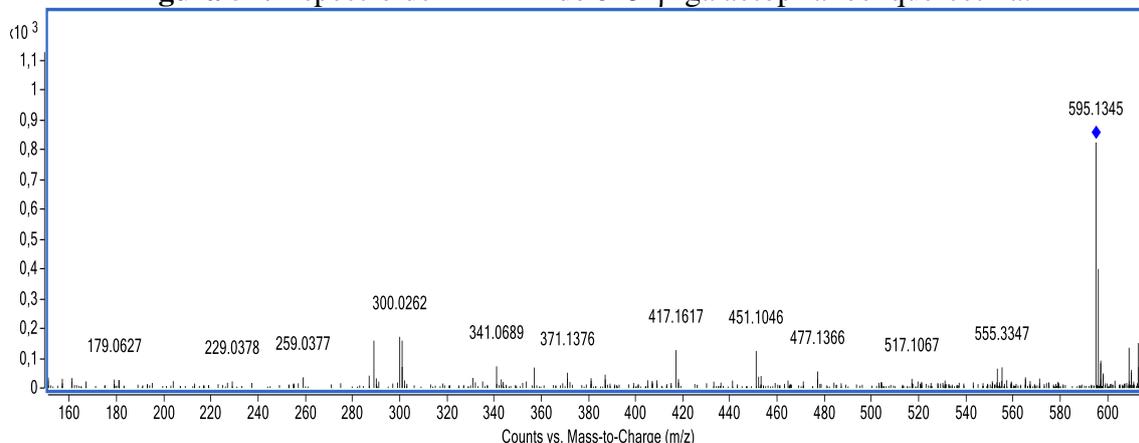
Figura 50: Proposta de fragmentação para a (epi)catequina.

Fonte: SOUSA, 2015.

A clivagem heterolítica entre os anéis B e C resultou na formação do íon m/z 179, quando a carga estiver retida no fragmento do anel A-C. A proposta de clivagem do anel C através de um mecanismo RDA levou a formação dos íons m/z 137 e 151, quando a carga estiver retida no fragmento do anel A ou B, respectivamente. A clivagem heterocíclica com eliminação neutra do enol ($\text{CH}_2=\text{CHOH}$) leva a formação do íon do sinal de m/z 245 com retenção da carga negativa no anel A ou formação de um novo

heterocíclico, com a carga dispersa no anel B (SOUSA, 2015; OLIVEIRA, 2016; ABU-REIDAH et al., 2015).

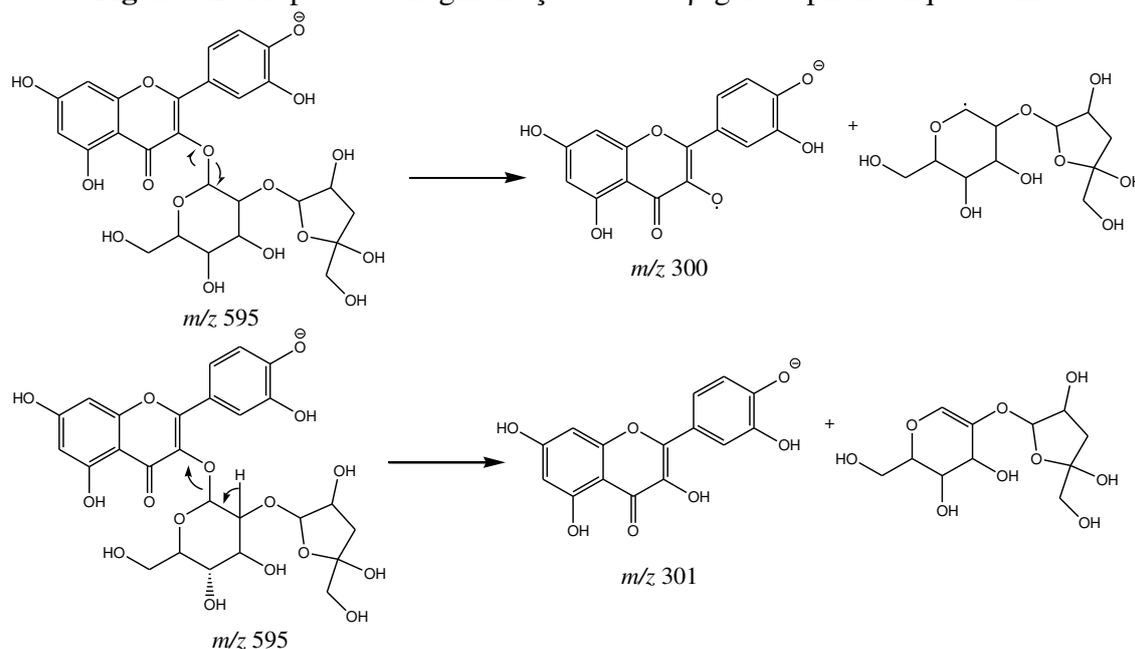
Figura 51: Espectro de EM-EM do 3-*O*-β-galactopiranosilquercetina.



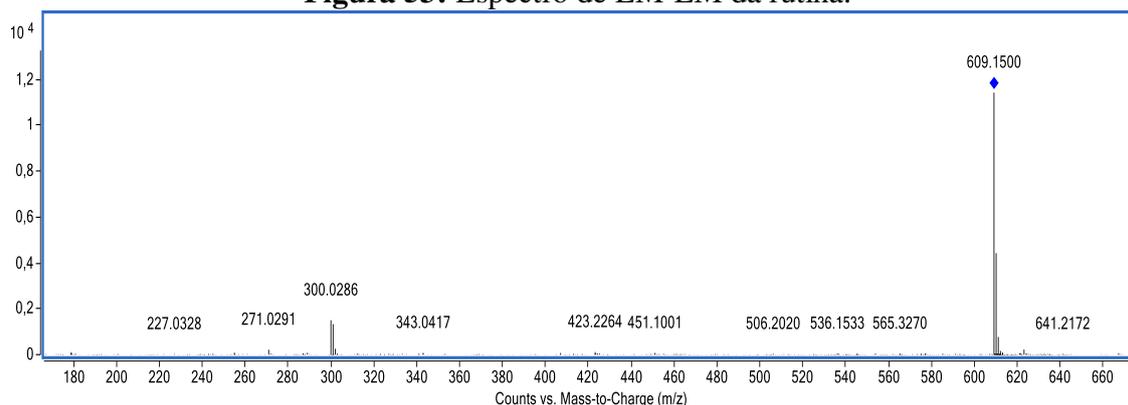
Fonte: a autora.

O composto que apresentou o íon molecular m/z 595 e íons fragmentados m/z 555, 471, 451, 341 e o pico base de 300 foi identificado como 3-*O*-β-galactopiranosilquercetina (calculado para C₂₆H₂₇O₁₆, MM = 595,1305, erro 2,18 ppm) (Figura 51). O espectro apresentou as fragmentações, o íon m/z 300 que pode ser atribuído a quebra homolítica da ligação do açúcar entre a quercetina, carbono anomérico (m/z 300) e pela quebra heterolítica formando o (m/z 301) (SILVA, et al., 2015).

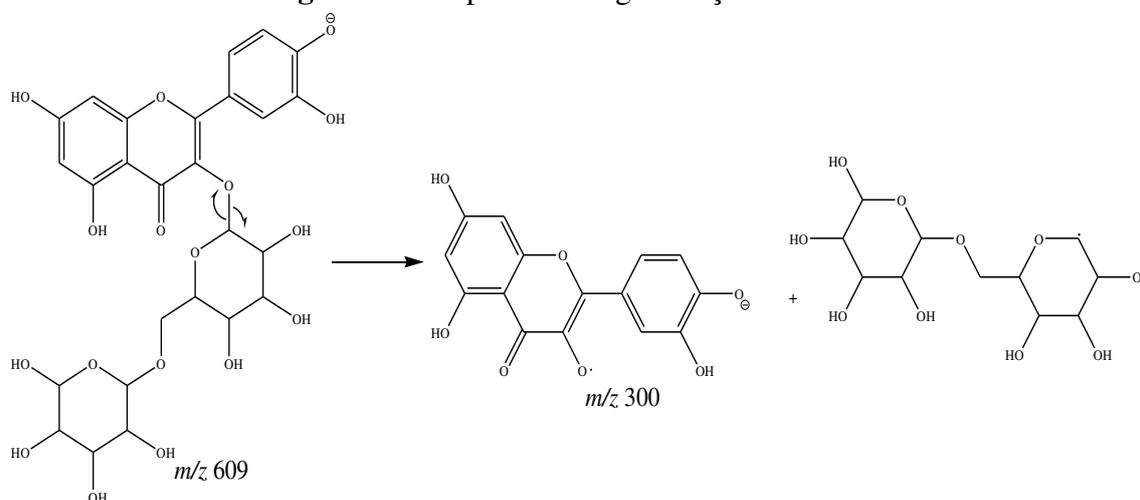
Figura 52: Proposta de fragmentação da 3-*O*-β-galactopiranosilquercetina.



Fonte: SILVA et al. (2015).

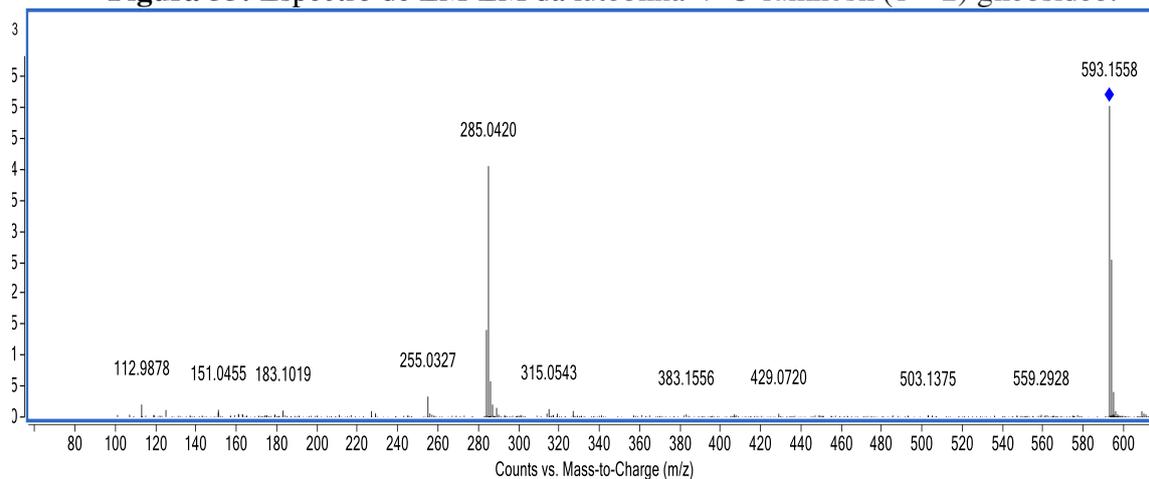
Figura 53: Espectro de EM-EM da rutina.

Fonte: a autora.

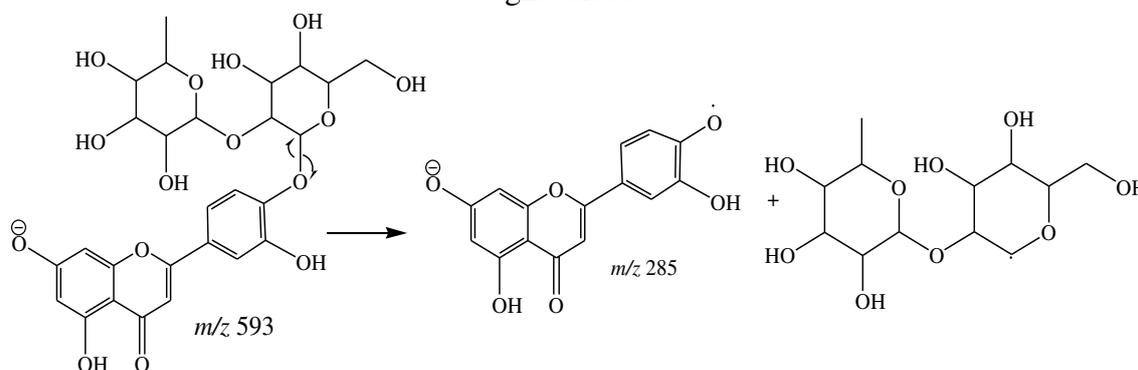
Figura 54: Proposta de fragmentação da rutina.

Fonte: SONIBARE et al., (2018).

A rutina é conhecida também por quercetina 3-*O*-rutinosídeo, e que apresenta o íon molecular m/z 609. O seu padrão de fragmentação é semelhante à quercetina ligado a um açúcar, onde ocorre uma cisão homolítica e formando o íon aglicona m/z 300 e o açúcar (Figura 54) (SONIBARE et al., 2018).

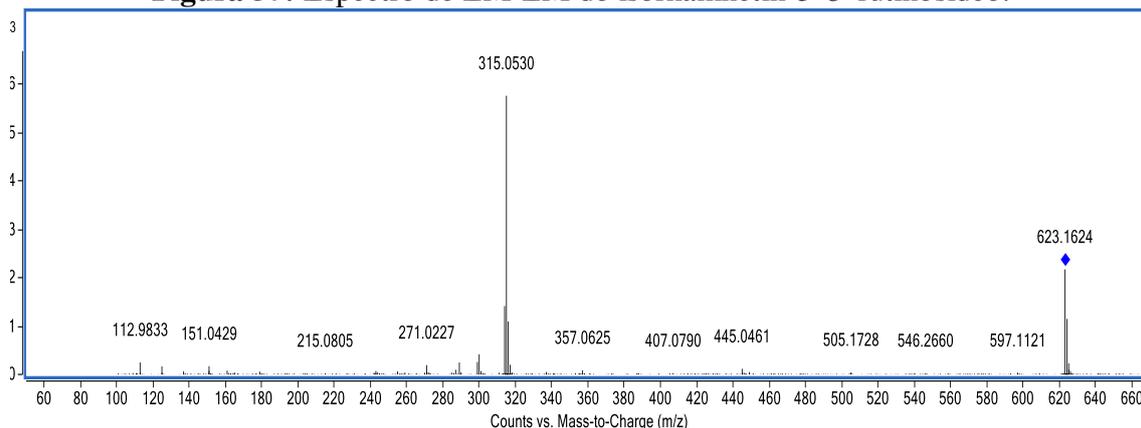
Figura 55: Espectro de EM-EM da luteolina-4'-O-ramnosil (1→2) glicosídeo.

Fonte: a autora.

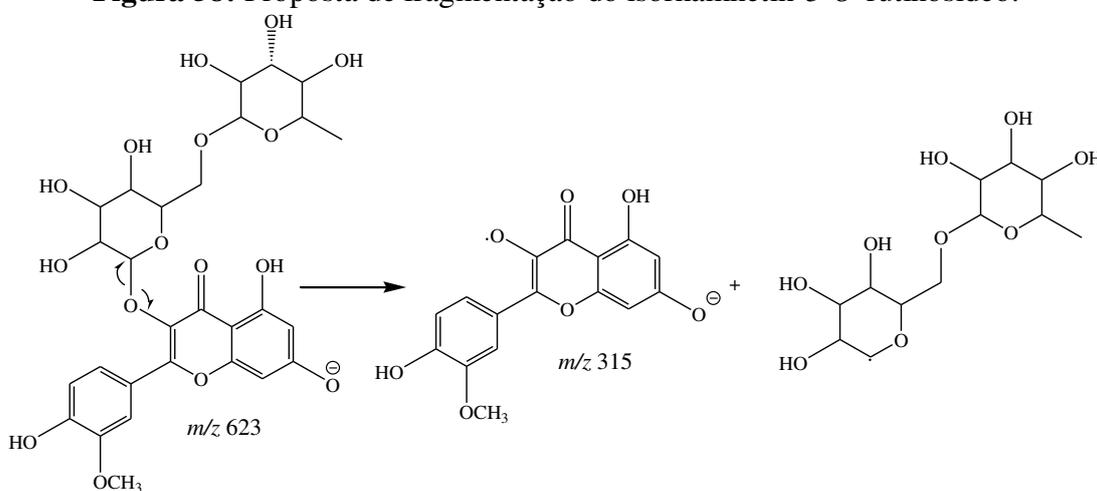
Figura 56: Proposta de fragmentação para a luteolina-4'-O-ramnosil (1→2) glicosídeo.

Fonte: ZHAO et al. (2014).

Este composto apresenta o íon molecular m/z 593. O seu padrão de fragmentação é semelhante à quercetina ligado a um açúcar, onde ocorre uma cisão homolítica formando o íon aglicona, pico base m/z 285 e o açúcar (Figura 56) (ZHAO et al., 2014).

Figura 57: Espectro de EM-EM do isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo.

Fonte: a autora.

Figura 58: Proposta de fragmentação do isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo.

Fonte: JIA et al. (2017); CHEN et al. (2015).

Este composto apresenta o íon molecular m/z 623. O seu padrão de fragmentação é semelhante à quercetina ligado a um açúcar, onde ocorre uma cisão homolítica formando o íon aglicona m/z 315, como pico base, e o seu açúcar correspondente (Figura 60) (CHEN et al., 2015).

Esses compostos identificados por CLAE-EM na amostra PR, são da classe dos ácidos orgânicos, alguns flavonoides (como flavanol e flavonóis do tipo glicosilados) e os taninos condensados. Alguns destes compostos já foram encontrados no gênero da planta em estudo (NUNES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018; MARTINS, 2018), o que justifica sua atividade antioxidante, visto que todos estes compostos possuem este caráter antioxidante. Entretanto, nesta espécie esses compostos são todos inéditos, sendo que os compostos luteolina-4'-*O*-ramnosil (1→2) glicosídeo e isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo, foram encontrados somente nesta espécie dentro do gênero.

5. CONCLUSÃO

O óleo essencial das folhas da *B. malifolia* apresentou em sua composição substâncias das classes dos álcoois, ácidos carboxílicos, alcanos, aldeídos, cetonas e dos terpenoides. O óleo do Período Seco (PS) apresentou como compostos majoritários o Fitol (**41**) e o Hexaidrofarnesil-acetona (**45**) dentro dos terpenoides com (25,19%) na sua composição. Além desses compostos foram encontrados o álcool (Z)- hex-3-enol (**44**) (17,99%), o Ácido palmítico (**46**) (10,62%) e o alcano linear Hexatriacontano (**47**) (18,43%). No óleo do período chuvoso (PC) foram encontrados o Fitol (**41**) (52,70%) e o (Z)-hex-3-enol (**44**) (26,22%) como compostos majoritários, constituindo-se em 78,92% do óleo extraído, evidenciando o efeito da sazonalidade na composição dos óleos.

O óleo essencial do período chuvoso apresentou atividade moderada contra todas as bactérias aeróbias e anaeróbias testadas, com CIM 100 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o óleo do período seco apresentou atividade moderada somente para as bactérias aeróbias *S. mitis* e *A. actinomycetemcomitans* e para a anaeróbia *A. naeslundii* (CIM = 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os óleos do período chuvoso e período seco não apresentaram atividade contra as leveduras do tipo *Candida*, dentro do intervalo de concentrações testadas, com valores de CIM maiores que 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A porcentagem de inibição da α -amilase, α -glicosidase dos óleos essenciais não foram satisfatórios, pois a porcentagem de inibição foi muito baixa, com $14,3 \pm 3,0$; $9,3 \pm 3$ % para o período seco e $7,9 \pm 3,6$; $6,6 \pm 1,6$ % para o período chuvoso, respectivamente. E para a atividade anti-glicação, os óleos do período seco e chuvoso não inibiram na concentração testada.

A avaliação sazonal dos óleos essenciais foi importante, pois o óleo do período chuvoso mostrou melhor atividade em comparação com o óleo do período seco. A interação sinérgica dos compostos no período chuvoso foi melhor do que no período seco contra as bactérias.

A prospecção fitoquímica dos extratos e partições das folhas de *B. malifolia* colhidas no período seco indicou a presença de terpenos, esteroides, taninos, fenóis, flavonoides.

A partição acetato de etila mostrou um maior teor de fenóis totais e proantocianidinas, enquanto a partição diclorometano apresentou o maior teor de flavonoides. Já a partição aquosa residual mesmo que apresentou baixo valor de fenóis,

teve boa atividade antioxidante como a partição de acetato, isso pode ter sido causado pelo uso de reagente vencido no teste de fenóis.

A atividade antibacteriana de todos os extratos e partições, apresentaram atividade moderada para a bactéria aeróbia *S. sanguinis* com CIM 200 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e para a bactéria anaeróbia *F. nucleatum* com CIM 100 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A atividade antifúngica também foi promissora, em que os extratos e partições apresentaram atividade com CIM variando de 11,72 a 187,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partição residual aquosa foi a que apresentou o melhor resultado com CIM 11,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o fungo *C. glabrata*.

Os extratos e partições não inibiram as enzimas da α -amilase, α -glicosidase pois apresentaram porcentagens muito baixas, com isso não foi possível calcular o IC_{50} dessas amostras. Entretanto os valores para anti-glicação foram significantes para EE, PA e PR, pois apresentaram porcentagem de glicação acima de 90% próximos do valor do controle ácido ascórbico ($100 \pm 0,0$), porém o CI_{50} também não foi determinado para essas amostras.

Para atividade antileishmania, a partição acetato de etila apresentou a menor CI_{50} com $195,5 \pm 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, porém mostrou alta citotoxicidade para a Célula Vero com CC_{50} $84,15 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com o cálculo do IS, comparando a atividade com a citotoxicidade, a partição residual aquosa foi a mais ativa e menos citotóxica dos que as outras partições e extratos, por isso é a mais indicada para futuros processos de fracionamento e isolamento de compostos bioativos.

A análise de CLAE-EM para a partição residual aquosa identificou compostos fenólicos, que são da classe de ácidos orgânicos como o (ácido quínico); compostos na classe dos flavonoides, como o flavan-3-ol ((epi)-catequina); os flavonóis como (3-*O*- β -galactopiranosilquercetina, rutina, luteolina-4'-*O*-ramnosil (1 \rightarrow 2) glicosídeo e o isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo) e taninos condensados como o (dímero (epi)-catequina-(epi)-catequina), todos inéditos na espécie, justificando assim a boa atividade antioxidante. Destaque para os compostos luteolina-4'-*O*-ramnosil (1 \rightarrow 2) glicosídeo e o isorhamnetin-3-*O*-rutinosídeo, que foram encontrados somente nesta espécie dentro do gênero.

Desta forma, este estudo contribuiu para o conhecimento químico e biológico da *B. malifolia*.

6. REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH M. A.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 70, p. 74–86, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.023>

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil componentd by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Ed Carol Stream: Allured Business Media, 2017. 804 p.

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da índia. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.2, p.146-161, 2012.

AHMED, N. Advanced glycation end products--rolein pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.09.004>

ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais: Abordagem histórica contemporânea**. Salvador: Editora da UFBA, 2011.

<https://doi.org/10.7476/9788523212162>

ALMEIDA, S. P., PROENÇA, C. E. B., SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.

ALTOE, T. D. P. (2014) **Estudo químico-biológico de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae)**. Dissertação de mestrado em Química. Centro de ciências exatas da Universidade Federal do Espírito Santo.

ALVES-SILVA, E. Post Fire Resprouting of *Banisteriopsis malifolia* (Malpighiaceae) and the Role of Extrafloral Nectaries on the Associated Ant Fauna in a Brazilian Savanna. **Sociobiology**, v. 58, n. 2, p. 327-339, 2011.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699–705, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2010.03851.x>

ANDERSON, W. R. Floral conservatism in Neotropical Malpighiaceae. **Biotropica**, v. 11, n. 3, p. 219-223, 1979.

<https://doi.org/10.2307/2388042>

ANDRADE, N. J.; DIAS, I.; PINHEIRO, A. L.; MONTANARI, R. M.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, C. J. Chemical composition and

antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100019>

ANDRADE-CETTO, A.; CABELLO-HERNANDEZ, C.; CARDENAS-VAZQUEZ, R. Alpha-glucosidase inhibiting activity of five Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Planta Medica**, v. 79, n. 13, p. 1248–1248, 2013.

<https://doi.org/10.1055/s-0033-1352350>

AQUINO, R.; CRESCENZO, S.; SIMONE, F. Constituents of *Banisteriopsis caapi*. **Fitoterapia**, v. 62, n. 5, p. 453, 1991.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils : a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

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

<https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

BARDAJÍ, D. K.; SILVA, J. J. M.; BIANCHI, T. C.; EUGÊNIO, D. S.; OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO, L. F.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANNI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18-27, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.017>

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

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

<https://doi.org/10.3390/molecules17043989>

BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.**

Dissertação (Mestrado em Zootecnia Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido).

Patos, PB: Universidade Federal de Campina Grande, p. 62, 2008.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 528-534, 1992.

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São**

Paulo, v.50, n.2, p.67-74, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000200001>

BOLZANI, V. S.; VALLI, M.; PIVATTO, M., VIEGAS JR, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

<https://doi.org/10.1351/PAC-CON-12-01-11>

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M.; KATZ, B. Antibacterial properties of phenolic antioxidants and lipids. **Food Technology**, v. 34, p. 51-53, 1980.

BRITO, A. M. G. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., *Mentha piperita* L.** 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.

<https://doi.org/10.1038/414813a>

BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 701–708, 2013.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12091>

CARVALHO, D. A.; RODRIGUES, V. E. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, 17-35, 2007.

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, n. 1, p. 82–89, 2006.

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

CASTILHO, A. L.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; CANEZIN, P. H.; DIAS SIQUEIRA, V. L.; DE LIMA SCODRO, R. B.; CARDOSO, R. F. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 119-121, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.007>

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao Estudo das Plantas Medicinas Metabólitos Secundários, 2.ed., p. 113, 2004.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpet creeper with glyphosate. **Weed Science**, v. 49, p. 156-163, 2001.
[https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2001\)049\[0156:COLSWC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2001)049[0156:COLSWC]2.0.CO;2)

CHEN, T. L.; ZHANG, M.; LI, J. L.; SURHIO, M. M.; LI, B. B.; YE, M. Structural characterization and hypoglycemic activity of *Trichosanthes* peel polysaccharide. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*. **Food Science and Technology**, v. 70, p. 55–62, 2016.

CHEN, Y.; YU, H.; WU, H.; PAN, Y.; WANG, K.; JIN, Y.; ZHANG, C. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen *Typhae* for Transformation Rule Exploration. **Molecules**, v. 20, p. 18352-18366, 2015.
<https://doi.org/10.3390/molecules201018352>

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

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

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

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, in: 34 (Ed.), CLSI document M 27–A3. PA, Wayne, p. 27, 2008.

CONTI, R.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 43–44, 2012.
<https://doi.org/10.21800/S0009-67252012000300014>

COUTINHO, L. M. Aspectos do Cerrado: Clima. 2000. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Disponível em:
http://eco.ib.usp.br/cerrado/aspectos_clima.htm. Acesso em junho de 2018.

COUTINHO-NETO, A. A.; SILVA, P. P. A. VII Botânica no Inverno 2017/Org. Carlos Eduardo Valério Raymundo [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2017. 332 p.

CRUZ, E. M. O.; PINTO, J. A. O.; FONTES, S. S.; BLANK, M. F. A.; BACCI, L.; JESUS, H. C. R.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Water deficit and seasonality study on essential oil constituents of *Lippia gracilis* Schauer germplasm. **Science World Journal**, p. 1-9, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/314626>

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 299-315, 2015.
<https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>

DAVIS, C. C. et al. Long-term morphological stasis maintained by a plant–pollinator mutualism. **PNAS**, Washington, v. 111, n. 16, p. 5914–5919, 2014.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1403157111>

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. et al. An in vitro and in vivo study of the alpha-amylase activity of phaseolamin. **Journal Medical Food**, v. 17, n. 8, p. 915-920, 2014.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0044>

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 1629-1642, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3ed. New York: Wiley & Sons, 2009.
<https://doi.org/10.1002/9780470742761>

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.
<https://doi.org/10.3390/metabo2020303>

DINICOLANTONIO, J. J.; BHUTANI, J.; O'KEEFE, J. H. Acarbose: Safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. **Open Heart**, v. 2, 2015.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food

science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 77–112, 1998.

<https://doi.org/10.1079/BJN19980106>

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUBRAVKA, S.; BUCHBAUER, G. Biological Activity of Some Volatile Diterpenoids. **Current Bioactive Compounds**, v. 11, p. 38-48, 2015.

<https://doi.org/10.2174/157340721101150804150419>

ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária a saúde. São Paulo: **Manole**; 2001.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 1015-1019, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>

ENGELLEN.L.; STEHOUWER, C. D.; SCHALKWIJK, C. G. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 677-689, 2013.

<https://doi.org/10.1111/dom.12058>

ENGLISH-LOEB, G.; STOUT, M. J.; DUFFEY, S. S. Drought Stress in Tomatoes: Changes in Plant Chemistry and Potential Nonlinear Consequences for Insect Herbivores. **Oikos**, v. 79, n.3, 2007.

<https://doi.org/10.2307/3546888>

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

<https://doi.org/10.1021/jf1005935>

FACINA, T. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

FERREIRA, C. A. 2013. 79 p. **Polinização e herbivoria floral no gênero Banisteriopsis (Malpighiaceae) em área de cerrado de Uberlândia, MG.** Dissertação de mestrado em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade de Uberlândia.

FLORES, D. 2003. **O uso de fitoterapia pelas gestantes: mito ou realidade.** Pelotas, RS. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Pelotas.

FREITAS, L. B. O.; BOAVENTURA, M. A. D.; SANTOS, W. L.; STEHMANN, J. R.; JUNIOR, D. D.; LOPES, M. T. P.; MAGALHAES, T. F. F.; DA SILVA, D. L.; DE RESENDE, M. A. Allelopathic, cytotoxic and antifúngic activities of new dihydrophenanthrene and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 12, n. 1, 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 Plantas Mediciniais**, Havana, v. 16, n. 1, p. 60-71, 2011.

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, p. 163-171, 2012.

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

FURTADO, F. B.; DE AQUINO, F. J.; NASCIMENTO, E. A.; MARTINS, C. M.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; CUNHA, L. S.; LEANDRO, L. F.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; SILVA, C. V. S.; 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, p. 4560-4577, 2014.

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

GARRETT, R. Química Nova Interativa, Sociedade Brasileira de Química, 2013.

Disponível em:

<http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=VA0UJ8vW0IXin1I60hZpcCq8j5CpQ8leV_DenuS0rzsulYuKphQzulgC7YPwBgdDs-k67PK_9mpiWRaoLI5oOg>. Acesso em: 27 jun. 2018.

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

GIBBONS, R. J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. **Journal Dental Research**, v. 68, n. 5, p. 750-60, 1989.

<https://doi.org/10.1177/00220345890680050101>

GÓMEZ-BARRIO, A.; VEJA, C.; ESCARIO, J. A.; ROLÓN, M. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, p. 103-107, 2006.

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

GONÇALVES, L. A., BARBOSA, L. C. A., AZEVEDO, A. A., CASALI, V. W. D., NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 8-14, 2003.

GOUGHENOUR, K. D.; BALADA-LLASAT, J. M.; RAPPLEYE, C. A. Quantitative microplate-based growth assay for determination of antifungal susceptibility of *histoplasma capsulatum* yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 3286-3295, 2015.

<https://doi.org/10.1128/JCM.00795-15>

GOUVEIA, S.; GONÇALVES, J.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts from flowers of *Andryala glandulosa* ssp. *varia* (Lowe ex DC.) R. Fern., an endemic species of Macaronesia region. **Industrial crops and products**, v. 42, p. 573-582, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.040>

GRINEVICIUS, V. M. A. S. **Avaliação da remediação de percolados de uma indústria têxtil utilizando bioindicadores e biomarcadores**. 2006, 179 p. Florianópolis, SC. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.

GUA, D.; FANGA, C.; YANGB, J.; LIA, M.; LIUA, H.; YANGB, Y. Chemical composition and α -amylase inhibitory activity of the essential oil from *Sabina chinensis* cv. Kaizuca leaves. **Natural Product Research**, v. 32, n. 6, p. 711-713, 2018.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332612>

HEREDIA, A.; DOMÍNGUEZ, E.; SERRANO, J. M.; LAGUNA, L.; REINA, J. J.; CASADO, C. G. La cutícula vegetal: estruturay funciones. **Ecología**, v.12, p. 293-305, 1998.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 15, n. 12, p. 1695–1703, 2009.

<https://doi.org/10.1086/599039>

HOW, K. Y.; HONG, K. P.; CHAN, K. G. Porphyromonas gingivalis: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 53, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

<https://doi.org/10.1021/jf030723c>

HUBER, L. S.; Rodriguez-Amaya, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

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>

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAIISHI, 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>

ISLAM, M. T.; ALIC, E. S.; UDDIND, S. J.; SHAW, S.; ISLAM, M. A.; AHMEDD, M. I.; SHILLF, M. C.; KARMAKARD, U. K.; YARLAG, N. S.; KHANH, I. N.; BILLAHI, M. M.; PIECZYNSKAJ, M. D.; ZENGINK, G.; MALAINERL, C.; NICOLETTIM, F.; GULEIM, D.; NEAGOEN-BERIDAN, I.; APOSTOLOVQ, A.; BANACHR, M.; YEUNGU, A. W. K.; EL-DEMERDASHV, A.; XIAIX, J.; DEVY, P.; YELEZ, S.; JOZWIKJ, A.; KAMALAC, M. A.; MUBARAKAB, M. S.; MISHRAAF, S. K.; SHIPILD, J. A.; ATANASOVJ, A. G. Phytol: A review of biomedical activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 82-94, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>

JAKUS.V.; RIETBROCK, N. Advanced glycationend-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological Research**, v. 53, n. 2, p. 131-142, 2004.

JIA, C.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; YANG, J.; XUB, C.; MAO, D. Identification of Glycoside Compounds from Tobacco by High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Linear Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry Coupled with Electrospray Ionization Orbitrap Mass Spectrometry. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 28, n. 4, p. 629-640, 2017.

JUNIOR, S. H. M.; CAMPOS, V. A. C.; ALVES, D. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SOUZA, L. P. S.; BOTELHO, D. M. S.; HALFOUN, S. M.; OLIVEIRA, D. F. Antifungal activity of flavonoids from *Heteropterys byrsonimifolia* and a commercial source against *Aspergillus ochraceus*: in silico interactions of these compounds with a protein kinase. **Crop Protection**, Tehran, v. 67, n. 1, p. 107–114, 2014.

KAPLAN, M. A. C., FIGUEIREDO, R.; GOTTLIEB, O. R. Chemical diversity of plants from Brazilian cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 66, p. 49-54, 1994.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KING, S. R. The Source of our cures: A new pharmaceutical company wants to provide reciprocal benefits and recognize the value of indigenous. **Cultural Survival Quarterly**, v. 15, n. 3, p. 19-22, 1991.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Med**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1250027>

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2013, p. 1-16, dec. 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/162750>

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals: a review. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 27, p. 13–39, 2012.
<https://doi.org/10.1002/ffj.2082>

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from *Copaiba* (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012.
<https://doi.org/10.3390/molecules17043866>

LEITE, A. C.; NETO, A. P.; AMBROZIN, A. R. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p.1-6, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100002>

LIOLIOS, C.; LAOUER, H.; BOULAACHEB, N.; GORTZI, O.; CHINOU, I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *phlomis bovei* De Noé subsp. *Bovei*. **Molecules**, v. 12, p. 772-781, 2007.
<https://doi.org/10.3390/12040772>

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

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S. Flavonóides. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 17, p. 18-22, 2000.

LU, M.; LI, T.; WAN, J.; LI, X.; YUAN, L.; SUN, S. Antifungal effects of phytochemicals on *Candida* species alone and in combination with fluconazole. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 2, p. 125-136, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.021>

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 14, n. 613, p. 1-19, 2008.

MAMEDE, M. C. H. et al. **Malpighiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Flora do Brasil, Rio de Janeiro, 2015.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Universidade Federal de Viçosa; 2000.

MARTINS, M. M. 2012. 66p. **Constituintes voláteis, fenóis totais, capacidade antioxidante e biológica de folhas, flores e raízes da Vernonia brasiliana Less.** Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

MARTINS, M. M. 2018. 118 p. **Estudo fitoquímico e atividades antioxidantes, antimicrobiana, antiprotozoária e citotóxica da espécie Banisteriopsis oxyclada (A. Juss) B. Gates.** Tese de doutorado em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

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>

MEDEIROS, E. A.S.; MENEZES, F. G.; VALLE, L. M. C. Pneumonias bacterianas associadas à saúde. In: Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar – APECIH. Manual de prevenção de infecções hospitalares do trato respiratório. São Paulo: APECIH, 2 ed., p.1-17, 2005.

MESSERSCHMIDT, A.; MAES, L.; AL-MUSAYEIB, N. M.; COS, P.; MOTHANA, R. A. In vitro antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal

activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n.1, p. 1-7, 2011.

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

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050-4063, 2009.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. S, p. 198-207, dez. 2008.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)

NEGRI, M.; SALCI, T.; SHINOBU-MESQUITA, C.; CAPOCI, I.; SVIDZINSKI, T.; KIOSHIMA, E. Early State Research on Antifungal Natural Products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925-2956, 2014.

<https://doi.org/10.3390/molecules19032925>

NEVES, D. P., GOMES, C. F. L.; IGLÉSIAS, J. J. F.; BARÇANTE, J. M. P.; DOS SANTOS, R. L.C. **Parasitologia Dinâmica**, 3. ed, São Paulo: Atheneu, 2009.

NEVES, R. C. S.; ILZENAYDE, A.; NEVES, A. I.; MORAES, M. M.; PRISCILLA, S.; BOTELHO, P. S.; CAMARA, C. A. G. Composição química do óleo essencial das folhas de *Byrsonima Sericea* DC (Malpighiaceae). 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NUNES, B. C. 2016. 104 p. **Prospecção química e avaliação biológica de *Banisteriopsis laevifolia* (Malpighiaceae)**. Dissertação de mestrado em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

NUNES, B. C., MARTINS, M. M., CHANG, R., MORAIS, S. A.L., NASCIMENTO, E. A., OLIVEIRA, A., CUNHA, L. C.S., SILVA, C. V., TEIXEIRA, T. L., AMBRÓSIO, M.A.L.V., MARTINS, C. H.G., AQUINO, F.J.T. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia*

(A. Juss.) B. Gates leaves. **Industrial Crops Products**, v. 92, p. 277-289, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.016>

OLIANI, J. 2012. 228 p. **Estudo químico e avaliação das atividades antiprotzoárias e antimicrobiana in vitro dos alcaloides isoquinolínicos e do óleo volátil de Annona crassiflora Mart. (Annonaceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.

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**, vol. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>

OLIVEIRA, D. M. 2016. 144 p. **Estudo fitoquímico e biológico de Banisteriopsis argyrophylla (A. Juss) B. Gates (Malpighiaceae)**. Dissertação de mestrado em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

OLIVEIRA, F; AKISUE, G. Fundamentos em Farmacobotânica. São Paulo: **Atheneu**, 2003.

PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae, Caesalpinoideae) em um floresta semidecídua no sudeste doo Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 177-182, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200007>

PEJIN, B.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; NIKOLIC, M.; SOKOVIC, M. In vitro anti-quorum sensing activity of phytol. **Natural Product Research**, v. 29, p. 374–377, 2015.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.945088>

PEJIN, B.; KOJIC, V.; BOGDANOVIC, G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. **Natural Product Research**, v. 28, p. 2053–2056, 2014.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.921686>

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Control of microorganisms by physical agents. **Microbiology**, p. 469–509, 1988.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10, 2004.

PFIZER. Identificação do medicamento Ecalta. Laboratórios Pfizer Ltda. 6p. 2014. Disponível em:
www.pfizer.com.br/sites/g/files/g10030991/f/product_attachments/Ecalta.pdf.
Acessado em maio de 2018.

PHUTDHAWONG.W.; DONCHAI, A.; KORTH.J.;PYNE.S. G.; PICHA, P.; NGAMKHAM, J.; BUDDHASUKH, D. The components and anticancer activity of the volatile oil from *Streblus* sp. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v.19, n. 5, p. 445-447, 2004.

PINTO T. J. A.; KANEKO T. M.; OHARA M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2003.

PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45–61, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>

PINTO, L. N. **Plantas medicinais utilizadas por comunidade do município de Igarapé Miri**. 2008. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém.

PRAIA, A. S.; SILVA, E. F. QUEIROZ, S. A.; VOLOIS, A. C. C. Compostos fenólicos. 2014. Disponível em:
<http://www.procitropicos.org.br/portal/conteudo/print.php?itemid=2911> Acesso: 20 de outubro de 2018.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
<https://doi.org/10.1021/jf0502698>

PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; DUDAI, N. The influence of season and harvest frequency on essential oil and herbal yields from a pure clone of sage (*Salvia officinalis* L.), grown under cultivated conditions. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 326-329, 1986.
<https://doi.org/10.1021/np50044a023>

RADULOVIC, N.; STOJANOVIC, G.; PALIC, R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 85–88, 2006.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1815>

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses. In: RANGEL, E. F.; LAINSON. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 291-309, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

RAZAVIA, S. M.; NEJAD-EBRAHIMIB, S. Phytochemical analysis and allelopathic activity of essential oils of *Ecballium elaterium* A. Richard growing in Iran. **Natural Product Research**, v. 24, p. 1704-1709, 2010.
<https://doi.org/10.1080/14786410902884933>

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

REZENDE, J. F. À sombra do plátamo: crônicas de história da medicina. São Paulo: Editora Unifesp. Fleming, o acaso e a observação, p. 241–243, 2009.

RIBANI, R. H.; HUBER, L. S.; AMAYA, D. B. R. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 263-268, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.12.004>

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>

ROCHA, E. O.; CUNHA, L. C. S.; SILVA, M. V. S. G.; FREITAS, T. R.; NASCIMENTO, E. A.; SILVA, L. O.; MARTINS, C. H. G.; AQUINO, F. J. T.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial das flores de *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little. **Revista Virtual De Química**, v.10, n. 5, p. 1-15, 2018.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53–60, jan./ mar. 2007.

ROHN, S.; RAWEL, H. M.; KROLL, J. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3566-3671, 2002.
<https://doi.org/10.1021/jf011714b>

SÁ, S.; FIUZA, T. S.; BORGES, L. L.; FERREIRA, H. D.; TRESVENZOL, L. M. F.; FERRI, P. H.; REZENDE, M. H.; PAULA, J. R. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, p. 688-693, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.011>

SAID, I. M.; BIN-DIN, L.; SAMSUDIN, M. W.; YUSOFF, N. I.; LATIFF, A.; ALI, R. M.; HADI, A. H. A. A phytochemical survey of Sayap-Kinabalu Park, Sabah.

ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC), Artigo VI, p. 1-8, 1998.

SAMPAIO, A. L. F.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SOUSA, M. C.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 16, p. 38-43, 2000.

SANDES, A. R; BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.13, p.28-32, 2000.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M.A.; ROCHA, L. R. M., SANTOS, L. C., LIMA, C. A. H.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.053>

SANTANA, E. C. 2017. 130 p. **Atividade antioxidante, antimicrobiana e caracterização de compostos bioativos da casca interna de Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc.** Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
<https://doi.org/10.14393/ufu.di.2018.8>

SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E.; D'-OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 436-441, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300017>

SANTOS, T. V. S. et al. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.005>

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. S.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n 3, p. 803-808, 2007.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000300031>

SCANNAPIECO, F. A.; STEWART, E. M.; MYLOTTE, J. M. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. **Crit Care Med**. v. 20, n. 6, p. 740-50, 1992.
<https://doi.org/10.1097/00003246-199206000-00007>

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

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Natural Product Reports**, London, v. 31, n. 10, p. 1425–1448, 2014.

<https://doi.org/10.1039/C4NP00060A>

SHAN, X.; LIU, X.; HAO, J.; CAI, C.; FAN, F.; DUN, Y.; et al. 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>

SILVA, A. F.; RABELO, M. F. R.; ENOQUE, M. M. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1016-1030, 2015.

https://doi.org/10.1590/1983-084x/14_115

SILVA, F. R. G. 2006, 70 p. **Florística, estrutura e padrões de dispersão em um cerrado, Quartel Geral, MG**. Dissertação de Mestrado (Botânica). Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES, JÚNIOR A. Biological properties of medicinal plants. *Journal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases*, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>

SILVA, N. L.; ZOBIOLE, N. N.; DA SILVA, D. B.; SARTORI, A. L. B.; OLIVEIRA, R. J.; PINTO, M. E. A.; DOS SANTOS, F. J. L.; SIQUEIRA, J. M. Constituintes químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*. **Quimica Nova**, v. 38, n. 5, p. 1-10, 2015.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288– 305, 2012.

SILVA-FILHO, P.V. Plantas do cerrado produtoras de matéria tintorial. **Informe Agropecuário**, v. 16, p. 28-32, 1992.

SILVEIRA, I. R., MAIA, F. O. M., GNATTA, J. R., LACERDA, R. A. Higiene bucal: prática relevante na prevenção de pneumonia hospitalar em paciente em estado crítico. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 23, n. 5, p. 697-700, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0103-21002010000500018>

SIMÕES, C. M. O. (Org) ... [et al.]. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017b. 486 p.

SIMÕES, C. M. O.... [et al.]. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004a. 1104 p.

SIMÕES, C. M. O.; Spitzer, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.18, p. 387-416.

SIMON, D. **O guia Decepar Chora de ervas: 40 receitas naturais para uma saúde perfeita**. Rio de Janeiro Campus; 2001.

SOARES, L. B.; TUCCI, E. C.; GONÇALEZ, E.; FELICIO, C.; FELICIO, J. D. Acaricide and fungicide effects of the *Artemisia vulgaris* essential oil. **Annual Research & Review in Biology**, v. 5, n. 4, p. 285–292, 2015.
<https://doi.org/10.9734/ARRB/2015/13190>

SONIBARE, M. A.; AYOOLA, I. O.; GUYE, B.; ABBERTON, M. T.; D'SOUZA, R.; KUHNERT, N. Leaves metabolomics profiling of *Musa acuminata* accessions using UPLC-QTOF-MS/MS and their antioxidant activity. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 2, p. 1093-1106, 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11694-018-9725-4>

SOUSA, R. M. M. de. 2015. 222p. **ESTUDO QUÍMICO DE Eugenia calycina Cambess E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DE ALFA-AMILASE**. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

SOUZA, J. R. P.; MORAIS, H.; CARAMORI, P. H.; JOJANSSON, L. A. P. S.; MIRANDA, L. V. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 40-44, 2008.
<https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000100008>

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>

STRANGES, P. M.; HUTTON, D. W.; COLLINS, C. D. Cost-Effectiveness Analysis Evaluating Fidaxomicin versus oral Vancomycin for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection in the United States. **Value in health**, v. 16, p. 297-304, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.jval.2012.11.004>

TAHA, M.; BAHARUDIN, M. S.; ISMAIL, N. H.; IMRAM, S.; KHAN, M. N.; RAHIM, F.; SELVARAJ, M.; CHIGURUPATI, S.; NAWAZ, M.; QURESHI, F.; VIJAYABALAN, S. Synthesis, α -amylase inhibitory potential and molecular docking study of indole derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 36-42, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.05.021>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Y. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-Candida Agents: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n., p. 1420, 2015.

TOMA, A.; MAKONNEN, E.; MEKONNEN, Y.; DEBELLA, A.; ADDISAKWATTANA, S. 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>

TOREZAN-SILINGARDI, H. M. 2007. 180 p. **A influência dos herbívoros florais, dos polinizadores e das características fenológicas sobre a frutificação de espécies da família Malpighiaceae em um Cerrado de Minas Gerais**. Tese de doutorado em Ciências, Universidade Estadual de São Paulo.

TORRES, N. M. P. O.; XAVIER, J. A.; GOULART, M. O. F.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. A química dos produtos finais de glicação avançada. **Química Nova**, v. 10, n. 2, p. 1-19, 2018.

TRINH, B. T.; STAERK, D.; JÄGER, A. K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 189–195, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.060>

VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P. F.; DEWDNEY, M. M. A Rapid Resazurin-Based Microtiter Assay to Evaluate QoI Sensitivity for *Alternaria alternata* Isolates and Their Molecular Characterization. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1262-1270, 2012.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1037-RE>

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

VOGEL, S. History of the Malpighiaceae in the Light of Pollination Ecology. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 55, p. 130-142, 1990.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>

WANG, L.; JOHNSON, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. **Applied Environ Microbiology**, v. 58, p. 624-629, 1992.

WANG, Y. H.; SAMOYLENKO, V.; TEKWANIA, B. L.; KHANA, I. A.; MILLERD, L. S.; CHAURASIYAA, N. D.; RAHMANA, M.; TRIPATHIA, L. M.; KHANA, S. I.; JOSHI, V. C.; WIGGERA, F. T.; MUHAMMAD, I. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 662-671, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.02.013>

WANG, Y.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O.; CHUN, O. K. Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the U.S. diet. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 3, p. 447- 452, 2011.

<https://doi.org/10.3945/jn.110.133900>

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil 92. São Paulo, Brazil: Editorial SBT Brazil; 1992. p. 103.

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

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

ZHAO Y.; LI, X. A.; ZENG, X. B.; HUANGA, X. B.; HOU, S. A.; LAIA, X. Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*. **The Royal Society of Chemistry**, 2013.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, 2001.

<https://doi.org/10.1038/414782a>