



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

BRUNO CÉSAR NUNES

PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Banisteriopsis
laevifolia* (MALPIGHIACEAE)

UBERLÂNDIA-MG
ABRIL -2016

BRUNO CÉSAR NUNES

PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Banisteriopsis
laevifolia* (MALPIGHIACEAE)

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino
Coorientador: Prof. Dr. Roberto Chang

UBERLÂNDIA-MG
ABRIL - 2016

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

N972p
2016 Nunes, Bruno César, 1985-
 Prospecção química e avaliação biológica de *Banisteriopsis*
 laevifolia (Malpighiaceae) / Bruno César Nunes. - 2016.
 182 f. : il.

 Orientador: Francisco José Tôrres de Aquino.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
 Inclui bibliografia.

 1. Química - Teses. 2. *Banisteriopsis* - Teses. 3. Óleos vegetais -
Teses. I. Aquino, Francisco José Tôrres de. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



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 235/PPQUI.

DATA: 29/04/2016

DISCENTE: Bruno César Nunes

MATRÍCULA: 11412QMI002

TÍTULO DO TRABALHO: Prospecção química e avaliação biológica de *Banisteriopsis laevifolia*

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

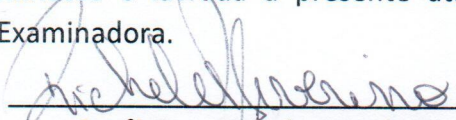
LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

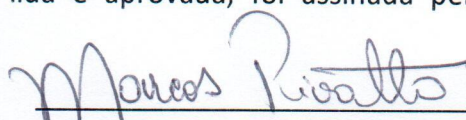
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Caracterização química e atividades biológicas da espécie *Banisteriopsis laevifolia* (A.Juss.) B.Gates.

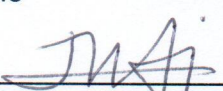
Às quatorze horas do dia vinte e nove de abril do ano dois mil e dezesseis, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Richele Priscila Severino, da Universidade Federal de Goiás, Marcos Pivatto e Francisco José Tôres de Aquino, do Instituto de Química da UFU, 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 na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, 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

"Prospecção química e avaliação biológica de Banisteriopsis laevifolia (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 18 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Profª Dra. Richele Priscila Severino
UFG


Prof. Dr. Marcos Pivatto
IQUFU


Orientador(a): Prof. Dr. Francisco José Tôres de Aquino – IQUFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

A minha esposa Ana Paula pelo total apoio.

Aos meus pais pelo grande apoio em mais uma etapa.

Ao Professor Dr. Francisco José Tôres de Aquino, pela firme orientação e conselhos.

Ao Professor Dr. Roberto Chang por sua co-orientação.

Ao Professor Dr. Evandro Afonso do Nascimento, por suas valiosas contribuições e discussões dos resultados nas análises dos óleos essenciais por CG-EM.

Aos Professores Dr. Luís C S Cunha, Carlos H. G. Martins e Maria A. L. V. Ambrósio (Universidade de Franca-SP) pelas análises de antimicrobianos.

Ao Professor Dr. Cláudio Vieira da Silva (Instituto de Ciências Biomédicas-UFU) pelas análises de antiprotozoários.

Ao Professor Dr. Marcos Pivatto, por suas contribuições para a análise de Espectrometria de Massas deste trabalho.

Ao doutorando Mário M Martins (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais-UFU) pelo apoio em várias fases do desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas Laboratório de Produtos Naturais-UFU, especialmente Adrianade O. Martins, Raquel R. A. Souza e Dayane M. Oliveira pelo companheirismo e apoio em tantos momentos.

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

RESUMO

O gênero *Banisteriopsis* é bastante difundido na medicina tradicional. Este trabalho tem como objetivo contribuir com informações sobre a constituição química e sobre a avaliação da atividade biológica do óleo essencial, do extrato etanólico das folhas e das frações da *Banisteriopsis laevifolia*. A prospecção química indicou a presença de flavonoides, terpenoides, saponinas, fenóis e esteroides. Não foi detectada a presença de compostos nitrogenados característicos de algumas espécies desta família. A classe de metabólitos predominante foi de flavonoides, com maiores concentrações nas frações acetato de etila e *n*-butanol. As atividades antibacterianas, antifúngicas e a citotoxicidade do óleo, extrato etanólico e frações foram avaliadas pelo método da microdiluição em caldo, de onde foram calculadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM). O extrato etanólico e frações não inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas testadas com CIM menores que 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para as bactéria Gram-negativas testadas as frações hexânica e hidroetanólica foram mais efetivas contra a bactéria *F.nucleatum* (CIM de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O extrato etanólico apresentou atividade antifúngica com CIM de 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As frações acetato de etila e *n*-butanol apresentaram CIM de 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 93,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, despertando o interesse para o isolamento. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do radical livre DPPH. O extrato etanólico e as frações acetato de etila e *n*-butanol mostraram-se ativa, visto que apresentaram valores de CE_{50} (4,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4,07 e 8,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) equivalentes ao do BHT (7,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A Análise por CLAE-EM/EM das frações mais ativas (acetato de etila e *n*-butanol) permitiu identificar compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóis) de reconhecida atividade biológica na literatura. Na análise dos componentes voláteis por CG-EM dos óleos essenciais das folhas, coletadas em dois períodos estudados (seco e chuvoso), foi encontrada uma pequena variação nos compostos. As principais classes identificadas para o óleo coletado no período da seca foram álcoois alifáticos (23,4%), terpenoides (18,7%), ésteres (10,4%), e alcanos de cadeia longa (9,2%). O período da chuva apresentou maior número de terpenoides (26,8%). Os compostos majoritários (3Z)-hexenol, fitol e untriacontano estão presentes nos dois períodos de coletas das folhas, em quantidades diferentes (19,4%; 9,8%; e 7,5% no período da seca, e 17,0%; 14,9%; e 15,3% no período chuvoso, respectivamente). O óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* do período chuvoso não foi efetivo frente às bactérias bucais Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Entretanto, exibiu atividade antifúngica relevante (CIM de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra *Candidas*. Desta forma, os resultados da atividade biológica para o extrato etanólico, frações, e para o óleo essencial da *B. laevifolia* são promissores. Este estudo contribuiu para o conhecimento químico e biológico da espécie *B. laevifolia*.

Palavras-chaves: *Banisteriopsis laevifolia*. Extrato etanólico e frações. Óleo essencial. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The *Banisteriopsis* genus is widespread in traditional medicine. This work aims to contribute with information about the chemical composition and on the evaluation of the biological activity of the essential oil, the ethanol extract of the leaves and partitions of the *Banisteriopsis laevifolia*. The phytochemical screening test of ethanol extract and partitions of leaves indicated the presence of flavonoids, terpenoids, saponins, phenols and steroids compounds. Nitrogenous compounds, characteristic of some species of this family, were not detected. Flavonoids were the predominant metabolite, with the highest concentrations on the partitions ethyl acetate and n-butanol. The antibacterial activity, antifungal and cytotoxicity of the essential oil, ethanol extract and partitions were assayed by microdilution broth method (MBM), where the minimum inhibitory concentrations (MIC) were calculated. The ethanol extract and partitions did not inhibit growth against Gram positive bacteria tested, with MIC less than 400 mg L⁻¹. For the Gram negative bacteria tested, the hexane and hydroethanol partitions were more effective against *F. nucleatum* bacteria (MIC 100 µg mL⁻¹). The ethanol extract showed antifungal activity with MIC of 31.2 mg L⁻¹. Ethyl acetate and n-butanol partitions showed MIC 187.5 mg L⁻¹ and 93.7 mg L⁻¹, respectively, arousing interest for isolation studies. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical method. The ethanolic extract, ethyl acetate and n-butanol partitions were active, since they showed EC₅₀ values (4.53 µg mL⁻¹, 4.07 and 8.39 µg mL⁻¹, respectively), values equivalent to the BHT (7.3 mg L⁻¹). The analysis by HPLC-MS/MS of the most active fractions (ethyl acetate and n-butanol) identified phenolic compounds (flavonols and phenolic acids) which exert recognized biological activity. The GC-MS analysis of the essential oils from leaves collected in two periods studied (dry and wet), showed a small variation in the number of compounds. The major classes identified for the oil collected in the dry period were aliphatic alcohols (23.4%), terpenoids (18.7%), sterols (10.4%) and long-chain alkanes (9.2%) compounds. Terpenoids (26.8%) were the major class for the rain season. The major compounds (3Z)-hexenol, phytol and untriacontano are present in the two seasons but in different amounts (19.4%, 9.8% and 7.5% during the dry season, and 17.0 %, 14.9% and 15.3% in the rainy season, respectively). The essential oil from rainy season was not effective against the oral bacteria Gram positive and Gram negative tested. However, showed significant antifungal activity with MIC 1000 mg L⁻¹ against *Candida*. Thus, the promising results with respect to biological assays of ethanolic extract and partitions from *B. laevifolia* contributed to the chemical and biological knowledge of the species *B. laevifolia*.

Keywords: *Banisteriopsis laevifolia*. Ethanolic extract and partitions. Essential oil. Antimicrobial activity. Antioxidant activity.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Rendimento do extrato etanólico das folhas de <i>B. laevifolia</i>	36
Tabela 2 - Extração líquido-líquido do extrato das folhas de <i>B. laevifolia</i>	37
Tabela 3 - Resultados da prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas da <i>B. laevifolia</i> e das frações.....	37
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. laevifolia</i>	39
Tabela 5 - Resultados da atividade antiprotozoária para o extrato e frações das folhas da <i>B. laevifolia</i>	40
Tabela 6 - Atividade antifúngica do extrato etanólico e das frações para <i>B. laevifolia</i> (em $\mu\text{g mL}^{-1}$).....	41
Tabela 7 - Valores de IS para a atividade antifúngica.....	42
Tabela 8 - Resultados do teor de fenóis totais do extrato etanólico e das frações da <i>B. laevifolia</i>	43
Tabela 9 - Resultados da quantificação de proantocianidinas do extrato etanólico e das frações da <i>B. laevifolia</i>	45
Tabela 10 - Resultados da quantificação do teor de flavonoides do extrato etanólico e das frações da <i>B. laevifolia</i>	47
Tabela 11 - Correlação entre os valores de CE_{50} e a intensidade da atividade antioxidante.....	50
Tabela 12 - Valores de CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da capacidade antioxidante para o extrato etanólico e das frações da <i>B. laevifolia</i>	51
Tabela 13 - Identificação por espectrometria de massas de compostos bioativos presentes na fração acetato de etila e <i>n</i> -butanol.....	54

Capítulo 2

Tabela 1 - Rendimentos dos óleos das folhas da <i>B. laevifolia</i> e <i>B. sericea</i>	80
Tabela 2 - Composição química do óleo essencial das folhas de <i>B. laevifolia</i> no período da seca.....	82
Tabela 3 - Distribuição por grupos funcionais dos componentes do óleo essencial da folha da <i>B. laevifolia</i> , no período da seca.....	83
Tabela 4 - Composição química do óleo essencial das folhas de <i>B. laevifolia</i> no período da chuva.....	90
Tabela 5 - Classificação por grupos funcionais dos componentes do óleo essencial da folha da <i>B. laevifolia</i> do período da chuva.....	91
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) do óleo essencial extraído das folhas de <i>B. laevifolia</i> no período da chuva.....	93

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Alcaloides isolados de <i>B. Caapi</i> : (1) harmina; (2) harmalina; (3) tetrahydroharmina; (4) harmalol.....	20
Figura 2 - Substâncias isoladas de <i>B. caapi</i> : Fitormônios – estigmasterol (5) e β -sitosterol (6); triterpenos - ácido ursólico (7) e ácido oleanólico (8); sesquiterpenos – nerolidol (9).....	20
Figura 3 - Compostos (10, 11 e 12) isolados de <i>B. anisandra</i>	21
Figura 4 - Fotografia da espécie <i>B. laevifolia</i> (cipó-prata).....	23
Figura 5 - Rotas biossintéticas dos metabolitos secundários.....	24
Figura 6 - Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>B. laevifolia</i>	26
Figura 7 - Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu).....	43
Figura 8 - Curva padrão de calibração típica para o ácido gálico.....	44
Figura 9 – Reação da vanilina com taninos condensados.....	45
Figura 10 - Curva de calibração da catequina.....	46
Figura 11 - Complexação de um flavonoide com solução de AlCl_3	47
Figura 12 - Curva de calibração da quercetina.....	48
Figura 13 - Mecanismo de reação entre o radical $\text{DPPH}^\cdot$ e uma estrutura antioxidante (HA).....	49
Figura 14 - Estabilização do radical livre $\text{DPPH}^\cdot$: através da conjugação do elétron livre entre os átomos de nitrogênios (reação 1); através da conjugação do elétron livre com os anéis aromáticos (reação 2).....	50
Figura 15 - Mecanismo de reação do $\text{DPPH}^\cdot$	51
Figura 16 - Cromatograma de íons totais da fração de acetato de etila obtido por IES-EM/EM.....	53
Figura 17 - Cromatograma de íons totais da fração <i>n</i> -butanol obtido por IES-EM/EM.....	54
Figura 18 – Espectro de massas do pico 1 identificado como ácido quínico.....	56
Figura 19 - Espectro de massas para o pico 2, identificado como ácido cafeoilquínico.....	57
Figura 20 – Proposta de fragmentação do ácido cafeoilquínico via rearranjo McLafferty....	58
Figura 21 – Espectro de massas para o pico 3 identificado como Procianidina.....	58
Figura 22 – Proposta de fragmentação do tipo retro-Diels-Alderdo íon m/z 577 a m/z 425....	59
Figura 23 – Espectro de massas para o pico 3, identificado como (epi)catequina.....	59
Figura 24 – Fragmentação proposta no espectro de massa para o íon m/z 289.....	60

Figura 25 – Espectro de massas do pico 4 identificado como 3-O- β -galactopiranosilquercetina.....	61
Figura 26 – Espectro de massas do pico 5 identificado como quercetina-3-O-glucoronideo.....	61
Figura 27 – Espectro de massas do pico 5 identificado como rutina.....	62
Figura 28 – Espectro de massas do pico 6 identificado como 3-O- α -L-rhamnopyranosideo-quercetina.....	63
Figura 29 - Estruturas químicas dos compostos identificados por CLAE-EIS-EM/EM para as duas frações estudadas.....	64

Capítulo 2

Figura 1 - Mecanismos de formação das unidades isoprênicas ativas (DMAPP) e (IPP) pela via do mevalonato.....	73
Figura 2 - Mecanismos de formação das unidades isoprênicas ativas dimetilalildifosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5-P mevalonato....	75
Figura 3 - Esquemas das vias de biossíntese responsáveis pela produção de terpenoides, a partir da formação dos blocos de isoprenoides dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP).....	76
Figura 4 - Aparelhos de Clevenger utilizados para a extração do óleo essencial das folhas da <i>B. laevifolia</i>	78
Figura 5 - Cromatografo a gás acoplado à espectrometro de massas utilizado para a identificação do óleo essencial extraído das folhas da <i>B. laevifolia</i>	79
Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>B. laevifolia</i> obtido no período da seca.....	81
Figura 7 - Espectros de CG-EM do (Z)-3-hexen-1-ol.....	83
Figura 8 – Proposta de fragmentação do (Z)-3-hexen-1-ol.....	84
Figura 9 - Espectros de CG-EM do fitol.....	84
Figura 10 - Proposta de fragmentação do fitol.....	85
Figura 11 - Espectros de CG-EM do untriacontano.....	85
Figura 12 - Proposta de fragmentação do untriacontano.....	86
Figura 13 - Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial da folha da <i>B. laevifolia</i> ; (Z)-3-hexen-1-ol, o fitol e o untriacontano.....	87
Figura 14 - Cromatograma de CG-EM do óleo essencial extraído das folhas da <i>B. laevifolia</i> obtido no período da chuva.....	89
Figura 15 - Gráfico comparativo (%) dos grupos funcionais encontrados nos óleos essenciais das folhas coletadas nos períodos seco e chuvoso.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACETIL-COA	Acetilcoenzima A
ATCC	(do ingles) “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
BHT	Butilidroxitolueno
CE ₅₀	Concentração Efetiva Média
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CHD	Dicloridrato de clorexidina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	(do ingles) “ <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> ”
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMEM	Dulbecco’s modified Eagle’s médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilidrazila
DXP	1-Deoxi-D-xilulose-5-fosfato
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Equivalente de catequina
EQ	Equivalente de quercetina
FPP	Farnesil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
GGPP	Pirofosfato de geranil-geranila
HUFU	Herbário da Universidade Federal de Uberlândia
Hz	Hertz
IA	Índice aritmético
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração de inibição média
IPP	3-Isopentenil pirofosfato
IS	Índice de seletividade
SFB	Soro fetal bovino
MEP	Metileritriol fosfato

MES	Tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico
MOPS	Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
MVA	Mevalonato
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina
OE	Óleo essencial
PBS	Tampão fosfato salino
Rf	Fator de retenção
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
TSB	Caldo triptona de soja
Tr	Tempo de retenção
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV/Vis	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS.....	16
 CAPÍTULO 1: ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO E PARTIÇÕES DAS FOLHAS DE <i>B. Laevifolia</i>	
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 <i>Banisteriopsis laevifolia</i> (Cipó-prata): família e gênero.....	19
1.2 <i>Banisteriopsis laevifolia</i>	22
1.3 Metabolismos vegetais (biossíntese).....	23
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1 Coleta do material vegetal.....	25
2.2 Preparo da amostra.....	25
2.3 Preparações do extrato etanólico das folhas de <i>B. laevifolia</i>	25
2.3.1 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>B. laevifolia</i>	26
2.4 Prospeção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de <i>B. laevifolia</i>	26
2.5 Atividades biológicas do extrato etanólico e partições das folhas de <i>B. laevifolia</i>	28
2.5.1 Atividades antimicrobianas do extrato e frações das folhas de <i>B. laevifolia</i>	28
2.5.2 Atividade antifúngica do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. laevifolia</i>	29
2.5.3 Atividade antiprotozoária.....	30
2.6 Atividade citotóxica.....	31
2.7 Atividade antioxidante.....	32
2.7.1 Determinação do teor de fenóis totais.....	32
2.7.2 Determinação de teor de proantocianidinas.....	33
2.7.3 Determinação do teor de flavonoides.....	33
2.7.4 Determinação da capacidade antioxidante.....	34
2.8 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i> (CLAE-IES-EM/EM) das frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol.....	35
2.9 Análise estatística.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
3.1 Rendimento do extrato etanólico.....	36
3.2 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>B. laevifolia</i>	36
3.3 Prospeção fitoquímica do extrato etanólico e das frações.....	37

3.4 Atividades biológicas do extrato etanólico e frações de <i>B. laevifolia</i>	38
3.4.1 Atividade antimicrobiana do extrato e frações das folhas de <i>B. laevifolia</i>	38
3.4.2 Atividade antiprotzoária e citotóxica do extrato etanólico e das frações.....	40
3.4.3 Atividade antifúngica do extrato e partições das folhas de <i>B. laevifolia</i>	41
3.5 Quantificação da atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de <i>B. laevifolia</i>	43
3.5.1 Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	44
3.5.2 Determinação de proantocianidinas.....	45
3.5.3 Determinação do teor de flavonoides.....	47
3.5.4 Capacidade sequestrante de radicais livres DPPH [•] pelo extrato e frações da <i>B. laevifolia</i>	49
3.5.4.1 Análise da atividade antioxidante através da Concentração Efetiva média (CE ₅₀)....	51
4 Identificação de compostos fenólicos nas frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol utilizando a CLAE-EM/EM.....	53
5 REFERÊNCIAS.....	65

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEOESSENCIAL EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *B. Laevifolia*

1 INTRODUÇÃO.....	72
1.1 Óleos essenciais.....	72
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
2.1 Preparo da amostra.....	77
2.2 Extração do óleo essencial.....	77
2.3 Análise do óleo essencial por Cromatografia a gás Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	78
2.3.1 Identificação do óleo essencial das folhas da <i>B.laevifolia</i>	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	80
3.1 Rendimento do óleo essencial.....	80
3.2 Composição química do óleo essencial extraído das <i>B. laevifolia</i> no período da seca.....	80
3.3 Composição química do óleo essencial extraído das <i>B. laevifolia</i> no período da chuva.....	89
3.4 Atividades biológicas do óleo essencial extraído das folhas de <i>B. laevifolia</i> colhidas no período da chuva.....	93
3.4.1 Atividade antimicrobiana.....	93
3.4.2 Atividade antifúngica do óleo essencial extraídos das folhas de <i>B. laevifolia</i> no período da chuva.....	95
4 REFERÊNCIAS.....	96
CONCLUSÃO GERAL.....	101
APÊNDICE A – Resumos publicados em anais de congressos.....	102
APÊNDICE B – Artigo submetido no periódico Industrial Crops and Products.....	102

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos como importantes ferramentas nos procedimentos das terapias naturais. O Brasil já reconhece a importância do conhecimento popular e da utilização de produtos naturais pela população em seus cuidados primários de saúde, através da implantação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, fundamentado na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que valoriza o uso sustentável da biodiversidade brasileira e a preservação do conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais. A busca por novos medicamentos tem despertado a comunidade química para estudar novas espécies de plantas com potencial para a descoberta de novos candidatos à pró-fármacos.

Estudos fitoquímicos relacionados com espécies da família Malpighiaceae, largamente presente no território nacional, demonstram que partes destes vegetais estão associadas às diversas atividades biológicas importantes como atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticarcinogênica e antidepressiva, entre outras. A escolha da planta *Banisteriopsis laevifolia* prende-se ao fato da ausência de estudos na literatura científica relacionados à caracterização química e biológica de extratos, frações e do óleo essencial da espécie. *Banisteriopsis* é um dos gêneros com maior número de espécies em Malpighiaceae, sendo a espécie mais famosa a *B. caapi*, por seus componentes alcaloídicos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi contribuir para o estudo químico e biológico sobre *B. laevifolia* (cipó-prata), uma planta bem conhecida no cerrado brasileiro. Para tanto, foram delineados dois objetivos específicos:

I) Estudo químico e biológico do extrato e frações das folhas de *B. laevifolia*.

Inicialmente foram preparados os extratos e frações a partir das folhas coletadas de *B. laevifolia*. Em seguida foi realizada a prospecção fitoquímica, o estudo de atividade antimicrobiana, antifúngica, antiprotzoária, citotóxica e antioxidante do extrato etanólico e frações. As frações que apresentaram melhores resultados de atividade biológica foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM). Os resultados alcançados são apresentados no Capítulo 1.

II) Estudo químico e biológico do óleo essencial das folhas de *B. laevifolia*.

De posse das folhas de *B. laevifolia* foi preparado o óleo essencial, simultaneamente ao estudo dos extratos das folhas. A identificação dos compostos voláteis foi determinada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Em seguida, foi feito o estudo de atividade antimicrobiana, antifúngica citotóxica. Os resultados alcançados são apresentados no Capítulo 2.

CAPÍTULO 1: ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *B. laevifolia*

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram utilizadas em praticamente todas as culturas como uma fonte de medicamento. Garantia da segurança, qualidade, e eficácia de plantas medicinais e produtos à base de plantas tornou-se uma questão-chave nos países industrializados e em desenvolvimento. A prática da medicina tradicional é generalizada na China, Índia, Japão, Paquistão, Sri Lanka e Tailândia. Na China cerca de 40% do consumo total de medicamento é atribuída a medicamentos tradicionais tribais (SINGH, 2015).

As plantas medicinais possuem uma grande diversidade de compostos que traz grande interesse a pesquisadores da botânica, da farmacologia e da química para o conhecimento e seu potencial medicinal (MACIEL et al., 2002). Uma análise cienciométrica sobre as tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil apontam para um crescimento vertiginoso a partir de 2006, muito provavelmente devido ao decreto 5813/2006 que designou a Política Nacional de Plantas Medicinais (CARNEIRO et al., 2014).

No Brasil aproximadamente 80% da população faz uso de plantas medicinais que fazem parte da medicina popular e fitoterápica (JESUS, 2008). Para ser considerada medicinal a planta deve possuir substâncias que tenham fins terapêuticos ou precursores de fármacos. O conhecimento da toxicidade também tem uma grande importância, pois as pessoas usam sem esse conhecimento e acabam, às vezes, ficando vulneráveis ao tratamento por plantas medicinais (PINTO et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais como medida profilática, e 85% usam plantas medicinais para preparações. Desde então, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização das plantas medicinais no âmbito sanitário e na saúde (ROSA et al., 2011).

Existem poucos estudos voltados sobre a flora do cerrado para a identificação de plantas úteis, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada. Dados mostram que cerca de 48,9% do bioma já tenha sido devastado (para o período de 2002-2011) e que este possui somente 8,6% de sua extensão protegida por lei, sendo atualmente a vegetação em maior risco no país. Dados mais recentes apontam que o cerrado possui 25% de

sua área no território brasileiro e 54% de sua vegetação preservada (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015). Sendo assim e, levando-se em conta a grande diversidade do bioma Cerrado e a diversidade de plantas que são importantes para o uso medicinal, são necessários estudos que relatem a diversidade biológica e o conhecimento químico deste complexo vegetacional.

O bioma Cerrado é a segunda maior área em abundância de plantas nativas do Brasil, ocupando 22% do território nacional. Este bioma é apontado como grande detentor de diversidade biológica, sendo a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo, especialmente quando se consideram as espécies lenhosas (GUARIM-NETO; MORAIS, 2003). As árvores são bem distintas, com troncos curvos, revestidos por uma cortiça espessa, e suas folhas são normalmente grandes e rígidas (INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTA, 2014). O gênero *Banisteriopsis* está distribuído ao longo do cerrado, normalmente em forma de lianas, podendo ainda formar arbustos (LIMA, 2005).

1.1 *Banisteriopsis laevifolia* (Cipó-prata): família e gênero

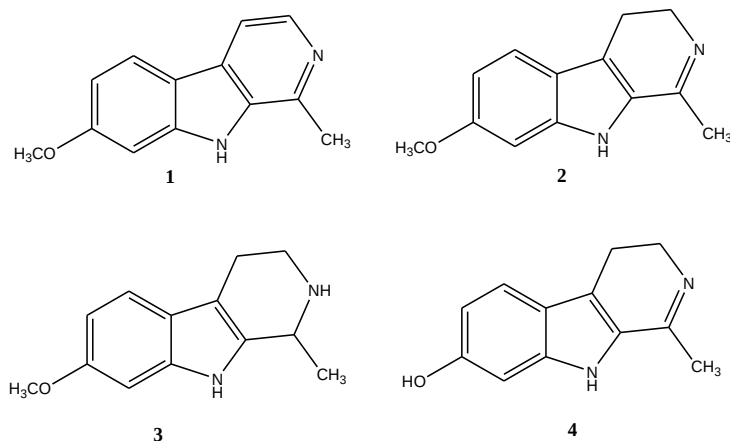
A planta *Banisteriopsis laevifolia* pertence à família das Malpighiaceae e ao gênero *Banisteriopsis*. Malpighiaceae é uma família monofilética, com 1.300 espécies reunidas em 77 gêneros. Apresenta distribuição pantropical, e sua maior diversidade encontra-se no continente sul-americano (ANDERSON; DAVIS, 2010).

O gênero *Banisteriopsis* está presente na América do Sul com 92 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru (WANG et al., 2010). É um dos gêneros com maior número de espécies em Malpighiaceae.

A *Banisteriopsis caapi* é a espécie que apresenta maior número de relatos na literatura. Essa espécie é utilizada no preparo da bebida sagrada e psicoativa conhecida como Ayahuasca (WANG et al., 2010). Outra espécie, a *Banisteriopsis argentea*, também pode ser usada no preparo da Ayahuasca devido à presença de alcaloides B-carbolínicos. (GHOSAL E MAZUNDER 1971). Estudos químicos feitos com as folhas de *B. caapi* identificaram três alcaloides majoritários que são a harmina (1), harmalina (2) e a tetrahydroharmina (3) (MCKENNA, 2004). Até hoje o estudo e a confirmação sobre a presença de alcaloides em *B. Caapi* traz novas discussões. Foi desenvolvido um novo método analítico para determinação da substância conhecida como harmalol (4) e (2), usando eletrodos de carbono vítreo (Figura

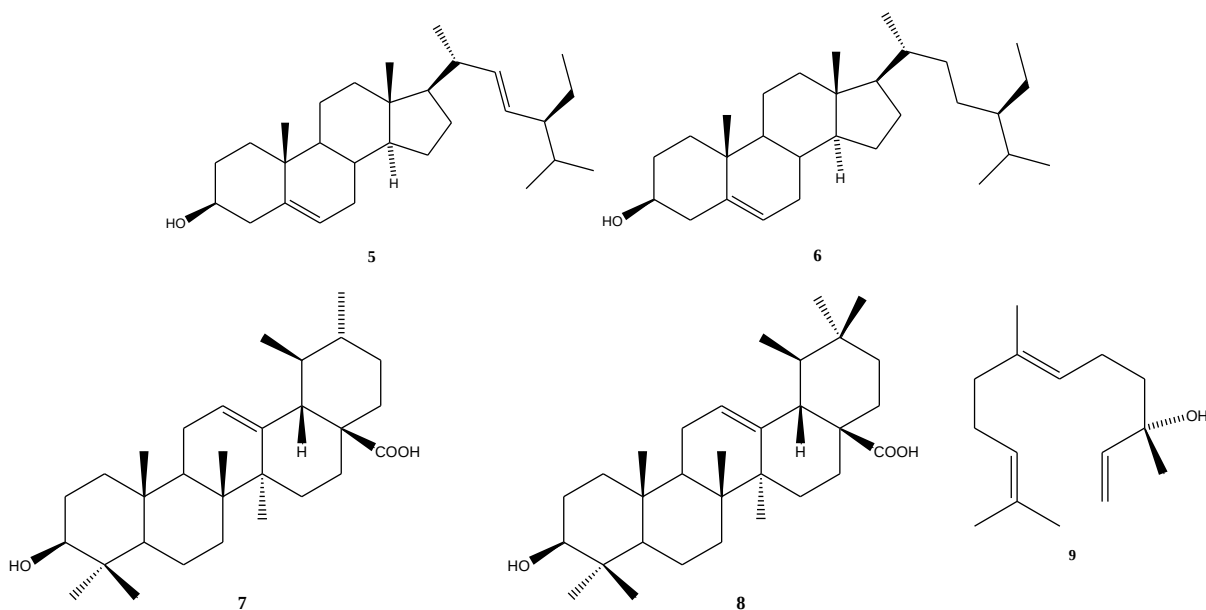
1). O método se baseia na voltametria cíclica para a caracterização do comportamento eletroquímico destes alcaloides, facilitando assim a detecção (STANKOVIC, 2015).

Figura 1 - Alcaloides isolados de *B. Caapi*: harmina (1); harmalina (2); tetrahydroharmina (3); harmalol (4).



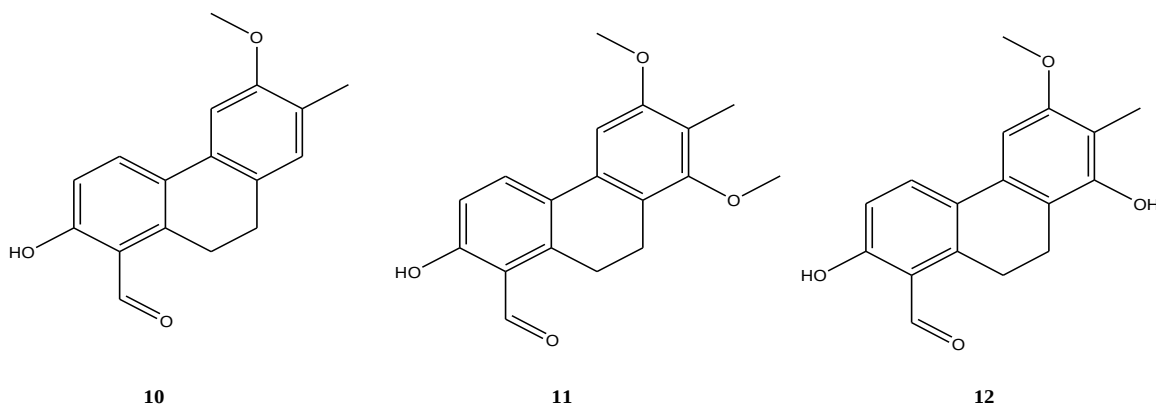
Também foram isolados esteróides como: estigmasterol (5) e β -sitosterol (6) triterpenos como: ácido ursólico (7) e ácido oleanólico (8); e sesquiterpenos como nerolidol (9) (AQUINO et al., 1990) (Figura 2).

Figura 2 - Substâncias isoladas de *B. caapi*: fitormômios – estigmasterol (5) e β -sitosterol (6); triterpenos - ácido ursólico (7) e ácido oleanólico (8); sesquiterpenos – nerolidol (9).



As folhas e raízes de *Banisteriopsis anisandra* usadas na medicina popular para o tratamento tópico de infecções fungicidas foram estudadas do ponto de vista químico, sendo que nas folhas foram isolados os compostos: o 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**10**), o 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**11**) e o 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**12**) (Figura 3). (FREITAS, 2015).

Figura 3 – Derivados diidrofenantrenos isolados de *B. anisandra*.



São encontradas na literatura várias citações sobre o gênero *Banisteriopsis* relacionadas ao seu potencial medicinal (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; FRIAS, et al., 2011). No extrato de *B. argyrophylla* foram descritas ação anti-inflamatória, sendo empregado no tratamento de hemorragia de ovário e em nefrites e blenorreias; a *B. campestris* é uma espécie utilizada como um diurético; e a *B. megaphylla*, popularmente conhecida como videira prata, possui atividade antipirética, sendo descrita para o tratamento de doenças pulmonares. Para *B. anisandra* foram encontrados relatos para o uso de extratos etanólicos que apresentaram atividade antimicrobiana em ensaio *in vitro* (PÁDUA et al., 2013; FRIAS, et al., 2012).

1.2 *Banisteriopsis laevifolia*

Banisteriopsis laevifolia (A. Juss.) B.Gates, cujo nome comum é cipó prata é uma espécie nativa do Brasil, onde cresce nas savanas tropicais ou nas margens das matas ciliares. O nome que caracteriza o gênero é a combinação de *Banisteria* (em referência ao sacerdote inglês e naturalista norte-americano John Banister (1654 – 1692) [STERLING et al., (1997)

apud John Banister (2014)], e do termo grego "*opsis*" = aparência, semelhança. O nome da espécie é a combinação dos termos em latim "*laevis*" = lisa, brilhante, e "*folia*" = folha.

B. laevifolia é uma trepadeira lenhosa de grande porte, de ramos finos e alongados, com cerca de 2-4 m de altura, com ramos jovens e cobertos por uma espessa camada cor de ouro, ou marrom escuro. As folhas são opostas, ovadas, arredondadas na base, de cor verde-escuro na parte superior e de aspecto prateado na parte inferior (Figura 4). Apresenta inflorescências terminais compostas por conglomerados, em pedúnculo longo, carregando flores com cerca de 2 cm de diâmetro e 5 pétalas unguiculate (pétalas com base muito estreita semelhante a uma haste), de cor amarelo dourado. Suas sementes são pequenas de forma alongada, achatada e de cor marron-avermelhada, inseridas em frutos espessos do tipo samarídeo ou noz, muito lignificado, o que torna difícil sua separação. Está espécie se encontra na forma de sub-arbustos que podem formar grandes moitas às margens das estradas ou se espalhar sobre outros indivíduos de outras espécies (LIMA, 2005).

Figura 4 – Fotografia da espécie *B. laevifolia* (cipó-prata).



Fonte: Próprio autor.

Popularmente as raízes desta espécie são utilizadas como anti-inflamatório, nas hemorragias ovarianas, nefrites e gonorréias. Ramos com folhas ou flores são usados como diurético, e em problemas renais, como cálculos (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

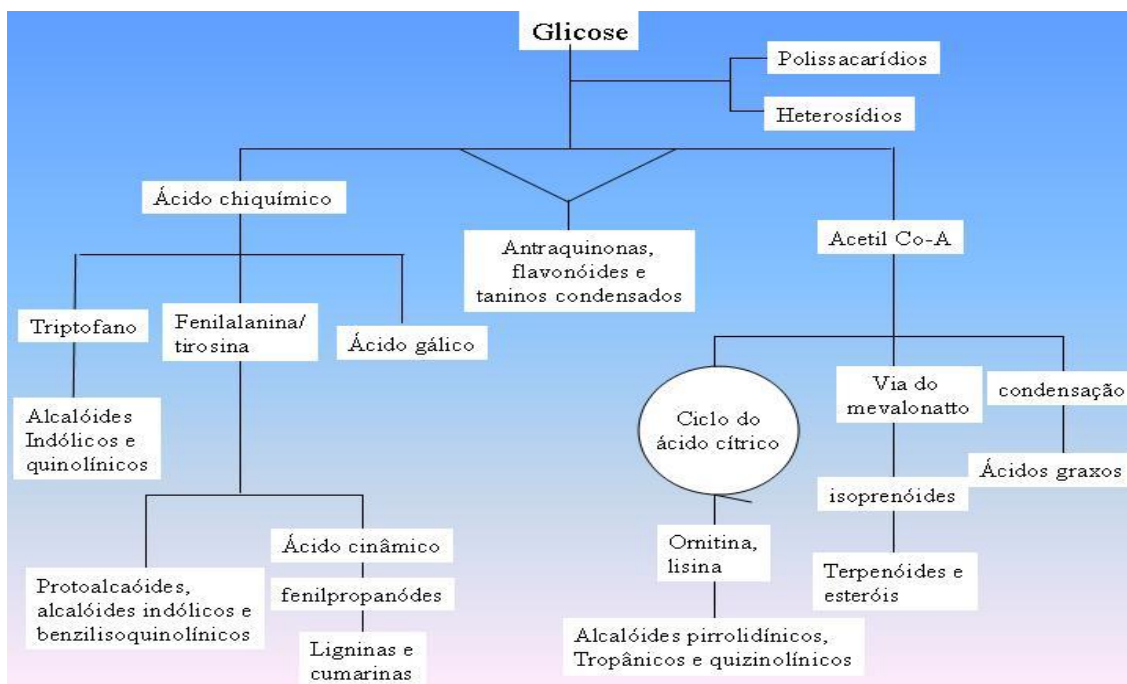
1.3 Metabolismos vegetais (biossíntese)

As etapas do processo vital das plantas como germinação, desenvolvimento, reprodução, envelhecimento e morte, são controladas por transformações químicas realizadas pelo metabolismo primário. O metabolismo secundário é característico e específico para cada

indivíduo e, apesar de estarem presentes em pequenas quantidades, proporcionam fatores de adaptação e proteção em seu habitat. Como exemplos podem ser citados fenilpropanóides e terpenoides constituintes dos óleos essenciais, alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, saponinas entre outros. Esses compostos desempenham papéis ecológicos importantes como a proteção da planta contra micro-organismos, insetos e herbívoros, e a atração de polinizadores (BRAZ FILHO, 2010).

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcaloides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). Estas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os chamados derivados do acetato (SIMÕES et al., 2007). Entrando no ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenoides e os esteróis, enquanto as acetogeninas resultam da condensação do acetato. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonoides e dos taninos condensados. (Figura 5). (SIMÕES et al., 2007).

Figura 5 - Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.



Fonte: OLIVEIRA, 2009.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O preparo das amostras e as análises químicas foram feitas no laboratório do NuPPeN (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) do Instituto de Química. Já as análises de atividade antimicrobiana e antifúngica foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca, com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. As análises de atividade antiprotozoária e citotóxica foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular de Tripanosomatídeos da UFU, com a colaboração do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva.

2.1 Coleta do material vegetal

Todas as amostras vegetais foram coletadas na fazenda localizada no município de Monte Alegre de Minas – Minas Gerais (Latitude: 18°34'56.85"S; Longitude: 49°2'52.61"O). Primeiramente foi feita a identificação do material vegetal (folhas e flores) pela Dra. Maria Cândida H. Mamede, do Instituto de Botânica de São Paulo, especialista na família Malpighiaceae. Após o reconhecimento uma parte deste material foi depositada como exsicata no Herbário Uberlandense sob o número HUFU 67.075. Posteriormente foi solicitado o acesso ao patrimônio genético ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o qual tem como autorização o número 010300/2014-7.

2.2 Preparo da amostra

As folhas coletadas foram separadas daquelas deterioradas e posteriormente trituradas em pedaços pequenos de aproximadamente 2 cm. Foi determinado o teor de umidade com cerca de 1,0 g de cada amostra que foi deixada em balança de luz infravermelha, a temperatura de 105 ± 2 °C, por quinze min., até que o teor de umidade se mantivesse constante, sendo possível medir o teor da umidade em porcentagem.

2.3 Preparações do extrato etanólico das folhas de *B. laevifolia*

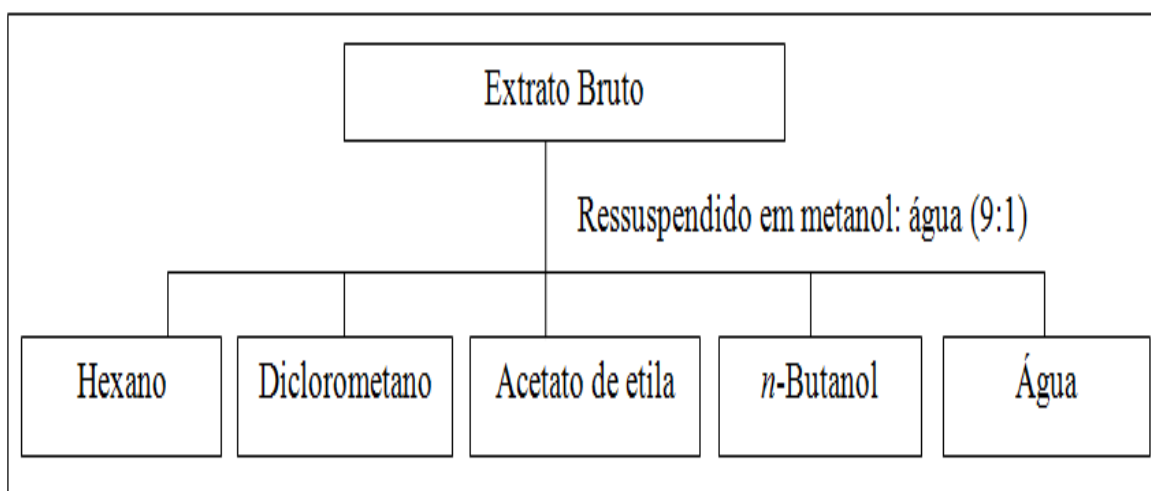
O extrato etanólico das folhas de *B. laevifolia* foi obtido através do processo de maceração à temperatura ambiente, utilizando erlenmeyer de 2,0 L, protegido da luz. Foram

utilizadas 220 g de folhas, previamente secos e triturados. A maceração das folhas foi realizada utilizando etanol (95%) como solvente (2,0 L), durante sete dias. Após este período, a solução com os extrativos foi filtrada, o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 40 °C. O extrato foi liofilizado para remoção da água. O processo de maceração foi repetido sete vezes. Os extratos foram armazenados em frascos de vidro a -18 ± 5 °C.

2.3.1 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *B. laevifolia*

Foram pesadas cerca de 22,0 g de extrato etanólico e solubilizados em 300,0 mL de solução metanol:água (9:1). Com o auxílio de um funil de separação, a extração líquido-líquido foi realizada com solventes de polaridade crescentes hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. O processo de extração com cada solvente foi repetido cinco vezes. Para as extrações com acetato de etila e *n*-butanol foi necessário adicionar água para a fração hidrometanólica para ajudar na formação das fases. Os solventes das frações foram removidos por rotoevaporação sob pressão reduzida, e banho a 40 °C. Em seguida, as frações foram submetidos à liofilização para remoção da água e armazenadas em frascos de vidro, a -18 ± 5 °C. (Figura 6).

Figura 6 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *B. laevifolia*.



2.4 Prospecção fitoquímica do extrato etanólico e frações das folhas de *B. laevifolia*.

Para a realização dos testes foram preparadas soluções em metanol na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) com fase estacionária de sílica (60G), com indicador de fluorescência. Foram utilizados dois tipos de eluentes: a) clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio, na proporção de (9:1:0,25); b) ácido fórmico:ácido acético:acetato de etila:água na proporção (1,1:1,1:10:2,6).

Os reveladores utilizados foram preparados de acordo com a metodologia de Wagner e Bladt (1996);

i) Anisaldeído-ácido sulfúrico (detecção de saponinas, terpenos, esteroides, fenol e açúcares);

0,5 mL de anisaldeído foram misturados com 10 mL de ácido acético glacial. A esta mistura foi adicionado posteriormente 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem;

A placa foi borrifada com o revelador, aquecida a 100 °C por 5 a 10 min., e então analisada.

ii) Dragendorff (detecção de alcaloides e nitrogênio heterocíclico);

Para a revelação, foram preparadas duas soluções:

Solução A: Foram dissolvidos 0,8 g de nitrato de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial e adicionados 40 mL de água destilada sob aquecimento;

Solução B: Foram dissolvidos 8,0 g de iodeto de potássio em 30 mL de água.

Solução estoque: Mistura de A e B (1:1). Solução para pulverização: 1 mL da solução estoque foi misturada com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água.

iii) Liebermann-Burchard (detecção de triterpenos e esteróides)

5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa foi pulverizada com 10 mL da solução, aquecida a 100 °C por 5 a 10 min. e então analisada em luz UV (365 nm).

iv) NP/PEG, difenilboriloxietilamina. (detecção de flavonoides)

Para revelação, foram preparadas duas soluções:

Solução A: Solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 1% (m v⁻¹).

Solução B: Solução etanólica de polietileno glicol-4000 a 5% (m v⁻¹).

Solução para pulverização: Foram misturados 10 mL da solução A e 8 mL da solução B.

Após a borrifação na placa, a análise foi feita sob luz UV (365 nm).

v) Cloreto férrico (detecção de taninos e compostos fenólicos)

Foi preparada uma solução aquosa de cloreto férrico a 10% (m v⁻¹). A placa foi borrifada com 10 mL da solução e então analisada.

2.5 Atividades biológicas do extrato etanólico e frações das folhas de *B.laevifolia*

2.5.1 Atividades Antimicrobianas do extrato e frações das folhas de *B. laevifolia*

Para o teste de atividade antimicrobiana foram utilizadas bactérias aeróbicas e anaeróbicas da coleção ATCC: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33217), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741).

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método da microdiluição em caldo em microplacas (PETROLINI et al., 2013) para avaliar a menor quantidade de amostra necessária para inibir o crescimento dos microrganismo. Esse resultado é expresso como concentração inibitória mínima (CIM) (OSTROSKY, 2008). As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

Para a realização da técnica de microdiluição em microplaca, todas as amostras foram inicialmente preparadas com concentrações de 8,0 mg mL⁻¹ (solução estoque). Para se obter esta concentração, foram dissolvidas 2 mg de cada amostra em 250 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Foram retirados 125 µL da solução de partida e acrescentados a 1875 µL de caldo

TBS, obtendo-se uma solução mãe para microrganismos aeróbicos de concentração 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a obtenção da solução mãe para microrganismos anaeróbicos, foram retirados 162,5 μL da solução de partida que foram acrescentados a 2,4 mL de caldo Schaedler suplementado, sendo obtida também uma solução de concentração 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 h dos microrganismos aeróbicos, crescidos no meio Ágar triptona de soja enriquecido com 5% de sangue de carneiro, foram transferidas para uma solução salina; o mesmo procedimento foi utilizado para preparação das bactérias anaeróbicas com crescimento de 72 h em ágar Schaedler. Padronizou-se o inóculo, fazendo a comparação deste com o tubo 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1}) para bactérias na escala Mc Farland. Esta preparação do inóculo foi realizada para todas as bactérias.

Para a determinação de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição, foi utilizado como controle positivo o digluconato de clorexidina. Para o método de microdiluição em caldo, as concentrações de digluconato de clorexidina variaram de 11,5 mg mL^{-1} a 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ainda foram realizados os seguintes controles: esterilidade dos caldos TSB e Schaedler; controle da cultura (inóculo); esterilidade da clorexidina; esterilidade dos extratos e óleos essenciais e controle do DMSO (5 a 1%).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, de acordo com as normas vigentes. As vidrarias, ponteiras e os meios de cultura foram esterilizados. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços. Cada poço recebeu inóculo, caldo triptona soja ou caldo Schaedler e amostra das soluções preparadas. O volume final em cada poço foi de 100 μL para os microrganismos aeróbicos e 200 μL para os microrganismos anaeróbicos. Foram avaliadas as amostras das soluções nas concentrações de 400 a 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e determinada a concentração mínima de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

As placas que continham bactérias aeróbicas foram seladas com parafilme e incubadas a 36 °C por 24 h em microaerofilia pelo sistema de chama/vela. Após o período de incubação, foram adicionados em cada poço 30 μL de resazurina (Sigma), preparada em solução aquosa (0,01%). Este sistema revelador permite a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra testada, sendo que a cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e a cor vermelha, a presença de crescimento bacteriano. Os microrganismos anaeróbicos foram incubados por 48 a 72 h em câmara de anaerobiose, a 36 °C. Em seguida, foi utilizado o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das CIMs para os microrganismos

anaeróbicos. A avaliação para o extrato, frações e óleo essencial das folhas foram avaliados em triplicata.

2.5.2 Atividade antifúngica do extrato etanólico e frações das folhas de *B. laevifolia*

Para os testes antifúngico foram utilizado às seguintes leveduras: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *Candida glabrata* (ATCC 15126). O inóculo foi preparado baseado nas normas preconizadas pela NCCLS M-27 A2. Primeiramente os fungos foram cultivados em placas de Petri, contendo ágar Sabouraud, por 24 h, a 37 °C. Após esse período, com o auxílio de alça de platina esterilizada, foram transferidas algumas colônias das leveduras para tubos, contendo 2 mL de solução salina 0,5 %. Esses tubos foram comparados a escala de McFarland 0,5 para se obter o valor de 6×10^6 UFC mL⁻¹. Em seguida foram realizadas as diluições recomendadas pela NCCLS, (2002) em caldo RPMI, até que o inóculo obtivesse a concentração de $1,2 \times 10^3$ UFC mL⁻¹.

Para o controle positivo foi utilizada a droga Anfotericina B, sendo diluída para obter a concentração entre 16 µg mL⁻¹ e 0,8 µg mL⁻¹, na microplaca de 96 poços. Para a validação dos ensaios, quanto ao controle da Anfotericina B, foi utilizada cepas de referência, para se obter faixa de CIM de 0,5 a 2,0 µg mL⁻¹. Também foram realizados outros controles como: de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), controle do inóculo (que deve apresentar crescimento devido à ausência de agentes antimicrobianos), controle de esterilidade dos antifúngicos, controle de esterilidade dos extratos, e controle do solvente (DMSO), que é o controle negativo. O controle do solvente deve ser realizado para que não haja dúvidas a respeito da inibição do crescimento do microrganismo, pois em algumas concentrações o solvente pode levar a inibição do crescimento microbiano.

A técnica da determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas diluições seriadas em concentrações de 3000 a 1,46 µg mL⁻¹. O meio de cultura utilizado foi o caldo RPMI, tamponado com MOPS, e pH final de 7,2. Nas microplacas foram realizadas diluições seriadas, com volume final no poço de 200 µL. Para o controle positivo foi realizado o mesmo processo, com concentrações de 8,0 a 0,031 µg mL⁻¹. Para o controle negativo a concentração utilizada foi de 1,0%.

Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 h, a 37 °C. Decorrido este período, foi determinada a CIM através do uso do oxido-redutor resazurin. A leitura foi realizada observando-se a mudança da coloração da resazurin, onde a presença da

cor azul representa ausência de crescimento, enquanto que a cor vermelha é interpretada como presença de crescimento fúngico.

2.5.3 Atividade antiprotozoária

Nas análises de atividade antiprotozoária foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular de Tripanosomatídeos da UFU, com a colaboração do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva.

O caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O caldo foi suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina (2 mM). O estágio promastigotas de *Leishmania amazonensis* da cepa PH8 foi cultivado em BHI, à temperatura de 25 °C. Para o teste com *Leishmania amazonensis* as amostras de extrato e frações da *B. Laevifolia* foram dissolvidas em metanol, e diluídas com BHI, até que se formou uma solução mãe de 640 µg mL⁻¹ para cada amostra. A concentração final de metanol da solução mãe não excedeu 3,0%.

O teste de viabilidade celular foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, a partir da solução mãe, e se fazendo a diluição com meio de cultura BHI (para a *Leishmania amazonensis*) até que obtivessem as concentrações a serem testadas. O volume final de cada poço foi de 100,0 µL, sendo 20,0 µL de inóculo (solução a 1,0 ×10⁸ parasitas por 2,0 mL) com 80,0 µL das concentrações das amostras.

A placa de *Leishmania amazonenses* foi incubada por 48 horas, a 25 °C. Em seguida foram adicionados 2,0 µL em cada poço de uma solução reveladora de resazurina a 3,0 mM em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006), e seguiu com nova incubação por 24 h, a 25 °C. Em seguida, foi realizada a leitura a 594 nm, em um espectrofotômetro de microplaca. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a partir dos resultados das absorbâncias. A viabilidade foi calculada em função do controle de crescimento, construindo-se um gráfico de dose resposta entre concentração da amostra e viabilidade celular, permitindo o cálculo do IC₅₀ (concentração em que 50% dos protozoários foram inibidos através de uma regreção não linear) (KOELLA & HUBER, 1993).

2.6 Atividade citotóxica

As análises da atividade citotóxica como da atividade antiprotozoária foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular de Tripanosomatídeos da UFU, com a colaboração do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva.

O meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2,0 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 (60,0 mg L⁻¹), gentamicina (40 mg L⁻¹) e estreptomicina (10 mg L⁻¹).

As culturas das células Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África) foram mantidas em DMEM, a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

As amostras da *B. Laevifolia* foram dissolvidas em metanol e diluídas com DMEM, até que se formou uma solução mãe, de 640 µg mL⁻¹. A concentração final de metanol da solução mãe não excedeu 3%.

Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o método de diluição em microplaca. Na realização de cada teste independente da célula, foi preparada uma solução contendo 1×10^6 células em 10 mL de meio DMEM suplementado. Desta solução, foram pipetados 100 µL para cada poço da análise. A placa então foi incubada por 6 horas, a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Depois de aderidas, o meio de cultura de cada poço foi retirado e em seguida foi adicionadas as concentrações das amostras a serem testadas, partindo da solução mãe em DMEM. O volume final de cada poço foi de 100 µL e a quantidade estimada de células presentes em cada poço foi de 1×10^4 células.

Após ser preparada, a placa foi incubada por 48 horas, a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida foi adicionado a solução reveladora de resazurina a 3,0 mM em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006), sendo 10 µL em cada poço da placa de células Vero. Novamente foram incubadas por 24 horas, a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Depois foi realizada leitura a 594 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade foi calculada em função do controle de crescimento, construindo-se um gráfico de dose resposta entre concentração da amostra e viabilidade celular,

permitindo o cálculo do IC₅₀ (concentração em que 50% das células foram lisadas) através de uma regressão não linear (KOELLA & HUBER, 1993)

2.7 Atividade antioxidante

2.7.1 Determinação do teor de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965; SOUSA et al., 2007). Uma massa de 12,5 mg do extrato etanólico e frações das folhas foi dissolvida em um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume final completado com metanol. Desta solução, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL que foi transferida para um tubo de ensaio. Foram adicionados 2,5 mL de uma solução aquosa do reativo Folin Ciocalteu a 10%, e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%, recém-preparada.

A mistura foi incubada por 5,0 minutos em banho-maria, a 50 °C, resfriada e posteriormente foi medida em espectrofotômetro a absorvância no comprimento de onda de 760 nm, em relação ao branco. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância da amostra com uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 40, 60 e 80 µg mL⁻¹), e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (MORAIS, 2008).

2.7.2 Determinação de teor de proantocianidinas

A realização do teste proantocianidinas para verificar a presença de taninos condensados foi feita pelo método proposto por (MORAIS, 2009). Foram pesados 12,5 mg dos extratos e frações das folhas, transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL e completado o volume. Desta solução, foi retirada uma alíquota de 2,0 mL e transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL em triplicata. Neste mesmo balão, foram adicionados 3,0 mL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico 70%, na concentração de 10,0 mg mL⁻¹.

A mistura foi mantida em banho-maria a 50 °C, por 15 min. A amostra foi resfriada e a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 500 nm em comparação ao branco. Foi determinado o teor de proantocianidinas, por interpolação da absorvância das amostras, contra uma curva padrão construída com padrões de catequina (5, 10, 15, 20 e 30 µg mL⁻¹). Os

resultados foram expressos em miligramas de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato.

2.7.3 Determinação do teor de flavonoides

Foi utilizada a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998), onde o teor de flavonoides foi determinado para o extrato e frações das folhas. Inicialmente, em um tubo de ensaio foram adicionados 2,0 mL de solução em metanol do extrato e frações ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m v^{-1}) e 2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada em repouso por 30 min, a temperatura ambiente. Em um espectrofotômetro, a absorbância 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 miligrama 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 da absorbância obtida, *versus* concentração de quercetina utilizada.

2.7.4 Determinação da capacidade antioxidante

O método utilizado para determinação da capacidade antioxidante foi o espectrofotométrico em 517 nm (MORAIS, 2008). Inicialmente, foram preparados 50,0 mL de solução estoque de DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em metanol, na concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, mantida sob refrigeração e protegida luz. Foram feitas diluições de 10,0 a $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uma curva de calibração foi construída, a partir dos valores das absorbâncias registrados no comprimento de onda de 517 nm de todas as soluções (10 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), contra um branco. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata. A atividade antioxidante do extrato e das frações foram determinadas utilizando o radical livre DPPH $\cdot$. Foram preparadas soluções do extrato e frações da folha a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. A partir destas soluções foram realizadas diluições nas seguintes concentrações: 415, 330, 245, 160 e $75 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada uma destas diluições, foi retirada uma alíquota de 0,3 mL da amostra e adicionados 2,7 mL de solução de DPPH $\cdot$ (concentração $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol). Também foi feito um branco nas mesmas condições, sem o DPPH $\cdot$. Após a adição do radical DPPH $\cdot$, as soluções foram deixadas em repouso, e suas absorbâncias registradas no comprimento de

onda de 517 nm, após 1h. A porcentagem de atividade antioxidante (AA) foi determinada pela equação abaixo:

$$DPPH\text{sequestrado (\%)} = \left(\frac{Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \right) 100$$

Onde: $Abs_{controle}$ é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH, $Abs_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra) após 1 hora de reação, e Abs_{branco} é a absorbância da amostra em metanol.

As medidas da concentração eficiente (CE_{50}), que representam a concentração da amostra necessária para seqüestrar 50% dos radicais de DPPH·, foram calculadas através de um gráfico da porcentagem de DPPH· seqüestrado, após uma 1h de reação, em função das concentrações de extrato/frações.

2.8 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (CLAE-IES-EM/EM) das frações acetato de etila e *n*-butanol

Foram realizadas análises nos equipamentos abaixo:

a) Cromatografia líquida;

As análises por CLAE das amostras foram realizadas em um aparelho Shimadzu Nexera onde as separações cromatográficas foram realizados em uma coluna XR-ODS marca Shimadzu Shim-pack (150 x 2 mm.i.d.) com um volume de injeção de amostra de 1,0 µl. A fase móvel foi uma mistura de água acidificada com ácido fórmico (100: 0,1% v/v) (solução A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico (100: 0,1% v/v) (solução B). Foi utilizado um sistema gradiente de solventes que consistiu de: 0-15% de B (0,01-1 min); 15-40% de B (1-7 min); 40-90% de B (7-8 min); este sistema de solvente foi mantido por um minuto. Em seguida foi feito outro gradiente a 90% de B (8-9 minutos) e 90-15% de B (9-10 min). O fluxo da fase móvel foi 0,35 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A calibração foi realizada com formiato de sódio 10 mM, para cada amostra no início da análise cromatográfica;

b) Espectrômetria de Massas;

Para as análises por CLAE-IES/EM/EM, foi utilizado um equipamento Shimadzu Nexera acoplado com um espectrômetro de massa Bruker Impact HD (Bremen, Alemanha) de alta resolução com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Os dados foram adquiridos no modo negativo sendo ajustados numa faixa de m/z 20-1500 com velocidade de aquisição de taxa a 8 Hz. Nitrogênio foi usado como gás de secagem com fluxo 10 mL min⁻¹, e como um gás de nebulização à pressão de 4 bar. O capilar foi aquecido a 200 °C com fluxo de gás nebulizante de 10 L min⁻¹, e 4,5 KV. A calibração foi realizada com formiato de sódio 10 mM para cada amostra, no início da corrida cromatográfica. As análises foram feitas no modo auto EM/EM com aquisição automática de espectros de fragmentação para íons mais intensos. Em seguida os espectros de EM² foram comparados com espectros da literatura. Também foram adquiridos os dados de massa de alta resolução. Estes EMs foram analisados e calculados os erros (em ppm), em relação a massa exata pela equação abaixo:

$$E_{\text{ppm}} = \left[\frac{(\text{massa exata} - \text{massa experimental})}{\text{massa exata}} \right] 10^6$$

2.9 Análise Estatística

As análises na determinação dos constituintes macromoleculares, fenóis totais, flavonóides e proantocianidinas, bem como da atividade antioxidante, foram realizadas em triplicata e os resultados correspondem à média $\pm$ o desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Rendimento do extrato etanólico

O extrato etanólico das folhas de *B.laevifolia* foi obtido por maceração. O cálculo do rendimento do extrato etanólico está na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Rendimento do extrato etanólico das folhas de *B. laevifolia*.

Amostra	Massa do material vegetal	Massa (g)	Rendimento (%)
Folha (extrato etanólico)	220,0	25,8	11,7

3.2 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *B. laevifolia*

O extrato etanólico (22,0 g) das folhas de *B.laevifolia* foi submetido à extração líquido-líquido, com solventes orgânicos com polaridades crescentes e o rendimento foi calculado (Tabela 2).

Tabela 2 - Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas.

	Extração (mg)					Total	Rendimento (%)
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a		
Hexano	245,2	71,0	54,2	61,8	64,8	496,8	2,2
Diclorometano	2,0	214,9	216,7	95,5	93,4	2,6	11,8
Ac. Deetila	1,4	1,1	922,2	1,6	1,0	6,0	27,4
<i>n</i> -Butanol	4,3	541,7	191,0	477,0	425,0	6,0	26,9
Água/metanol	532,2	-	-	-	-	532,2	2,4

*A partir de 22,0 g de extrato etanólico.

Analisando o resultado da extração líquido-líquido, observa-se um maior rendimento nas frações de acetato de etila e *n*-butanol. Já as demais frações apresentaram baixos rendimentos. Durante os processo de extração líquido-líquido foi adicionada água para melhorar as separações entre as fases.

3.3 Prospecção fitoquímica do extrato etanólico e das frações

Na prospecção fitoquímica as amostras foram diluídas em uma pequena quantidade sendo aplicada nas placas de CCD, que foi em seguida feita a inspeção com lâmpada de UV 254 e 365. A avaliação da presença dos metabólitos secundários está na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *B.laevifolia* e das frações.

Amostra	Flavonoides	Alcaloides	Fitoconstituintes			
			Alcaloides/ Nitrogênio Heterocíclico	Terpenoides/ Saponinas/ fenol e açúcar	Terpenoides/ <i>Esteroides</i> / Saponinas	Terpenoides/ Flavonoides
E.E.*	+++	-	-	++	+	+
E.E.**	-	-	-	-	-	+
F.H.*	-	-	-	-	+	+
F.H.**	-	-	-	++	+	-
F.D.*	++	-	-	++	++	++
F.D.**	++	-	-	++	+	+
F.A.*	+++	-	-	+	++	++
F.A.**	++	-	-	++	+	-
F.B.*	+++	-	-	+	+	++

E.E = extrato etanólico; F.H = partição hexano; F.D = partição diclorometano; F.A = partição acetato de etila; F.B = partição *n*-butanol.*A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando fase como móvel (acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético:água,10:1,1:1,1:2,6). FM1; ** A placa de sílica gel foi desenvolvida utilizando fase como móvel (clorofórmio: metanol: hidróxido de amônia, 9:1: 0,25). FM2;+: presente; - : ausente.

Através dos testes de prospecção foi possível observar a presença de compostos fenólicos no extrato e nas frações das folhas. Não foi detectada a presença de alcaloides. A classe de metabólitos predominante foi a dos flavonoides, nas frações acetato de etila, *n*-butanol e extrato etanólico.

Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA *et al.*, 2007). (FURTADO, 2014). Estes compostos apresentam grupos hidroxila e carbonila na sua estrutura e por esse motivo solventes mais polares são capazes de extrair estes compostos do material vegetal. Portanto, os resultados da prospecção fitoquímica se encontram de acordo com os resultados mostrados na análise do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Assim, as frações acetato de etila e *n*-butanol são promissoras para continuidade dos estudos de isolamento de compostos da classe dos flavonoides.

O fato desta espécie não apresentar alcalóides causou uma razoável surpresa, já que a espécie *B. caapi* possui os alcaloides harmina, harmalina e tetrahydroharmina, isolados (MCKENNA, 2004). Mas já para a espécie *B. pubipetala* testes para alcalóides deram negativo também, e positivo para taninos e flavonoides (SACRAMENTO, 2013). Já o extrato hexânico das folhas de *B. malifolia* e a *B. campestri* apresentaram diversas classes de metabólitos, inclusive alcaloides (FRIAS, 2012). Tais resultados podem ser explicados pela diferença de clima, solo em que as plantas foram coletadas.

Devido à sua alta heterogeneidade química, os alcalóides não podem usualmente ser identificados por apenas uma metodologia cromatográfica. Portanto, há a necessidade do uso de vários reativos de precipitação para determinar a presença destes metabólitos. A formação de sais quaternários identificando seu núcleo com um nitrogênio em estado de oxidação negativa é a base para a precipitação deste grupo de substâncias. Também observam resultado falso-positivo para a presença de alcaloides em extratos que contenham proteínas, purinas, betaínas, alga-pironas, hidróxi-fenóis e lignanas (SIMÕES, 1999).

3.4 Atividades biológicas extrato etanólico e frações de *B. laevifolia*.

3.4.1 Atividade antimicrobiana do extrato e frações das folhas de *B. laevifolia*

Os testes para verificar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações das folhas estão representados na Tabela 4. Para o extrato etanólico e frações, a concentração máxima testada foi de 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanólico e frações das folhas de *B. laevifolia*.

Bactérias	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							M***
	EE	PH	PD	PAE	PB	PA	CHD**	
<i>S. mutans</i> ¹	> 400	>400	>400	>400	>400	>400	0,9	-
<i>S. mitis</i> ¹	> 400	>400	>400	>400	>400	>400	7,4	-
<i>S. sanguinis</i> ¹	> 400	>400	>400	>400	>400	>400	7,4	-
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ¹	> 400	>400	>400	>400	>400	>400	1,9	-
<i>P. gingivalis</i> ²	*	400	200	>400	>400	200	-	*
<i>F. nucleatum</i> ²	200	100	400	>400	>400	100	-	-
<i>A. naeslundii</i> ²	> 400	>400	>400	>400	>400	>400	-	-
<i>B. fragilis</i> ²	> 400	>400	>400	>400	>400	400	-	0,4
<i>B. tetrataiotaomicon</i> ²	--	--	--	--	--	--	-	1,5

*Não houve crescimento bacteriano; **Concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (CHD = Clorexidina) = 0,115 $\mu\text{g/mL}$ a 59,0 $\mu\text{g/mL}$; ***Concentrações do controle positivo testado para as anaeróbias (M = Metronidazol) = de 0,0115 $\mu\text{g/mL}$ a 5,9 $\mu\text{g/mL}$; 1 = Bactéria Gram-positiva (aeróbica); 2 = bactéria Gram-negativa (anaeróbica); EE: Extrato Etanólico. FH: Fração hexano. FD: Fração diclorometano. FAE: Fração acetato de etila. FB: Fração *n*-butanol. FA: Fração hidrometanólica.

Segundo Holetz (2002), para valores de CIM abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana é considerada promissora. Valores entre 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana é considerada moderada. Valores entre 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade

antimicrobiana é considerada fraca, e valores acima de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade é considerada inativa. Já RÍOS E RECIO (2005), por outro lado, consideram que apenas atividades antimicrobianas com CIM abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ podem ser consideradas promissoras.

Pela tabela 4 observa-se que a avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *B. laevifolia* não apresentou atividade na concentração 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como a metodologia empregada não utilizou concentrações entre 400 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não podemos afirmar com certeza que a atividade antimicrobiana é moderada ou fraca. Entretanto, observa-se que tanto o extrato etanólico quanto as partições possuem o mesmo nível de atividade contra cada bactéria estudada, com exceção a bactéria *F. nucleatum* que apresentou atividade igual a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Não houve crescimento bacteriano para *P. gingivalis*, nem para *B. thetaiotaomicron*. Para as partições estudadas não houve atividade para bactérias aeróbicas. Vale ressaltar que as bactérias aeróbicas são menos resistentes que as anaeróbicas porque elas não possuem uma bicamada fosfolipídica na sua parede celular, como as anaeróbicas. Já para bactérias anaeróbicas destaca-se a atividade antimicrobiana contra bactéria *F. nucleatum*, comum CIM de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as frações hexano e hidrometanólica, e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a fração diclorometano. E a atividade contra bactéria *P. gingivalis* destaca-se também nas frações diclorometano e hidrometanólica, com um CIM de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tais frações podem ser utilizadas para futuros isolamentos de compostos responsáveis por essas atividades.

A literatura não se encontra resultados de atividade antimicrobiana para os seus extratos e partições, para efeito de comparação. Entretanto, testes realizados com extratos das folhas de *B. anisandra* contra a bactéria *S. aureus* mostraram CIM entre 21,5 mg mL^{-1} e 430 mg mL^{-1} (PADUA et al., 2013). Extrato etanólico das folhas de *B. anisandra* não apresentou atividade para essa bactéria (FREITAS et al., 2010). Vale aqui ressaltar que estes resultados da literatura estão expressos em mg mL^{-1} , e os resultados apresentados para a *B. laevifolia* estão em $\mu\text{g mL}^{-1}$, isto é, 1000 vezes mais eficiente.

3.4.2 Atividade antiprotozoária e citotóxica do extrato etanólico e das frações

Os resultados IC_{50} das atividades antiprotozoária e citotóxica das amostras de extrato etanólico e frações da *B. laevifolia* estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da atividade antiprotozoária para o extrato e frações das folhas da *B. laevifolia*.

Amostras	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) <i>Leishmania amazonensis</i>	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) Célula Vero
Extrato etanólico	> 512	> 512
Fração hexano	362±24	331±11
Fração diclorometano	> 512	> 512
Fração acetato de etila	346±11	361±29
Fração <i>n</i> -butanol	> 512	> 512
Fração hidrometanólica	> 512	> 512

Analisando a Tabela 5, pode se concluir que entre as frações hexano e acetato de etila se destacam com a melhor atividade contra *Leishmania amazonensis*, pois seu IC₅₀ é menor que as demais partições. Isto significa que é necessária uma menor concentração para se inibir 50% dos parasitas em teste. Para o teste de citotoxicidade dos extratos e frações se destacam a partição hexano e acetato de etila como sendo os mais tóxicos, pois possui menor valor de IC₅₀, isto indica que a uma baixa concentração consegue inibir 50% das células.

Ao se compararem os valores de IC₅₀ da Tabela 5, foi observado que a fração hexano não apresentou resultado promissor para atividade antiprotozoária, pelo fato da amostra apresentar toxidade com concentrações inferior ao da atividade antiprotozoária. Já para a partição acetato de etila o valor de IC₅₀ é maior para o protozoário testado em relação ao IC₅₀ da atividade citotóxica, mas seus desvios são altos não podendo ser válida a atividade. O extrato etanólico e as demais frações não apresentaram atividade para o protozoário até a concentração de 512 µg mL⁻¹. Desta forma, não é possível validar a atividade.

Não foram encontrados estudos que relatam a atividade do extrato etanólico e das frações de espécies do gênero *Banisteriopsis* contra a *Leishmania amazonensis*, para efeitos de comparação de resultados.

3.4.3 Atividade antifúngica do extrato e frações das folhas de *B. laevifolia*

Os testes para verificar a atividade antifúngica do extrato etanólico e frações das folhas estão representados na Tabela 6. As concentrações mínima e máxima usadas foram 0,98 µg mL⁻¹ e 3000 µg mL⁻¹, respectivamente.

Tabela 6 - Atividade antifúngica do extrato etanólico e das frações para *B. laevifolia* (em $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Leveduras	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Extrato Etanólico	Hexano	Diclorometano	Acetato de Etila	n-Butanol	Água
<i>C. albicans</i>	31,2	>3000	>3000	187,5	93,7	>3000
<i>C. tropicalis</i>	62,5	>3000	>3000	375,0	187,5	>3000
<i>C. glabrata</i>	62,5	>3000	>3000	375,0	375,0	>3000

Concentrações do controle positivo testado frente às leveduras (Anfotericina = $0,031\mu\text{g mL}^{-1}$ a $16,0\mu\text{g mL}^{-1}$. *C. krusei* = $1,5\mu\text{g mL}^{-1}$; *C. parapsilosis* = $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$

A atividade antifúngica deve se provavelmente a capacidade dos flavonoides presentes nestas amostras de formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fungicas (ARIF, et al., 2011). Por outro lado, a natureza lipofílica dos flavonoides pode ser capaz também de romper as membranas dos fungos (ARIF, et al., 2011; SALAS et al., 2011). O extrato etanólico das folhas apresentou os melhores resultados para as três cândidas estudadas. Este melhor resultado do extrato em relação às frações pode ser explicado em razão de um possível sinergismo existente entre todos os compostos no extrato. Resultados moderados foram obtidos para as partições acetato e butanol, seguindo os mesmos critérios de atividade proposto por HOLETZ, (2002) para a atividade antimicrobiana.

Estudos com extrato etanólico das folhas de *B. anisandra* apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*. Entretanto, com valores de CIM muito alto ($86.000\mu\text{g mL}^{-1}$) (PÁDUA et al., 2013). Já com o extrato etanólico das folhas da *B. laevifolia* houve inibição com valor de CIM de $31,2\mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, uma concentração muito mais baixa, e relevante.

Com relação ao teste de citotoxicidade, para o extrato etanólico e partições das folhas, foram avaliadas as suas toxicidades através das células *Vero* ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África). Para se obter uma relação entre a concentração inibitória (IC_{50}) e a atividade antifúngica (CIM, Tabela 6), foi determinado o índice de seletividade (IS), utilizando a equação:

$$\text{IS} = \log (\text{IC}_{50}/\text{CIM})$$

Os valores positivos de IS representam seletividade elevada para os microorganismos estudados, enquanto que valores negativos de IS indicam elevada toxicidade para as células Vero (CASE et al., 2006). Os valores do índice de seletividade estão na tabela 7.

Tabela 7 – Valores de IS para a atividade antifúngica.

Leveduras	Extrato Etanólico	Hexano	Diclorometano	Acetato de Etila	<i>n</i> -Butanol	Água
<i>C. albicans</i>	1,2	-1,0	-0,8	0,3	0,7	-0,8
<i>C. tropicalis</i>	0,9	-1,0	-0,8	-0,01	0,4	-0,8
<i>C. glabrata</i>	0,9	-1,0	-0,8	-0,01	0,1	-0,8
IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) Célula Vero	>512	331±11	>512	361±29	>512	>512

O extrato etanólico e fração *n*-butanol apresentaram índice de seletividade positivo, indicando maior atividade destes para as cândidas e menor citotoxicidade, resultados estes relevantes. Para a fração acetato de etila, apenas para *C. albicans* apresentou resultado positivo validando sua atividade. Para as demais frações devida à ausência de atividade até a concentração de 3000 µg mL⁻¹ o índice de seletividade está negativo. Na literatura não há nenhum resultado de citotoxicidade para espécies do gênero *Banisteriopsis* de modo que se possa comparar com a *B. laevifolia*.

3.5 Quantificação da atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de *B. laevifolia*

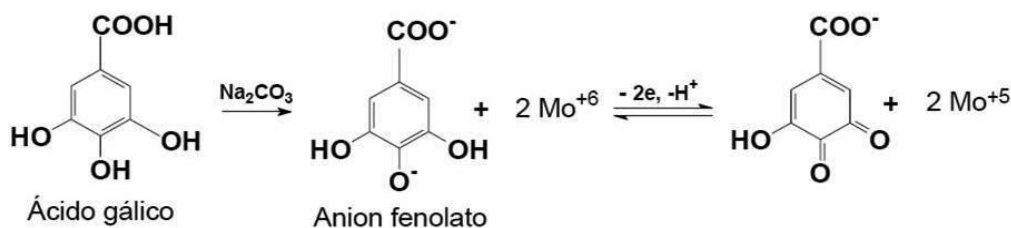
A análise quantitativa da atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de *B. laevifolia* foi baseada na quantificação do teor de fenóis totais, proantocianidinas, flavonoides e pelo ensaio “*in vitro*” da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH (SOUSA, et al., 2007; MORAIS, et al., 2009).

3.5.1 Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

A determinação de fenóis totais foi realizado pelo método de Folin-Ciocalteu que consiste em quantificar em espectrofotômetro a redução sofrida pelos ácidos fosfomolibídico (H₃PMo₁₂O₄₀) e fosfotungístico (H₃PW₁₂O₄₀) em presença de substâncias fenólicas

(MESSERSCHMIDT et al., 2012). Este processo de redução faz com que haja uma mudança na coloração da solução de amarelo para azul, A Figura 7 mostra a reação detalhada.

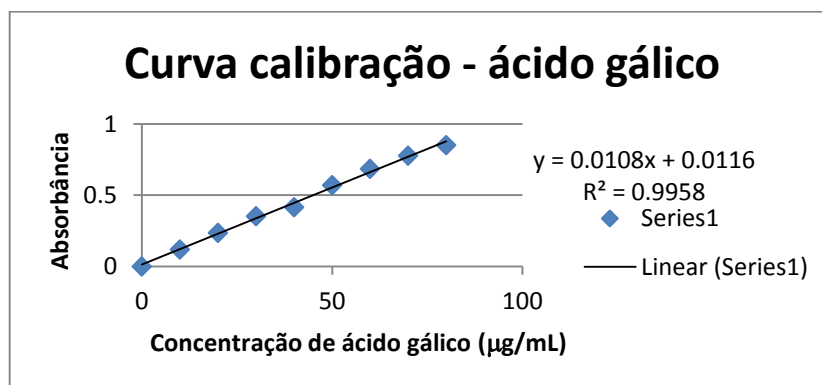
Figura 7 - Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu).



Fonte: OLIVEIRA, 2008.

Para a quantificação de fenóis totais foi construída uma curva de calibração com o padrão de ácido gálico (Figura 8), onde se mediu a absorvância da reação entre o ácido gálico e o Folin.

Figura 8 - Curva padrão de calibração típica para o ácido gálico.



O teor de fenóis totais foi calculado através da regressão linear da curva de calibração do gráfico da absorvância da reação entre o ácido gálico e o Folin *versus* concentração de ácido gálico. O resultado pode ser expresso em *mg* de equivalente de ácido gálico por *g* (EAG) de extrato ($\text{mg EAG g}_{\text{extrato}}^{-1}$), ou material vegetal seco ($\text{mg EAG g}_{\text{vegetal}}^{-1}$). Esta última forma considera o rendimento de extração. Quanto maior este valor, maior o teor de fenóis totais. Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados do teor de fenóis totais no extrato etanólico e das frações da *B. laevifolia*.

Amostra	Folha (mg de EAG g_{vegetal}⁻¹)
Extrato etanólico	542,3 ± 2,12
Hexano	66,2 ± 1,60
Diclorometano	495,1 ± 3,70
Acetato de etila	660 ± 1,52
<i>n</i> - Butanol	784,7 ± 4,57

De acordo com os dados da Tabela 8 as frações de *n*-butanol e acetato de etila apresentaram um maior teor de compostos fenólicos. Já a partição hexano baixo teor de compostos fenólicos. Este resultado já era esperado devido à polaridade dos compostos fenólicos. Quanto maior o teor de compostos fenólico maior a capacidade de sequestro do radical DPPH·.

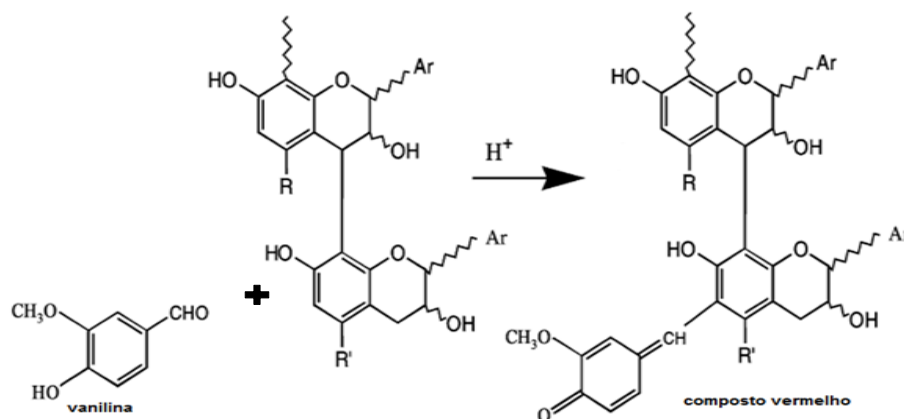
Comparativamente a outra planta do cerrado, *Eugenia calicyna*, a partição hexano apresentou 22,5 mg de EAG/g_{extrato}, diclorometano 70,1 mg de EAG/g_{extrato}, acetato de etila 350,1 mg de EAG/g_{extrato}, e butanol 311,3 mg de EAG/g_{extrato} (SOUSA, 2015), resultados menores do que a *B. Laevifolia*. Houve uma similaridade nas partições acetato e butanol nas duas espécies, apresentando maiores teores de fenóis totais e boa atividade antioxidante.

Em relação ao extrato etanólico, as folhas da espécie *B. oxyclada* apresentou um teor de 83,3 mg de EAG/g_{extrato} (FARIA, 2014), enquanto o extrato etanólico das folhas da *B. Laevifolia* apresentou um resultado bem superior de atividade antioxidante (cerca de 540 mg de EAG g_{extrato}⁻¹).

3.5.2 Determinação de proantocianidinas

Através do método da vanilina sulfúrica pode-se quantificar o teor de proantocianidinas presentes no extrato e nas partições da *B. laevifolia*. Este método baseia-se na reação da vanilina com os taninos formando um composto vermelho (Figura 9), e este pode ser quantificado (PELL et al., 2001).

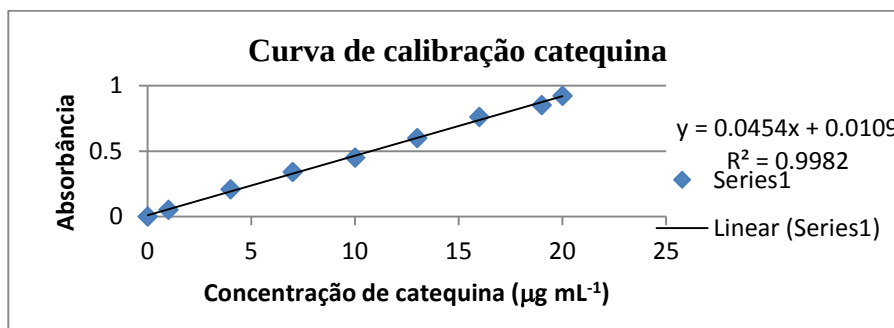
Figura 9 - Reação da vanilina com taninos condensados.



Fonte: PELL et al., 2001.

A quantificação do teor de proantocianidinas foi realizada através da construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de catequina (Figura 10).

Figura 10 - Curva de calibração da catequina



O teor de proantocianidinas foi calculado através da curva de calibração do gráfico da absorbância da reação entre a catequina e a vanilina *versus* a concentração de catequina. O resultado foi dado em *mg* de equivalente de catequina por *g* de extrato ($\text{mg EC g}_{\text{extrato}}^{-1}$) e por *g* de material vegetal seco ($\text{mg EC g}_{\text{vegetal}}^{-1}$), este último considera o rendimento de extração. Quanto maior este valor, maior o teor de proantocianidinas. Os valores para o teor de proantocianidinas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados da quantificação de proantocianidinas do extrato etanólico e das partições da *B. laevifolia*.

Amostra	Folha (mg de EC g_{vegetal}⁻¹)
Extrato etanólico	274,6 ± 8,28
Hexano	18,5 ± 8,23
Diclorometano	278,6 ± 2,70
Acetato de etila	268,9 ± 3,26
<i>n</i> - Butanol	382,1 ± 1,75

Observa-se pela Tabela 9 que o maior teor de proantocianidinas entre as frações foi para a fração butanólica. Em seguida temos as frações diclorometano e acetato de etila. Comportamento semelhante aos dos fenóis totais apresentados na (Tabela 8), onde o *n*-butanol possui maior valor, seguido da fração acetato. Provavelmente, isto se deve ao fato das frações butanólica e acetato apresentarem outros tipos de compostos fenólicos em maior quantidade. Fato que é comprovado quando se observa o rendimento do processo de partição líquido-líquido (Tabela 2), no qual se constata um rendimento elevado para as frações *n*-butanol e acetato. Convertendo o valor de mg EC por grama de extrato, em porcentagem, é obtido um valor de 27%. Esta porcentagem é bem elevada, uma vez que este valor é comparável ao teor de taninos do extrato presente no fitoterápico da espécie conhecida como Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), no qual seu extrato deve apresentar no mínimo uma concentração de 8% de proantocianidinas (ANVISA, 2003).

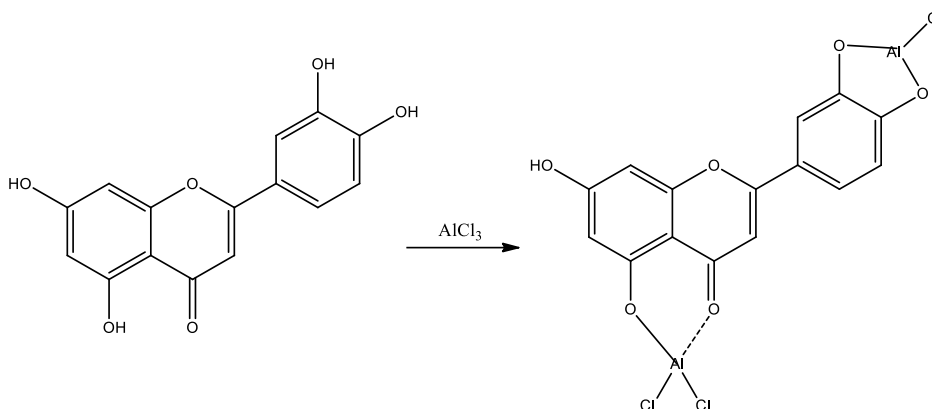
O uso de drogas contendo taninos está relacionado com as propriedades adstringentes que esses possuem. Algumas propriedades dos taninos já foram comprovadas, como efeito antidiarreico, antisséptico e na precipitação de proteínas, ajudando nos processos de cura da pele, como feridas, queimaduras e inflamações. Ao mesmo tempo, as plantas se utilizam destes compostos para seu mecanismo de defesa à exposição térmica e mecânica (MONTEIRO et al., 2005).

3.5.3 Determinação do teor de flavonoides

A quantificação do teor de flavonoides foi realizada através do método com solução de AlCl₃ (WOISKY; SALATINO, 1998). Nesta análise, o cátion alumínio (Al³⁺) forma complexos estáveis com os flavonoides, conforme está mostrado na Figura 11. O complexo formado apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não

complexado, assim o monitoramento dessa complexação é realizada em espectrofotômetro de UV, no comprimento de onda de 425 nm.

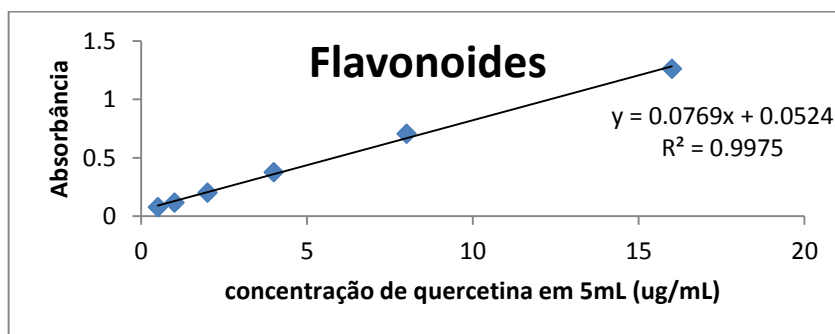
Figura 11 - Complexação de um flavonoide com solução de AlCl_3 .



Fonte: MARKHAM (1982 apud MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998)

A quantificação do teor de flavonoides foi realizada através da construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de quercetina (Figura 12).

Figura 12 - Curva de calibração da quercetina.



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 mgde equivalente de quercetina por g de extrato ($\text{mg EQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$) e por g de material vegetal seco ($\text{mg EQ g}_{\text{vegetal}}^{-1}$), este último considera o rendimento de extração. Quanto maior esse valor maior o teor. Os resultados para teor de flavonoides estão expressos na (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados da quantificação do teor de flavonoides do extrato etanólico e das frações da *B. laevifolia*.

Amostra	Folha
	Teor de flavonoides (mg EQ g _{vegetal} ⁻¹)
Extrato etanólico	61,24 ± 0,43
Hexano	60,57 ± 0,44
Diclorometano	77,21 ± 1,86
Acetato de etila	88,81 ± 3,5
<i>n</i> - Butanol	18,78 ± 0,93

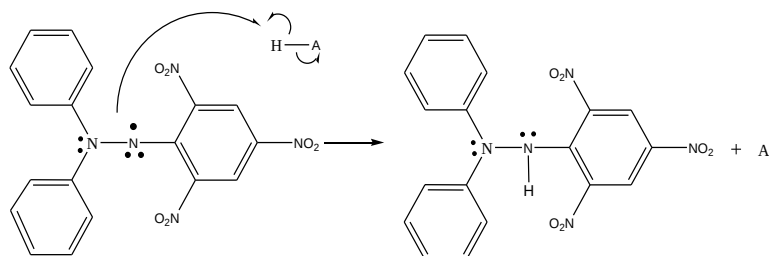
O teor de flavonoides na fração acetato de etila das folhas da *B. laevifolia* foi maior em relação as outras frações. Estes resultados seguem a mesma tendência que fenóis totais e proantocianidinas. Entretanto, o teor de flavonoides para a partição *n*-butanol se encontra extremamente baixo, inclusive quando se observa os valores de mg EQ por grama de extrato. As análises mostradas revelaram que a partição *n*-butanol apresenta elevada quantidade de fenóis totais e proantocianidinas. Portanto, e provavelmente, os flavonoides que estão presentes *n*-butanol podem apenas ser monômeros de taninos e então não complexam com o AlCl₃ ou não apresentam hidroxilas como substituintes capazes de complexar com AlCl₃, ou o comprimento de onda do flavonóide complexado com AlCl₃ é diferente de 425 nm.

3.5.4 Capacidade sequestrante de radicais livres DPPH· pelo extrato e frações da *B. laevifolia*.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método do sequestro do radical livre DPPH·, que se baseia na reação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila com um composto com potencial antioxidante (A-H) (Figura 13). As estruturas consideradas antioxidantes neste estudo foram às estruturas polifenólicas presentes nos extratos e frações das folhas de *B. laevifolia*.

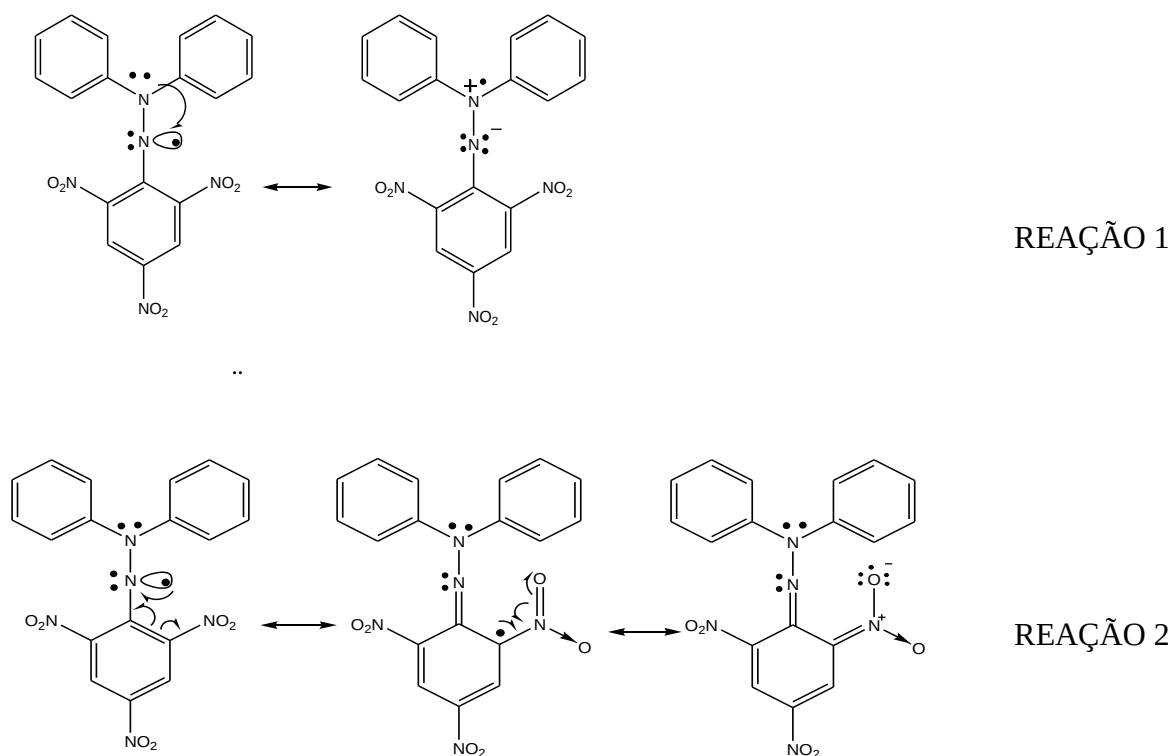
A solução do radical livre DPPH· absorve luz em 517 nm, e possui coloração violeta. Quando ocorre esta reação há uma redução formando 2,2-difenil-1-picridrazina (DPPH-H), cuja coloração é amarela. Esta mudança de coloração pode ser monitorada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Visível (BERSET et al., 1995). O método de sequestro de radicais livres DPPH· é bastante utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante por ser considerado de fácil manipulação, sensível, preciso e prático (OLIVEIRA, 2015).

Figura 13 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH $\cdot$ e uma estrutura antioxidante (HA).



A alta aplicação deste radical livre nos estudos de atividade antioxidante se dá pela sua alta estabilidade química durante o manuseio. Seu elétron desemparelhado na estrutura é estabilizado por ressonância (Figura 14) entre os átomos de nitrogênio (Reação 1), podendo estender-se para os três anéis aromáticos (Reação 2).

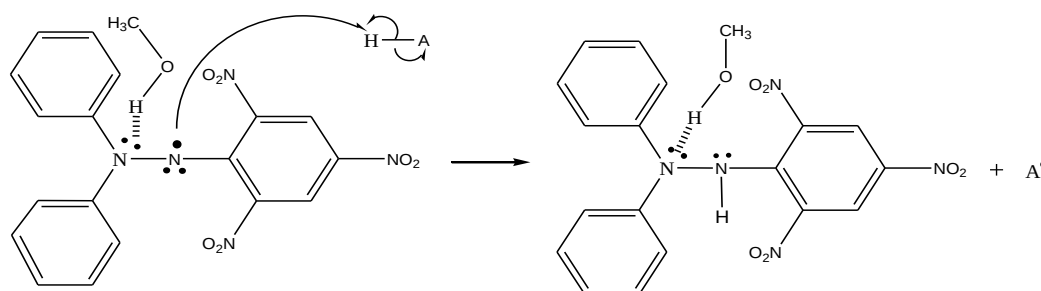
Figura 14 - Estabilização do radical livre DPPH $\cdot$: através da conjugação do elétron livre entre os átomos de nitrogênios (reação 1); através da conjugação do elétron livre com os anéis aromáticos (reação 2).



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA (2015).

A solução de radical DPPH $\cdot$ empregada foi a metanólica, apresentando vantagens em relação à solução aquosa uma vez que o átomo de nitrogênio, que possui o octeto de elétrons (N_{oe}), se associa preferencialmente com o hidrogênio ácido do metanol, deixando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio radicalar (N_{rad}) reagir com a estrutura antioxidante (AH), como mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Mecanismo de reação do radical livre DPPH $\cdot$.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2015.

3.5.4.1 Análise da atividade antioxidante através da Concentração Efetiva média (CE₅₀)

O potencial da atividade antioxidante pode ser correlacionada com o valor obtido de CE₅₀ (Tabela 11) (REYNERTSON, 2005).

Tabela 11 - Correlação entre os valores de CE₅₀ e a intensidade da atividade antioxidante.

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

Foram construídas curvas analíticas do extrato e das frações com diferentes concentrações para a determinação do CE₅₀ (concentração efetiva média) para as amostras. Os valores de CE₅₀ foram expressos em concentração (µg mL⁻¹) necessária para consumir 50% do radical livre DPPH• (ARGOLO et al., 2004). Os resultados de sequestro de radicais livres DPPH• (expresso em concentração efetiva, CE₅₀) do extrato etanólico e frações das folhas da *B. laevifolia* estão expressos na Tabela 12.

A partir da construção destas curvas foi possível calcular a atividade antioxidante dos extratos e das frações. Quanto menor o valor de CE₅₀ maior é o potencial antioxidante da amostra, pois menor é a concentração de amostra para consumir 50% do radical DPPH• (REYNERTSON et al., 2005).

Tabela 12 - Valores de CE₅₀ (µg mL⁻¹) da capacidade antioxidante para o extrato etanólico e as partições da *B. laevifolia*.

Amostra	Folha CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)
Extrato etanólico	4,53 ± 0,92
Hexano	58,17 ± 1,46
Diclorometano	9,14 ± 0,79
Acetato de etila	4,07 ± 0,46
<i>n</i> - Butanol	8,39 ± 1,07
BHT*	7,3 ± 0,3

*Controle positivo (butilidroxitolueno)

O extrato das folhas da *B. Laevifolia* demonstrou relevante sequestro do radical livre DPPH· quando comparado com extratos etanólicos de outras espécies do cerrado já estudadas. Tal atividade está relacionada ao teor de fenóis totais e ao teor de proantocianidinas. Resultados obtidos nos testes em CCD demonstram que os extratos da *B. laevifolia* apresentaram duas classes de metabólitos secundários majoritários (flavonoides e terpenos), sendo que o resultado para flavonoides corrobora com os resultados dos ensaios de avaliação do potencial antioxidante (DPPH·), já que esta classe de compostos possui atividade antioxidante conhecida.

Através da (Tabela 12) é possível observar que, o extrato etanólico, as frações acetato de etila e *n*-butanol apresentam os menores CE₅₀ e, portanto, melhor atividade antioxidante. Estes resultados de CE₅₀ são comparáveis ao do BHT, apresentando excelente atividade antioxidante. Este fato mostra que esse extrato e as partições acetato e butanol são promissores no isolamento de compostos com excelente atividade antioxidante.

Comparativamente, a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas da *B. laevifolia* (CE₅₀ = 4,53 µg mL⁻¹) é bem superior à atividade antioxidante da outra espécie de Banisteriopsis, a *B. oxyclada* (CE₅₀ = 25,9 µg mL⁻¹; FARIA, 2014). De qualquer forma, estes resultados das atividades antioxidantes corroboram com outra planta da família das Malpighiaceae, a *Byrsonima gardneriana* que apresentou CE₅₀ de 3,12 µg mL⁻¹ para o extrato etanólico de suas folhas. Para a fração acetato de etila da *B. laevifolia* o valor de CE₅₀ foi muito próximo da mesma fração acetato da *B. gardneriana* (3,5 µg mL⁻¹; ROLIM, 2013).

4 Identificação de compostos fenólicos nas frações acetato de etila e *n*-butanol utilizando a CLAE-EM/EM.

A partir dos melhores valores de CIM observados nas avaliações das atividades antifúngicas e de CE_{50} para a atividade antioxidante, as frações acetato de etila e *n*-butanol, foram submetidas à análise por espectrometria de massas com o objetivo de identificar os compostos bioativos. As Figuras 16 e 17 apresentam os cromatogramas de íons totais obtido por Ionização Eletrospray (IES) das frações acetato de etila e *n*-butanol. Foram observados compostos que co-eluíram no mesmo sinal dos cromatogramas de CLAE/EM, com tempos de retenção muito próximos.

Figura 16 – Cromatograma de íons totais da fração de acetato de etila obtido por IES-EM/EM.

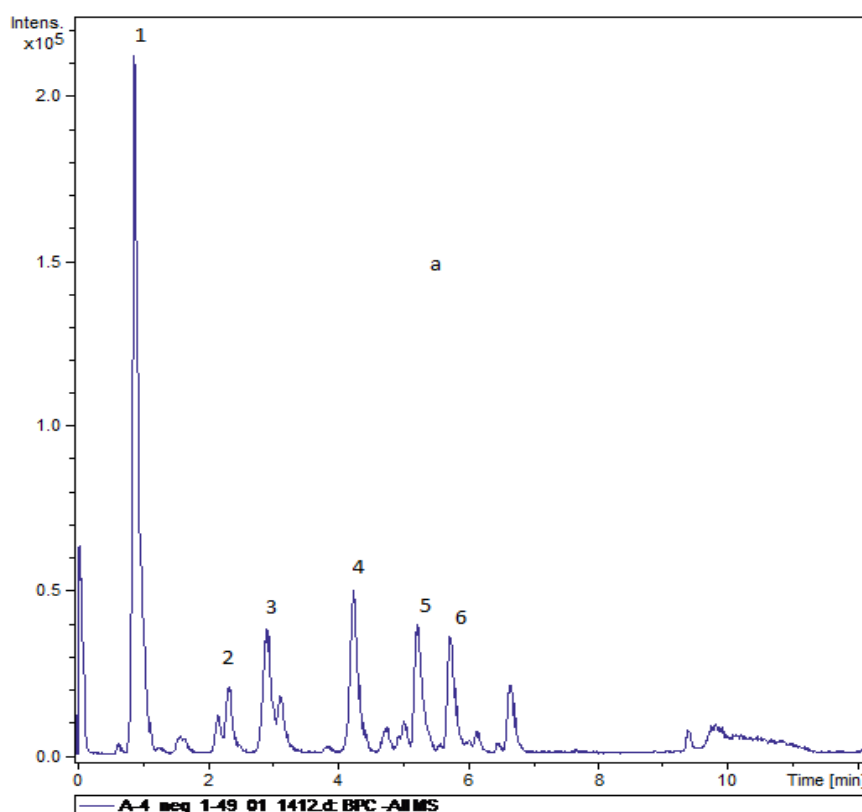
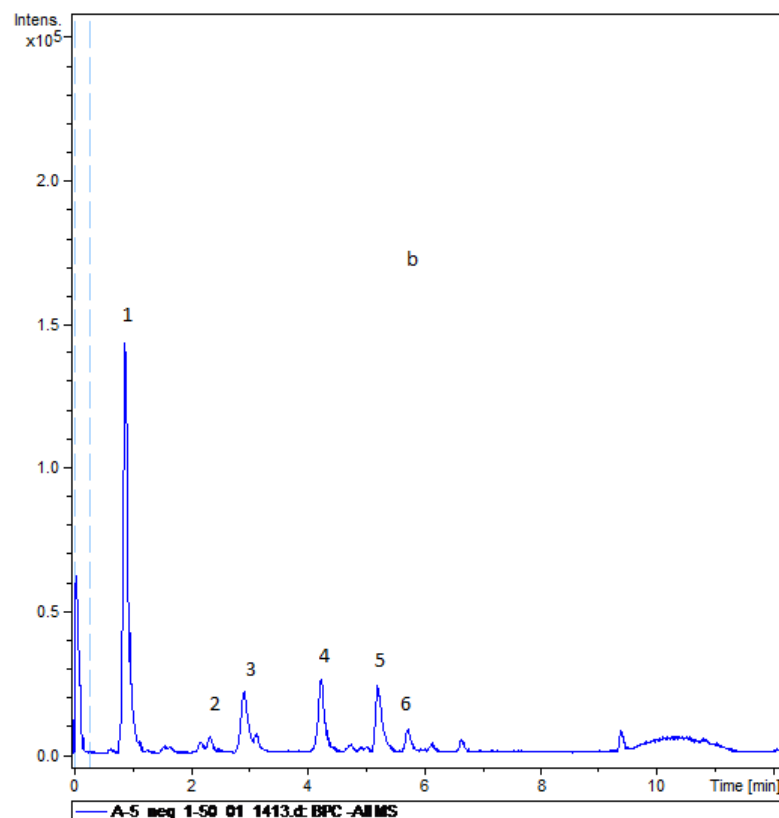


Figura 17 - Cromatograma de íons totais da fração *n*-butanol obtido por IES-EM/EM.



Foram observados compostos que co-eluíram no mesmo sinal dos cromatogramas de CLAE/EM, com tempos de retenção muito próximos. Após comparações dos dados de massas de alta resolução e de EM² com aqueles de referências padrões da literatura, foi possível propor a presença de compostos fenólicos reconhecidamente bioativos (ácidos fenólicos e flavonóis), em ambas as frações (Tabela 13).

Tabela 13 - Identificação por espectrometria de massas de compostos bioativos presentes na fração acetato de etila e *n*-butanol.

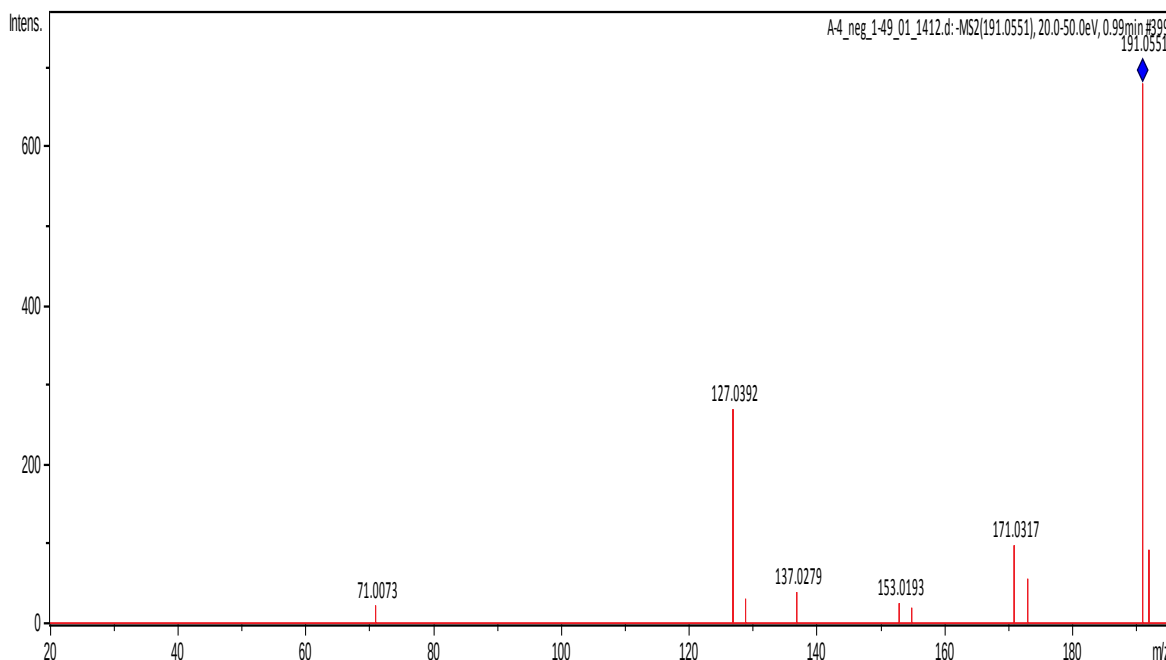
Pico	t _R (min)	Composto	Ions [M-H] ⁻	Fragmentação EM ² (<i>m/z</i>)	E _{ppm}	Referência
1	0,93 ^{a,b}	ácido quínico	191,0561	191(173, 171, 153, 137, 127)	0,00 ^{a,b}	LAY-KEOW et al., 2004.
2	2,37 ^a 2,20 ^b	Ácidocafeoilquínico	353,0878	353(191, 179, 173, 135)	0,00 ^a 0,56 ^b	SUN et al., 2007. BASTOS et al., 2007.
3	2,39 ^a 2,38 ^b	procianidina B1	577,1350	577(451,425, 407, 289, 125)	0,17 ^{a,b}	KAJDŽANOSKA et al., 2010; SUN et al., 2007; GOUVEIA et al., 2013.
	2,94 ^a 2,96 ^b	(epi)catequina	289,0717	289(245, 205, 179, 137)	0,34 ^a 0,00 ^b	KAJDŽANOSKA et al., 2010; SUN et al., 2007.
4	4,31 ^{a,b}	3-O-β-galactopiranosil quercetina	595,1304	595(300, 271, 255)	0,16 ^a 0,00 ^b	SILVA et al., 2015.
	4,80 ^{a,b}	procianidina B2	577,1341	577 (451, 425, 407, 289, 125)	1,73 ^a 0,17 ^b	SUN et al., 2007; GOUVEIA et al., 2013.
5	5,24 ^a 5,23 ^b	quercetina-3-O-glucuronideo	477,0673	477 (301, 255, 178, 151)	0,20 ^a 0,00 ^b	SUN et al., 2007; KAJDŽANOSKA et al., 2010.
	5,25 ^a 5,24 ^b	Rutina	609,1462	609 (301, 300, 255, 178, 151)	0,16 ^a 0,32 ^b	SUN et al., 2007. BASTOS et al., 2007.
6	5,74 ^a 5,73 ^b	quercetin-3-O-α-L-rhamnopiranosideo	447,0932	447(301, 271, 255, 178, 151)	0,00 ^a 0,22 ^b	SALDANHA et al., 2013.

a = fração acetato de etila; b = fração *n*-butanol.

O pico 1 apresentou o íon molecular no modo negativo em *m/z* 191 que sugere a presença de ácido quínico, ou ácido cítrico, ou escopoletina. A fragmentação deste íon produz íons *m/z* a 173 e 135. A escopoletina produz um único íon fragmentado a *m/z* 176 que não foi observado no espectro. O espectro EM/EM dos ácidos cítrico e quínico compartilham os mesmos íons a *m/z* 173 e a *m/z* 111. O ácido cítrico apresenta picos adicionais (a *m/z* 87 e 85), sendo o pico base a *m/z* 111. No entanto, o ácido quínico apresenta íons adicionais a *m/z* 85, 93 e 127, sendo o íon a *m/z* 127 o pico

base, diferenciando os dois ácidos (Figura 18). Desta forma então o pico 1 foi identificado como ácido quínico (LAY-KEOW, 2004).

Figura 18 – Espectro de massas do pico 1 identificado como ácido quínico.



O pico 2 apresentou o íon molecular no modo negativo a m/z 353 e íons fragmentos a m/z 191, 179, 173, e 135 que coincide com os fragmentos apresentados pelo ácido cafeoilquínico (Figura 19) (SUN, et al., 2007; BASTOS, et al., 2007), cujo mecanismo para a fragmentação deste ácido clorogênico está representado na Figura 20. O fragmento m/z 191 corresponde ao ácido quínico e o fragmento m/z 173 à eliminação neutra de uma molécula de água (SUN, et al., 2007).

Figura 19 – Espectro de massas para o pico 2, identificado como ácido cafeoilquínico.

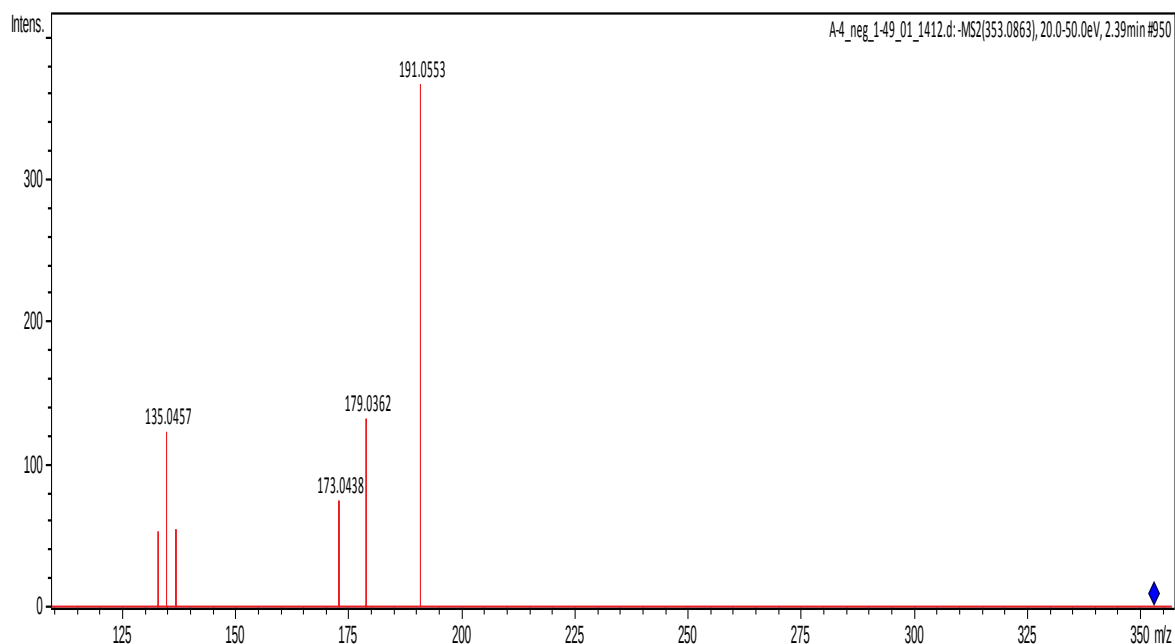
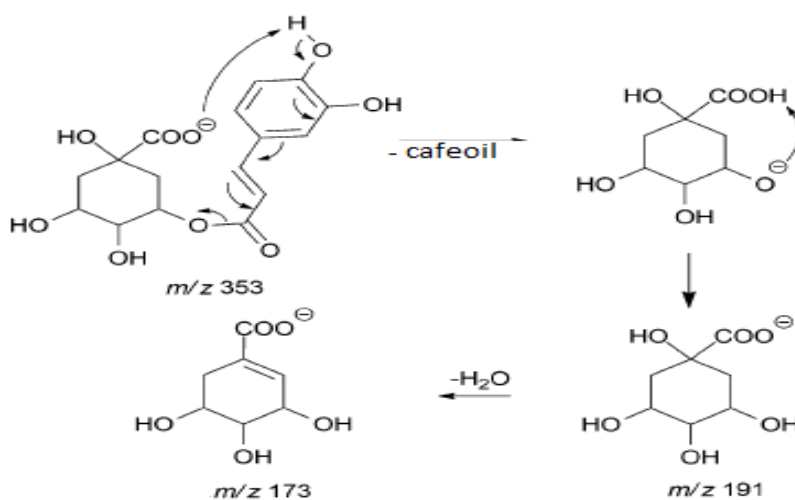


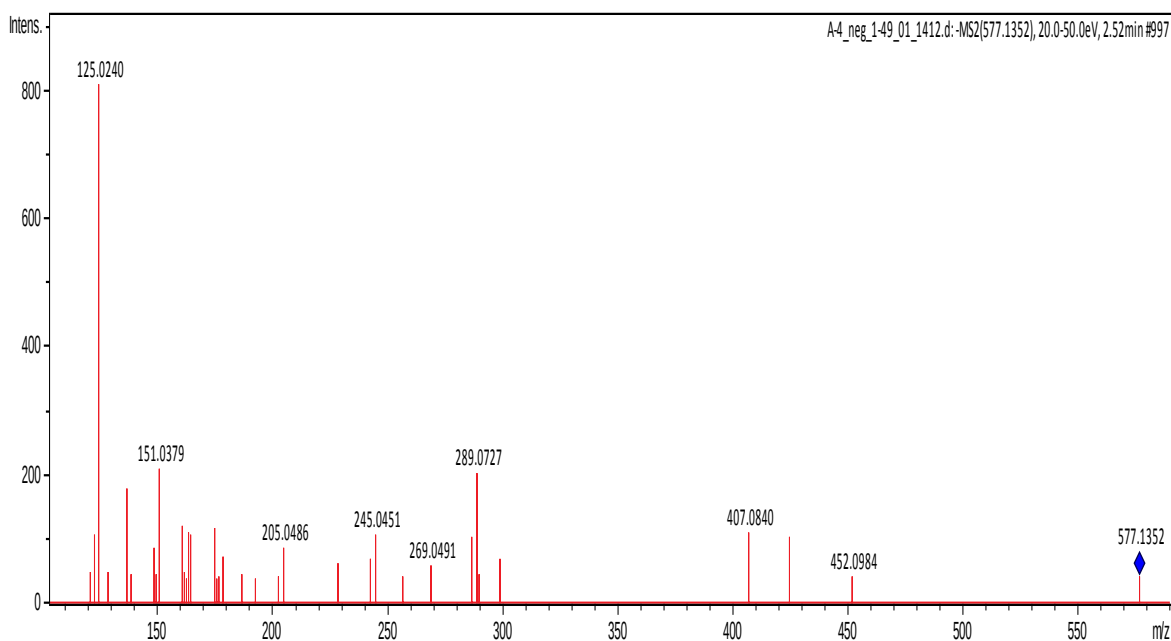
Figura 20 – Proposta de fragmentação do ácido cafeoilquínico, via rearranjo McLafferty.



Fonte: Adaptado de Norberto et al., (2016).

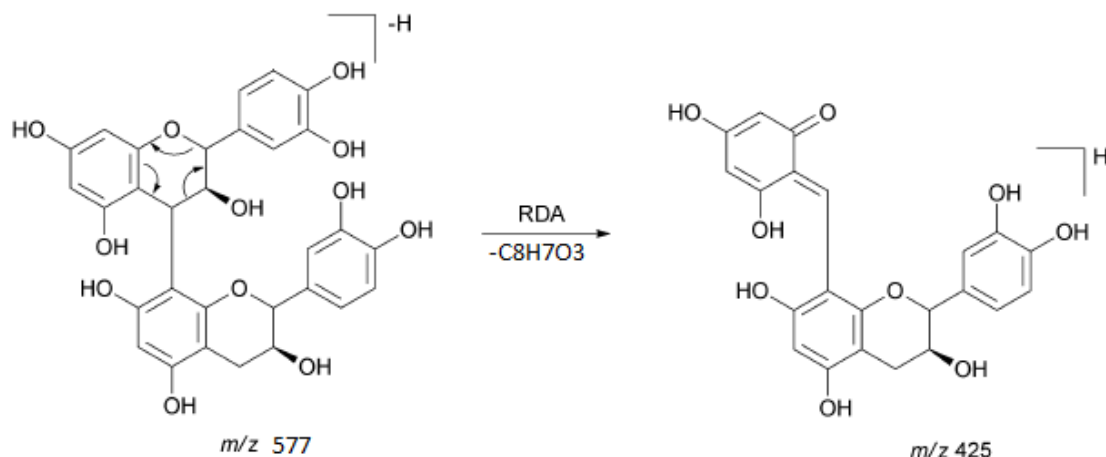
No pico 3 dos dois cromatogramas, foi observada a coeluição de dois compostos. O composto que apresentou o íon molecular no modo negativo a m/z 577 e íons fragmentos a m/z 425, 289, 161, e 125 corresponde a diferentes dímeros de procianidina do tipo (epi)catequina-(epi)catequina, (Figura 21). Os fragmentos de íons a m/z 425 e a m/z 289 correspondem ao monômero (epi)catequina (KAJDŽANOSK, et al., 2010; SUN, et al., 2007).

Figura 21 – Espectro de massas para o pico 3 identificado como Procianidina.



Como descrito por Gu et al. (2003), um dímero de procianidina consiste de uma unidade de extensão e uma unidade terminal. O anel heterocíclico das unidades de flavan-3-ols fragmenta-se através de mecanismos conhecidos como RDA (retro-Diels-Alder) e FAH (fissão do anel heterocíclico). Ambos os mecanismos de fragmentação podem ocorrer tanto na unidade de extensão quanto na unidade terminal (Figura 22). No entanto, a fragmentação na unidade de extensão dá origem a íons com um sistema π - π hiperconjugado maior. Assim, esta fragmentação é mais favorável energeticamente. A fragmentação RDA dos dímeros produziu majoritariamente íons com m/z 425 ($[M-H-152]^-$). Íons com m/z 407 ($[M-H-152-18]^-$) resultam da eliminação de uma molécula de água a partir dos íons com m/z 425, principalmente do OH na posição 3 do anel C (GU et al., 2003). Os íons com m/z 451 ($[M-H-126]^-$) resultam da eliminação da molécula de floroglucinol (anel A) (HAYASAKA et al., 2003). Íons com m/z 559 ($[M-H-18]^-$) resultam da eliminação de uma molécula de água a partir da procianidina (m/z 577), e os íons com m/z 289 ($[M-H-288]^-$) resultam da eliminação de uma molécula de (epi)catequina (SANDHU e GU, 2003).

Figura 22 – Proposta de fragmentação do tipo retro-Diels-Alder do íon m/z 577 a m/z 425.

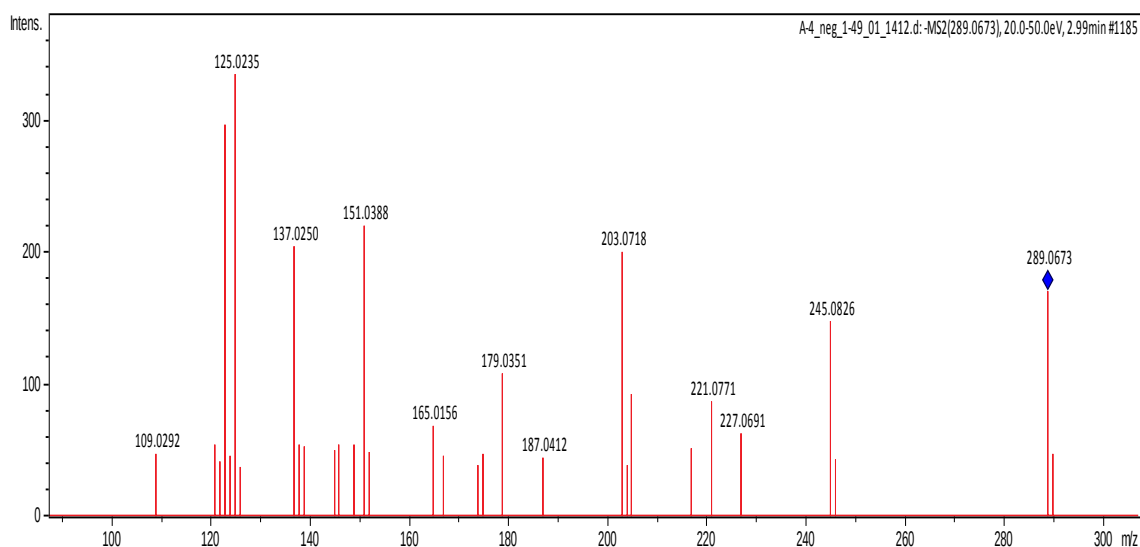


Fonte: Adaptado de Norberto (2016).

Estes dados, associados ao tempo de retenção do pico 3 (2,39 min) permitem concluir que esta estrutura dimérica de (epi)catequina se trata da Procianidina B1.

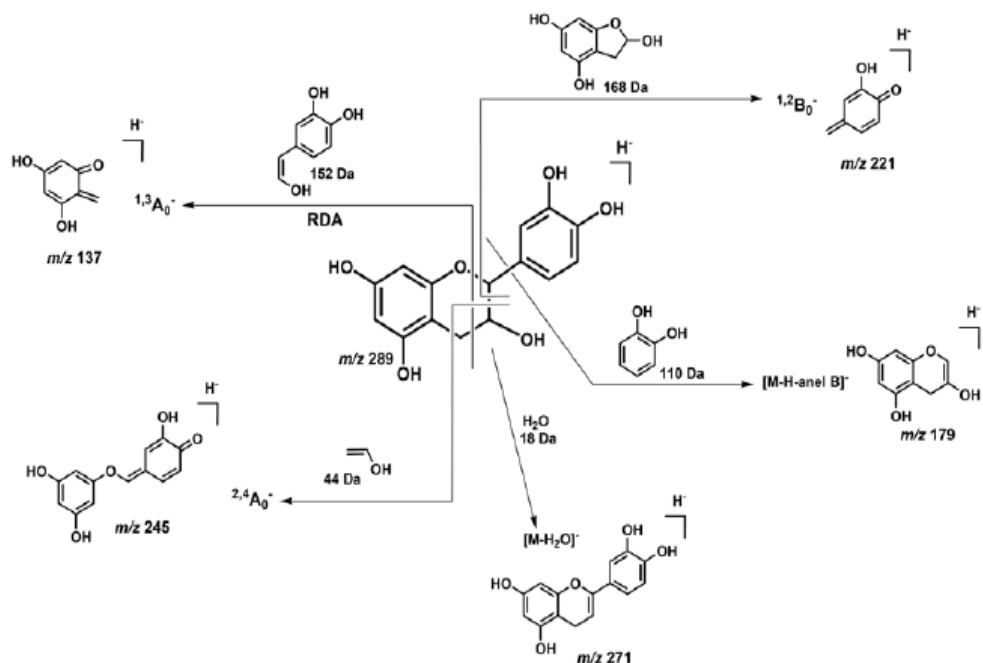
O pico que apresentou o íon molecular no modo negativo a m/z 289 e íons fragmentados a m/z 271, 245, 179, 168, 152 e 135 foi identificado como catequina ou epicatequina (Figura 23).

Figura 23 – Espectro de massas para o pico 3, identificado como (epi)catequina.



O íon a m/z 245 perde 44 u.m.a referente a saída de enol (Figura 24). Ocorre também a perda de $C_6H_6O_2$, obtendo-se uma massa de 179 (KAJDŽANOSK, et al., 2010).

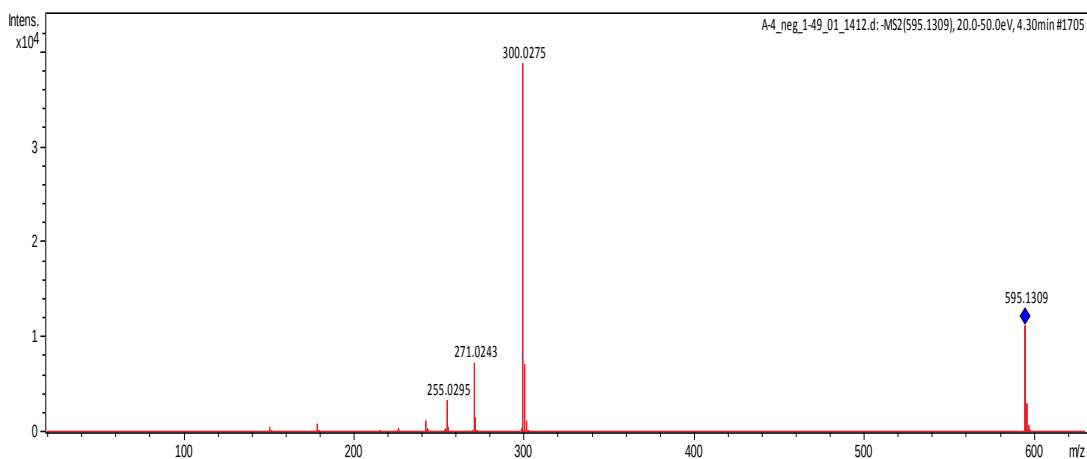
Figura 24 – Fragmentação proposta no espectro de massa para o íon m/z 289.



Fonte: SOUSA, 2015.

No pico 4 também co-eluíram dois compostos. O composto que apresentou o íon molecular no modo negativo a m/z 595 e íons fragmentados a m/z 300, 271, e 255 foi identificado como 3-O- β -galactopiranosilquercetina (calculado para $C_{26}H_{27}O_{16}$, MM = 595, 1305, erro 0,16 ppm) (Figura 25). O espectro apresentou as fragmentações, m/z 300 e m/z 255, que podem ser atribuídas a fragmentações da ligação acetal entre a quercetina (m/z 300) e o açúcar (m/z 255) (SILVA, et al., 2015).

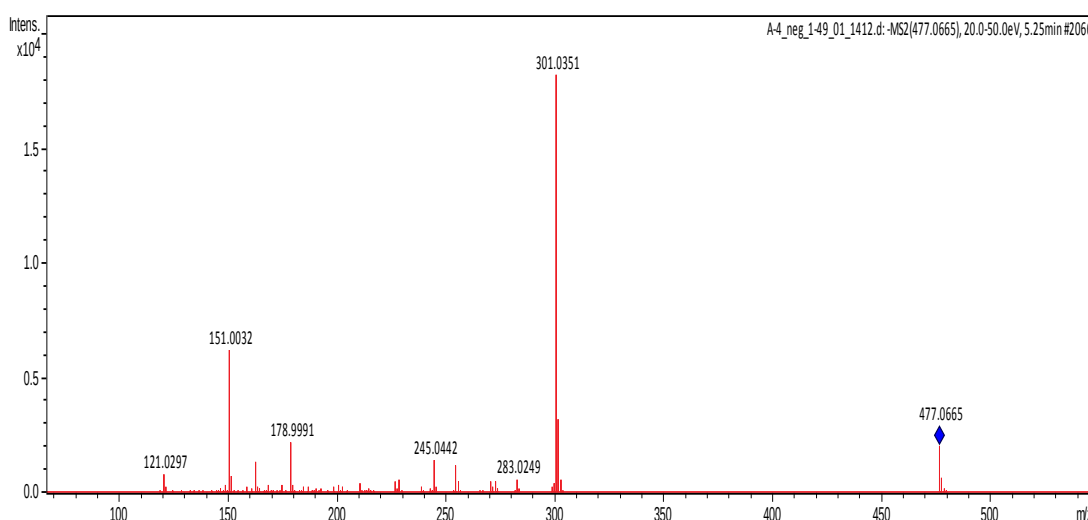
Figura 25 – Espectro de massas do pico 4 identificado como 3-O- β -galactopiranosilquercetina.



O outro composto identificado nesse mesmo pico apresentou o íon molecular no modo negativo a m/z 577 e íons fragmentos a m/z 451, 425, 407, 289, e 125 correspondente à dímeros de procianidina. Como no pico 3 foi identificado a procianidina B1, com tempo de retenção a 2,39 (min), agora nesse pico, com tempo de retenção em 4,90 min, foi identificado o isômero procianidina B2, que possui o espectro de massa idêntico da procianidina B1 (KAJDŽANOSK et al., 2010; SUN et al., 2007).

No pico 5 o composto que apresentou o íon molecular no modo negativo a m/z 477 e íons fragmentados a m/z 301, 255, 178 e 151 foi identificado como quercetina-3-O-glucoronideo (Miquelianina). A presença do íon majoritário a m/z 301 é característico de derivados do ácido glucorônico e da quercetina (Figura 26) (SUN et al., 2007).

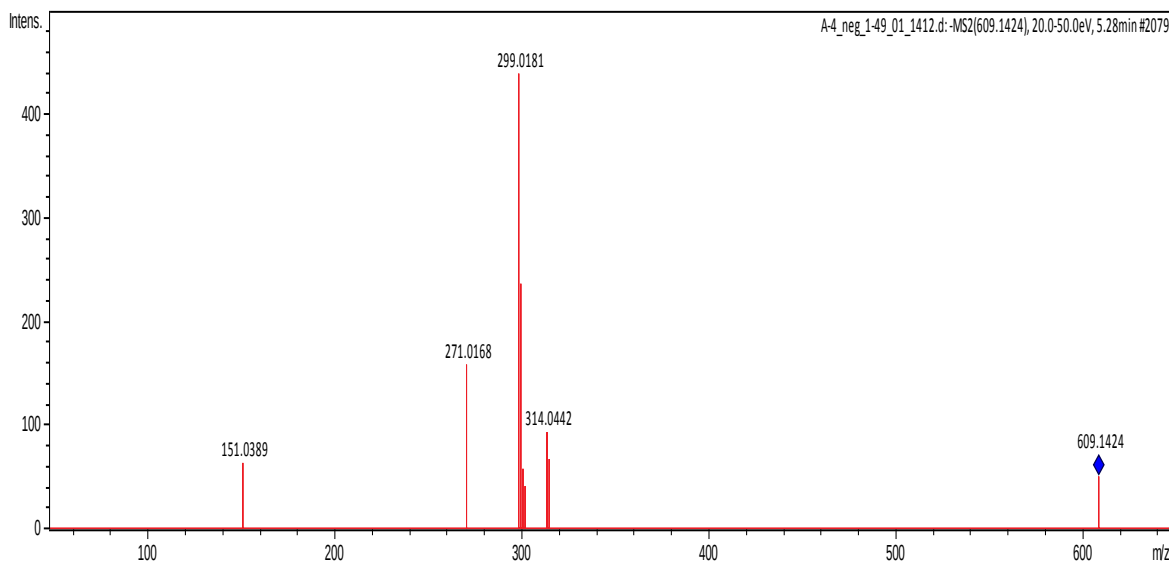
Figura 26 – Espectro de massas do pico 5 identificado como quercetina-3-O-glucoronideo.



Foi identificado também nesse mesmo pico o composto conhecido como rutina, com tempo de retenção de 5,24 min e um erro ppm 0,16. Este composto é conhecido também por quercetina 3-O-rutinósideo, 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 formando o íon aglicona de massa m/z 301 e o açúcar, já mostrado anteriormente.

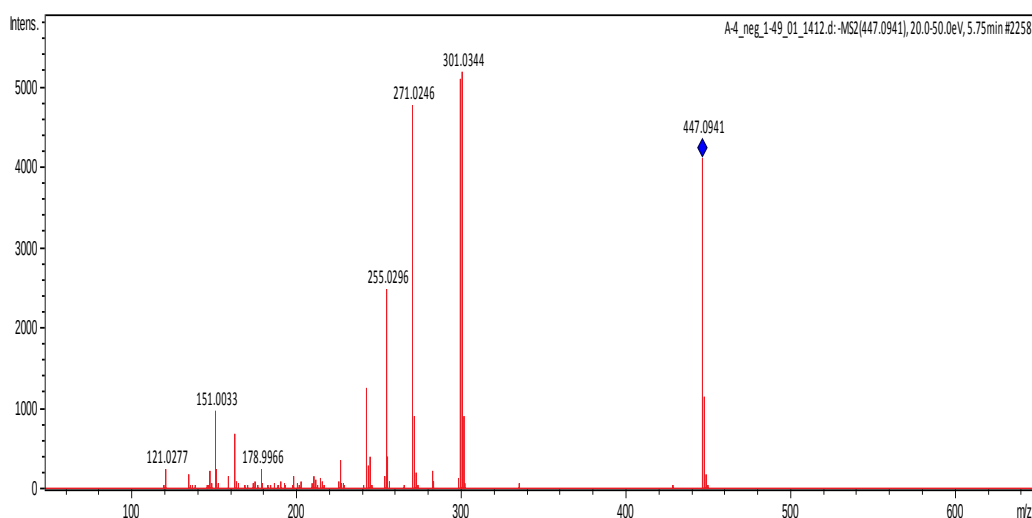
O seu espectro de fragmentação (Figura 27) originou os íons m/z 314, 301, 300, 299, 271 e 151 o íon aglicona da quercetina, formado pela perda de duas unidades, uma ramanose e um hexósido (SUN, et al., 2007).

Figura 27 – Espectro de massas do pico 5 identificado como rutina.



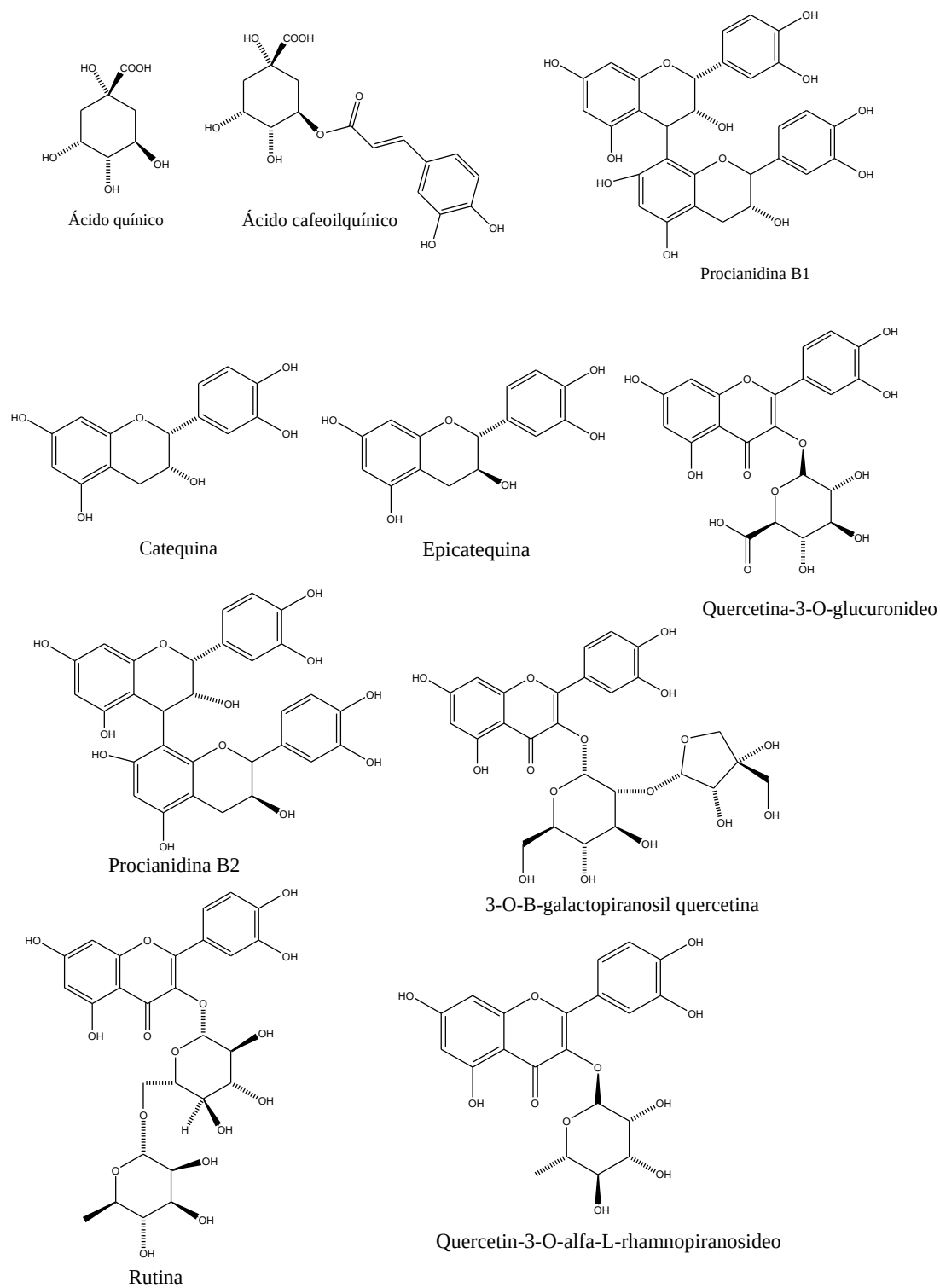
O pico 6 foi identificado como 3-*O*- α -L-rhamnopyranosideo-quercetina com íon precursor de m/z 447. A sua fragmentação apresenta so íons m/z 301, 271, 255, 178 e 151. O íon m/z 301 é resultado da clivagem da unidade de açúcar, típico de deoxihexose, bem como o íon m/z 271, característico de flavon-3-*O*-monoglucoside e a m/z 179, como resultada da RDA de anel A (Figura 28) (SALDANHA, 2013).

Figura 28 – Espectro de massas do pico 6 identificado como 3-*O*- α -L-rhamnopyranosideo-quercetina.



As estruturas químicas dos compostos identificados por CLAE-EIS-EM/EM (Tabela 13) são mostradas na Figura 29.

Figura 29 - Estruturas químicas dos compostos identificados por CLAE-EIS-EM/EM para as duas frações estudadas.



Todos estes compostos identificados também estão presentes na espécie *Byrsonima*, outra Malpigiaceae (GUILHON-SIMPLICIO e PEREIRA, 2011). Os compostos identificados nas frações acetato de etila e *n*-butanol se destacam em atividades antifúngicas em outras espécies de plantas. A quercetina e o ácido clorogênico (e seus derivados ácido quínico e ácido caféico) estão entre os componentes bioativos isolados da *Adesmia aegiceras* (Fabaceae), e que apresentaram atividade inibitória contra a *C. albicans* (AGNESE et al. 2001).

REFERÊNCIAS

- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução - RDC nº 150, de 17 de junho de 2003**. Brasília, DF. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2003/rdc/150_03rdc.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2016.
- AGNESE, A. M.; Pérez, C.; Cabrera, J. L. *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. **Phytomedicine**, Córdoba, v. 8, n. 5, p. 389-394, Sep. 2001.
- ANDERSON, W. R.; DAVIS, C. C. A. Complete generic phylogeny of malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 97, n. 12, p. 2031–2048, Dec. 2010.
- AQUINO, R.; CRESCENZO, S.; SIMONE, F. Constituents of *Banisteriopsis caapi*. **Fitoterapia**, Milano, v. 62, n. 5, p. 453, 1991.
- ARGOLO, A. C.; SANTANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, Taiwan, v. 95, n. 2, p. 229-233, Nov. 2004.
- ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. Natural products: antifungals agents derived from plants. Opportunity, challenge and scope of natural products. **Medicinal Chemistry**, Kerala, v. 81, p. 283-311, 2011.
- BASTOS, D. H.; Saldanha, L. A.; Catharino, R. R.; Sawaya, A. C.; Cunha, I. B.; Carvalho, P. O.; Eberlin, M. N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 3, p. 423-432, Mar. 2007.
- BERSET, C.; CUVELIER, M. E.; BRAND-WILLIAMS, W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science Technology**, Nebraska, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite: cerrado 2010-2011**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80120/PPCerrado/Relatorio%20Tecnico_Bioma%20Cerrado_2011vfinal.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2016.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, jun. 2010.
- CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44-75, jul./dez. 2014.
- 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**, Limerick, v. 106, n. 1, p. 82-89, Jun. 2006.

FARIA, C. O.; MARTINS, M. M.; ARAÚJO, H. L.; ABDALLA, C. B. M.; PIVATTO, M.; A. OLIVEIRA; R. CHANG; AQUINO, F. J. T.; MORAIS, S. A. L. Avaliação do teor de compostos fenólicos e da capacidade de sequestro do radical livre DPPH do extrato etanólico das folhas da *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss) B.Gates. ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 28., 2014, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: SBQ, 2014. Disponível em: <<https://www.unifal-mg.edu.br/caex/inscricoes/submissoes/S05168.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

FREITAS, L. B. O. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *B. anisandra* (A.Juss) B. Gates e síntese de amidas indólicas para a avaliação da atividade alelopática.** 2010. 236 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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**, Mexico City, v. 12, n. 1, p. 9-16, Jun. 2015.

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. Mar. 2011.

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

GHOSAL, S.; MAZUMDER, U. K. Alkaloids of the leaves of *Banisteriopsis argentea*. **Phytochemistry**, Varanasi, v. 10, n. 3, p. 2840-2842, Mar. 1971.

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**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 103-107, Jan. 2006.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Arknasas, v. 51, n. 25, p. 7513-7521, Dec. 2003.

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

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M. Chemical and pharmacological aspects of *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011.

HAYASAKA, Y.; WATERS, E. J.; CHEYNIER, V.; HERDERICH, M. J.; VIDAL, S. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Glen Osmand, v. 17, n. 1, p. 9-16, Dec. 2003.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTA. **Bioma cerrado**, 2014. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-cerrado.html>> Acesso em: 24 jul. 2014.

JESUS, A. M. **Saberes populares em plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Centro Universitário Augusto Motta, 2008.

JOHN BANISTER. In: WIKIPEDIA. 2014. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/John_Banister>. Acesso em: 7 abr. 2016.

KAJDŽANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, S. HPLC-DAD-ESI-MSN Identification of Phenolic Compounds in Cultivated Strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**. Macedonian, v. 29, n. 2, p. 181-194, Jul. 2010.

KLIS, F. M.; DE GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, Amsterda, v. 39, n. 1, p. 1-8, Jan. 2001.

KOELLA, J. C.; HUBER, W. A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasites. **Acta Tropica**, Basel, v. 55, n. 4, p. 257-261, Dec. 1993.

LAY-KEOW, N. G.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of cigarette tobacco by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS) analysis of the aqueous extracts a novel and simple approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ottawa, v. 52, n. 24, p. 7251-7257, Nov. 2004.

LIMA, L. F. **Biologia reprodutiva de *Banisteriopsis* (Malpighiaceae) no Jardim Botânico de Brasília** – DF. 2005. 44f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://www.pgecl.unb.br/images/sampled/ arquivos/dissertacoes/2000a2010/2005/Laudicia%20F.%20Lima.pdf>>. Acesso em: 07 out. 2014.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, n. 0, p. 3-9, Jul. 1998.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. 1. ed. London: Academic Press, 1982. 113 p.

MCKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of Ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, Minneapolis, v. 102, n. 2, p. 111-129, May 2004.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscustiliaceus L*: estudos comparativos de método de extração**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MESSERSCHMIDT, A.; MAES, L.; AL-MUSAYEIB, N. M.; COS, P.; MOTHANA, R. A. In vitro antiplasmodial, antileishmanial and antrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. **Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine**, Riyadh, v. 12, n. 1, p. 12-49, Apr. 2012.

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.

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. 5, p. 198-207, Dez. 2008.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido à diferente grau de torra. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da terapia antifúngica de leveduras**, Wayne, 2002. Norma aprovada. Documento M27-A2 do NCCLS.

NORBERTO, P. L.; DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **The Royal Society of Chemistry**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 367-524. Mar. 2016.

OLIVEIRA, A. C. **Capacidade antioxidante de farinhas de resíduos de frutas tropicais**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, R.B. Metabolismo vegetal. 2009. Disponível em:
<<http://www.oocities.org/br/plantastoxicas/rota-metabolica.html>>. Acesso em: 3 maio 2016.

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

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

PELL, A. N.; MBUGUA, D. M.; SCHOFIELD, P. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Ithaca, v. 9, n. 1, p. 21-40, May. 2001.

PETROLINI, F. V. B.; LUCARINI, R.; SOUZA, M. G. M.; PIRES, R. H.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C.H. G. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 829-834, Dec. 2013.

PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Manoa, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2005.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, Aug. 2005.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

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

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 311 - 318, Nov. 2011.

SACRAMENTO, V. M.; OLIVEIRA, D. A. O.; ROYO, V. A.; OLIVEIRA, D. M.; SIMÕES, M. O. M.; MENEZES, E. V.; JÚNIOR, A. F. M. Prospecção fitoquímica das folhas de *Banisteriopsis pubipetala*. In: FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO, 8., 2014, MONTES CLAROS. **Anais...** Montes Claros: Fepeg, 2014. Disponível em:<http://www.fepeg2014.unimontes.br/sites/default/files/resumos/arquivo_pdf_anais/prospectocorrigidoformatadook.pdf>. Acesso em: 10 out. 2015.

SALAS, P. M.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S. L. Antifungal activity and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, Buenos Aires, v. 4, n. 124, p. 1411-1415, Jan. 2011.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 7, p. 8402-8416, Jul. 2013.

SANDHU, A. K.; GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Florida, v. 58, n. 8, p. 4681-4692, Mar. 2010.

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*, **Química Nova**. São Paulo, v. 38, n. 5, p. S1-S10, abr. 2015.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da UFRGS, 1999. 819 p.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS, 2007. 1104 p.

SINGH, R. Medicinal plants: A review. **Journal of Plant Sciences**, Rajasthan, v.3, n. 1, p. 50-55, Jan. 2015.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

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

SOUSA, R. M. F. **Estudo Químico De *Eugenia calycina* Cambess e Avaliação Das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e Inibidora Da Enzima Alfaamilase**. 2015. 213f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

STANKOVIC, D.; MEHMETI, E.; SVORC, L.; KALCHER, K. New electrochemical method for the determination of β -carboline alkaloids, harmalol and harmine, in human urine samples and in *Banisteriopsis caapi*. **Journal Microchemical**, Belgrade, v. 118, n. 0, p. 95-100, Jan. 2015.

STERLING, K. B.; HARMOND, R. P.; CEVASCO, G. A.; HAMMOND, L. F. **Biographical dictionary of American and Canadian naturalists and environmentalists**. Greenwood Press: Westport, 1997. 937 p.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 3, p. 679-693, Mar. 2007.

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

WANG, Y. H.; SAMOYLENKO, V.; TEKWANIA, B. L.; KHANA, I. A.; MILLER, 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**, Mississippi, v. 128, n. 3, p. 662-671, Apr. 2010.

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.

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *B. laevifolia* (Malpighiaceae)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são constituídos de substâncias orgânicas voláteis que caracterizam o aroma de várias plantas. As plantas produzem essas substâncias voláteis a partir de vias metabólicas secundárias, ou seja, não prioritárias ao metabolismo do vegetal (GARCIA et al., 2009). Praticamente todos os óleos essenciais constituem uma mistura de princípios químicos muito complexos e variam amplamente na sua composição (MATOS, 1989).

Os óleos essenciais são misturas de diversas substâncias químicas produzidas pelas plantas aromáticas, entre elas os compostos terpênicos, derivados de fenilpropano (LAVABRE, 1992). Monoterpenos e sesquiterpenos são hidrocarbonetos constituídos por dez e quinze átomos de carbono, respectivamente, sendo ambos obtidos pela mesma via biossintética. Os diterpenos – moléculas com vinte átomos de carbono – são dificilmente encontrados nos óleos essenciais. As plantas também sintetizam moléculas com trinta ou quarenta átomos de carbono, mas estes não são óleos essenciais.

Os óleos essenciais são relativamente fluidos, mas alguns são sólidos a temperatura ambiente. Diferenciam-se dos óleos graxos por sua natureza altamente volátil, sendo insolúveis em água, fracamente solúveis em ácido acético, muito solúvel em álcool, podendo ser misturados com óleos vegetais, gorduras e ceras. Outros grupamentos funcionais, como cetonas, aldeídos, ésteres, álcoois terpênicos, fenóis e cineol também podem ser encontrados nos óleos essenciais (GRAMOLELLI, 2006). Eles geralmente são extraídos das plantas, flores, rizomas, cascas ou frutos utilizando-se técnicas como a de arraste a vapor e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, sendo estes predominantes no mercado de exportação brasileiro (BIZZO, 2009).

Constantemente os metabólitos monoterpenoides e sesquiterpenoides gerados por vários conjuntos vegetais, são expostos a fatores internos (genéticos) e externos como temperatura, luminosidade, tipo de solo, disponibilidade de água e outros (CARDOSO et al.,

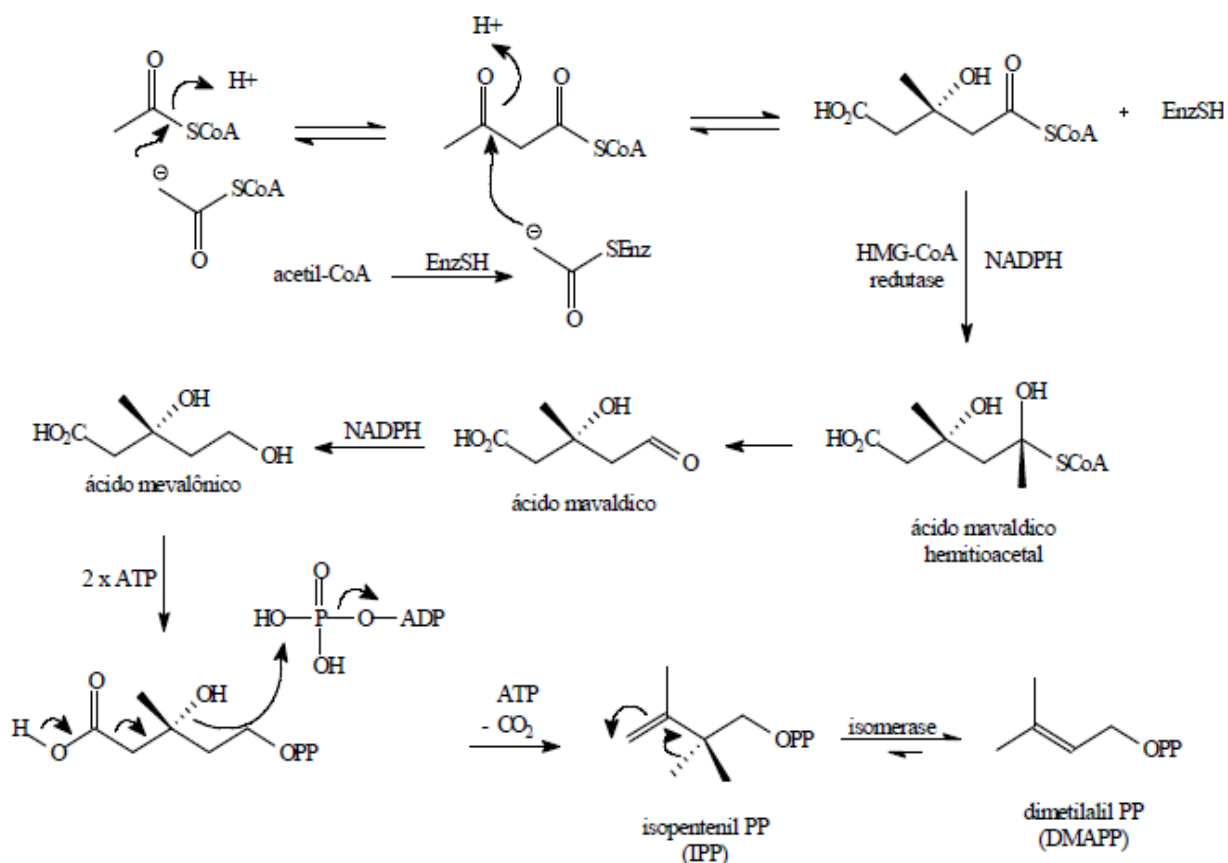
2001). Alguns outros elementos que são capazes de provocar a emissão de terpenos são os eventos fenológicos, a idade da folha, o acúmulo de nitrogênio foliar, herbivoria, injúria física e outras formas de estresse (GUENTHER, 1997).

Os terpenoides predominam na composição química dos óleos essenciais, esses constituintes apresentam como precursor comum o isopentil-pirofosfato. Menos numerosos, nos óleos essenciais estão os fenilpropanoides, que são derivados do ácido chiquímico e apresentam como característica estrutural um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos, que apresentam uma dupla ligação (SILVA, et al., 2012).

Segundo BALDWIN (2010), a origem biossintética dos terpenos deriva de unidades isoprênicas fosforiladas, que são moléculas pentacarbonadas que podem ser originadas por duas vias. A primeira delas ocorre no citoplasma e nas mitocôndrias e é dependente do mevalonato, enquanto a segunda ocorre nos cloroplastos e plastídios e independente do mevalonato, sendo conhecida também como via do metileritritol fosfato (MEP) ou rota da 1-deoxi-D-xilulose (DXP).

Na rota do ácido mevalônico, ocorre à condensação aldólica de três moléculas de acetil-CoA, a partir de uma série de etapas, para formar o ácido mevalônico. Esse intermediário de seis carbonos é, então, pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, para produzir o isopentil-pirofosfato (IPP), que é a unidade básica dos terpenos (Figura 1). Essa unidade pentacarbonada, por meio de reações de isomerização, é convertida em dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) (DEWICK, 2009).

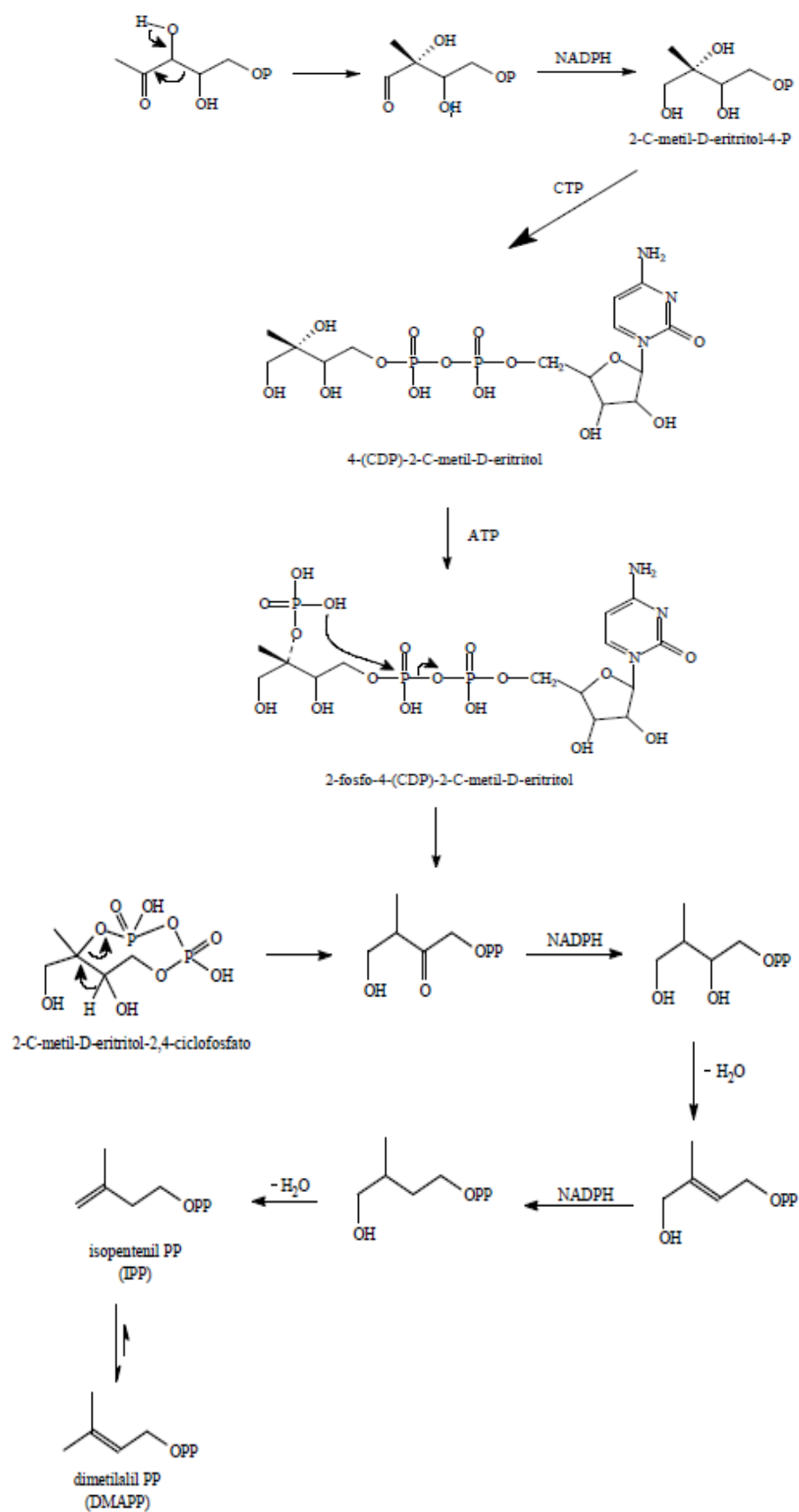
Figura 1 - Mecanismos de formação das unidades isoprênicas ativas (DMAPP) e (IPP) pela via do mevalonato.



Fonte: Adaptado de DEWICK (2009).

Na rota do metileritritol fosfato (MEP) o IPP é formado a partir do gliceraldeído-3-fosfato e de dois átomos de carbono derivados do piruvato que se combinam, passando por sucessivas reações para produzir o 2-C-metil-*D*-eritritol-2,4-ciclodifosfato, que se converte a IPP (Figura 2).

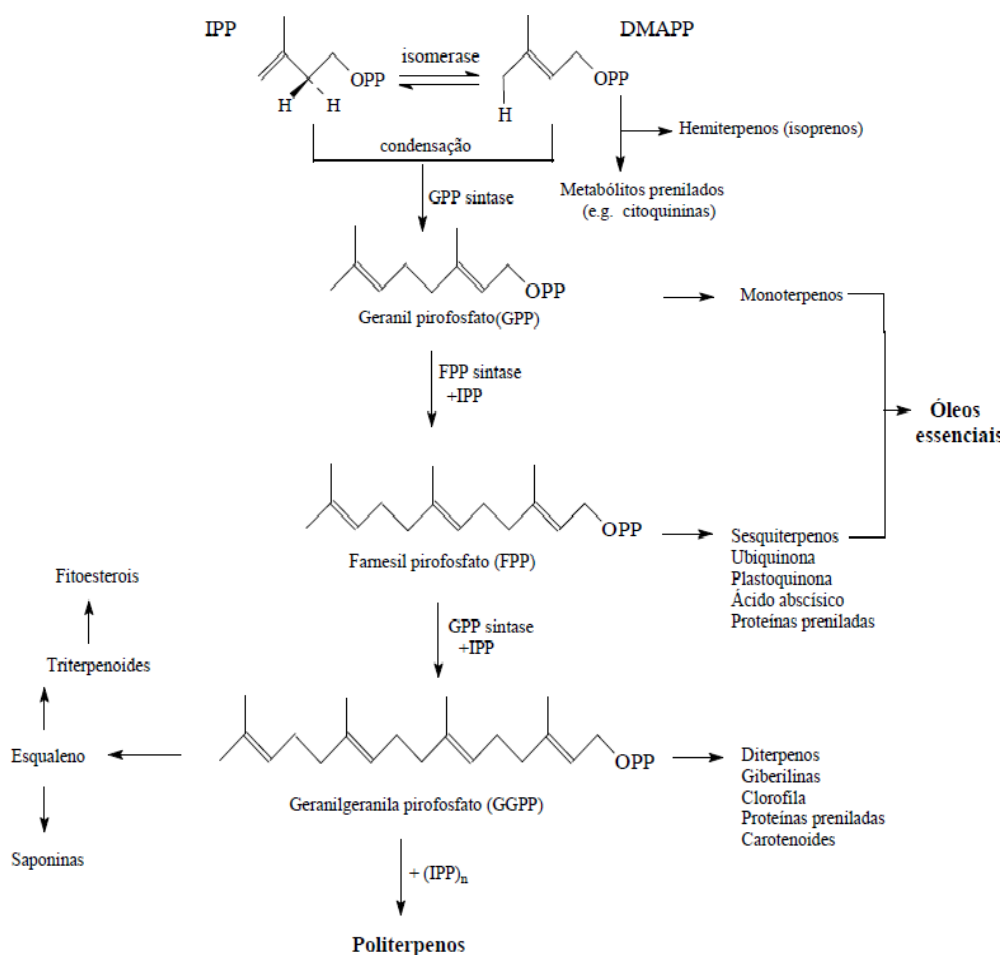
Figura 2 - Mecanismos de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetil-alil-difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-*D*-xilulose -5-P-mevalonato.



Fonte: Adaptado de DEWICK, (2009).

As moléculas de IPP e seu isômero DMAPP, sintetizadas em ambas as vias, unem-se para formar terpenos maiores, por meio do modelo “cabeça-cauda” (Figura 3). Essa condensação de Claisen de unidades de IPP e DMAPP, pela ação da enzima prenil-transferase, forma 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 degeranil-geranila (GGPP, C20), precursor dos diterpenos.

Figura 3 - Esquemas das vias de biossíntese responsáveis pela produção de terpenoides, a partir da formação dos blocos de isoprenoides dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP).



Fonte: Adaptado de DEWICK, (2009).

As ciclizações do GGPP, por meio da formação de diferentes carbocátions e rearranjos, levam a formação de diferentes estruturas de diterpenos. A dimerização de FPP e GGPP forma os triterpenos e os tetraterpenos, com 30 e 40 átomos de carbono,

respectivamente. Provenientes de um precursor comum, as estruturas terpênicas sintetizadas por essas duas rotas podem ser modificadas por reduções, oxidações e ciclizações, formando numerosos e distintos compostos terpênicos, que constituem, assim, um dos maiores e, talvez estruturalmente, os mais diversos grupos de metabólitos secundários derivados dos vegetais (Figura 3) (DEWICK, 2009).

Os óleos essenciais produzidos pelas plantas auxiliam na sua sobrevivência, já que estes exercem funções de autodefesa e de atração de polinizadores. Para avaliação qualitativa e quantitativa do óleo essencial se aplica a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) (DAFERRA et al., 2000). Na análise de composição química do óleo essencial de uma planta deve se levar em conta uma série de parâmetros, tais como condições ambientais, estação de coleta, procedimento de extração, condições de armazenamento das plantas coletadas até a extração (SEVERO et al., 2009).

Farmacologia, botânica, microbiologia, fitopatologia e alimentos são algumas áreas em que os óleos essenciais podem ser aplicados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo da amostra

Parte das folhas coletadas em maio de 2014 (período de seca) e dezembro de 2014 (período de chuva) no município de Monte Alegre de Minas – Minas Gerais (localização descrita no Capítulo 1) foram retiradas dos galhos, sendo separadas aquelas com defeito, posteriormente foram picadas em pedaços pequenos de aproximadamente dois centímetros.

2.2 Extração do óleo essencial

Três amostras frescas de 100 g de folhas foram colocadas e transferidas para três balões de 2 L, respectivamente, com aproximadamente 1L de água. Assim o material vegetal fresco foi submetido à extração dos óleos essenciais por hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger (Figura 4) (MORAIS et al., 2009). A mistura água e óleo foi transferida para um funil de separação e o óleo essencial extraído com 3 volumes de 2 mL de diclorometano. Em seguida, as frações de óleo essencial em diclorometano foram secas com sulfato de sódio anidro, e transferidas para frasco de vidro âmbar, sendo colocadas em seguida em manta

aquecedora, a uma temperatura de 30 °C, para evaporar o diclorometano. O óleo essencial foi mantido em freezer, à temperatura de aproximadamente -18 ± 5 °C, até o momento da análise.

Figura 4 - Aparelhos de Clevenger utilizados para a extração do óleo essencial das folhas da *B. laevifolia*.



Fonte: Autor.

2.3 Análise do óleo essencial por Cromatografia a gás Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As amostras de óleos essenciais foram analisadas num aparelho da marca Shimadzu (Figura 5), modelo GC2010/QP5010, equipado com coluna capilar SPP-5 de 30 m. Foi utilizado como gás carreador o gás hélio, a fluxo constante de 1 mL min^{-1} , as temperaturas do injetor (modo split 1:20) e detector foram 220 e 240 °C, respectivamente, sendo o gradiente de aquecimento de 60 a 240 °C (3 °C min^{-1}). O detector de massas atuou com energia de impacto de 70 eV, e os fragmentos de 40 a 650 Da foram registrados (ADAMS, 2007).

Figura 5 - Cromatografo a gás acoplado à espectrometro de massas utilizado para a análise do óleo essencial extraído das folhas da *B. laevifolia*.



Fonte: Autor.

2.3.1 Identificação do óleo essencial das folhas da *B.laevifolia*

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi baseada na comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros das bibliotecas Wiley229, Nist08s, Wiley7 e Shim2205 e em comparação com os índices aritméticos (IA) calculados e tabelados na literatura.

A equação utilizada no cálculo do IA (Equação 1) foi proposta por Van den Dool e Kratz, em 1961, e adotada recentemente por Adams (ADAMS, 2007):

$$\text{Equação 1:} \quad IA(x) = 100 (n^{\circ} \text{ de carbonos do } Pz) + 100 \frac{t(x) - t(Pz)}{t(Pz+1) - t(Pz)}$$

Onde:

x = composto no momento t;	t (x)= tempo de retenção do composto em análise;
Pz = alcano antes de x;	t (Pz)= tempo de retenção do alcano antes de x;
Pz + 1 = alcano depois de x;t	(Pz+1)= tempo de retenção do alcano depois de x.

Para obtenção destes índices, uma mistura de padrões de alcanos (C₁₀ – C₄₀) foi preparada e injetada nas mesmas condições de análise. Para quantificação de cada constituinte foi utilizada a área correspondente do cromatograma obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Rendimento do óleo essencial

A Tabela 1 abaixo apresenta o rendimento obtido da extração do óleo essencial da *B. laevifolia* em comparação com o rendimento obtido para *Byrsonima sericea* (NEVES, 2010), outra Malgipiaceae.

Tabela 1 - Rendimentos dos óleos das folhas da *B. laevifolia* e *B. sericea*.

Espécie	Rendimento em porcentagem (%)
<i>B. laevifolia</i>	0,06
<i>B. sericea</i> [#]	0,05

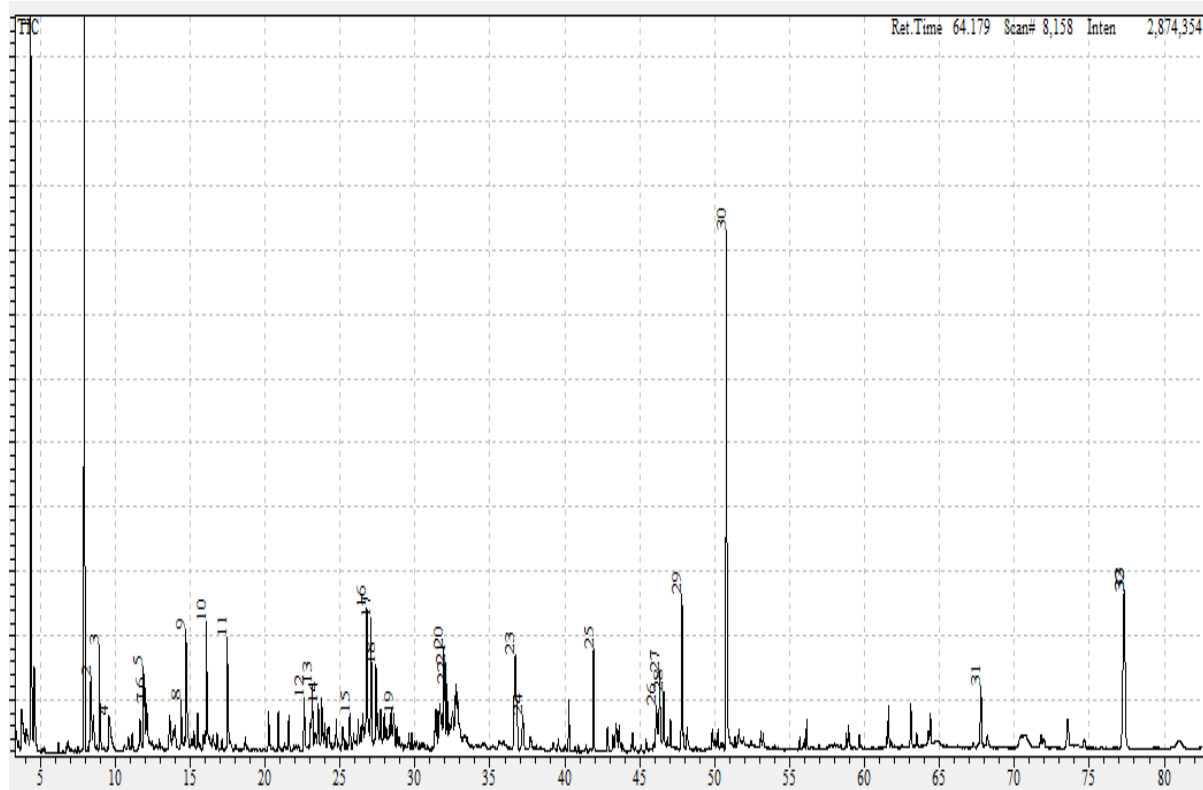
[#]NEVES e colaboradores, 2010.

Não há nenhum relato na literatura de estudos feitos com o óleo essencial da *B. laevifolia*. O óleo essencial obtido a partir das folhas de *B. laevifolia* apresentou baixo rendimento, (0,06%), embora o valor do rendimento aproximou-se daquele estudado por Neves e colaboradores (2010) pertencente à mesma família (Malpighiaceae), e apresentou bem maior do que o rendimento encontrado para *Ingá laurina* (*Caesalpiniaechinata*), o pau-brasil, da família Leguminosae (FURTADO et al., 2014). Entretanto, o rendimento obtido é bem inferior aos apresentados por outras espécies já estudadas. Por exemplo, óleos cítricos, apresentam rendimento aproximadamente de 0,4% (SILVA-SANTOS et al., 2006). Folhas de *Eucalyptus citriodora* têm rendimento do óleo variando entre 1,0 e 1,6% (VITTI e BRITO, 2003), e os óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomumverum*) apresentam um rendimento de 0,2 e 2,0%, respectivamente (KOKETSU et al., 1997).

3.2 Composição química do óleo essencial extraído das folhas *B. laevifolia* no período da seca.

A Figura 6 mostra um cromatograma do óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* obtido no período da seca. Na análise deste cromatograma foram considerados somente os compostos com picos de área acima de 1,27%.

Figura 6 - Cromatograma de CG-EM do óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* obtido no período da seca.



Fonte: Autor.

O resultado da identificação dos constituintes químicos está expresso na Tabela 2, e a distribuição por classe de compostos esta descrito na Tabela 3.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial das folhas de *B.laevifolia* no período da seca.

Número do pico	t _R (min)	Compostos	Área (TIC)%	IA (tabelado)	IA (calculado)
1	4,33	(Z)-3-hexen-1-ol	19,4	857 ^a	855
2	8,36	α -terpinoleno	1,9	1014 ^b	1011
3	8,92	(S)-3-etil-4-metilpentanol	2,6	1020 ^a	1026
4	9,57	N.I.	2,0	-	1043
5	11,88	linalol	1,6	1106 ^a	1105
6	11,97	nonanal	1,3	1108 ^a	1107
7	12,08	N.I.	1,7	-	1110
8	14,39	(E,Z)-3,6-nonadienol	1,4	1156 ^a	1164
9	14,70	N.I. (Éster?)	3,8	-	1172
10	16,07	N.I. (Éster?)	3,2	1229 ^b	1204
11	17,47	isovalerato de (Z)-hexen-3-ila	2,5	1238 ^a	1236
12	22,60	α -copaeno	1,4	1365 ^a	1353
13	23,14	N.I.	1,8	1366 ^b	1366
14	23,54	hexanoato de (Z)-hexen-3-ila + beta-burboneno ^(*)	1,6	1378 ^a + 1381 ^a	1375 + 1378
15	25,64	N.I.	1,3	-	1424
16	26,78	N.I.	3,9	-	1451
17	27,06	N.I.	3,4	-	1458
18	27,40	N.I.	1,9	1463 ^a	1466
19	28,58	2-tridecanonona	1,4	1495 ^b	1494
20	31,91	N.I.	2,2	-	1577
21	32,01	N.I.	1,6	-	1578
22	32,13	N.I.	1,5	-	1583
23	36,69	2-pentadecanona	4,9	1697 ^a	1702
24	37,19	Pentadecanal	1,4	1715 ^a	1716
25	41,91	hexaidrofarnesil-acetona	2,1	1847 ^a	1847
26	46,11	ácido palmítico	1,7	1971 ^a	1972
27	46,32	N.I.	2,2	-	1978
28	46,59	N.I.	1,6	-	1986
29	47,81	N.I.	3,4	-	2024
30	50,77	fitol	9,8	2119 ^a	2119
31	67,76	heptacosano	1,6	2700 ^b	2700
32 + 33	77,32	untriacontano	7,5	3100 ^b	3100
Total (%)			100		

N.I. = não identificado; TIC = total ions chromatogram; IA = índice aritmético; T_r = tempo de retenção; ^(*) Considerando-se 50% de cada composto; ^aBanco de dados da Nist (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>); ^b Adams (2007).

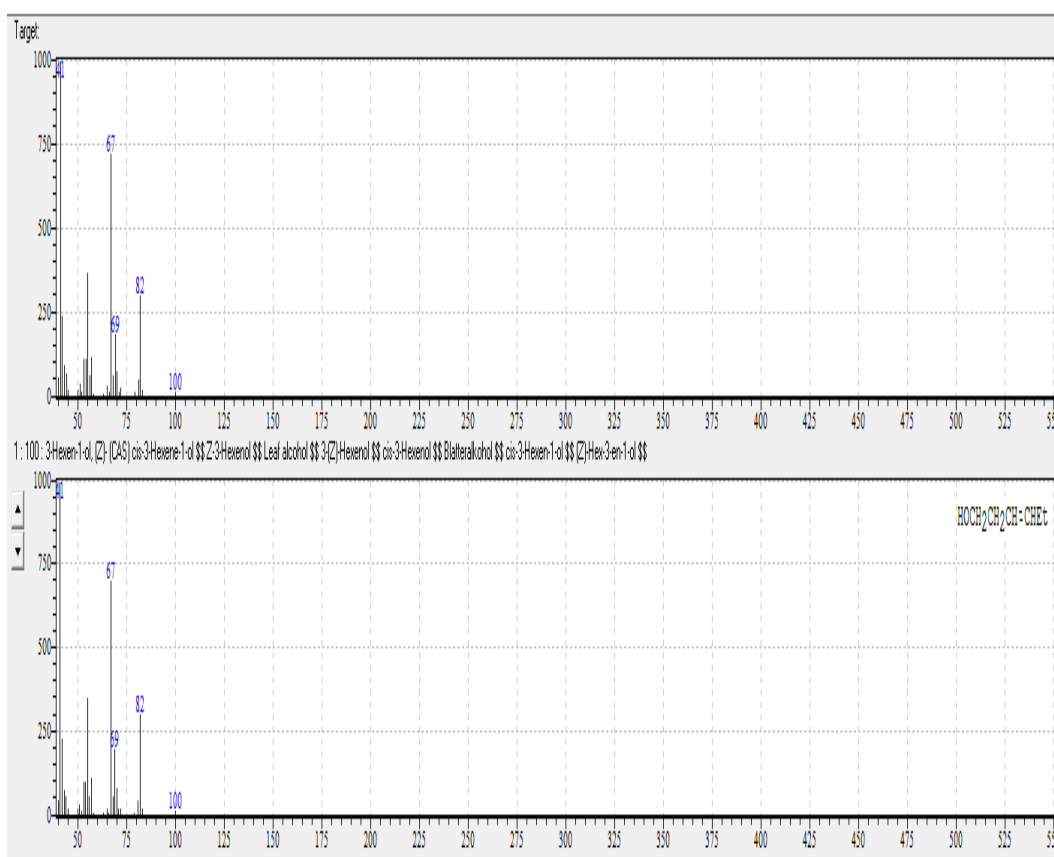
Tabela 3 - Distribuição por grupos funcionais dos componentes do óleo essencial das folhas da *B. laevifolia*, no período da seca.

Grupos funcionais	(%) (nºde compostos)
Álcool alifático	23,4 (3)
Éster	10,4 (4)
Aldeído	2,6 (2)
Cetona	5,9 (3)
Ácido carboxílico	1,7 (1)
Monoterpeno não oxigenado	1,9 (1)
Monoterpeno oxigenado	1,6 (1)
Diterpeno	9,8 (1)
Sesquiterpeno	5,3 (2)
Alcano de cadeia longa	9,2 (2)
N.I.	28,2 (12)

N.I. = não identificado.

As Figuras 7, 9 e 11 mostram os espectros de massas dos compostos majoritário do óleo essencial extraído das folhas de *B. laevifolia*.

Figura 7 - Espectros de CG-EM do (Z)-3-hexen-1-ol.



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.

Na Figura 8 se encontram o mecanismo proposto para algumas fragmentações (m/z) observadas no espectro de massas do (Z)-3-hexen-1-ol.

Figura 8 – Proposta de fragmentação do (Z)-3-hexen-1-ol.

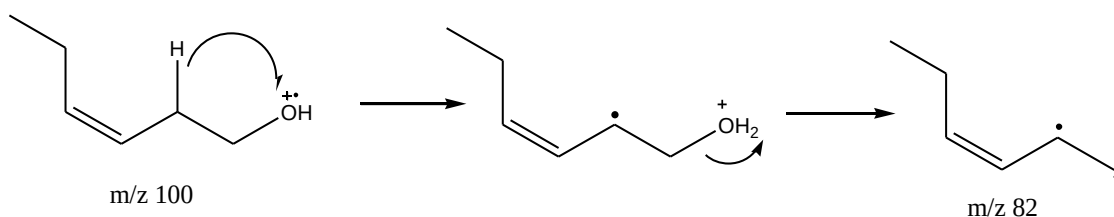
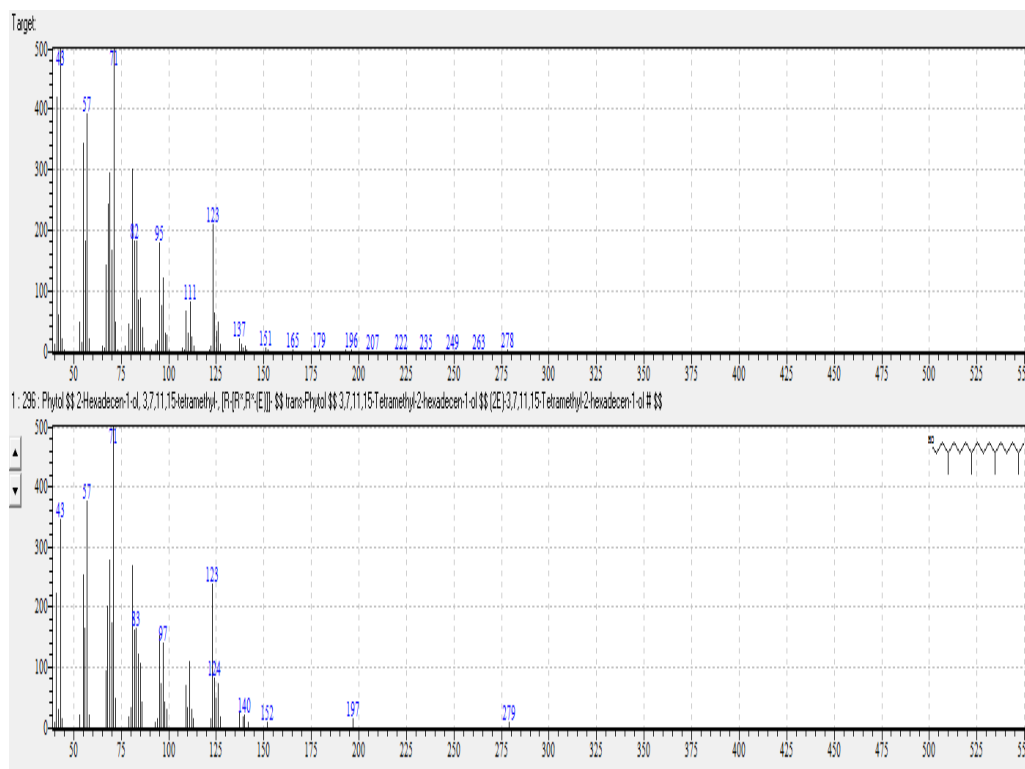
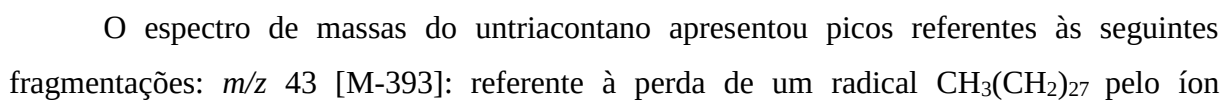


Figura 9 - Espectros de CG-EM do fitol.



O espectro de massas do fitol apresentou picos referentes às seguintes fragmentações: m/z 278 [M-18]: referente à perda de água pelo íon molecular m/z 296; m/z 123 [M-18-155]: referente à perda de dois radicais de isopreno pelo fragmento m/z 278.

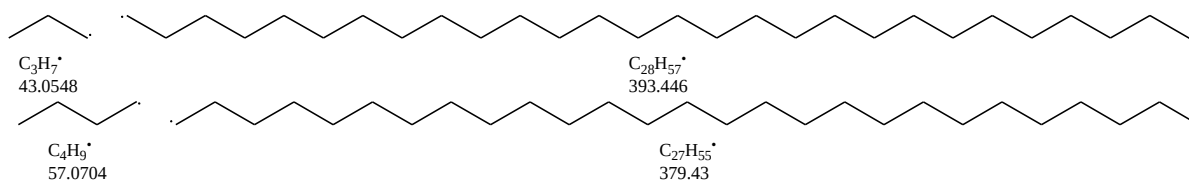
Figura 10 – Proposta de fragmentação do fitol.



molecular m/z 436; m/z 57 [M-379]: referente à perda de um radical $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}$ pelo íon molecular m/z 436.

Na Figura 12 se encontram os mecanismos propostos para algumas fragmentações (m/z) observadas no espectro de massas.

Figura 12 – Proposta de fragmentação do untriacontano.



O resultado apresentado na Tabela 2 mostra que o óleo da folha da *B. laevifolia* possui uma variedade de compostos. Foram identificados 18 compostos voláteis sem ambiguidades, e dois ésteres que não foram identificados precisamente (picos 9 e 10).

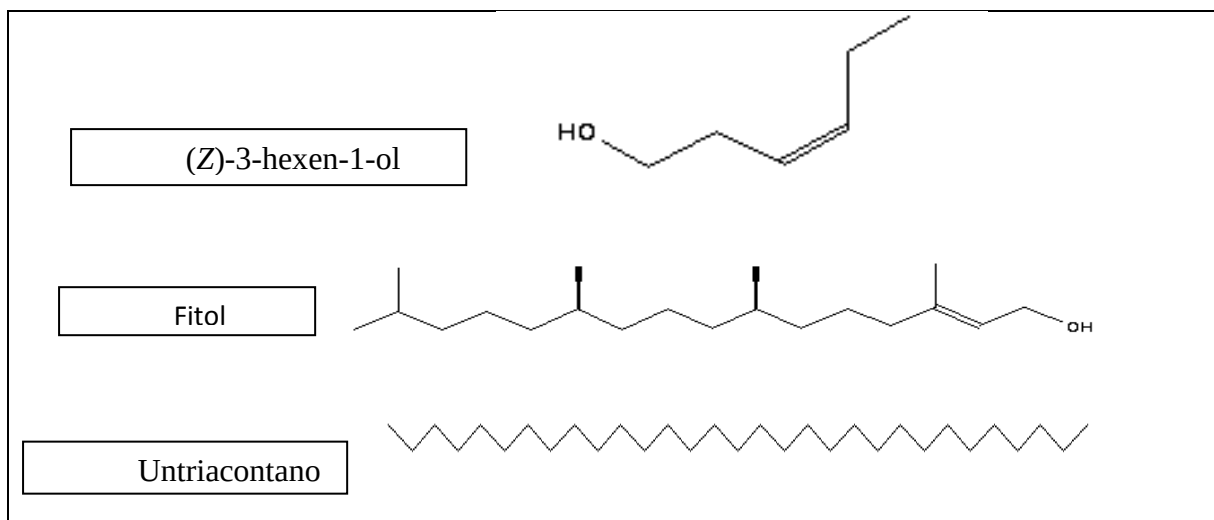
A maioria das classes de compostos identificadas (Tabela 3) foram álcoois alifáticos (23,40%), seguidos de terpenoides (18,66%), ésteres (10,38%), e alcanos de cadeia longa (9,17%). Analisando as porcentagens das áreas dos picos do cromatograma, encontra-se como compostos majoritários neste óleo o (*Z*)-3-hexen-1-ol com 19,39%, o fitol com 9,85%, e o untriacontano com 7,54%, cujas estruturas estão demonstradas na Figura 13. A porcentagem de compostos não identificados foi relativamente expressiva (28,17%), sendo que os mesmos não foram identificados por falta de dados nas bibliotecas eletrônicas do aparelho de CG-EM que permitissem a identificação.

Os terpenoides exibem variadas funções nos vegetais. Os monoterpenos agem na atração dos polinizadores, já que estes são constituintes fundamentais dos óleos voláteis. Já os sesquiterpenos geralmente exibem funções de proteção contra fungos e bactérias, e vários terpenoides dão origem aos hormônios que causam o crescimento vegetal (MAHMOUD; CROTEAU, 2002).

Como exemplo dos terpenoides presentes no óleo essencial das folhas da espécie *B. laevifolia* tem-se o monoterpeno linalol. Este composto tem um amplo valor no mercado de cosméticos e perfumaria, já que o mesmo é largamente usado como fixador de fragrâncias (DIAS; SILVA, et al., 2013). O linalol (1,62%) tem sido amplamente avaliado como acaricida (PRATES et al., 1998), bactericida e fungicida (BELAICHE et al., 1995). Na medicina, este constituinte químico é aplicado, com sucesso, como sedativo (SUGAWARA et al., 1998) e

anticonvulsivo (ELISABETSKY et al., 1999), e também apresenta propriedades anticâncer (WATTENBERG, 1991).

Figura 13 - Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial da folha da *B. laevifolia*; (Z)-3-hexen-1-ol, o fitol e o untriacontano.



Fonte: Próprio autor.

O (Z)-3-hexen-1-ol é conhecido popularmente como “álcool folha”, um líquido oleoso incolor, com aroma forte de grama recém-cortada, produzido em pequenas quantidades pela maioria das plantas, tendo como um de seus papéis a proteção contra as bactérias, já que permite que a parte cortada se regenere (GARRETT et al., 2013).

Outro constituinte majoritário encontrado no óleo foi o diterpeno fitol (9,85%), componente do grupo dos álcoois acíclicos insaturados de cadeia longa e ramificada. Esses álcoois apresentam uma série de atividades biológicas (TIRAPELLI et al., 2010). Segundo Dewick (2009), o fitol é a forma resumida do geranil-geraniol, um dos diterpenos mais simples e significativos da natureza, visto que forma a cadeia lateral lipofílica da vitamina K e das clorofilas. O fitol também pode ser encontrado no ambiente marinho, em óleos vegetais e produtos lácteos derivados de ruminantes (RONTANI; VOLKMAN, 2003).

Pesquisas de Phutdhawong e colaboradores (2004) revelaram que o óleo essencial de folhas frescas da espécie *Streblus asper* é composto por 45,1% do constituinte fitol e que exibiu atividade anticâncer em testes feitos com ratos que tinham leucemia linfocítica. Tradicionalmente esse diterpeno é utilizado na indústria como componente de cosméticos, xampus, sabonetes, detergentes, entre outros (COSTA, 2012). O fitol ocasiona muitos benefícios anti-idade, já que é conhecido por melhorar a tenacidade e equilibrar a fluidez de

óleo natural da pele, pois o mesmo quando em contato com a pele transforma-se em ácido fitânico (BRITO, 2010).

O óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* tem como um dos principais constituintes o alcanos não ramificado de cadeia longa untriacontano (7,54%), um dos principais constituintes de ceras naturais. Os principais constituintes químicos das ceras epicuticulares são n-alcenos, ésteres, álcoois e ácidos de cadeia longa (CHACHALIS et al., 2001). Segundo Heredia e colaboradores (1998), devido à sua constituição química, as ceras se destacam como a principal barreira protetora contra a perda de água por transpiração excessiva, atuação de patógenos, radiações solares e entradas de produtos químicos e contaminantes. Portanto, é bem provável que, assim como nas ceras, esta seria a função do ácido palmítico (1,69%), untriacontano (7,54%), heptacosano (1,63%), e os ésteres não-identificados (10,38%) presentes neste óleo essencial de *B. laevifolia*.

No óleo essencial das folhas colhidas no período de seca de *B. laevifolia* foi encontrado um ácido graxo saturado de cadeia longa, o ácido palmítico. Na literatura têm-se relatos apontando os ácidos oléico, esteárico e mirístico, palmítico, linoléico e linolênico e outros ácidos graxos de cadeia longa, como agentes alelopáticos, sendo os ácidos mirísticos e palmíticos os mais influentes inibidores de germinação do sorgo já que a capacidade inibitória é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia carbônica dos ácidos. Os ácidos graxos saturados e insaturados são substâncias corriqueiras em vegetais e estes têm como função ser uma barreira contra a perda de água para as plantas (MELOS et al., 2007).

Segundo Santos (1997), os ésteres apresentam potencial antifúngico, sedativo, e podem ser poderosos agentes espasmolíticos.

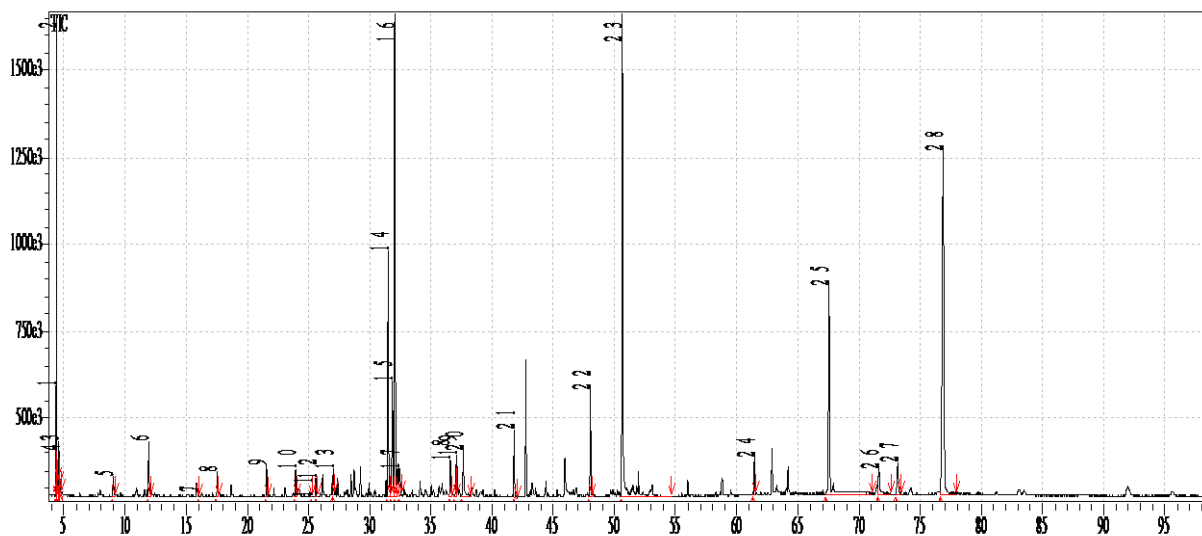
Alguns compostos presentes no óleo das folhas colhidas no período de seca, em baixa concentração, apresentam atividades biológicas importantes (LANG e BUCHBAUER, 2011). Destacam-se o α -copaeno (1,43%), que possui efetiva atividade contra patógenos gram-positivos humanos (*B. subtilis*, *S. aureus*); o nonanal (1,47%), efetivo contra *E. faecalis*; e o α -terpinoleno (1,87%) efetivo antibacteriano presente em diversos óleos essenciais (Machado, 2011).

Mesmo não sendo identificados, estes compostos têm sua importância, podendo até mesmo ser responsáveis por atividades biológicas da planta.

3.3 Composição química do óleo essencial extraído das *B. laevifolia* no período da chuva

A Figura 14 mostra um cromatograma do óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* obtido no período da chuva. Na análise deste cromatograma foram considerados somente os compostos com picos de área acima de 1,5%.

Figura 14 - Cromatograma de CG-EM do óleo essencial extraído das folhas da *B.laevifolia* obtido no período da chuva.



O resultado da identificação de cada constituinte está expresso na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição química do óleo essencial das folhas de *B.laevifolia* no período da chuva.

Número do pico	t _R (min)	Compostos	Área (TIC), %	IA (tabelado)	IA (calculado)
1	4.31	(E)-3-hexen-1-ol	3,4	844 ^a	845
2	4.36	(Z)-3-hexen-1-ol	17,0	850 ^a	856
3	4.60	(E)-2-hexen-1-ol	0,8	862 ^b	869
4	4.64	1-hexanol	1,3	863 ^a	872
5	8.99	(S)-3-etil-4-metilpentanol	0,8	1020 ^b	1028
6	11,89	linalol	1,9	1095 ^a	1105
7	15.97	salicilato de metila	0,5	1190 ^b	1201
8	17.48	2-metilbutanoato de (Z)-hex-3-enila	2,3	1233.5 ^b	1236
9	21.55	tiglato de (Z)-hex-3-enila	1,3	1329 ^a	1328
10	23.94	hexanoatode (Z)-hex-3-enila	0,9	1380 ^b	1384
11	25.62	N.I.	0,8	-	-
12	25.60	trans-cariofileno	0,9	1417 ^a	1423
13	27.00	geranil acetona	0,8	1453 ^a	1457
14	31.50	(6E)-nerolidol(trans-nerolidol)	4,4	1561 ^a	1567
15	31.84	benzoato de (3Z)- hexenila	3,5	1565 ^a	1575
16	32.04	N.I.	11,7	-	-
17	32.39	óxido de cariofileno	1,0	1582 ^a	1589
18	36.59	2-heptadecanona	0,8	1697 ^a	1699
19	37.08	N.I.	1,1	-	-
20	37.62	(2Z,6E) –farnesol	1,2	1722 ^a	1727,5
21	41.81	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1,6	1847 ^b	1845
22	48.03	(6E, 10E)-geranil-linalol	1,8	2030 ^a	2030
23	50.63	fitol	14,9	2110 ^b	2114
24	61.42	pentacosano	0,8	2500 ^a	2494
25	67.50	heptacosano	6,8	2700 ^a	2692
26	71.61	nonacosano	0,9	2900 ^a	2893
27	73.18	N.I.	1,4	-	-
28	76.86	untriacontano	15,3	3100 ^a	-
-		Total (%)	100		

N.I.. = não identificado; TIC = total ionschromatogram; IA = índice aritmético; TR = tempo de retenção; (*) Considerando-se 50% de cada composto; ^aBanco de dados da Nist na Web: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>; ^b Adams, 2007.

A partir da análise das tabelas de componentes dos óleos essenciais foi possível constatar que os compostos majoritários (3Z)-hexenol, fitol e untriacontano estão presentes nos dois períodos de coletas das folhas, em quantidades diferentes (19,4%; 9,8%; e 7,5% no período da seca, e 17,0%; 14,9%; e 15,3% no período chuvoso, respectivamente). Os compostos salicilato de metila, trans-cariofileno, (6E)-nerolidol, óxido de cariofileno,

(6*E*,10*E*)-Geranil-linalol estão presentes no óleo essencial do período de chuva e não no período de seca. Estes compostos apresentam também reconhecidas atividades biológicas (LANG e BUCHBAUER, 2011).

A distribuição por classe de compostos do óleo essencial das folhas coletadas no período da chuva encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Classificação, por grupos funcionais, dos componentes do óleo essencial da folha da *B. laevifolia* do período da chuva.

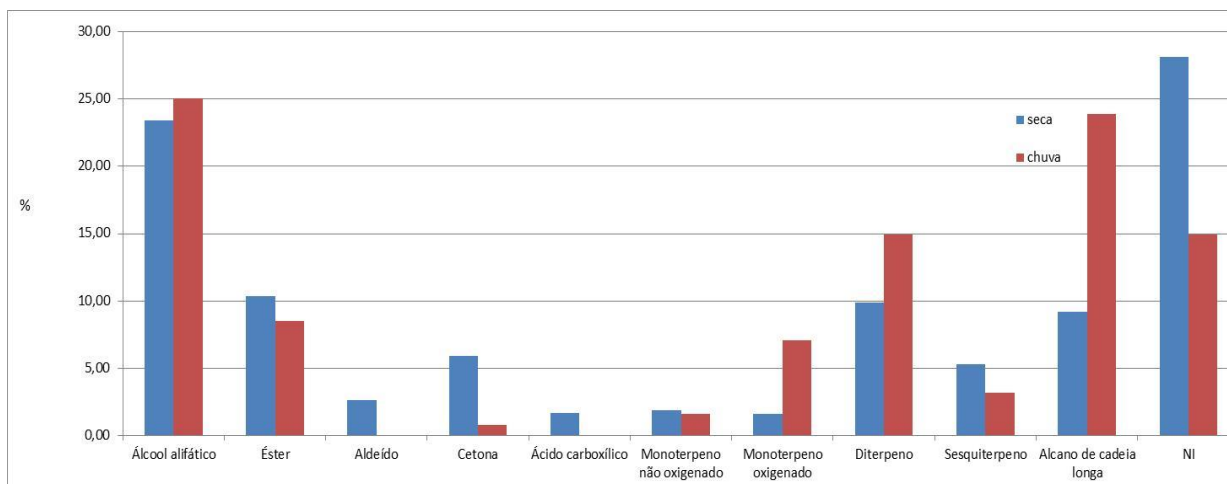
Grupos funcionais	(%) (nº de compostos)
Álcool alifático	25,1 (4)
Éster	8,5 (4)
Cetona	0,8 (3)
Monoterpeno	1,6 (2)
Monoterpeno oxigenado	7,1 (3)
Diterpeno	14,9 (1)
Sesquiterpeno	3,1 (3)
Alcano de cadeia longa	23,9 (4)
N.I.	14,9 (4)

N.I. = não identificado.

Foram identificados 24 compostos voláteis sem ambiguidades. Comparando os resultados das Tabelas 3 e 5, observa-se que o percentual de compostos não identificados do período de seca (28,2%) é o dobro do período de chuva (14,9%). O período da chuva apresentou maior número de terpenoides (26,8%) contra 18,7% para o período seco. Os terpenoides mais abundantes foram fitol (14,9%), nerolidol (4,4%), linalol (1,9%), (6*E*,10*E*)-geranil-linalol (1,7%) e o óxido de cariofileno (1,0%). Para o período chuvoso o óleo essencial da *B. laevifolia* apresentou maior quantidade de álcoois alifáticos (25,1%) e de alcanos de cadeia longa (23,9%) do que no período de seca (23,4% e 9,2%, respectivamente). Só foi identificada uma cetona no óleo essencial deste período. Não foram encontrados ácidos carboxílicos nem aldeídos no óleo essencial do período de chuva.

Para maiores comparações entre os dois períodos de coletas das folhas, a Figura 15 apresenta proporções relativas das classes de compostos presentes nos óleos essenciais das folhas coletadas no período seco e chuvoso.

Figura 15 - Gráfico comparativo (%) dos grupos funcionais encontrados nos óleos essenciais das folhas coletadas nos períodos seco e chuvoso.



Observa-se que o período da seca apresentou maior número de classes de compostos identificadas (11) contra 8 classes para o período de chuva.

Existem cada vez mais estudos que relatam os fatores ambientais que influenciam o conteúdo de metabólitos secundários, como óleos essenciais (PAVARINI et al., 2012).

A espécie *B. laevifolia* floresce no período das chuvas (novembro-janeiro no cerrado). Estudos mostram que a alta intensidade de luz neste período do ano é um fator que influencia a concentração e/ou composição dos terpenoides (SPRING; BIENERT, 1987; KARASOU et al., 1998; IONNIDIS et AL., 2002) produzidos nos tricomas foliares (TUNNER, 2000; MCCASKILL; CROTEAU, 1998), no período chuvoso). Furtado et al., (2014) encontrou a mesma luz-dependência para a concentração de terpenoides na espécie *Ingá laurina* (Sw.) Willd, outra planta do cerrado, coletada na região do Triângulo Mineiro. No período de maior luminosidade foram observadas no óleo da espécie *B. laevifolia* também maiores concentrações de álcoois alifáticos e alcanos de cadeia longa. Estes compostos fazem parte naturalmente das ceras epicuticulares que por sua vez funcionam como barreira protetora contra perdas de água por transpiração excessiva, radiações solares, entre outros fenômenos (HERIDA et al., 1998), como já mencionado. A presença destes compostos no óleo essencial das folhas podem também estar desempenhando a mesma função das ceras epicuticulares. Também os ésteres são geralmente encontrados em altas concentrações nas plantas neste período (SANTOS, 1997). Entretanto, a maior quantidade de ésteres encontrada no período de seca (período vegetativo) sugere que estes compostos atuam no mecanismo de defesa da planta contra intemperismos.

3.4 Atividades biológicas do óleo essencial extraído das folhas de *B. laevifolia* colhidas no período da chuva.

3.4.1 Atividade antimicrobiana

Os testes para verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas no período de chuva estão representados na Tabela 6. A escolha de concentração mais alta para o óleo essencial é tomada em decorrência da literatura científica mostrar, em diversos momentos, que os óleos essenciais só possuem atividade antimicrobiana em concentrações bem elevadas (SANTURIO et al., 2011). O valor testado foi de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo extraído das folhas de *B. laevifolia*.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) do óleo essencial extraído das folhas de *B. laevifolia* no período da chuva.

Bactérias	Óleo Essencial	CHD	M
<i>S. mutans</i> ¹	> 400	0,922	-
<i>S. mitis</i> ¹	> 400	7,375	-
<i>S. sanguinis</i> ¹	> 400	7,375	-
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ¹	> 400	1,844	-
<i>P. gingivalis</i> ²	*	-	*
<i>F. nucleatum</i> ²	> 400	-	-
<i>A. naeslundii</i> ²	> 400	-	-
<i>B. fragilis</i> ²	> 400	-	0,368
<i>B. tetrataeniosa</i> ²	--	-	1,475
Células Vero ³ (IC ₅₀)	161±6	-	-

*Não houve crescimento bacteriano; **Concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (CHD = Clorexidina) = 0,115 $\mu\text{g/mL}$ a 59,0 $\mu\text{g/mL}$; **Concentrações do controle positivo testado para as anaeróbias (M = Metronidazol) = de 0,0115 $\mu\text{g/mL}$ a 5,9 $\mu\text{g/mL}$; 1 = Bactéria Gram-positiva (aeróbica); 2 = bactéria Gram-negativa (anaeróbica); 3 = células Vero; OE: óleo essencial.

Observa-se pela Tabela 6 que a avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* colhidas no período de chuva não inibiu o crescimento das bactérias com CIM menores que 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Assim, o estudo confirma a pouca susceptibilidade de linhagens bacterianas Gram positivas e Gram negativas frente ao óleo essencial das folhas de *B. laevifolia*. Como a metodologia empregada não utilizou concentrações entre 400 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não podemos afirmar com certeza que a atividade antimicrobiana é moderada ou fraca. Não houve crescimento bacteriano para *Porphyromonas gingivalis*, nem para *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Alguns constituintes químicos deste óleo essencial já são conhecidos por ter significativa atividade antimicrobiana, tais como salicilato de metila, trans-cariofileno, óxido de cariofileno, (6*E*,10*E*)-geranil-linalol (LANG e BUCHBAUER, 2011); (6*E*)-nerolidol (SKALTSA et al., 2000); fitol (INOUE et al., 2005); (E)-3-hexen-1-ol, e o linalol (DORMAN e DEANS, 2000), já mencionados anteriormente. Embora nenhuma propriedade antimicrobiana tenha sido mencionada na literatura para untriacontano [(um dos três compostos majoritários no óleo essencial do período chuvoso (15,3%)], é possível que este composto esteja associado a efeitos sinérgicos, antagonísticos e aditivos com outros compostos de alta lipofilicidade (fitol, trans-cariofileno, por exemplo) na atividade antimicrobiana (BASSOLÉ e JULIANI, 2012). A hidrofobicidade de óleos essenciais lhes permite particionar os lípidos da membrana celular e mitocôndrias, tornando-o permeável e conduzindo os conteúdos intercelulares (BURT, 2004).

O mecanismo de ação de óleo essencial sobre os microrganismos é muito complexo e ainda não foi explicado. Alguns estudos apontam que o mecanismo de ação de terpenos envolve o rompimento da membrana plasmática (KALEMBA e KUNICKA, 2003, STEFANOVIC et al., 2012). Portanto, a ação antimicrobiana dos óleos estaria ligada ao caráter hidrofílico e lipofílico dos compostos presentes, já anteriormente mencionado. Compostos oxigenados geralmente apresentam maior atividade que aqueles não oxigenados (KALEMBA e KUNICKA, 2003). Álcoois terpênicos, por exemplo, têm demonstrado elevada atividade contra vários microrganismos, agindo na desnaturação de proteínas. Assim, o caráter lipofílico do esqueleto de hidrocarboneto e o caráter hidrofílico dos grupos funcionais podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana de determinado composto. Pode se inferir, então, que a baixa concentração de sesquiterpenos na espécie *B. laevifolia* pode ter contribuído pela ausência de atividade antimicrobiana significativa.

Não há resultados na literatura sobre atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre o gênero *Banisteriopsis* para que se possam comparar seus resultados.

Com relação ao teste de citotoxicidade, para o óleo essencial do período chuvoso, foi avaliada a sua toxicidade contra células Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África). Para se obter uma relação entre a inibição citotóxica (IC₅₀) e a atividade antimicrobiana (CIM), foi determinado o Índice de seletividade (IS), utilizando a equação:

$$IS = \log(IC_{50}/CIM)$$

Os valores positivos de IS representam seletividade elevada para os microorganismos estudados, enquanto que valores negativos de IS indicam elevada toxicidade para as células Vero (CASE et al., 2006). Para o óleo essencial foi encontrado o valor de 0,4 para o IS. Desta forma, observa-se que o óleo essencial mostrou-se quase tão tóxico quanto ativo.

3.4.2 Atividade antifúngica do óleo essencial extraídos das folhas de *B. laevifolia* no período da chuva.

Para a realização dos testes antifúngicos as concentrações mínima e máxima usadas foram 0,98 µg mL⁻¹ e 3000 µg mL⁻¹, respectivamente. No óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* a inibição dos fungos ocorreu em uma concentração de 1000 µg mL⁻¹, concentração mais alta do que aquela encontrada para o extrato. Esta atividade antifúngica encontrada (1000 µg mL⁻¹) é elevada para estudos para óleo frente à Cândidas (LANG E BUCHBAUER, 2011). Entretanto, foi encontrado um valor negativo de IS (-0,8), significando toxicidade do óleo para as células Vero. A literatura não informa resultados de atividade antifúngica para óleos do gênero *Banisteriopsis*. Óleos essenciais que apresentam na sua composição o linalol, trans-cariofileno, trans-nerolidol óxido de cariofileno, fitol, em baixas concentrações, como no nosso estudo, apresentaram atividade antifúngica (LANG e BUCHBAUER, 2011).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. ed. Carol Stream: Allured Bussiness Media, 2007. 804 p.
- BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, London, v. 20, n. 24, p. 392-397, Dec. 2010.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, Apr. 2012.
- BELAICHE, T.; TANTAOUI-ELARAKI, A.; IBRAHIMY, A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sciences des Aliments**, v. 15, n. 6, p. 571-578, Dec. 1995.
- BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588, 2009.
- BRITO, H. R. Caracterização química de óleos essenciais de *Spondiasmombin L.*, (Ciências Florestais) – Universidade Federal de Campina Grande no CSTR – **Centro de Saúde e Tecnologia Rural**, Paraíba. 2010.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Utrecht, v. 94, n. 3, p. 223–253, Aug. 2004.
- BUCHBAUER, G.; LANG, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, Vienna, v. 27, n. 1, p. 13-39, Aug. 2011.
- CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P; DELU FILHO, N.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Texto acadêmico. Editora UFLA-Lavras, 1 ed., v. 1, p. 81, 2001.
- 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**, Limerick, v. 106, n. 1, p. 82-89, 2006.
- 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**, Champaign, v. 49, p. 156-163, 2001.
- COSTA, J. P. **Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos**. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Teresina. 2012.

DAFERRA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Athens, v. 48, n. 6, p.76-81, June 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3ed. New York: Wiley & Sons, 2009.

DIAS, S. M.; SILVA, R. R. Perfumes: uma Química Inesquecível. **Química nova Interativa** - Sociedade Brasileira de Química. PlubSBQ. ca.2013. Disponível em: <<http://qnint.s bq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=46>>. Acesso em: 22 dez.2014.

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

ELISABETSKY, E.; BRUM, L. F. S.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p.107-113, May 1999.

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

GARCIA, A. A., CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GARRETT, R. Química Nova Interativa, Sociedade Brasileira de Química, ca. 2013. Disponível em: <http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=VA0UJ8vW0lXin1I60hZpcCq8j5CpQ8leV_DenuS0rzsulYuKphQzuLgC7YPwBgkDs-k67PK_9mpiWRaoLI5oOg> Acesso em: 17 dez.2014.

GRAMOLELLI, F. J. **Extração de óleos essenciais e verificação da atividade antifúngica**. *Argumento*, ano VIII, n. 14. Maio 2006.

GUENTHER, A. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. **Ecological Applications**, v. 7, n. 1, p. 34-45, Feb. 1997.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic Effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 5, p. 1770-1774, May 2005.

IOANNIDIS, D.; BONNER, L.; JOHNSON, C. B. UV-B is required for normal development of oil glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). **Annals of Botany**, London, v. 90, n.4, p. 453-460, Sep. 2002.

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

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

KAROUSOU, R.; GRAMMATIKOPOULOS, G.; LANARAS, T.; MANETAS, Y.; KOKKINI, S. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 8, p. 2273-2277, Dec. 1998.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. O.; LOPES, D.; MORSEBACH, N. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, 1997.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 3º ed. Rio de Janeiro, RJ: Record, 1992.

MACHADO, B. F. M. T. **Óleos essenciais: verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana**. 2011. 111 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87924>>. Acesso em 21 de agosto de 2015.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends Plant Science**. v. 7, n. 8, p. 366–373. Aug. 2002.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: IOCE, 1989.

MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 1, p. 31-37, 1998.

MELOS, J. L. R. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 292-297, Apr. 2007.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido à diferente grau de torra. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009.

NEVES, R. C. S.; ILZENAYDE A. NEVES, A. I.; MORAES, M. M.; PRISCILLA S. BOTELHO, P. S.; CÂMARA, C. A. G. **Composição química do Óleo Essencial das folhas de *Byrsonima Sericea* DC (Malpighiaceae)**. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T0241-1.pdf>> Acesso em 13 jan.2015.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 5–16. Sep. 2012.

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 asper*. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 19, n. 5, p. 445-447, Sep/Oct. 2004.

PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 193-197, Apr. 1998.

RONTANI, J. F.; VOLKMAN, J. K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, Marseille, v. 34, n. 1, p. 1-35, Jan. 2003.

SANTOS, F. A. **Atividade antimicrobiana, antinociceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* Pers. e *Psidium pohlium* Berg.** 1997. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará, 1997.

SEVERO, J.; GALARÇA, S. P.; AIRES, R. F.; CANTILLANO, R. F. F.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Avaliação de compostos fenólicos, proantocianidinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Brazilian Journal of Food Technology**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 65-69, Jan. 2009.

SILVA, N. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N.; FERNANDES, A. J. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Products Research**, Roma, v. 26, n. 16, p. 1510-1514, Oct. 2012.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 8-13, 2006.

SKALTSA, H. D.; LAZZARI, D. M.; MAVROMATI, A. S.; TILIGADA, E. A.; CONSTANTINIDIS, T. A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, n. 7, p. 672-674, 2000.

SPRING, O.; BIENERT, U. Capitulate glandular hairs from sunflower leaves: development, distribution and sesquiterpene lactone content. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 130, n. 1, p. 441-448, Jan. 1987.

STEFANOVIC, O.; RADOJEVIC, I.; VASIC, S.; COMIC, L. **Antibacterial activity of naturally occurring compounds from selected plants**: Antimicrobial Agents. ed. Rijeka: InTech, 2012. 1-24 p.

SUGAWARA, Y.; HARA, C.; TAMURA, K.; FUJII, T.; NAKAMURA, K.; MASUJIMA, T.; AOKI, T. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. **Analytica Chimica Acta**, v. 365, n. 1, p. 293-299, 1998.

TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, A. M.; TOSTES, R. C. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Herbal Medicine**, Ribeirão Preto, v. 81, n. 7, p. 690-702. Jun. 2010.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, n. 2, p. 655-663, Oct. 2000.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **ESALQ, Documentos Florestais**. Piracicaba: ESALQ, 2003.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene (nerolidol). **Oxford Journals Life Science & Medicine Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 151-152, 1991.

CONCLUSÃO GERAL

A prospecção fitoquímica dos extratos e partições sugeriu a presença de flavonoides, terpenoides, saponinas, propilpropanoide, fenóis e esteróides. As classes predominantes foram os flavonoides, com maiores concentrações nas partições acetato de etila e *n*-butanol. Entretanto, não foi detectada a presença de compostos nitrogenados. As atividades antioxidantes e antifúngicas mostraram-se seletivas para o extrato etanólico e partições acetato e *n*-butanol, tornando estas frações promissoras para estudos de isolamentos. Já a atividade antimicrobiana não foi efetiva para valores de CIM abaixo de 400 µg mL⁻¹ para as bactérias avaliadas neste estudo. A análise por CLAE-EM/EM das frações acetato de etila e *n*-butanol permitiu identificar compostos fenólicos bioativos que exercem reconhecida atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica. São necessárias investigações adicionais sobre a capacidade antioxidante dos metabólitos presentes nos extratos, visto que apresentaram valores de CE₅₀ equivalentes ao do BHT.

Foi encontrada uma grande variedade de compostos voláteis nos óleos essenciais das folhas da *B. laevifolia* coletadas no período de seca e no período de chuva. A porcentagem de compostos não identificados foi relativamente expressiva para os dois períodos de coletas. Os óleos essenciais apresentaram baixos rendimentos e os metabólitos secundários apresentaram pequena variação (em termos de classes), em função da sazonalidade. O óleo essencial das folhas de *B. laevifolia* colhido no período da chuva não foi efetivo frente às bactérias bucais testadas. Entretanto, exibiu atividade antifúngica relevante contra as cepas das *Candidas* testadas, apresentando valores de IS igual a 0,4. Quando comparado com o padrão de valores positivos não tóxico e negativo tóxico. A citotoxicidade revelou que este óleo é quase tão tóxico quanto ativo.

Desta forma, os resultados de atividade biológica para o extrato etanólico, frações e óleo essencial das folhas da *B. laevifolia* se revelam promissores e contribuíram para o conhecimento químico e biológico da espécie.

APÊNDICES: Trabalhos científicos oriundos desta pesquisa

A- Resumos publicados em anais de congressos

1 - Atividade antioxidante do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates. XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG, 10 a 12 de Novembro de 2014, Poços de Caldas–MG. POSTER

2 - Composição química do óleo essencial das folhas da espécie *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates. 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 25 a 28 DE MAIO DE 2015, Águas de Lindóia-SP. POSTER

3 - Atividades antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial das folhas da espécie *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates. XXIX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG, Belo Horizonte-MG, novembro de 2015.

4 - Phytochemical screening, antimicrobial and antifungal activities of the ethanol extract of the species *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates. 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Goiânia-GO, maio/junho de 2016.

B – Artigo submetido no periódico Industrial Crops and Products (sob revisão)

"Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B.Gates leaves". INDCRO-D-16-01466R1, Elsevier Editorial System.