

Letícia Alves da Silva

**Atividade Antioxidante e Antimicrobiana do
Fracionamento Bioguiado do Extrato Etanólico do
Caule e Atividade Leishmanicida e Citotóxica do
Óleo Essencial das Folhas da Espécie
Banisteriopsis oxyclada (A. Juss.) B. Gates**

Uberlândia

2017

Letícia Alves da Silva

**Atividade Antioxidante e Antimicrobiana do Fracionamento
Bioguiado do Extrato Etanólico do Caule e Atividade
Leishmanicida e Citotóxica do Óleo Essencial das Folhas da
Espécie *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates**

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Trabalho de Conclusão de Curso

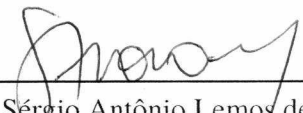
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

Uberlândia
2017

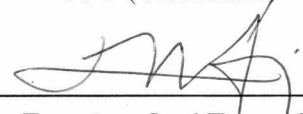
LETÍCIA ALVES DA SILVA

**Atividade Antioxidante e Antimicrobiana do Fracionamento
Bioguiado do Extrato Etanólico do Caule e Atividade
Leishmanicida e Citotóxica do Óleo Essencial das Folhas da
Espécie *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates**

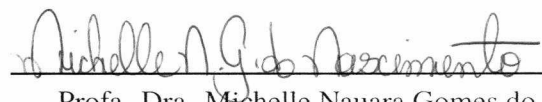
Trabalho aprovado. Uberlândia, 2017:



Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes -
UFU (Orientador)



Prof. Dr. Francisco José Torres de Aquino -
UFU (Titular 1)



Profa. Dra. Michelle Nauara Gomes do
Nascimento - UFU (Titular 2)

Uberlândia
2017

*Dedico este trabalho à minha família e ao
meu noivo Renan que sempre acreditaram no meu sucesso.*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu bondoso DEUS por ser a minha fortaleza, permitindo que eu chegasse até aqui, por ter me sustentado todas as vezes que pensei em desistir e por ter me capacitado diante de todas as dificuldades.

Agradeço aos meus pais Rosangela e Acriziomar, pelo amor, carinho, dedicação e perseverança ao longo desta trajetória.

Ao meu noivo Renan pelo amor, incentivo, compreensão, paciência, companheirismo e apoio.

Às minhas irmãs e irmão: Larissa, Débora, Dayane e Acriziomar, e toda a minha família que sempre acreditaram no meu sucesso.

Ao meu orientador e coorientador Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes e Msc. Mário Martins Machado, juntamente com o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais pela oportunidade e apoio.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Química e a todos os meus professores que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Enfim, a todos que contribuíram e torceram para esta conquista, muito obrigado!

*"O sonho levou ao treino
E o treino trouxe o suor
O suor, me trouxe o cansaço
E o cansaço me fez melhor
Na melhora, vi meu progresso
Ao progresso, meu foco imponho
O foco foi meu caminho
E o caminho me leva ao sonho."
Autor Desconhecido*

Resumo

As plantas medicinais foram por muitos anos o único meio de tratamento de doenças em escala mundial, os conhecimentos de seus potenciais terapêuticos eram exclusivamente populares, mas com a inovação e o desenvolvimento de estudos, muitos fármacos utilizados atualmente, são de origem de plantas. Uma das fontes de material para pesquisa neste seguimento é o Cerrado, por possuir uma extensa área de ocupação, uma riquíssima biodiversidade e muitas espécies endêmicas, entretanto este bioma está em crescente devastação, encontrando-se dentre os 17 ecossistemas mais degradados no mundo. Neste contexto, este trabalho se cumpriu em dois objetivos: o fracionamento bioguiado do extrato etanólico do caule da espécie *Banisteriopsis oxyclada*, por meio da avaliação das atividades antioxidante e antibacteriana; e a avaliação da composição, atividade leishmanicida e citotóxica do óleo essencial das folhas da mesma. Uma vez que a presente espécie, popularmente conhecida como “cipó-prata”, é pertencente ao Cerrado e não apresenta nenhum estudo até o momento. Para obtenção do extrato etanólico, os caules foram secos e moídos, e o pó resultante foi então submetido ao processo de extração com etanol 95%. O extrato foi particionado por meio de seis solventes com diferentes polaridades (hexano, acetato de etila, diclorometano, n-butanol e água). Devido aos resultados positivos das partições de n-butanol e diclorometano para os testes de atividade antibacteriana e antioxidante, estas passaram pelo método de separação em coluna cromatográfica. Todas as frações obtidas, as partições e extrato foram submetidos a teste de atividades antioxidante e antibacteriana. Para obtenção do óleo essencial das folhas da *Banisteriopsis oxyclada*, estas foram submetidas à extração por hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger por um período de quatro horas. Após, o óleo essencial foi recolhido em um funil de separação e lavado com 3 frações de 5,0 mL de diclorometano. Os produtos foram secos com sulfato de magnésio anidro. A separação e identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais foram obtidas por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados das atividades antioxidante e antimicrobiana obtidos para as partições de n-Butanol e diclorometano mostraram-se melhores do que algumas espécies do mesmo gênero. A maioria dos constituintes encontrados na composição do óleo essencial pertence às classes dos álcoois e aldeídos. Dentre eles o fitol apresenta destaque devido à efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, apresentados na literatura.

Palavras-Chave: *Banisteriopsis oxyclada*, Extrato Etanólico, Óleo Essencial, Atividade Anti-oxidante, Atividade Antimicrobiana, Atividade Leishmanicida, Atividade Citotóxica.

Abstract

Medicinal plants have for many years been the only means of treating diseases on a world scale, knowledge of their therapeutic potential was exclusively popular, but with the innovation and development of studies, many drugs currently used, are plant-based. One of the sources of material for research in this area is the Cerrado, because it has an extensive area of occupation, a rich biodiversity and many endemic species, although this biome is in increasing devastation, being among the 17 most degraded ecosystems in the world. In this context, this work was accomplished in two objectives: the bioguided fractionation of the ethanolic extract of the stem of the species *Banisteriopsis oxyclada*, through the evaluation of the antioxidant and antibacterial activities; and the evaluation of the composition, leishmanicidal and cytotoxic activity of the essential oil of leaves of the same. Since the present species, popularly known as "silver-lupine", belongs to the Cerrado and presents no study to date. To obtain the ethanolic extract, the stems were dried and ground, the resultant was then subjected to the extraction process with 95% ethanol. The extract was partitioned by means of six solvents with different polarities (hexane, ethyl acetate, dichloromethane, n-butanol, methanol and water). Then the n-butanol and dichloromethane partitions underwent the chromatographic column separation method. All fractions obtained, partitions and extract were subjected to antioxidant and antibacterial activities test. In order to obtain essential oil from leaves of *Banisteriopsis oxyclada*, these were subjected to extraction by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus for a period of four hours. The essential oil was then collected in a separatory funnel and washed with 3 5.0 mL dichloromethane fractions. The products were dried with anhydrous magnesium sulfate. The separation and identification of the volatile constituents of the essential oils were obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The results of the antioxidant and antimicrobial activities obtained for the n-Butanol and dichloromethane partitions were shown to be better than some species of the same genus. Most of the constituents found in the composition of the essential oil belong to the class of alcohols and aldehydes. Among them phytol is highlighted due to the anti-inflammatory and antinociceptive effects presented in the literature.

Keywords: *Banisteriopsis oxyclada*, Ethanol Extract, Essential Oil, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, Leishmanicidal Activity, Cytotoxic Activity.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estruturas de alguns compostos isolados de espécies do gênero <i>Banisteriopsis</i>	19
Figura 2 – Fotografia da espécie <i>Banisteriopsis oxyclada</i> na vegetação do Cerrado . . .	19
Figura 3 – Fluxograma de fracionamento do caule da <i>Banisteriopsis oxyclada</i>	25
Figura 4 – Hidrodestilação em aparelhagem do tipo Clevenger	28
Figura 5 – Reação do sequestro do radical livre DPPH	30
Figura 6 – CCD da fração Frdc26 da partição PDC indicando possível composto isolado.	33
Figura 7 – Cromatograma do óleo essencial das folhas da <i>B. oxyclada</i> obtido por meio CG-EM.	33
Figura 8 – Estrutura dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas da <i>B.oxyclada</i> .	35

Lista de tabelas

Tabela 1 – Massas obtidas do extrato seco do caule da <i>B. oxyclada</i>	29
Tabela 2 – Valores das massas obtidas na partição líquido-líquido do extrato etanólico da <i>B. oxyclada</i>	29
Tabela 3 – Valores de CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da capacidade antioxidante para o extrato bruto e as partições da <i>B. oxyclada</i>	30
Tabela 4 – Valores da massa e CE ₅₀ das frações obtidas da amostra da PNBC.	31
Tabela 5 – Atividade antimicrobiana com bactérias aeróbias($\mu\text{g mL}^{-1}$)	31
Tabela 6 – Atividade antimicrobiana com bactérias anaeróbias($\mu\text{g mL}^{-1}$)	32
Tabela 7 – Valores da massa das frações obtidas da separação por cromatografia em coluna da PDC.	32
Tabela 8 – Composição do óleo essencial das folhas da <i>B. oxyclada</i>	34
Tabela 9 – Relação percentual das classes de compostos presentes no óleo essencial das folhas da <i>B.oxyclada</i>	35
Tabela 10 – Atividade leishmanicida e citotoxicidade do óleo essencial da <i>B.oxyclada</i> . . .	35

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise Estatística de Variância
CG-EM	Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas
IA	Índice Aritmético
EXTC	Extrato Etanólico do Caule
PHC	Partição Hexano do Caule
PDC	Partição Diclorometano do Caule
PAC	Partição Acetato de Etila do Caule
PAGC	Partição Hidroalcoólica do Caule
PNBC	Partição n-Butanol do Caule
Fr _{dc}	Fração Obtida da Partição Diclorometano do Caule
Fr _{nb}	Fração Obtida da Partição n-Butanol do Caule
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
EM	Espectrometria de Massas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
IF	Infravermelho
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CE ₅₀	Concentração Efetiva Média
RND	Rendimento
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
TR	Tempo de Retenção
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Hidroxitolueno Butilado

CI₅₀ Concentração Inibitória Média

IS Índice de Seletividade

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Um pouco da história geral das plantas medicinais	14
1.2	Usos de plantas medicinais no Brasil e suas origens	15
1.3	A importância de seus potenciais terapêuticos	16
2	BIOMA CERRADO	17
2.1	Família Malpighiaceae	17
2.2	Gênero <i>Banisteriopsis</i>	18
2.3	Espécie <i>B. oxyclada</i>	19
3	ÓLEO ESSENCIAL	21
4	CONDIÇÕES CLIMÁTICAS: A INFLUÊNCIA DO CLIMA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS PLANTAS	22
5	OBJETIVOS	23
5.1	Objetivos Gerais	23
5.2	Objetivos Específicos	23
6	METODOLOGIA	24
6.1	Extrato Etanólico do Caule	24
6.1.1	Coleta do Material	24
6.1.2	Preparo do Extrato Etanólico do Caule	24
6.1.3	Partição Líquido-Líquido do Extrato Etanólico	24
6.1.4	Fracionamento	25
6.1.5	Atividade Antioxidante	26
6.1.6	Determinação da Atividade Antibacteriana	27
6.1.6.1	Microrganismo Utilizados	27
6.1.6.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	27
6.1.7	Análise Estatística	27
6.2	Óleo Essencial	27
6.2.1	Extração do Óleo Essencial	27
6.2.2	Separação e Identificação de Compostos Voláteis	28
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
7.1	Extrato Etanólico do Caule	29
7.1.1	Rendimento Extração Etanólico	29

7.1.2	Rendimento das Partições Líquido-Líquido	29
7.1.3	Determinação da Atividade Antioxidante por DPPH	29
7.1.4	Atividade Microbiana	31
7.2	Óleo Essencial	33
7.2.1	Extração do Óleo Essencial	33
7.2.2	Separação e Identificação dos Compostos Voláteis	33
7.2.3	Atividade leishmanicida e citotóxica do óleo essencial das folhas	35
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS	38

1 Introdução

1.1 Um pouco da história geral das plantas medicinais

Plantas medicinais são vegetais que apresentam substâncias capazes de auxiliar no tratamento de doenças. São facilmente encontradas na América Latina, distribuídas em mais de 90 mil espécies. Seus potenciais terapêuticos são conhecidos há séculos, em especial pelas mulheres, que desenvolveram ao longo do tempo diversas formas de extração de seus princípios ativos (FRANÇA et al., 2008).

A história das plantas medicinais é tão antiga quanto à própria existência do homem. Não é possível encontrar um ponto inicial de quando as plantas começaram a ser utilizadas para fins medicinais. No entanto, o que se sabe é que o conhecimento de seus potenciais terapêuticos surgiu de modo empírico na busca da sobrevivência por meio do tratamento de eventuais ferimentos e doenças (ALMEIDA, 2011).

Dentre os escritos mais antigos encontra-se o registro Pen Ts'ao, de 2800 a.C, escrito pelo herborista chinês Sheng Numg, onde descreve a aplicação de centenas de plantas na cura de várias moléstias. Mais tarde, em 1500 a.C, houve grande contribuição egípcia com registro de documentos da cultura médica. Foram descritos espécies vegetais como a mirra, de uso adstringente e anti-inflamatório, o látex do olíbano, para inflamações bucais, o sândalo como antidiarreico e a papoula, fonte do ópio, da morfina, da codeína e da papaverina, era conhecida como sedativo e antipasmódico (ALMEIDA, 2011).

A Grécia contribuiu, por meio de Pedacius Dioscórides, com a sistematização das conhecidas drogas vegetais na obra *De Matéria Médica*, a qual trazia a origem, características e usos de mais de 500 drogas vegetais, além de algumas de origem animal e mineral. Em paralelo, a medicina Árabe, muito contribuiu com o conhecimento de flores medicinais, além de introduzir na Europa novas drogas como: canela, limão, noz-moscada, sene, tamarindo e cânfora. (ALMEIDA, 2011)

Com o início das rotas marítimas no final do século XV, foi possível agregar os conhecimentos medicinais da Índia e da América no uso de vegetais como o coco, chá preto e o café. No entanto, o estudo farmacológico das substâncias responsáveis pelos potenciais terapêuticos das plantas, só teve início no século XVI com Paracelso, por meio do domínio da técnica de extração de algumas substâncias de plantas medicinais utilizadas na época.(ALMEIDA, 2011)

Apesar da grande contribuição de Paracelso, apenas no final do século XVIII foi possível estabelecer uma proposta científica sólida para o uso de fitofármacos. Nesta época iniciaram-se o isolamento e estudos dos metabólitos secundários presentes nas plantas. As primeiras substâncias isoladas foram os ácidos orgânicos: oxálico, málico e tartárico, a partir de um extrato vegetal. Depois disso, no século XIX, vários compostos foram isolados e tiveram sua estrutura química elucidada, como por exemplo, a morfina presente no ópio, obtido da papoula. (ALMEIDA, 2011)

No início do século XIX, foram realizados, juntamente com o isolamento e identificação de substâncias, testes de toxicidade em animais. A partir desse momento, os estudos de plantas medicinais ganharam aspectos de análises experimentais. As substâncias bioativas, isoladas de extratos vegetais, começaram a ser estudadas aumentando a visão de aplicabilidade terapêutica das plantas medicinais. Dessa forma, a etnomedicina, farmacologia e produtos naturais começaram a se estabelecer dentro do estudo das plantas medicinais e seus potenciais terapêuticos (ALMEIDA, 2011). Atualmente, pesquisas nessas áreas se ocupam na comprovação da identidade botânica, composição química, obtenção e identificação de princípios ativos, além de estudar as ações farmacológicas e tóxicas dessas substâncias.(DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004)

1.2 Usos de plantas medicinais no Brasil e suas origens

O conhecimento sobre as plantas medicinais no Brasil tem origem diversificada devido ao processo de colonização. As plantas medicinais de conhecimento popular que se tem atualmente tiveram influência principalmente das culturas: indígena, africana, europeia e asiática.(ALMEIDA, 2011)

Com a vinda dos africanos para o Brasil, muitas espécies foram trazidas para o território e começaram a fazer parte não só para o uso medicinal, mas também de seus rituais religiosos. Dentre as colaborações africanas temos a mamona, dendê, quiabo, inhames, tamarineiros e jaqueiras, as quais melhor se adaptaram ao Brasil.(ALMEIDA, 2011)

A população indígena, por ser nativa no Brasil, teve grande contribuição no arsenal de plantas medicinais conhecidas popularmente. Os índios viviam em harmonia com a natureza, buscando nela à sobrevivência a eventuais problemas, tais como: doenças, ferimentos e caça (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006). Dentre a contribuição indígena destaca-se: a caapeba, urucum, guaraná, com uso na suplementação energética e a copaíba e adiroba, usadas em tratamento doenças de pele. (ALMEIDA, 2011)

A contribuição europeia e asiática nesses conhecimentos é mais evidente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, devido à forte presença de imigrantes dessas origens. As espécies difundidas por essas culturas se introduziram também da culinária brasileira. Dentre as espécies de maior destaque estão: erva-cidreira, erva-doce, manjerição, anis-verde, louro, canela, gengibre e cravinho da índia. (ALMEIDA, 2011)

Apesar da riqueza dos conhecimentos das plantas medicinais no Brasil, poucos são os estudos científicos nessa área. Em um resumo apresentado por Brandão et al. (2006), demonstra que houve uma acentuada substituição das plantas nativas do Brasil por medicamentos industrializados e outros produtos vegetais estrangeiros, tal fato pode estar associado aos poucos estudos científicos das plantas medicinais brasileiras, reafirmando a necessidade de investimentos em pesquisa nessa área.

1.3 A importância de seus potenciais terapêuticos

As plantas produzem um vasto e diversificado conjunto de compostos orgânicos, onde a grande maioria não participa diretamente do seu crescimento e desenvolvimento. Esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários, e exercem diversas funções na planta. Em contrapartida, os demais compostos produzidos, que estão diretamente ligados ao seu crescimento e desenvolvimento tais como: fitoesteróis, lipídios de acila, nucleotídeos, aminoácido e ácidos orgânicos, são conhecidos como metabólitos primários (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). De acordo com a origem biossintética estes compostos podem ser divididos em três grandes grupos: os terpenoides, os alcaloides e os compostos fenólicos. No entanto, não é possível distinguir facilmente os metabólitos secundários e primários analisando suas moléculas precursoras, estrutura química ou origem biossintética. Dessa maneira, a melhor forma de distingui-los é de acordo com seus aspectos funcionais. (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000)

Como citado anteriormente, os metabólitos primários são os compostos responsáveis pelas funções básicas de crescimento e desenvolvimento da planta. Os metabólitos secundários, no entanto, são as moléculas responsáveis pela interação ecológica da planta com o seu habitat. (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000) Neste aspecto, eles são produzidos pela planta com diversas finalidades: atração de polinizadores, defesa contra parasitas, proteção de brusca mudança de temperatura, entre outros fatores que possam favorecê-las em seu habitat (DELBONE; LANDO, 2010) Porém, o grande interesse pelo estudo dessas substâncias está associado à sua eficácia no tratamento de doenças, pois no organismo humano elas atuam de forma diferente, podendo ser nocivas ou não de acordo com sua concentração e administração. (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010)

É importante ressaltar que a biossíntese desses metabólitos está diretamente relacionada às necessidades secundárias da planta. Isso significa que pode haver uma variação de suas substâncias e quantidades, dependendo da região onde a planta se encontra, uma vez que as espécies vegetais podem se adaptar ao meio (FERREIRA; AQUILA, 2000. (Edição Especial))

Portanto, existem alguns fatores que irão influenciar no conteúdo do metabólito secundário da planta, tais como processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos que estão associados às condições ambientais na qual a planta se encontra. (GOBBO-NETO; LOPES, 2007)

2 Bioma Cerrado

No Brasil existem cinco regiões que apresentam uma abundante variedade de espécies medicinais: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Pantanal Mato-grossense, Cerrado e Caatinga (ALMEIDA, 2011). Dentre eles, o Cerrado recebe destaque por ser um dos maiores biomas do Brasil, localizado nas regiões Centro-Oeste do país, apresentando uma grande biodiversidade em sua fauna e flora.

A flora do bioma Cerrado é bastante rica, exibindo uma das maiores diversidades de plantas vasculares, sendo elas arbustivas, arbóreas, herbáceas e cipós, apresentando um endemismo de 44% em sua flora (KLINK; MACHADO, 2005). Além disso, há uma vasta gama de espécies distribuídas por todo o seu território, encontradas em mais de uma localidade, o que lhe confere uma variedade de habitats e alternância de espécies. (RATTER; BRIDGEWATER; RIBEIRO, 2003)

Devido a sua grande biodiversidade este bioma tem desempenhado um papel muito importante nas pesquisas de investigação e análise de plantas medicinais, bem como todos os estudos relacionados à etnobotânica (POVH; ALVES, 2013). Entretanto, essas pesquisas têm vivido um grande desafio devido à grande e crescente devastação da vegetação do Cerrado, o qual se encontra dentre os 17 ecossistemas mais degradados no mundo (POVH; ALVES, 2013). As regiões do Brasil mais afetadas por essas degradações é o Centro-Oeste, tendo como causa os constantes desmatamentos e queimadas para fins agrícolas, totalizando em uma perda de 55% da área do Cerrado (KLINK; MACHADO, 2005)

2.1 Família Malpighiaceae

Muitas plantas pertencentes ao Cerrado, distribuídas nas mais variadas famílias, têm sido empregadas popularmente no tratamento de várias doenças, dentre elas estão as pertencentes à família das Malpighiaceae. (CONCEIÇÃO; RUGGIERI; RODRIGUES, 2011)

A família Malpighiaceae é composta por aproximadamente 1300 espécies distribuídas em 75 gêneros, é encontrada em larga escala nas regiões tropicais e subtropicais, sendo o continente americano o seu melhor habitat (ALEXANDRINO; SOUSA; BASTOS, 2011); ocorrendo na forma de arbustos, árvores, lianas e ervas (ANDERSON, 1979). Mesmo com um grande número de espécies, atualmente, apenas 2% delas apresentam estudos sobre seus aspectos químicos (QUEIROZ et al., 2015).

Apesar de aproximadamente 90% das espécies estarem localizadas em regiões neotropicais, é na América do Sul que ocorre o maior número de diversidade da família Malpighiaceae (ANDERSON, 1979), sendo o Brasil o mais abundante apresentando 300 espécies subordinadas em 38 gêneros distribuídas por todas as vegetações que compõem o Bioma Cerrado, onde o estado

de Minas Gerais recebe destaque por apresentar uma surpreendente diversidade (ANDERSON, 1979).

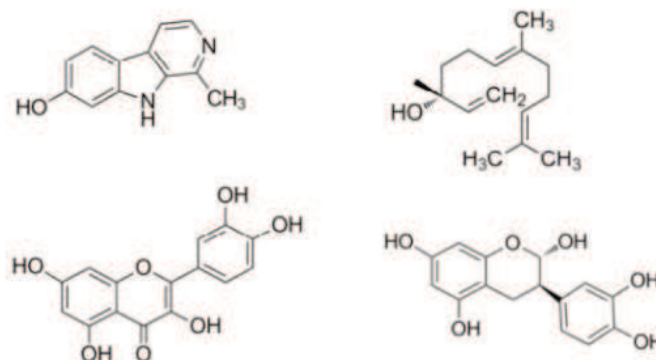
Várias plantas desta família apresentam importância social, econômica e ecológica. Seus cultivos são comuns para fins ornamentais por exibirem flores e frutos de várias pigmentações, abundantes e duradouros, como por exemplo, o triális – *Galphimia brasiliensis* (L.) A.Juss. Os frutos de algumas espécies também são utilizados na alimentação de animais e seres humanos, sendo a acerola (*Malpighia emarginata* DC.) o representante mais comum deste seguimento, e mais conhecido desta família. Em relação a aspectos etnobotânicos se destaca a espécie *Banisteriopsis caapi*, a qual suas folhas e caules são empregados na produção de bebidas com efeitos alucinógenos em rituais indígenas sul-americanos da Floresta Amazônica. (SOARES, 2012)

2.2 Gênero *Banisteriopsis*

O gênero *Banisteriopsis* é um dos maiores formadores da família Malpighiaceae exibindo cerca de 90 espécies, sendo encontradas na forma de lianas e arbustos, e distribuídas nas regiões neotropicais, do México até a Argentina, mas o Brasil se destaca por possuir 66% das espécies (FREITAS et al., 2015), principalmente nas regiões do Cerrado (SOUTO; OLIVEIRA, 2012).

O gênero *Banisteriopsis* tem se destacado devido a comprovação de suas atividades biológicas como: antibacteriana, anti-inflamatórios e antifúngicos, nas espécies estudadas (PÁDUA et al., 2013). Algumas delas já eram popularmente utilizadas por indígenas no tratamento de alcoolismo, como é o caso da *B. caapi*, onde suas folhas eram matéria-prima na preparação de uma bebida alucinógena (SCHWARZ et al., 2003). (Outras também foram estudadas, como a *B. argyrophylla* apresentando ação anti-inflamatória, e portanto sendo utilizada em casos de hemorragias e nefrites, a *B. campestris* utilizada como um diurético, e a *B. megaphylla* que pode ser empregada em tratamento pulmonar exibindo uma atividade antipirética (PÁDUA et al., 2013).

As atividades biológicas apresentadas por espécies desse gênero estão associadas aos diferentes metabólitos secundários produzidos por essas plantas. Estudos revelam que diversos compostos já foram isolados nas espécies do gênero *Banisteriopsis*, dentre eles flavonoides, taninos, alcaloides e terpenoides (Figura 1) (FRIAS et al., 2012).

Figura 1 – Estruturas de alguns compostos isolados de espécies do gênero *Banisteriopsis*

Fonte: Frias, 2012

2.3 Espécie *B. oxyclada*

A *B. oxyclada* (Figura 2) é uma espécie pertencente ao gênero *Banisteriopsis*, que por sua vez faz parte da família Malpighiaceae. É encontrada preferencialmente em mata de galeria, na vegetação do Bioma Cerrado, apresentando hábito do tipo trepadeira, e está distribuída no Brasil nas regiões de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Pará, Maranhão, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul (MEDEIROS et al., 2011).

Figura 2 – Fotografia da espécie *Banisteriopsis oxyclada* na vegetação do Cerrado

Fonte: Salles, 2007

A *Banisteriopsis oxyclada* é popularmente conhecida como “cipó-folha-de-prata” ou “cipó-prata”, é utilizada como analgésico e anestésico na medicina popular (SOUZA; GRAEL, 2014). Esta espécie já apresenta estudos da fitotoxicidade do extrato etanólico de suas folhas e fruto sobre o crescimento de plantas daninha (ANESE et al., 2016), e estudos fitoquímicos, avaliações citotóxica e avaliação de algumas atividades biológicas (antitumoral, tripanocida, leishmanicida, antibacteriana, antifúngica) do extrato etanólico de suas folhas (CUNHA, 2016). No entanto, ainda não há estudos na literatura que abranjam o isolamento dos metabólitos secundários desta espécie.

3 Óleo Essencial

Dentre o conjunto de compostos produzidos pela planta, o óleo essencial se destaca devido às suas reconhecidas atividades antibacteriana e antioxidante, somado a isso ele apresenta biodegradabilidade, baixa toxicidade em mamíferos, além de poderem apresentar funções biológicas superiores aos seus respectivos compostos sintéticos (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2014). Todos esses fatores contribuem para a crescente utilização dos óleos essenciais nas indústrias, sendo adicionados em alimentos, bebidas, cosméticos e produtos de higiene pessoal (MIRANDA et al., 2016).

Óleo essencial se caracteriza por ser uma mistura constituída pelas substâncias voláteis da planta, podendo conter mais de 300 compostos (WOLFFENBUTTEL, 2007). Em uma definição mais ampla óleo essencial é o produto obtido da planta quando partes dela são submetidas à destilação (hidrodestilação ou destilação com arrastamento por vapor de água), ou, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, no caso de citrinos (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2014). A variação da metodologia de extração do óleo essencial pode levar à obtenção de diferentes extratos, variando sua composição e consequentemente suas atividades biológicas e/ou toxicidade. (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2014)

4 Condições climáticas: a influência do clima na composição química das plantas

Os metabólitos secundários, como comentado em tópicos anteriores, são produzidos pela planta para favorecer sua adaptação ao meio (DELBONE; LANDO, 2010). Dessa maneira qualquer mudança nos fatores climáticos pode influenciar em sua composição química. Dentre esses fatores estão: a variação de temperatura e a disponibilidade hídrica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A variação de temperatura é um fator de difícil avaliação, uma vez que este sofre influência direta de outros aspectos climáticos. Entretanto, a influência que esta exerce sobre a concentração de metabólitos secundários em uma planta é aplicável. Há evidências de que a quantidade de óleo essencial de uma planta aumente com o aumento da temperatura, podendo apresentar exceções (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A disponibilidade hídrica afeta principalmente os aspectos fisiológicos críticos das plantas, tais como a fotossíntese, crescimento, etc. Como consequência o excesso ou a falta deste leva ao aumento ou a diminuição da produção de metabólitos secundários nas plantas. A exemplo tem-se a correlação positiva de alguns constituintes do óleo essencial da espécie *Santolina rosmarinifolia*, enquanto que há um resultado negativo para a produção de saponinas na espécie *Phytolacca dodecandra* (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Além desses, existem outros fatores que podem ser avaliados quanto à influência na composição química das plantas, são eles: sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

5 Objetivos

5.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o estudo de uma planta presente no cerrado brasileiro que não apresenta estudo de sua composição química.

5.2 Objetivos Específicos

O cumprimento do objetivo geral se deu a partir dos seguintes objetivos específicos:

- Obtenção do extrato etanólico do caule e do óleo essencial das folhas da espécie *Banisteriopsis oxyclada*;
- Fracionar e isolar moléculas do extrato etanólico do caule da *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates;
- Analisar a atividade antibacteriana do extrato, das frações e das moléculas isoladas;
- Analisar a atividade antioxidante do extrato, das frações e das moléculas isoladas;
- Identificar os constituintes voláteis do óleo por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Realizar atividade antiprotozoária e citotóxica para o óleo essencial;

6 Metodologia

O preparo e análise química das amostras foram realizados no laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química na Universidade Federal de Uberlândia(UFU). As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca.

6.1 Extrato Etanólico do Caule

6.1.1 Coleta do Material

Previamente o material vegetal contendo caule e folhas da planta foi coletado na Fazenda Passa Três, a qual se localiza no município de Monte Alegre de Minas, e depositado no Herbário Uberlandense com número de registro HUFU 67.077. Uma duplicata deste material foi encaminhada para a Dra. Maria Cândida Mamede do Herbário SP especialista da família das Malpighiaceae, a qual identificou a presente espécie como *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates.

Com a identificação concluída foi solicitado à autorização de acesso de amostra de componente do Patrimônio Genético, a qual foi liberada com número de registro 010276/2014-9. Com todos os parâmetros legais regularizados já foi coletado o material vegetal do caule da *B. oxyclada* (A. Juss.) B. Gates e preparado o extrato etanólico.

6.1.2 Preparo do Extrato Etanólico do Caule

Uma massa inicial de aproximadamente 500 g do material seco foi adicionada a frascos de 4L e acrescentado etanol PA (95%) até cobrir a amostra completamente. Posteriormente o extrato etanólico foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo (a temperatura máxima de 40°C) sendo o resíduo concentrado obtido congelado e liofilizado. Repetiu-se este procedimento seis vezes com intervalo de sete dias entre cada extração. Os produtos foram armazenados em um freezer a $-18,0 \pm 5^{\circ}\text{C}$ até o momento dos ensaios. O procedimento de extração foi realizado 3 vezes e foi calculado o rendimento dos extratos produzidos.

6.1.3 Partição Líquido-Líquido do Extrato Etanólico

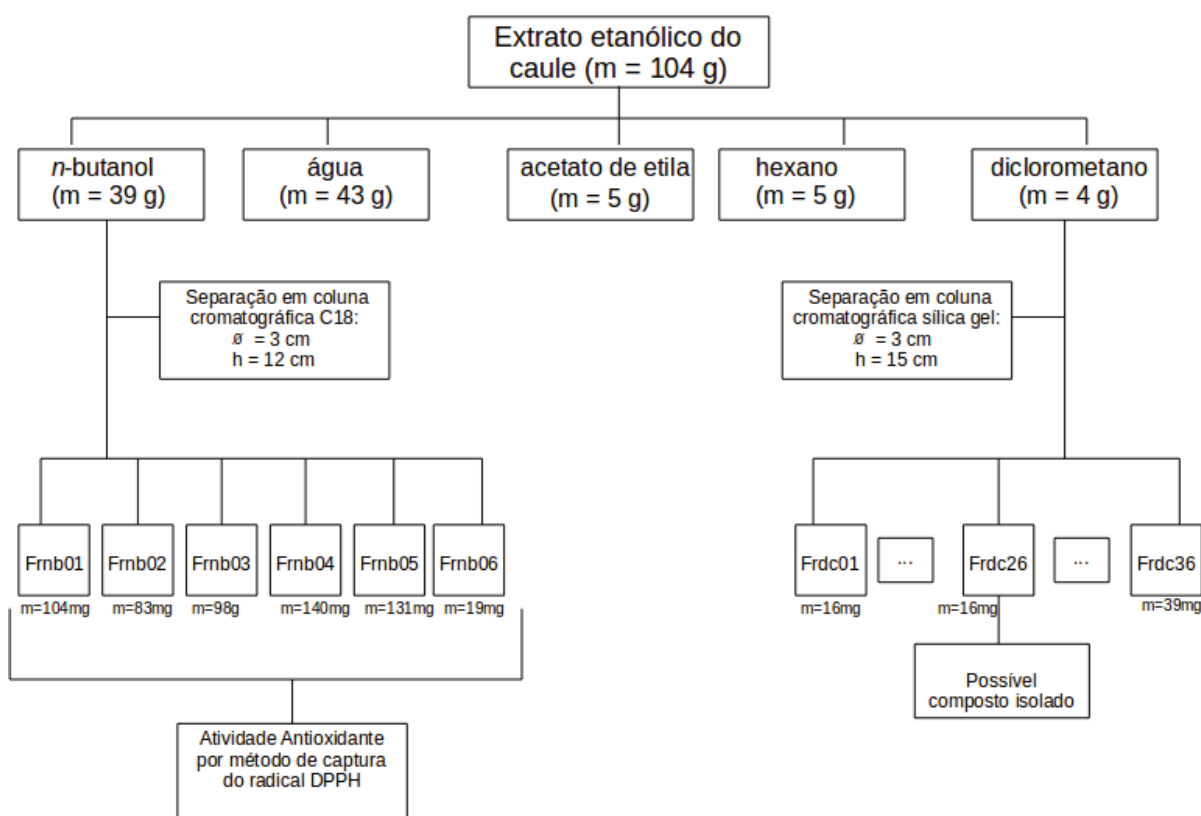
O extrato bruto do caule da *B. oxyclada* foi submetido a uma partição líquido- líquido, a partir de solventes orgânicos com polaridades crescentes. Assim inicialmente 25 g deste extrato foram ressuspensos em metanol-água na proporção 9:1, a mistura obtida foi filtrada. Em seguida o filtrado metanol-água resultante foi colocado em funil de separação, onde foi particionado com

hexano (PHC), diclorometano (PDC), Acetato de etila (PAC), n-Butanol (PNBC) e o residual foi denominado de partição hidroalcoólica (PAGC).

6.1.4 Fracionamento

O fracionamento e isolamento seguiu o fluxograma apresentado abaixo (Figura 3)

Figura 3 – Fluxograma de fracionamento do caule da *Banisteriopsis oxyclada*



Fonte: Própria Autora

A separação de compostos utilizando-se a técnica de cromatografia em coluna foi realizada para a partição de n-butanol (PNBC) resultando nas frações Frnb (Fração Obtida da Partição n-butanol do Caule) e para a partição do diclorometano (PDC) que resultou nas frações Frdc (Fração Obtida da Partição diclorometano do Caule) devido aos resultados biológicos relevantes obtidos para ambas.

Para a amostra de n-butanol (1,02g) a separação foi realizado em uma coluna cromatográfica com 12 cm de altura de fase estacionária de fase reversa (C18) e com diâmetro de 3 cm. Para eluição foi preparada uma mistura de metanol e água nas composições de 2% metanol:água até 100% metanol. A coluna foi eluída com a seguinte sequência: 100,0 mL (2% metanol:água), 80,0 mL (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%) e por fim 150,0 mL (100%). Ao final deste procedimento foi realizado o monitoramento por

cromatografia em camada delgada (CCD), para a junção de compostos semelhantes, utilizando-se reveladores adequados à caracterização de compostos obtendo o total de 6 frações (Frnb), as quais foram numeradas de 01 à 06.

Para a amostra de diclorometano (0,49g) a separação foi realizada em uma coluna com 15 cm de altura da fase estacionária sílica gel e com o diâmetro interno de 3 cm, tendo como fase móvel uma mistura de diclorometano e metanol. A eluição foi realizada com o aumento gradativo da polaridade da fase móvel, com a adição de metanol à mistura, conforme a seguinte sequência: 1.800,0 mL (100% diclorometano), 975,0 mL (99%), 300,0 mL (98%, 97%, 96%, 95,5%, 90%, 80%, 70%) e por fim 300,0 mL (100% metanol). Em seguida foi realizado o monitoramento por CCD utilizando-se quatro fases móveis com polaridades diferentes e o revelador Liberman para a caracterização dos compostos, obtendo o total de 36 frações (Frdc) numeradas de 01 a 36.

Na fração 26 (Frdc26) obteve-se um possível composto isolado o qual foi submetido a técnicas de Espectrometria de Massa (EM), Ressonância Nuclear Magnética (RMN), Ultravioleta (UV) e Infravermelho (IF) para a elucidação da estrutura do composto em questão, o que está em andamento.

6.1.5 Atividade Antioxidante

Preparou-se 50,0 mL de solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazila) na concentração de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foi realizado as diluições de 10,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir dos valores de absorbância registrados no comprimento de onda de 517 nm para estas diluições, contra um branco, uma curva analítica foi construída. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

A atividade antioxidante do extrato foi determinada usando-se o radical livre DPPH. Para a análise uma solução da amostra foi preparada na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Esta solução foi diluída e obteve-se amostras com as seguintes concentrações: 415, 330, 245, 160 e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada uma destas diluições, uma alíquota de 0,30 mL foi testada com 2,70 mL de solução de DPPH (de concentração 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol). Também, foi feito um branco nas mesmas condições, mas sem o DPPH. Após a adição do radical DPPH, as soluções foram deixadas em repouso e suas absorbâncias registradas no comprimento de onda de 517 nm após o período de uma hora. A porcentagem de sequestro do radical DPPH foi determinada pela Equação 1.

$$DDPH_{\text{sequestrado}}(\%) = \left[\frac{Abv_{C1} - (Abv_A - Abv_{C2})}{Abv_{C1}} \right] \times 100 \quad (6.1)$$

Onde: Abv_{C1} corresponde à absorbância do controle 1 (0,30 mL de metanol + 2,70 mL do radical do DPPH);

Abv_A corresponde a absorbância da amostra ao final de 60 minutos e

Abv_{C2} corresponde a absorbância do controle 2 (0,30 mL de amostra + 2,70 mL de metanol).

A concentração efetiva média (CE_{50}), que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, foi calculada plotando-se a porcentagem de DPPH sequestrado versus as concentrações dos extratos de cada amostra (ARGOLO et al., 2004)

6.1.6 Determinação da Atividade Antibacteriana

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

6.1.6.1 Microrganismo Utilizados

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

6.1.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de todas as amostras e antibióticos de referência (cloranfenicol, ampicilina e gentamicina) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo conforme Holetz et al. (2002). Cada amostra ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi assepticamente misturada ao inóculo, no mesmo meio, com uma densidade ajustada ao tubo 0,5 da escala de McFarland (10^8 células bacterianas) e diluído 1:10, pelo procedimento de microdiluição em caldo. As bandejas de microtitulação foram incubadas a 37°C e os CIMs foram registrados após 24 h de incubação.

6.1.7 Análise Estatística

Todos os resultados das análises de atividade antioxidante e antibacteriana foram obtidos a partir da média das três repetições ($n=3$) com o seu desvio padrão e submetidos ao tratamento estatístico ANOVA com o nível de significância de 5%, pelo método de Tukey no programa GraphPad Prism 5.

6.2 Óleo Essencial

6.2.1 Extração do Óleo Essencial

O material vegetal fresco (folhas) foi submetido à extração do óleo essencial por hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger (Figura 4). Para cada extração, utilizou-se cerca de 50,0 g de amostra com 500,0 mL de água destilada em um balão volumétrico adequado. O

material foi extraído por um período 4,0 horas e o óleo obtido foi recolhido em um funil de separação e lavado com 3 frações de 5,0 mL de diclorometano. Os produtos foram secos com sulfato de magnésio anidro e guardados em frascos lacrados de cor âmbar e armazenados em freezer a $-18,0 \pm 5^\circ$ até o momento de sua utilização.

Figura 4 – Hidrodestilação em aparelhagem do tipo Clevenger



Fonte: Própria Autora

6.2.2 Separação e Identificação de Compostos Voláteis

A separação e identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais foram obtidas por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O equipamento esteve com uma rampa de temperatura de 60-246 °C ($3^\circ\text{C}/\text{min.}$); injetor no modo split a 220 °C; hélio a fluxo de 1 mL min^{-1} . O detector de massas com energia de impacto de 70 eV e foram captados fragmentos de 40 a 650 u; interface a 240 °C; temperatura da fonte de íons de 240°C; volume injetado de 1,0 μL . Para a identificação dos constituintes foi realizado três extrações e suas respectivas injeções. No processo de identificação foram utilizadas as bibliotecas de espectro de massa Wiley (7, 139 e 229), Nist (8, 27 e 147), SHIM2205 e SHIMDEMO e por índice aritmético (IA) comparando com a literatura, adotando como requisito similaridade dos espectros de massa acima de 90% e diferença do IA de no máximo 10 unidades. Para o cálculo do IA utilizou-se a Equação abaixo,

$$IA = 100P_z + 100 \left(\frac{TR(x) - TR_{Pz}}{TR_{Pz+l} - TR_P} \right) \quad (6.2)$$

Onde:

P_z = número de carbonos do alcano de tempo de retenção anterior ao composto analisado;

$TR(x)$ = tempo de retenção do composto analisado;

TR_{Pz} = tempo de retenção do alcano de tempo de retenção anterior ao composto analisado;

$TR(P_z+l)$ = tempo de retenção do alcano de tempo de retenção posterior ao composto analisado.

7 Resultados e Discussão

7.1 Extrato Etanólico do Caule

7.1.1 Rendimento Extração Etanólico

O rendimento para o extrato etanólico obtido por maceração está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Massas obtidas do extrato seco do caule da *B. oxyclada*

1°	2°	3°	4°	5°	6°	Total (g)	RND (%)
40,3502	21,6397	15,7045	11,3872	8,154	7,0666	104,4636	6,34± 0,71

Os rendimentos diminuíram durante o período de extração, o que justifica a finalização do procedimento na sexta extração.

7.1.2 Rendimento das Partições Líquido-Líquido

O extrato bruto do caule da *B. oxyclada* foi submetido à partição líquido- líquido por meio de solventes orgânicos com polaridades crescentes, e o seus rendimentos foram calculados e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores das massas obtidas na partição líquido-líquido do extrato etanólico da *B. oxyclada*

Solvente	1°	2°	3°	4°	5°	Total (g)	RND (%)
Hexano	0,8582	0,2515	0,1223	0,0643	0,0435	1,3336	4,64
Diclorometano	0,6936	0,1559	0,0780	0,0623	0,0527	1,0425	3,63
Acetado de Etila	0,3207	0,5385	0,3157	0,3335	0,2148	1,3897	4,84
N-Butanol	3,5914	3,4610	2,0295	1,1181	0,8425	11,0425	38,44
Água	12,3724	-	-	-	-	12,372	43,07

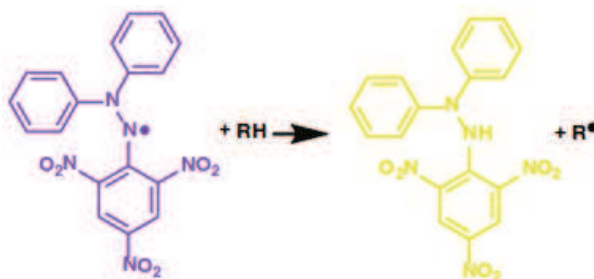
Analisando o rendimento das partições para o extrato etanólico do caule pode se averiguar que os maiores rendimentos foram obtidos para solventes de maior polaridade, sendo o maior da água, seguido pela partição n-butanol, pelo acetato e etila, hexano e o pior rendimento foi da partição com diclorometano.

7.1.3 Determinação da Atividade Antioxidante por DPPH

O teste de determinação da atividade antioxidante foi realizado pelo método do sequestro do radical livre DPPH, que se baseia na reação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (Figura 5), que absorve a luz em 517 nm e possui coloração violeta. Quando ocorre esta reação há uma

redução formando a substância 2,2-difenil-1-picridrazina cuja coloração é amarela. Esta mudança de coloração pode ser monitorada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Visível (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995)

Figura 5 – Reação do sequestro do radical livre DPPH



Fonte: Behrendorff, 2013

Foram construídas curvas analíticas do extrato e das partições com diferentes concentrações para a determinação do CE_{50} (concentração efetiva média) para as amostras (Tabela 2), os quais foram expressos em concentração ($\mu g\ mL^{-1}$) necessária para consumir 50% do radical DPPH (ARGOLO et al., 2004)

A partir da construção destas curvas foi possível calcular a atividade antioxidante dos extratos e das partições, que estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de CE_{50} ($\mu g\ mL^{-1}$) da capacidade antioxidante para o extrato bruto e as partições da *B. oxycyclada*

Amostra	CE_{50} ($\mu g\ mL^{-1}$)
Extrato Bruto	$6,38 \pm 1,5$
Hexano	$242,43 \pm 23,24$
Diclorometano	$81,75 \pm 4,55$
Acetato de Etila	$35 \pm 0,7$
N-Butanol	$1,28 \pm 0,17$
Água	$57,32 \pm 3,74$
BHT	7,3

Quanto menor o valor de CE_{50} maior é o potencial antioxidante da amostra, pois menor é a concentração de amostra para consumir 50% do radical DPPH (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005).

Observa-se então que o melhor resultado para a atividade antioxidante está atribuído à partição n-butanol (PNBC), com um valor bem abaixo do valor do BHT, aqui considerado como o padrão.

Comparando esse resultado com os obtidos para outra espécie pertencente à família Malpighiaceae, a *Byrsonima gardneriana*, que apresentou um valor de CE_{50} igual a $3,840 \pm 0,005$ do extrato n-butanol (ROLIM et al., 2013), obtido utilizando-se o mesmo método de captura

Tabela 6 – Atividade antimicrobiana com bactérias anaeróbias($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Microrganismo	EXTC	PHC	PDC	PAC	PBNC	PAGC	Controle
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	200	100	25	200	200	200	15
<i>F.nucleatum</i> ATCC 25586	>400	400	400	400	>400	400	16
<i>A.naeslundii</i> ATCC 19039	>400	>400	>400	>400	>400	>400	-
<i>B.fragilis</i> ATCC 25285	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,475

Analisando-se os resultados obtidos a partir do método de microdiluição com as bactérias aeróbias (Tabela 5) e anaeróbias (Tabela 6), pode-se observar que para todos os microrganismos aeróbicos testados, a concentração inibitória mínima (CIM) não foi favorável, uma vez que todos os extratos obtiveram valores maiores que $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Entretanto, os resultados obtidos para as bactérias anaeróbias foram melhores para apenas uma das espécies trabalhadas, a *Porphyromonas gingivalis*, sendo atribuído a partição de diclorometano do caule (PDC) o melhor resultado com um valor de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido da partição de hexano (PHC) com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Devido ao resultado positivo da PDC, esta foi submetida a uma separação dos seus constituintes por meio de uma coluna cromatográfica resultando em um total de 36 frações (Frdc), que tiveram suas massas registradas na Tabela 7.

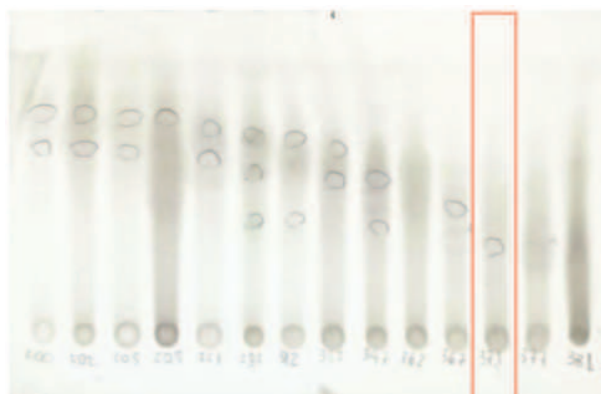
Tabela 7 – Valores da massa das frações obtidas da separação por cromatografia em coluna da PDC.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa(mg)	Fração	Massa (mg)
Frdc01	16,68	Frdc10	2,14	Frdc19	3,5	Frdc28	43,25
Frdc02	7,23	Frdc11	0,13	Frdc20	71,86	Frdc29	10,05
Frdc03	5,20	Frdc12	10,65	Frdc21	29,84	Frdc30	20,57
Frdc04	4,28	Frdc13	0,77	Frdc22	9,77	Frdc31	11,83
Frdc05	3,90	Frdc14	22,96	Frdc23	9,57	Frdc32	19,06
Frdc06	52,85	Frdc15	30,78	Frdc24	11,52	Frdc33	15,51
Frdc07	2,44	Frdc16	27,24	Frdc25	12,40	Frdc34	1,56
Frdc08	1,04	Frdc17	25,05	Frdc26	16,69	Frdc35	100,66
Frdc09	0,50	Frdc18	32,72	Frdc27	4,79	Frdc36	38,82

Dentre as frações que obtiveram maior massa temos a Frdc 35 (100,66 mg), seguido da Frdc20 (71,86 mg), depois a Frdc06 (52,85mg).

Por meio da técnica de separação cromatografia em camada delgada (CCD), realizada para todas as frações obtidas da PDC, observou-se a possível existência de um composto isolado na fração Frdc26 (16,69 mg), verificado pela presença de apenas uma mancha característica visível no UV 265 nm, como destacado na Figura 6 abaixo.

Figura 6 – CCD da fração Frdc26 da partição PDC indicando possível composto isolado.



Fonte: Própria Autora

7.2 Óleo Essencial

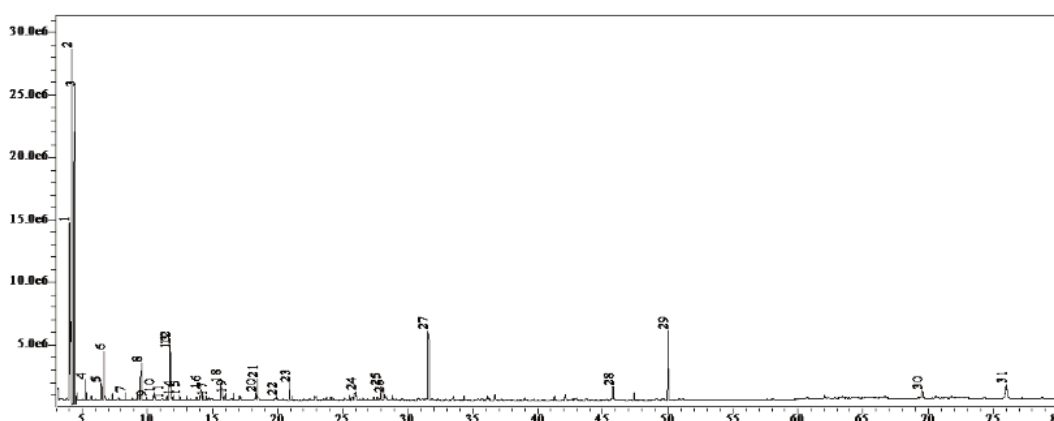
7.2.1 Extração do Óleo Essencial

O óleo essencial das folhas da *B. oxyclada* foi produzido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, sendo determinado o rendimento (%) de $0,016 \pm 0,002$. Na literatura foi encontrado apenas um trabalho de óleo essencial para espécies do gênero *Banisteriopsis*, para as folhas da *B. laevifolia* que apresentaram rendimento de 0,06 % (NUNES et al., 2016), valor superior ao encontrado para a espécie em estudo.

7.2.2 Separação e Identificação dos Compostos Voláteis

O cromatograma obtido do óleo essencial das folhas está apresentado na Figura 7, onde é possível identificar os compostos constituintes do óleo essencial obtido a partir das folhas da *B. oxyclada*.

Figura 7 – Cromatograma do óleo essencial das folhas da *B. oxyclada* obtido por meio CG-EM.



Fonte: Própria Autora

Com base nos dados obtidos no cromatograma acima (Figura 7), e utilizando-se as bibliotecas de espectro de massa Wiley (7, 139 e 229), Nist (8,27 e 147), SHIM2205 e SHIMDEMO e o índice aritmético (IA) e comparando com a literatura, adotando como requisito similaridade dos espectros de massa acima de 90% e diferença do IA de no máximo 10 unidades, foi possível obter a composição do óleo essencial das folhas da *B. oxyclada*, apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição do óleo essencial das folhas da *B. oxyclada*.

N°	TR	NOME	AI _{calculado}	AI _{terico}	TIC(%)
1	4,001	(2E)-hex-2-en-1-al	836	846*	9,73
2	4,147	(3Z)-hex-3-en-1-ol	844	850*	15,26
3	4,379	(2Z)-hex-2-en-1-ol	857	859*	13,00
4	5,261	(2E,4E)-hex-2,4-dien-1-al	904	907*	1,78
5	6,460	(2E)-hept-2-en-1-al	947	947*	1,58
6	6,703	Benzaldeído	955	952*	3,24
7	8,248	(2E,4E)-hept-2,4-dien-1-al	1.008	1005*	1,13
8	9,501	Benzeno-acetaldeído	1.041	1036*	3,26
9	9,913	(2E)-oct-1-en-1-al	1.052	1049*	1,15
10	10,558	Octan-1-ol	1.070	1063*	1,43
11	11,140	(E)-Linalol oxido (furanoide)	1.085	1084*	1,24
12	11,724	Nonan-1-al	1.101	1.100*	3,89
13	11,759	Linalol	1.102	1.095*	2,80
14	11,966	Hotrienol	1.107	1,108**	1,20
15	12,474	2-fenil-etan-1-ol	1.119	1.116**	1,07
16	14,136	(2E,6Z)-nona-2,6-dien-1-ol	1.158	1.159*	1,25
17	14,513	Isômero do (2E,6Z)-nona-2,6-dien-1-ol)	1.167	-	1,11
18	15,680	Metilsalicilato	1.194	1.190**	2,03
19	15,991	Decan-1-al	1.202	1.201*	1,08
20	18,304	Geraniol	1.254	1.249*	1,45
21	18,480	(2E)-dec-2-en-1-al	1.258	1.260*	2,5
22	19,923	(2E,4Z)-dec-2,4dien-1-al	1.291	1.292*	1,16
23	20,933	(2E,4E)-dec-2,4dien-1-al	1.314	1.315*	1,81
24	25,963	NI	-	-	2,04
25	27,907	4-(2,6,6-trimetil-cyclohex-1-en-1-il)-but-3-en-2-ona	1.478	1.487*	1,77
26	28,197	NI	-	-	1,19
27	31,585	NI	-	-	5,12
28	45,757	Ácido palmítico	1.960	1.962**	1,63
29	50,013	Fitol	2.093	2.096**	10,06
30	69,564	NI	-	-	1,59
31	76,022	NI	-	-	2,44

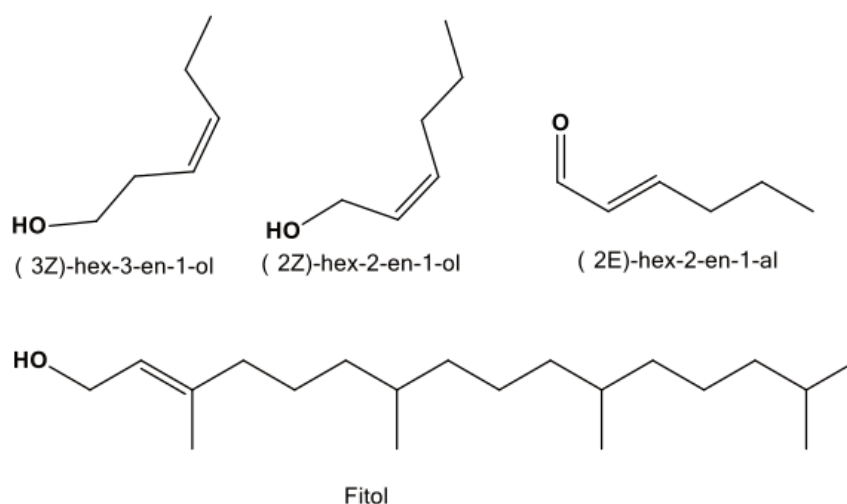
* ADAMS, 2007; **NIST.

A maioria dos constituintes encontrados na composição do óleo pertence à classe dos álcoois e aldeídos, como mostrado na Tabela 9. Os quatro compostos majoritários (Figura 8) do óleo representam 48,05% do óleo essencial, destes três são álcoois (38,32%) e um aldeído (9,73%).

Tabela 9 – Relação percentual das classes de compostos presentes no óleo essencial das folhas da *B.oxyclada*

Classe	Porcentagem (%)
Álcool	49,87
Aldeido	29,05
Cetona	1,77
Aromático	3,26
Éster	2,03
Ácido Carboxílico	1,63

Figura 8 – Estrutura dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas da *B.oxyclada*.



Fonte: Própria Autora

7.2.3 Atividade leishmanicida e citotóxica do óleo essencial das folhas

O óleo essencial foi submetido à atividade leishmanicida e a citotoxicidade, estes resultados estão apresentados na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10 – Atividade leishmanicida e citotoxicidade do óleo essencial da *B.oxyclada*

Amostra	CI ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) <i>Leishmania amazonensis</i>	CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Célula Vero	IS
Óleo Essencial	32 ± 1	36 ± 3	0.05
Anfotericina B	0,2 ± 0,01	-	-

Os resultados apresentados na Tabela 9 demonstram que o óleo essencial da *B. oxyclada* apresenta atividade leishmanicida, e por meio da avaliação o índice de seletividade (IS) observa-se que a amostra é 0,05 vezes menos tóxica para a célula do que para o protozoário em questão. Abrindo, dessa forma, um leque de possibilidades de princípios ativos para o tratamento desta doença.

Relacionando-se a composição do óleo essencial com a atividade contra protozoário do gênero *Leishmania*, pode-se averiguar que o fitol, representando 10,06% de sua composição, pode ser o possível responsável pela atividade leishmanicida do óleo essencial. Tal fato é comprovado por meio do trabalho de SILVA et al. (2015), onde uma fração rica em fitol apresentou uma atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* no estágio promastigotas de ($CI_{50} = 44,0 \pm 0,7 \mu g mL^{-1}$) e o óleo essencial da *B. oxyclada* com o fitol (10,06%) na composição apresentou melhor valor CI_{50} de $32 \pm 1 \mu g mL^{-1}$ do que para a forma promastigotas de *L. amazonensis*.

Além disso, o fitol apresenta atividade anti-inflamatória comprovada em um estudo realizado por Leite (2010) devido à sua alta eficiência contra artrite, agindo como protetor da cartilagem articular, mostrando ser promissor para o tratamento de artrite reumática e possivelmente para outros tipos de inflamações crônicas.

Quanto aos demais constituintes majoritários do óleo essencial existe um estudo que comprova a eficiência da mistura de (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-eno-1-ol + (Z)-hex-2-eno-1-ol + (E)-hex-2-enal na mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua*, espécie de praga comum em cafezais, (SILVA, 2011) abrindo possibilidades do uso de substâncias orgânicas no controle de *Meloidogyne spp.* em raízes de plantas.

8 Considerações Finais

A espécie estudada apresentou resultado positivo para a atividade antimicrobiana para um único tipo de bactéria anaeróbia, *Porphyromonas gingivalis*. E as frações obtidas a partir da partição n-butanol apresentaram resultados de atividade antioxidante eficientes e abaixo do padrão BHT, o que as torna promissoras.

O possível composto responsável pela atividade antioxidante na fração n-butanol do caule encontra-se em processo de confirmação da elucidação estrutural e faz parte da tese de doutorado do aluno Mário Machado Martins.

A obtenção e estudo do óleo essencial das folhas e do extrato etanólico do caule da espécie *Banisteriopsis oxyclada*, são inéditos, uma vez que ainda não há estudos do tipo na literatura.

Após separação e identificação dos compostos do óleo essencial foi possível obter uma composição rica em substâncias do tipo álcoois e aldeídos. Dentre eles, o fitol destacou-se devido à suas atividades anti-inflamatórias e antinociceptivos estudadas, além de ser um possível responsável pela atividade leishmanicida apresentada pela espécie estudada.

Referências

- ALEXANDRINO, V. H. D.; SOUSA, J. S.; BASTOS, M. N. C. Estudo taxonômico da família Malpighiaceae Juss. das restingas de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 6, n. 3, p. 335–347, Dez. 2011.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**: Abordagem histórica contemporânea. Salvador: Editora da UFBA, 2011.
- ANDERSON, W. R. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. **Biotropica**, v. 11, n. 3, p. 219–223, Set. 1979.
- ANESE, S. et al. Fitotoxicidade de extratos etanólicos de frutos e folhas de *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates sobre o crescimento de plantas daninhas. **Biotemas**, v. 29, n. 1, p. 1–10, Mar. 2016.
- ARGOLO, A. et al. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource technology**, v. 95, n. 2, p. 229–233, Nov. 2004.
- BEHRENDORFF, J. B. et al. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 76–87, Ago. 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, Jun. 1995.
- BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408–420, Jul./Set. 2006.
- CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, A. C.; RODRIGUES, M. S. Malpighiaceae do cerrado do Parque Estadual do Mirador, Maranhão, Brasil. **Scientia Plena**, v. 7, n. 2, p. 1–6, Fev. 2011.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Biochemistry and molecular biology of plants**: Natural Products: Secondary Metabolites. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1250–1319 p.
- CUNHA, L. **Plantas do cerrado brasileiro: triagem fitoquímica e de atividades biológicas de espécies nativas do município de Diamantina, região do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais**. 2016. 317 f. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, 2016.
- DELBONE, C.; LANDO, R. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. In: . Congresso de Educação do Norte Pioneiro, 5., 2010, Jacarezinho. **Anais...Jacarezinho**: UNEP, 2010.
- DEVIIENNE, K.; RADDI, G.; POZETTI, G. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 3, p. 11–14, Jun. 2004.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 175–204, 2000. (Edição Especial).

- FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais: óleos essenciais e voláteis. **Revista da Associação Portuguesa de Horticultura**, v. 114, n. 3, p. 29–33, 2014.
- FRANÇA, I. S. X. d. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201–208, Mar./Abr. 2008.
- FREITAS, L. B. et al. Allelopathic, cytotoxic and antifungic activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 9–16, Jun. 2015.
- FRIAS, U. et al. *Banisteriopsis* species: a source of bioactive of potential medical applications. **International journal of biotechnology for wellness industries**, v. 1, n. 3, p. 163–171, Set. 2012.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, Mar. 2007.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, Oct. 2002.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, Jul. 2005.
- LEITE, A. C. R. d. M. **Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais**. 2010. 119 f. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2010.
- MEDEIROS, J. d. D. et al. Guia de campo. vegetação do cerrado: 500 espécies. Brasília (Brazil) Ministerio do Meio Ambiente, 2011.
- MIRANDA, A. S. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213–220, Jan. 2016.
- NUNES, B. C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 277–289, Dez. 2016.
- PÁDUA, M. et al. Assessment of antimicrobial activity in vitro of ethanolic extracts of *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 3, p. 431–437, Jan. 2013.
- POVH, J. A.; ALVES, G. S. P. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba–MG. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231–242, Set. 2013.
- QUEIROZ, G. S. et al. Antibacterial and anti-inflammatory activities of *Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC.(Malpighiaceae). **Records of Natural Products**, v. 9, n. 3, p. 419–441, Ago. 2015.
- RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the brazilian cerrado vegetation iii: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh journal of botany**, v. 60, n. 1, p. 57–109, Mar. 2003.

- REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven *Myrtaceous fruits*. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 3, p. 25–36, Mar. 2005.
- ROLIM, T. L. et al. Chemical constituents and antioxidant activity of *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 524–527, Out. 2013.
- SALLES, A. (Ed.). **Jardim botânico de Brasília: diversidade e conservação**. Brasília: SAJBB, 2007. 355 p.
- SCHWARZ, M. et al. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 627–633, Jun. 2003.
- SILVA, J. M. da et al. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. **Experimental parasitology**, v. 159, n. 3, p. 143–150, Dez. 2015.
- SILVA, W. J. R. **Substâncias orgânicas no controle de *Meloidogyne spp.* em raízes de plantas**. 113 f. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011.
- SOARES, E. L. C. **Malpighiaceae na região sul do Brasil**. 25 f. Tese (Projeto de Tese Doutorado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Biociência, Porto Alegre, 2012.
- SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Pericarp structure in *Banisteriopsis* CB Rob. and *Diplopterys* A. juss. (Malpighiaceae): new data supporting generic segregation. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 527–536, Jul./Set. 2012.
- SOUZA, M.; GRAEL, C. Estudo fitoquímico de plantas do cerrado: ensaios com extratos etanólicos de *Peixotoa tomentosa* e *Banisteriopsis oxyclada*. In: . Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 8., 2014, Poços de Caldas. **Anais...Poços de Caldas: UNIFAL**, 2014.
- TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. d. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 116–121, Fev. 2006.
- VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.; WEBER, G. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documento 316, 2010.
- WOLFFENBUTTEL, A. N. Óleos essenciais. **Informativo CRQ-V**, v. 6, n. 105, p. 6–7, Nov./Dez. 2007.