



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

DAIANE MARIA OLIVEIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Banisteriopsis*
argyrophylla (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae)

UBERLÂNDIA

2016

DAIANE MARIA OLIVEIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Banisteriopsis*
argyrophylla (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Mestrado, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

UBERLÂNDIA

2016

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

O48e Oliveira, Daiane Maria, 1990-
2016 Estudo fitoquímico e biológico das folhas de *Banisteriopsis argyrophylla* (A. Juss.) B. Gates
(Malpighiaceae) / Daiane Maria Oliveira. - 2016.

20 f. : il.

Orientador: Alberto de Oliveira.

Coorientador: Marcos Pivatto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Banisteriopsis - Teses. 3. Extração por solventes - Teses. 4. Antioxidantes - Teses. I. Oliveira, Alberto de. II. Pivatto, Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.



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 244/PPQUI.

DATA: 26/07/2016

DISCENTE: Daiane Maria Oliveira

MATRÍCULA: 11422QMI003

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo fitoquímico e biológico das folhas de *Banisteriopsis argyrophylla* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae).

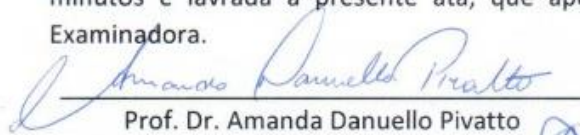
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

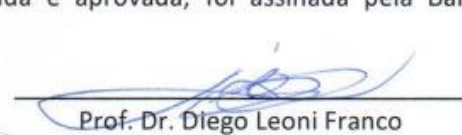
LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

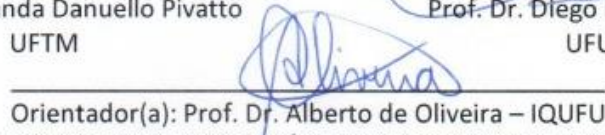
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo da espécie *Eugenia calycina* Cambes. (pitanga do cerrado): análise da composição do óleo essencial; avaliação das atividades antioxidante, inibitória da enzima α -amilase e antimicrobiana; isolamento de compostos bioativos.

Às quatorze horas do dia vinte e seis de julho do ano dois mil e dezesseis, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Amanda Danuello Pivatto, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Diego Leoni Franco e Alberto de Oliveira, 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(a) 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 mantido.

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 17 horas e 17 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Amanda Danuello Pivatto
UFTM


Prof. Dr. Diego Leoni Franco
UFU


Orientador(a): Prof. Dr. Alberto de Oliveira – IQUFU

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela proteção.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-01392-14) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Alberto de Oliveira pela orientação, confiança, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Pivatto pela coorientação e contribuições.

Aos Prof. Dr. Francisco J. T. de Aquino pelos ensinamentos, em especial os de química orgânica, que são à base deste trabalho.

Aos professores Dr. Roberto Chang, Sérgio A. L. Morais e Evandro A. do Nascimento pelos ensinamentos, atenção e auxílio no laboratório.

Ao prof. Dr. Maria Mamede pela identificação e classificação botânica.

As prof^{as} Dra. Raquel M. F. de Sousa e Dra. Sheila Cristina Canobre pelas sugestões e auxílio com a técnica de voltametria de pulso diferencial.

A empresa Waters em nome do PhD Michael Murgu pelos dados de CLUE-EM.

Aos prof. (s) Dr. Carlos H. G. Martins e Dr. Luís C. S. Cunha pela realização do ensaio antifúngico.

Ao prof. Dr. Cláudio V. da Silva e ao doutorando Mário M. Martins pela análise de citotoxicidade.

Ao prof. Dr. Foued S. Espindola e ao mestrando Allisson B. Justino pelos ensaios de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase.

Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pelas análises de espectrometria de massas.

A prof^a Dra. Vanderlan da Silva Bolzani pelas análises de ressonância magnética nuclear de de hidrogênio.

Ao aluno de iniciação científica Tomás Roquete pela paciência e ajuda neste trabalho.

A prof^a doutoranda Carla de M. Martins pela companhia durante a 15^a Conferência Brasileira de Produtos Naturais (BCNP) e pelas suas sugestões, auxílio e amizade.

Aos colegas e amigos: Luís C. S. Cunha, Mário M. Martins, Edmilson Rocha, Vinícius Alexandre, Michele N. G. do Nascimento, Rosimeire Borges, Bruno Nunes, Oswaldo

G. Junior, Eder Santana, Tiara Costa, Érica Machado, Thamires Rodrigues, Lays Rodrigues, Belisa Belut, Marcus V. de S. da Silva, Fabiana Barcelos, Kelly Lamounier e Camila Faria pela atenção, auxílios, ensinamentos e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Marcus de Aguiar pelo incentivo.

As minhas amigas Fernanda Romeiro e Juliana dos Reis pelo incentivo e carinho.

A minha irmã Letícia A. Oliveira pela imensa paciência e afeto.

Ao meu irmão Daniel P. de Oliveira pelo incentivo e carinho.

Aos meus pais Donisete dos R. Oliveira e Lucimar de F. Oliveira pelo amor e força.

Ao meu vovô Honorico M. Peres e familiares que se interessaram muito pela pesquisa.

Resumo

O aumento da resistência dos fungos em relação aos medicamentos existentes no mercado e os efeitos colaterais apresentados por alguns compostos com propriedades antioxidantes e inibidores enzimáticos, em especial contra a α -amilase e α -glicosidase, torna-se necessária à descoberta de novos compostos com potencial biológico. Neste contexto os produtos naturais podem ser uma fonte importante para a descoberta de novas arquiteturas moleculares ativas. Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar as atividades antioxidante, inibitória sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase, antifúngica e citotóxica do extrato etanólico (EE) das folhas da *Banisteriopsis argyrophylla* (Malpighiaceae) e suas frações, obtidas por extração líquido-líquido utilizando solventes de polaridades crescentes. O potencial antioxidante foi avaliado pelo método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), sendo as frações acetato de etila (FAE) e a *n*-butanol (FB) as mais potentes, este confirmando através da medida da corrente de pico e do potencial de oxidação, obtidos por voltametria por pulso diferencial (VPD). As atividades inibitórias sobre a α -amilase e α -glicosidase foram analisadas considerando as reações entre os substratos α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- α -CNP) e 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG), respectivamente. Inicialmente foi verificado que o EE apresentou considerável atividade contra a α -amilase ($CE_{50} = 2,89 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em relação ao controle positivo acarbose ($CE_{50} = 0,08 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e que não apresentou atividade promissora frente à α -glicosidase. Após essa observação, foi avaliada a atividade inibidora da α -amilase das frações, sendo que a FAE ($CE_{50} = 2,33 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a FB ($CE_{50} = 2,57 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) as que apresentaram as melhores inibições. A atividade antifúngica foi avaliada frente a espécies do gênero *Candida*, sendo que a FAE apresentou melhor potencial antifúngico (CIM's entre 93,75 e 11,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$) quando comparada com o padrão positivo anfotericina (CIM = 1,00 e 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os controles *C. parapsilosis* e *C. krusei*, respectivamente). O EE ($CC_{50} = 360,00 \pm 12 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as frações com CC_{50} 's maiores que 270,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram consideravelmente menos tóxicas para células Vero que o controle positivo cisplatina ($CC_{50} = 7,01 \pm 0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Como a FAE apresentou os melhores resultados para as atividades estudadas, esta foi submetida à cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM), sendo identificados os seguintes

flavonoides: (\pm)-catequina, quercetina-3-*O*- β -D-Glc/ quercetina-3-*O*- β -D-Gal, quercetina-3-*O*- β -L-Ara, quercetina-3-*O*- β -D-Xil, quercetina-3-*O*- α -L-Rha, kaempferol-3-*O*- α -L-Rha, quercetina-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha, quercetina-3-*O*-(3"-galoil)- α -L-Rha e kaempferol-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha. Em seguida, a FAE foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando fase estacionária C₁₈, sendo isolada a (\pm)-catequina (FAE-A1, 73,00 mg) e obtidas três frações (FAE-A2, FAE-A3 e FAE-A4) constituídas por uma mistura de flavonoides, identificados por cromatografia em camada delgada (CCD) e (-)-EM-IES. A (\pm)-catequina (FAE-A1) apresentou CIM de 2,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio utilizando *C. glabrata*, em relação ao padrão positivo anfotericina. Já as frações FAE-A2, FAE-A3, FAE-A4, apresentaram menor potencial antifúngico nas concentrações avaliadas (CIM's entre 5,86 e 187,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As frações FAE-A1–FAE-A4 apresentaram menor toxicidade que FAE principalmente A1, A3 e A4, que exibiram CC₅₀ maiores que 512,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os flavonoides identificados são descritos na literatura em relação ao potencial antioxidante e a (\pm)-catequina, quercetina-3-*O*-Rha e kaempferol-3-*O*-Rha são descritos como inibidores da α -amilase. Assim, a *B. argyrophylla* é uma espécie importante que contém compostos com potencial antioxidante que podem estar relacionados aos usos tradicionais como anti-inflamatório e também apresenta agentes antifúngicos e inibidores contra α -amilase. Portanto, estas folhas são recursos promissores para a produção de novos medicamentos.

Palavras-chave: *Banisteriopsis argyrophylla*. Folhas. Antioxidante. α -Amilase. α -Glicosidase. Antifúngico. Citotoxicidade. Flavonoides.

Abstract

With the increasing fungi resistance compared with existing drugs on the market and the side effects reported by some compounds with antioxidant properties and enzymatic inhibitors, in particular against α -amylase and α -glucosidase, the discovery of new compounds with biological potential, becomes a need. In this context, natural products can be an important source for the discovery of new active molecular architectures. Then, this study aimed to evaluate the antioxidant activity, the enzymatic inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase, the antifungal and cytotoxic activities of ethanolic extract (EE) the leaves of *Banisteriopsis argyrophylla* (Malpighiaceae) and their fractions, obtained by liquid-liquid extraction using solvents of increasing polarity. The antioxidant activity was evaluated by the free radical DPPH scavenging method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and the ethyl acetate fractions (FAE) and *n*-butanol (FB) were the most active, confirmed by the peak current and the oxidation potential obtained by differential pulse voltammetry (DPV). The inhibitory activity of the α -amylase and α -glucosidase was analyzed considering the reactions between substrates α -(2-chloro-4-nitrophenyl)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal- α -G2-CNP) and 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG), respectively. Initially, it was found that the EE showed considerable activity against α -amylase ($EC_{50} = 2.89 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) compared to the acarbose used as positive control ($EC_{50} = 0.08 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) and that did not showed promising activity against the α -glucosidase. After this observation we evaluated the inhibitory activity of α -amylase fractions, with FAE ($EC_{50} = 2.33 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) and FB ($EC_{50} = 2.57 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) showing the best inhibitions. The antifungal activity was evaluated against *Candida* species, and the FAE had better antifungal potential (MIC's between 93.75 and 11.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$) compared with amphotericin as positive standard (MIC = 1.00 and 2.00 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *C. parapsilosis* and *C. krusei* used as controls, respectively). The EE ($CC_{50} = 360.00 \pm 12 \mu\text{g mL}^{-1}$) and fractions (CC_{50} 's > 270.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were considerably less toxic to Vero cells than the cisplatin used as positive control ($CC_{50} = 7.01 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$). The FAE showed the best results for the activities studied, this fraction was submitted to ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS), and the following flavonoids have been identified: (\pm)-catechin, quercetin-3-*O*- β -D-Glc/ quercetin-3-*O*- β -D-Gal, quercetin-3-*O*- β -L-Ara, quercetin-3-*O*- β -D-Xyl, quercetin-3-*O*- α -L-Rha,

kaempferol-3-*O*- α -L-Rha, quercetin-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha, quercetin-3-*O*-(3"-galoil)- α -L-Rha and kaempferol-3-*O*-(3"-galoil)- α -L-Rha,. FAE was submitted to column chromatography using C₁₈ phase, and (\pm)-catechin was isolated (FAE-A1, 73 mg) and three fractions consisting of a mixture of flavonoids were obtained (FAE-A2, FAE-A3 and FAE-A4). These compounds were identified by thin layer chromatography (TLC) and (-)-ESI-MS. The (\pm)-catechin fraction showed an MIC = 2.83 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in assay using *C. glabrata*, with amphotericin as positive control. The fractions FAE-A2, FAE-A3, FAE-A4, showed less antifungal potential in tested concentrations. The identified flavonoids are described in the literature, regarding their antioxidant capacity and (\pm)-catechin, quercetin-3-*O*-Rha and kaempferol-3-*O*-Rha are described as α -amylase inhibitors. Thus, *B. argyrophylla* is an important species that produces compounds with antioxidant potential that can be related to the traditional use as anti-inflammatory and also has antifungal compounds and inhibitors of α -amylase. Therefore, these leaves are promising resources for the production of new drugs.

Keywords: *Banisteriopsis argyrophylla*. Leaves. Antioxidant. α -amylase. α -glucosidase. Antifungal. Cytotoxicity. Flavonoids.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de fármacos de origem natural lançados entre 1981 – 2014	18
Tabela 2 - Espécies do gênero <i>Banisteriopsis</i> utilizadas na medicina popular	38
Tabela 3 - Atividades biológicas e química de plantas do gênero <i>Banisteriopsis</i>	39
Tabela 4 - Metabólitos secundários bioativos isolados de algumas espécies de <i>Banisteriopsis</i>	39
Tabela 5 - Reagentes utilizadas no desenvolvimento da pesquisa	47
Tabela 6 - Rendimento das extrações em etanol 95% com folhas de <i>B. argyrophylla</i> ..	48
Tabela 7 - Faixa de concentração de extrato etanólico e frações na análise no ensaio do DPPH.....	49
Tabela 8 - Rendimentos obtidos na extração líquido/líquido do extrato etanólico de folhas de.....	56
Tabela 9 - Concentrações de extrato e frações utilizados na determinação do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides.....	59
Tabela 10 - Sistema de gradiente utilizando na análise por CLUE.....	61
Tabela 11 - Relação entre as intensidades de CE ₅₀ com a atividade antioxidante.....	68
Tabela 12 - Valores da concentração eficiente (CE ₅₀) da análise da atividade inibitória da α -amilase e da α -glicosidase do extrato etanólico (EE) das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	72
Tabela 13 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antifúngica do extrato etanólico (EE) das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	74
Tabela 14 - Valores de concentração eficiente (CE ₅₀) da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do DPPH do extrato etanólico (EE) e frações das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	75
Tabela 15 - Corrente de picos de oxidação (Ip) e potenciais de oxidação (Ep), observados pela DPV do extrato etanólico (EE) e frações obtidas utilizando tampão em acetato de sódio	76
Tabela 16 - Corrente de picos de oxidação (Ip) e potenciais de oxidação (Ep), observados pela DPV do extrato etanólico (EE) e frações obtidas utilizando tampão em fosfato de sódio.....	77
Tabela 17- Avaliação qualitativa do grau de correlação entre duas variáveis.....	78

Tabela 18 - Coeficiente de correlação entre os métodos DPPH e VPD para o EE e frações.....	79
Tabela 19 - Valores de CE ₅₀ da análise da atividade inibitória da α -amilase α -glicosidase do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	79
Tabela 20 -Valores da concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antifúngica do extrato etanólico (EE) e frações das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	80
Tabela 21 - Atividade citotóxica e índice de seletividade para o extrato etanólico (EE) e frações.....	81
Tabela 22 - Prospecção fitoquímica do extrato etanólico (EE) as frações das folhas de	85
Tabela 23 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas do EE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	92
Tabela 24 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas das frações das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	93
Tabela 25 - Correlações (r) entre a capacidade antioxidante analisada pelos métodos do DPPH (1/CE ₅₀), correntes (Ip ₁ e Ip ₂) com o teor de fenóis totais, flavonoides, proantocianidinas do extrato etanólico e frações.....	94
Tabela 26 - Compostos identificados na FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i> por CLUE/EM.....	96
Tabela 27 - Dados de RMN ¹ H para a (±)-catequina e para (±)-epicatequina (δ em ppm)	110
Tabela 28 - Dados de RMN ¹³ C para a (±)-catequina e para (±)-epicatequina (δ em ppm).....	111
Tabela 29 - Atividade antifúngica das frações FAE-A1–FAE-A4.....	117
Tabela 30 - Atividade citotóxica e índice de seletividade para frações FAEA1–FAEA4	119
Tabela 31 - Referências consultadas que relacionam propriedades biológicas e química com os compostos: catequina, quercetina-3- <i>O</i> -Rha e kaempferol-3- <i>O</i> -Rha.....	120

Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas do SCY-078 e da enfumafungina	16
Figura 2 - Análise das tendências de descoberta de novos fármacos do período 1981–2014	17
Figura 3 - Origem dos fármacos aprovadas de 1981-2014.....	17
Figura 4 - Distribuição do bioma Cerrado no Brasil	20
Figura 5 - Área total de área desmatada e remanescente em 2010 no Cerrado.....	21
Figura 6 - Ocorrência de desmatamento em Minas Gerais	21
Figura 7 - Estruturas do BHT e do <i>t</i> -BHT	24
Figura 8 - Exemplos de substâncias utilizadas para o controle glicêmico	25
Figura 9 - Exemplos de substâncias antifúngicas	27
Figura 10 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de MS em planta.....	28
Figura 11 - Relações biossintéticas entre produtos naturais de plantas.....	30
Figura 12 - Morfina, isolada do látex da papoula (<i>Papaver somniferum</i>).....	31
Figura 13 - Classes de flavonoides: estruturas e exemplos	32
Figura 14 - Estruturas de ressonância do anel aromático que estabilizam o radical formado.....	33
Figura 15 - Características estruturais dos flavonoides (quercetina) para apresentarem atividade antioxidante.....	34
Figura 16 - Exemplos de taninos hidrolisáveis e condensados	35
Figura 17 - Fórmula estrutural do isopreno	35
Figura 18 - Classificação dos terpenos e exemplos	36
Figura 19 - Flavonoides isolados de <i>Malpighia glabra</i>	37
Figura 20 - Flavonoides isolados das folhas da <i>Byrsonima crassa</i>	37
Figura 21 - Fotografias de flores e folhas de <i>Banisteriopsis argyrophylla</i>	43
Figura 22 - Rótulo de produto comercializado na cidade de São Paulo, com identificação do material referida como “ <i>B. argyrophylla</i> ”	44
Figura 23 - Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético	47
Figura 24 - Esquema do preparo do extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	48
Figura 25 - Montagem experimental da técnica de VPD	50

Figura 26 - Esquema da extração líquido/líquido do extrato etanólico de folhas de <i>B. argyrophylla</i>	55
Figura 27 - Extração ácido-base	58
Figura 28 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (FAE) das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	62
Figura 29 - Redução do DPPH pelo flavonoide antioxidante (+)-catequina.....	66
Figura 30 - Consumo do DPPH pelo extrato etanólico após por 1 hora em diferentes concentrações.....	66
Figura 31 - Espectro de soluções em CH ₃ OH de UV-vis do radical DPPH [•] , hidrazina (DPPH-H) e do ânion DPPH ⁻ à temperatura ambiente	67
Figura 32 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e os compostos fenólicos, considerando a influência dos solventes polares (PS).....	68
Figura 33 - Sinais de excitação para VPD: a) perfil da aplicação de potenciais em pulso e b) voltamograma	69
Figura 34 – Dados obtidos utilizando o tampão acetato de sódio para o extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i> : a) voltamograma de VPD e b) resultados médios de corrente de picos (Ip, µA) e potenciais de oxidação (Ep, V)	70
Figura 35 – Dados obtidos utilizando o tampão fosfato de sódio para o extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i> : c) voltamograma de VPD e d) resultados médios de corrente de picos (Ip, µA) e potenciais de oxidação (Ep, V)	70
Figura 36 - Reação química entre o substrato GalG2-CNP com a α-amilase	71
Figura 37- Reação química entre o substrato pNPG com a α-glicosidase	72
Figura 38 - Reação química de redução da resazurina para resorufina, com mudança de cor	73
Figura 39 - Voltamograma de VPD obtido com solução tampão acetato de sódio para o extrato etanólico (EE) e frações das folhas da <i>B. argyrophylla</i>	76
Figura 40 - Voltamograma de VPD obtido com solução tampão fosfato de sódio para o extrato etanólico (EE) e frações das folhas da <i>B. argyrophylla</i>	77
Figura 41 – CCDs do extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	83
Figura 42 - CCDs do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	84
Figura 43 – CCDs da extração ácido/base do extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	86
Figura 44 - Espectro de UV-VIS do extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i> ...	87

Figura 45 - Estrutura química geral dos flavonoides (A e B anéis aromáticos e C anel benzopirano).....	87
Figura 46 - Espectros de UV-VIS das frações obtidas na extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	88
Figura 47 - Reação do ácido gálico com molibdênio	89
Figura 48 - Reação de complexação do cloreto de alumínio com os flavonoides.....	90
Figura 49 - Reação entre a vanilina sulfúrica e um tanino catéuico.....	90
Figura 50 - Mecanismo da reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéuico	91
Figura 51 - Mecanismo da reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéuico	92
Figura 52- Cromatograma de CLUE-EM-IES no modo negativo da fração FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	95
Figura 53 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 2,50 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	96
Figura 54 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,29 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	97
Figura 55 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,51 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	97
Figura 56 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,62 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	97
Figura 57 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,90 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	98
Figura 58 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 5,55 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	98
Figura 59 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 6,05 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	98
Figura 60 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 6,16 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	99
Figura 61 -(-)-EM/EM-IES do composto com t_R 6,67 min da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	99
Figura 62 - CCD das frações FAEA1–FAEA4 das folhas de <i>B. argyrophylla</i> (FE: sílica, FM: (10: 1,1: 1,1: 2,6) e revelador: NP/PEG e inspecionadas em luz UV a 254 nm (a) e 354 nm (b)	100

Figura 63 - Cromatograma da fração FAE-A1 (t_R 21,6 min) obtido por CLAE-UV ₂₅₄	100
Figura 64 - Cromatograma da fração FAE-A2 obtido por CLAE.....	101
Figura 65 - Cromatograma da fração FAE-A3 obtido por CLAE.....	101
Figura 66 - Cromatograma da fração FAE-A4 obtido por CLAE.....	102
Figura 67- Flavonoides identificados nas frações A1–A4 (obtidas da FAE), das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	103
Figura 68 - Possibilidades de compostos presentes na FAE-A1	104
Figura 69 - EM-IES em alta resolução da fração FAE-A1.....	104
Figura 70 - (–)-EM/EM-IES em alta resolução da FAE-A1	105
Figura 71 - Proposta de fragmentação para a (±)-catequina ou (±)-epicatequina (m/z 289).....	106
Figura 72 - Espectro de infravermelho (KBr) para a (±)-catequina ou (±)-equicatequina (fração A1).....	107
Figura 73 - Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da (±)-catequina (fração FAE-A1).....	108
Figura 74 - Ampliação da Figura 73 (δ 2,3–4,7), da (±)-catequina (fração FAE-A1) .	108
Figura 75 - Ampliação da Figura 73 (δ 5,4–7,5), da (±)-catequina (fração FAE-A1) .	109
Figura 76 - Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, CD ₃ OD) da (±)-catequina (fração FAE-A1).....	109
Figura 77 - (–)-EM-IES em alta resolução da fração FAE-A2.....	112
Figura 78 - Propostas de fragmentação para os compostos 2–10 (derivados da quercetina e do kaempferol) identificados na FAE por CLUE-EM/EM.....	113
Figura 79 - (–)-EM-IES em alta resolução da fração FAE-A3.....	114
Figura 80 - (–)-EM-IES em alta resolução da fração FAE-A4.....	114
Figura 81 - Propostas de fragmentação para os compostos 8–10 identificados na FAE por.....	115
Figura 82 - Proposta de rotas biossintética dos flavonoides presentes na FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	116
Figura 83 - Fórmulas estruturais da (+)-catequina, da quercetina-3- <i>O</i> -Rha e do.....	120

Lista de abreviaturas e siglas

ACN	Acetonitrila
AE	Acetato de etila
ASC	Área sob a curva na ausência de extrato/fração
Ara	Arabinosídeo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B	<i>n</i> -butanol (butan-1-ol)
BHT	2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC ₅₀	Concentração citotóxica para se obter 50% de atividade
CE ₅₀	Concentração efetiva para se obter 50% de atividade
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etanólico
EGTA	Ácido aminopolicarboxílico
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
ESI-EM/EM	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
f-AG	Fração enriquecida da enzima α -glicosidase
f-AS	Fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase
FAE	Fração acetato de etila
FB	Fração <i>n</i> -butanol
FDCM	Fração diclorometano
FH	Fração hexano

FH ₂ O	Fração água
Glc	Glicosídeo
Gal	Galactosídeo
Gal-G2- α -CNP	α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside
H	Hexano
HSA-f	Fração de saliva enriquecida de α -amilase
ICPt	Iodocloroplatinato
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hz
MP	Metabólitos primários
MS	Metabólitos secundários
Mult	Multiplicidade
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NP	Difenilboriloxietilamina
PEG 4000	Polietileno glicol-4000
ppm	Partes por milhão
<i>p</i> NP- α -glc	4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
RDA	Fissão retro Diels-Alder
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
Rha	Ramnosídeo
Tris-HCl	Cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano
<i>t</i> -BHQ	<i>tert</i> -butil hidroquinona
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UNIFRAN	Universidade de Franca
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
u.	Unidade de massa atômica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
Xil	Xilosídeo
Δ	Erro relativo
δ	Deslocamento químico
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto

ddd	Duplo duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
m	Multipleto
s	Simpleto
sl	Simpleto largo

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA TESE	16
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
1.2.1 Atividades: antioxidante, inibitórias sobre a α -amilase e a α -glicosidase e antifúngica.....	23
1.2.1.1 Atividade antioxidante.....	23
1.2.1.2 Atividades inibitórias da α -amilase e da α -glicosidase.....	24
1.2.1.3 Atividade antifúngica.....	25
1.2.2 Metabolismo vegetal e os principais componentes biossintetizados.....	28
1.2.2.1 Metabólitos primários e secundários	28
1.2.2.2 Alcaloides	31
1.2.2.3 Compostos fenólicos	31
1.2.2.4 Terpenos	35
1.2.3 A família Malpighiaceae e os metabólitos secundários: alcaloides, compostos fenólicos e terpenos	36
1.2.3.1 Família Malpighiaceae.....	36
1.2.3.2 O gênero <i>Banisteriopsis</i>	38
1.2.3.3 <i>Banisteriopsis argyrophylla</i> (A. Juss.) B. Gates.....	42
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 GENERALIDADES METODOLÓGICAS	46
3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	47
3.3 PREPARO DO EXTRATO.....	48
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
3.4.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)	49
3.4.2 Voltametria por pulso diferencial (VPD).....	50
3.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES INIBITÓRIAS DAS ENZIMAS A-AMILASE E A-GLICOSIDASE	51
3.5.1 Ensaio com a α -amilase.....	51
3.5.2 Ensaio com a α -glicosidase	52
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À <i>CANDIDA SPP.</i>	53
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS VERO.....	54
3.8 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE <i>B. ARGYROPHYLLA</i>	55
3.8.1 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	55
3.8.2 Prospecção fitoquímica	56
3.8.3 Extração ácido-base.....	58
3.8.4 Análise espectroscópica UV-Vis.....	59
3.8.5 Determinação do teor de fenóis totais.....	59
3.8.6 Determinação do teor de proantocianidinas.....	60
3.8.7 Determinação do teor de flavonoides.....	60
3.8.8 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM).....	60

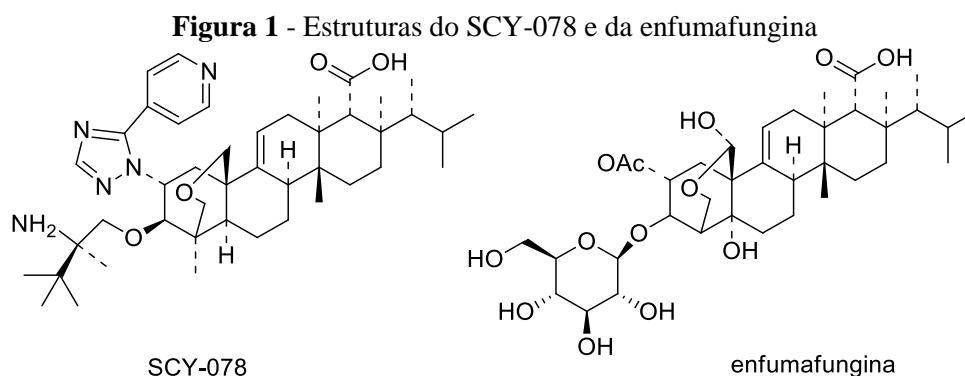
3.8.9 Purificação da fração acetato de etila (AE) por cromatografia em coluna (CC).....	61
3.8.10 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	62
3.8.11 Análise por espectrometria de massas com ionização por electrospray (IES-EM).....	63
3.8.12 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN).....	63
3.8.13 Análise na região do infravermelho (RI).....	63
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES: ANTIOXIDANTE, INIBITÓRIAS SOBRE A A-AMILASE E A A-GLICOSIDASE E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ETANÓLICO.....	65
4.1.1 Avaliação da atividade antioxidante	65
4.1.1.2 Método do DPPH	65
4.1.1.3 Método da VPD	69
4.1.2 Avaliação da atividade inibitória sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase	71
4.1.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	73
4.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES: ANTIOXIDANTE, INIBITÓRIAS SOBRE A A-AMILASE E A A-GLICOSIDASE E ANTIFÚNGICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM O EXTRATO ETANÓLICO	74
4.2.1 Avaliação da atividade antioxidante	75
4.2.1.2 Comparação estatística entre os resultados obtidos no método do DPPH e por VPD.....	78
4.2.2 Avaliação das atividades inibitórias sobre as enzimas α -amilase	79
4.2.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	80
4.3 Avaliação da atividade citotóxica e índice de seletividade.....	80
4.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE <i>B. ARGYROPHYLLA</i>	82
4.4.1 Análise da prospecção fitoquímica	82
4.4.2 Análise do espectro de UV-VIS	86
4.4.3 Análise dos teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas	89
4.4.3.1 Resultados dos teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas do extrato etanólico e frações das folhas da <i>B. argyrophylla</i>	89
4.4.3.2 Atividade antioxidante e inibitória sobre a α -amilase e os compostos fenólicos.....	93
4.4.4 Estudo fitoquímico da FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	95
4.4.4.1 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e identificação dos metabólitos secundários da fração FAE.....	95
4.4.4.2 Purificação dos metabólitos secundários da FAE	99
4.4.4.3 Identificação do composto isolado da FAE-A1.....	103
4.4.4.4 Identificação dos compostos das FAE-A2 – FAE-A4.....	112
4.4.4.5 Rotas biossintéticas dos flavonoides presentes na FAE das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	115
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS FRAÇÕES FAE-A1–FAE-A4	117
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DAS FAE-A1–FAE-A4	118
4.7 ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E INIBITÓRIA DA A-AMILASE DO COMPOSTO ISOLADO E DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS DA FAE.....	119
REFERENCIAS	123

1 Introdução

1.1 Relevância e justificativa da tese

Por milênios, plantas e microrganismos tem sido fontes valiosas de agentes terapêuticos obtidos através da produção de chás, garrafadas, óleos essenciais e de extratos. Tais preparações são resultantes especialmente da medicina popular que é transferida de geração para geração. Esta prática não está relacionada somente ao fácil acesso, mas também ao baixo custo dos produtos naturais (de plantas em especial) e as dificuldades encontradas atualmente com os cuidados à saúde, como a falta de médicos e o elevado valor de grande parte dos medicamentos sintéticos (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006, NEWMAN; CRAGG, 2012, SRIVASTAVA; PANDEY, 2015).

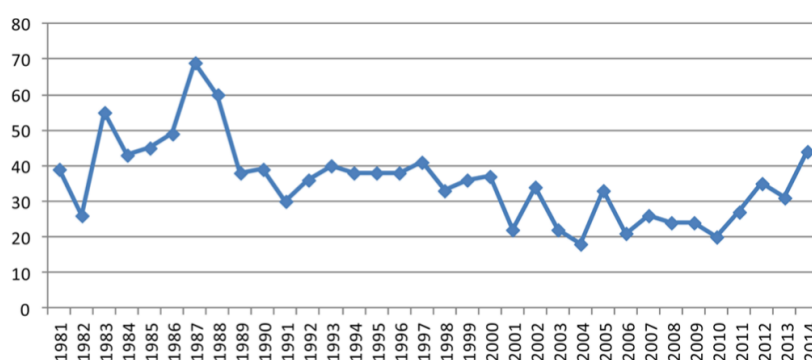
Nas últimas décadas a indústria farmacêutica, cosmética, agrícola e os pesquisadores tem buscado desenvolver novos produtos com base no conhecimento popular. Entretanto, os que chegam ao mercado têm diminuído em decorrência da complexidade que é exigida na produção (HEINRICH, 2010, DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). Como exemplo tem-se o desenvolvimento de um novo agente antifúngico denominado SCY-078, que dependeu de amplos estudos. O SCY-078 é uma substância semissintética derivada da enfumafungina (Figura 1). A enfumafungina apresentou atividade promissora *in vitro* contra *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*, entretanto, a presença da glicose interfere na farmacocinética do composto resultando em efeitos inadequados para seu desenvolvimento clínico (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014). Portanto, sempre há a necessidade de mais estudos que venham contribuir para o aperfeiçoamento e ou descobertas de novos fármacos.



Fonte: Butler, Robertson e Cooper (2014).

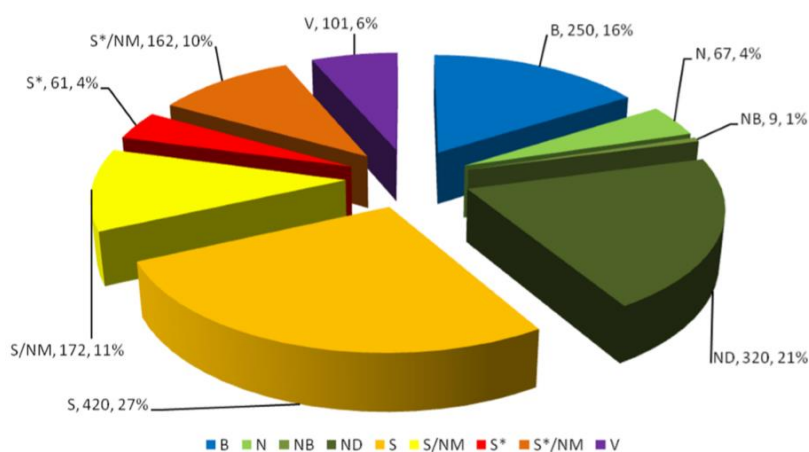
Apesar das dificuldades encontradas, o interesse científico na busca de novas agentes fitoterápicos, vem aumentando. A Figura 2 mostra as tendências na produção de fármacos nos últimos anos. Em 1987 houve um pico de crescimento, que vem oscilado regularmente com o tempo e a partir de 2010 tem sido observado novamente um aumento. Entre 1/1/1981 a 12/31/2014 dos 1562 novos fármacos que foram desenvolvidos, 73 % apresentam sua origem em produtos naturais, conforme o gráfico apresentado na Figura 3 (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 2 - Análise das tendências de descoberta de novos fármacos do período 1981–2014



Fonte: Newman; Cragg (2016).

Figura 3 - Origem dos fármacos aprovadas de 1981-2014¹



Fonte: Newman; Cragg (2016).

¹ N - produto natural; B - macromolécula biológica; NB - produto natural “botânico” (fitoterápicos); ND - derivado semissintético de produto natural; NM - desenvolvidos a partir do conhecimento adquirido de produto natural; S - sintético; S* - sintético com grupo farmacofórico de produto natural e V - vacina.

A Tabela 1 mostra exemplos de fármacos produzidos a partir de fontes naturais entre 1981 – 2014 (NEWMAN; CRAGG, 2016)

Tabela 1 - Exemplos de fármacos de origem natural lançados entre 1981 – 2014

(continua)

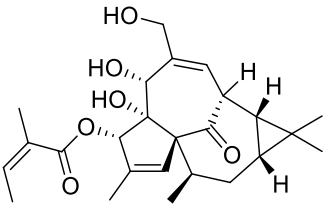
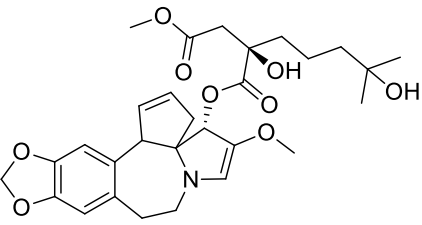
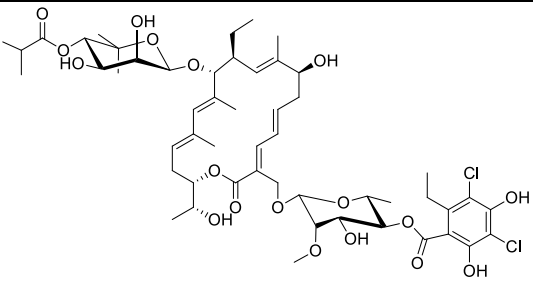
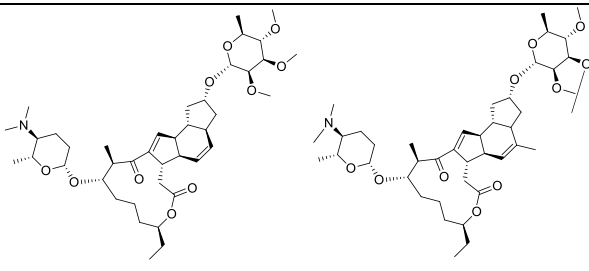
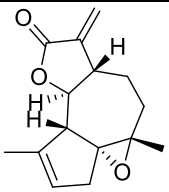
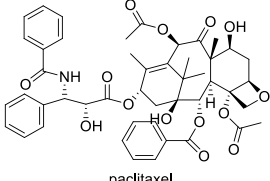
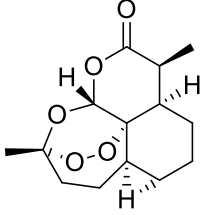
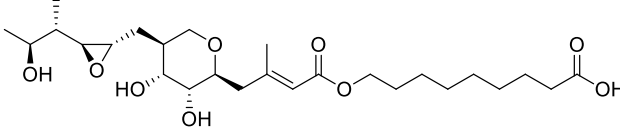
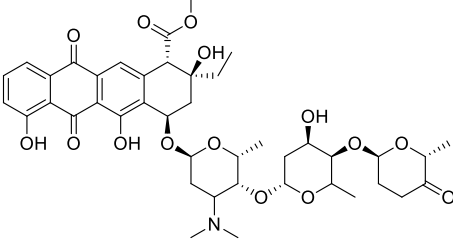
Moléculas	Ano	Origem	Atividades biológicas
nanopartículas de paclitaxel (PICN)	2014	<i>Taxus brevifolia</i> (planta)	anticancerígena
 <p>mebutate ingenol</p>	2012	<i>Euphorbia peplus</i> (planta)	tratamento de queratose actínica
 <p>mepesuccinate omacetaxine</p>	2012	<i>Cephalotaxus harringtonia</i> (planta)	anticancerígena
 <p>fidaxomicina</p>	2011	<i>Aurantiacum hamdenesis</i> (bactéria)	antibacteriana
 <p>espinosina A espinosina D</p>	2011	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> (bactéria)	antiparasitária
 <p>arglabina</p>	1999	<i>Artemisia glabella</i> (planta)	anticancerígena

Tabela 1 - Exemplos de fármacos de origem natural lançados entre 1981 – 2014

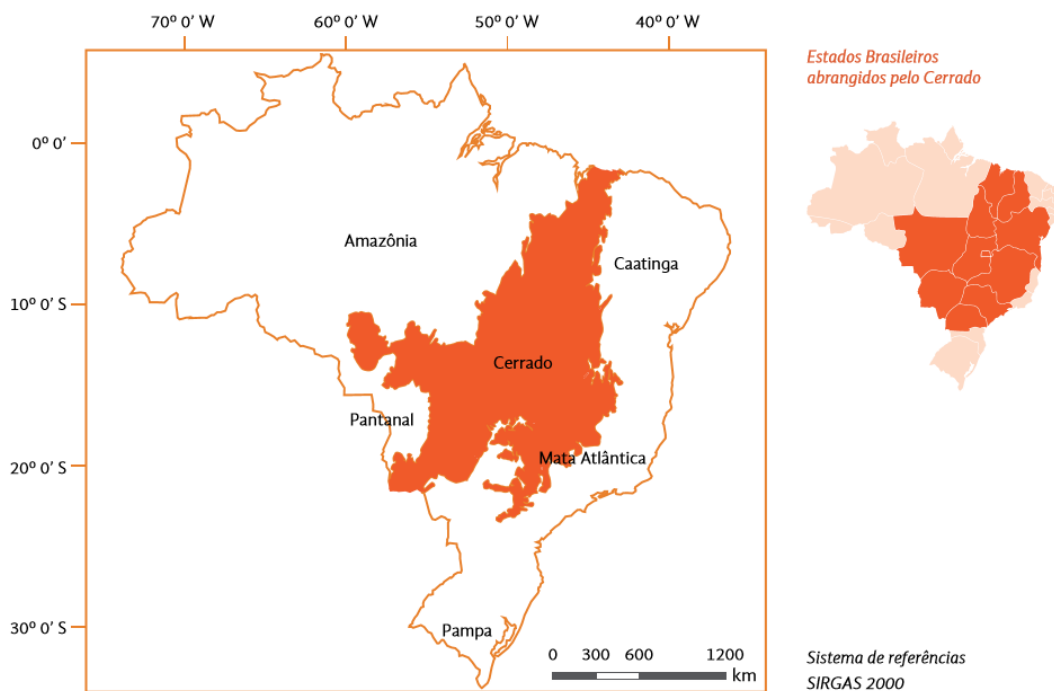
(conclusão)

Moléculas	Ano	Origem	Atividades biológicas
 <p>paclitaxel</p>	1993	<i>Taxus brevifolia</i> (planta)	anticancerígena
 <p>artemisinina</p>	1987	<i>Artemisia annua</i> (planta)	antiparasitária
 <p>mupirocina</p>	1985	<i>Staphylococcus aureus</i> (bactéria)	antibacteriana
 <p>aclarubicina</p>	1981	<i>Galilaeus Streptomyces</i> (bactéria)	anticancerígena

A motivação pela busca de plantas medicinais e novos fitoterápicos está vinculada a alguns fatores, tais como: resistência a drogas antimicrobianas e antifúngicas existentes no mercado, falta de medicamentos eficazes para a profilaxia e/ou tratamento de endemias ocasionadas por protozoários tripanossomatídeos (em especial o *Trypanosoma cruzi* e aqueles do gênero *Leishmania*). Além disso, alguns compostos, como os antioxidantes butilidroxitolueno (BHT) e o *tert*-butilidroquinona (*t*-BHQ) e os inibidores enzimáticos acarbose, miglitol e a metformina demonstraram efeitos colaterais ao organismo humano, animal e sobre o meio ambiente (LANG et al., 2008, PÉREZ et al., 2011, VADIVEL; BIESALSKI, 2011). Devido a estes fatores, o Brasil possui grande importância para os estudos envolvendo produtos naturais vinculados a atividade biológica, pois apresenta uma rica fauna e flora, além de uma alta diversidade cultural e étnica. O território brasileiro possui

uma parcela em torno de 15 % a 20 % da biodiversidade do planeta e é dividido em seis biomas: Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga, Pampa, Pantanal e Cerrado (Figura 4) (BRASIL, 2014).

Figura 4 - Distribuição do bioma Cerrado no Brasil

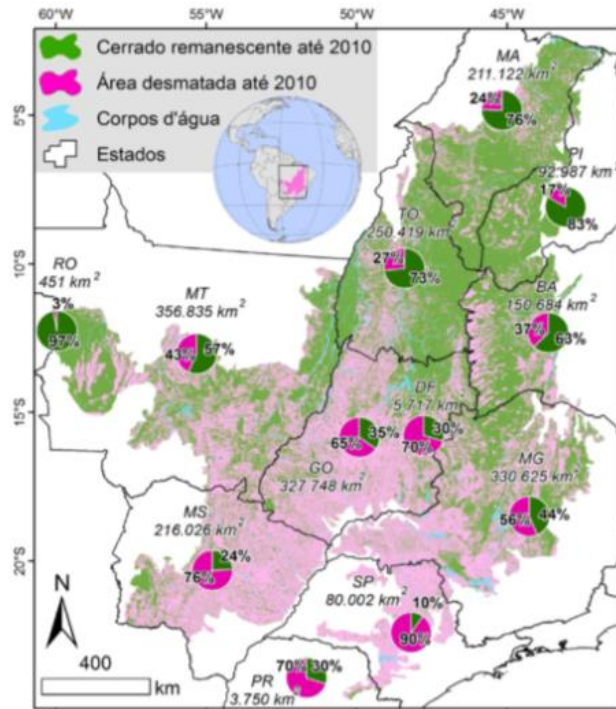


Fonte: Brasil (2014).

O Cerrado se destaca por apresentar o segundo maior bioma. Apresenta área estimada de 2.036.448 km², ocupando aproximadamente 24% do território brasileiro com uma elevada riqueza de espécies, das quais aproximadamente 44% são endêmicas. Suas nascentes formam as principais bacias hidrográficas brasileiras, que são: Tocantins/Araguaia, do Parnaíba, do São Francisco, do Paraná e do Paraguai, representando 14% da produção hídrica do Brasil. Abriga comunidades tradicionais que se desenvolveram através das riquezas naturais desse bioma e que demonstram muitos saberes populares (BRASIL, 2006, IBGE, 2016).

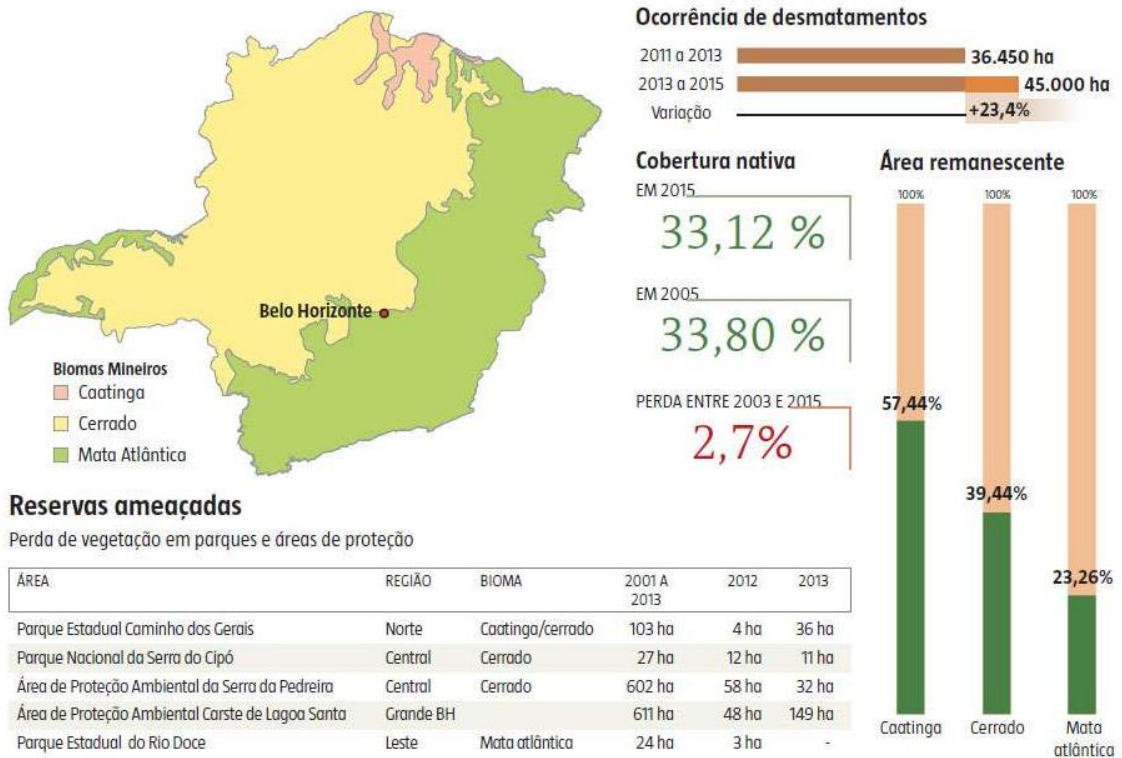
O maior desafio é conciliar o desenvolvimento econômico, subsidiado principalmente pela agricultura, em especial para a produtividade de grãos, produção de carvão e áreas para pastagem, com a conservação e a utilização sustentável dos recursos biológicos e culturais. A Figura 5 e Figura 6 mostram que nos últimos anos houve um aumento de áreas desmatadas. É previsto que continue ocorrendo uma diminuição significativa da flora e da fauna nos próximos anos devido às alterações climáticas em curso e a fatores antrópicos. Isto implica em ações urgentes (MACLEAN; WILSON, 2011).

Figura 5 - Área total de área desmatada e remanescente em 2010 no Cerrado



Fonte: Brasil (2014).

Figura 6 - Ocorrência de desmatamento em Minas Gerais



Fonte: Parreiras (2015) apud Instituto Estadual de Florestas (2015) e Brasil (Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável) (2011).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a *Banisteriopsis argyrophylla*, uma planta nativa do cerrado. Esta espécie apresenta estudos relacionados apenas à botânica e a taxonomia, sendo utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e no tratamento de problemas renais (RODRIGUES; CARVALHO, 2007, PLANTAMED, 2014). Além disso, várias espécies do seu gênero e família apresentam algum potencial biológico comprovado de atividade antifúngica e antioxidante. Não há relatos na literatura do potencial de inibição frente às enzimas α -amilase e α -glicosidase de extratos de plantas do gênero *Banisteriopsis*.

Assim, foram avaliadas a partir do extrato etanólico e frações das folhas de *B. argyrophylla* as atividades antioxidante, inibitórias sobre a α -amilase e α -glicosidase e antifúngica contra espécies de *Candida*. Foi realizado também o estudo fitoquímico com o objetivo de elucidar os metabólitos secundários bioativos presentes em suas folhas.

1.2 Referencial teórico

1.2.1 Atividades: antioxidante, inibitórias sobre a α -amilase e a α -glicosidase e antifúngica

1.2.1.1 Atividade antioxidante

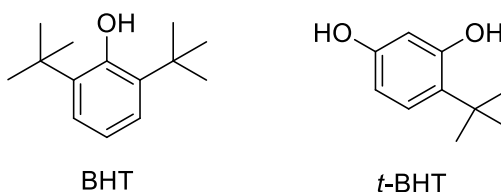
No processo de transferência de elétrons e pela exposição a fatores exógenos (alimentação, tabagismo, álcool, poluição, entre outros) o organismo produz espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem ser chamados de radicais livres, que são átomos ou moléculas que tem elétrons desemparelhados em sua camada externa. Assim, são substâncias altamente instáveis e quimicamente muito reativas. São exemplos de ERO: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^\bullet), radical hidroperoxila (HOO^\bullet) e radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (BARBOSA et al., 2010).

Triagens clínicas e estudos epidemiológicos vêm estabelecendo a relação de uma alimentação rica em frutas e verduras com a diminuição e/ ou prevenção de várias doenças, como artrite, disfunção cerebral, aterosclerose, cardiopatias, diabetes, enfisema, catarata, esclerose múltipla, câncer, inflamações crônicas, doenças do sistema imune e doenças degenerativas (doença de Alzheimer e Parkinson, por exemplo) (ROESLER et al., 2007). Estes alimentos que contêm substâncias que bloqueiam os danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos, recebem o nome de “antioxidantes” (DIPLOCK et al., 1998).

Na indústria de alimentos, cosméticos, bebidas e na pecuária são usados antioxidantes a fim de inibir e reduzir a oxidação lipídica dos produtos e prolongando a validade de consumo dos mesmos, contra a ação do oxigênio (RAMALHO; JORGE, 2006).

As plantas durante a biossíntese também produzem compostos antioxidantes que são um conjunto heterogêneo de substâncias formado por vitaminas E e C, polifenóis (flavonoides, em especial), carotenoides e enzimas (CASTRO et al., 2004, SINGH; RAJINI, 2004). Os compostos fenólicos, por exemplo, apresentam estruturas químicas que lhes permitem o sequestro ou neutralização de radicais livres e /ou a quelação de metais de transição (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Atualmente são utilizados em grande escala antioxidantes, como o 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT) e o *terc*-butilidroquinona (*t*-BHQ) (Figura 7). Todavia, segundo Sasaki et al. (2002), estas substâncias são prejudiciais à saúde do homem, animais e ao meio ambiente, sendo inclusive evidenciado como causadores de danos ao DNA.

Figura 7 - Estruturas do BHT e do *t*-BHT

Fonte: a autora.

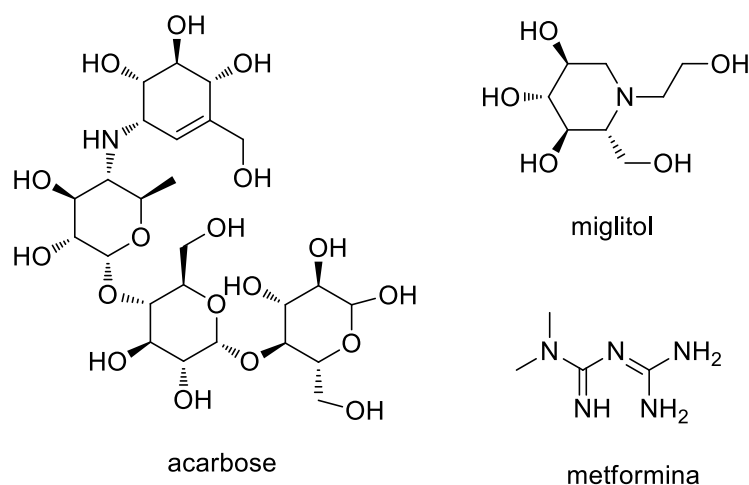
1.2.1.2 Atividades inibitórias da α -amilase e da α -glicosidase

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia (SARWAR N et al., 2010, BLONDE, 2012). Mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com diabetes, e a sua prevalência pode dobrar até 2030 (SARWAR N et al., 2010). Em 2014, foi estimado que 9% das pessoas maiores de 18 anos tiveram diabetes (WHO, 2014).

Assim, inibir enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, como a α -amilase e a α -glicosidase, torna-se uma abordagem promissora para controlar a hiperglicemia, um fator de risco para as complicações micro e macro vasculares no diabetes. A α -amilase é encontrada na saliva sendo responsável pela conversão do amido em oligossacarídeos menores com base na sequência homológica de aminoácidos (DE SOUZA; OLIVEIRA; MAGALHAES, 2010). A enzima α -glicosidase é encontrada no intestino delgado e têm por função catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas em oligossacarídeos e glicogênio, visando à produção de glicose (YOSHIMIZU et al., 2008, ANDRADE-CETTO; CABELLO-HERNANDEZ; CARDENAS-VAZQUEZ, 2013).

Essas enzimas são empregadas em vários processos industriais. Por exemplo, na indústria alimentícia (fabricação de cervejas e destilarias), têxtil, de papel, de detergente e farmacêutica (KANDRA, 2003). Com relação à última, há a preocupação com o desenvolvimento de produtos que atuem no controle de doenças orais (a enzima α -amilase salivar se liga aos esmaltes dos dentes levando a formação de placa dentária) e no controle glicêmico (SALES et al., 2012, DIEHL, 2013).

Os medicamentos usados para o tratamento no controle de glicose no sangue são a acarbose, o miglitol e a metformina (Figura 8) podendo apresentar efeitos colaterais, como distensão abdominal, flatulência e diarreia. Atuam no intestino, retardando a digestão e absorção dos carboidratos por meio da inibição da α -amilase pancreática e α -glicosidase da membrana intestinal (SOUZA, 2011, VADIVEL; BIESALSKI, 2011b, DIEHL, 2013).

Figura 8 - Exemplos de substâncias utilizadas para o controle glicêmico

Fonte: a autora.

1.2.1.3 Atividade antifúngica

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de *commodities* agrícolas. Em janeiro de 2016 a produção de cereais, leguminosas e oleaginosas (grãos em geral) totalizou 211,3 milhões de toneladas, 0,9% superior à obtida em 2015 (209,5 milhões de toneladas) (IBGE, 2016). Assim, aspectos de segurança alimentar devido aos riscos de contaminação devem ser controlados. Se os alimentos forem colhidos, manipulados e armazenados de forma inapropriada pode ocorrer o crescimento fúngico, relacionado em especial aos fungos micotoxigênicos, levando a prejuízos significativos no agronegócio (CONTI; GUIMARAES; PUPO, 2012).

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

Os fungicidas (do latim “*caedo*”=matar + “*fungus*”=fungo) são usados na agricultura e na área de veterinária, porém seu uso indiscriminado levou a alguns organismos desenvolverem certa resistência. (SOARES et al., 2015). Além disso, devido à sua alta toxicidade, seu uso requer atenção especial. A redução do uso de produtos químicos é uma

das principais características da agricultura sustentável, a qual respeita e preza pela conservação do meio ambiente (contaminação de águas, solo, animais e alimentos) e a saúde humana (intoxicação) (BIGATON et al., 2013, JUNIOR et al., 2014).

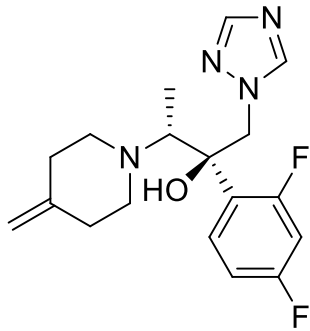
A análise de ocorrências de infecções fúngicas em humanos também deve ser considerada (VICENTE et al., 2003, ALMEIDA et al., 2010). Os fungos da espécie de *Candida*, por exemplo, se destacam por causar graves doenças. A *Candida albicans* é o principal agente etiológico das candidíases, entretanto, outras espécies de *Candida* tais como *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, são também considerados patógenos em humanos (HORN et al., 2009, SILVA et al., 2012, BRUNKE; HUBE, 2013). Os fungos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal no organismo e estão presentes na superfície de mucosas, como a cavidade bucal, pele e órgãos genitais. Porém, quando há um desequilíbrio dessa microbiota várias doenças infecciosas podem surgir, como a candidíase e a invasão das leveduras na corrente sanguínea (candidemia) (ARENDRUP, 2010). Estas leveduras são emergentes em ambientes hospitalares, contribuindo com a mortalidade principalmente de pacientes imunocomprometidos ou aqueles hospitalizados em estado grave (WORTHINGTON; CLARKSON, 2002, LIU et al., 2011, SARDI et al., 2013).

Em estudo realizado com 13.796 pacientes, em 1.265 UTI, em 75 países da Europa, América, Ásia e Oceania foi verificado que dos 51% dos doentes que estavam infectados com microrganismos, 16% destes receberam tratamento contra infecções causadas por fungos (VINCENT et al., 2009).

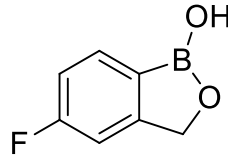
Além das infecções em humanos, os animais também sofrem ataques pelos fungos, sendo que o tratamento é mais difícil (SHARON; SHLEZINGER, 2013).

Neste contexto, de 2011 a 2014 foram aprovados somente dois compostos antifúngicos sintéticos, o efinaconazole e o tavaborole (NEWMAN; CRAGG, 2016). Ao longo da história foram desenvolvidos poucos medicamentos e, até a década de 70, foi utilizado especialmente o iodeto de potássio, a nistatina, a anfotericina, a flucitosina e o cetoconazol (Figura 9) (VICENTE et al., 2003, MARTINEZ, 2006). Além da dependência de poucos medicamentos para o tratamento das infecções fúngicas, há também os problemas associados com os efeitos colaterais e com a resistência microbiana em relação aos agentes antifúngicos convencionais (SARDI et al., 2013).

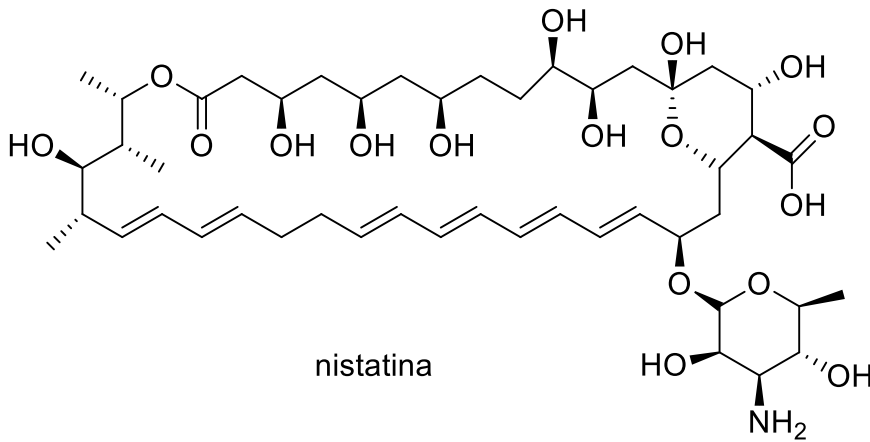
Figura 9 - Exemplos de substâncias antifúngicas



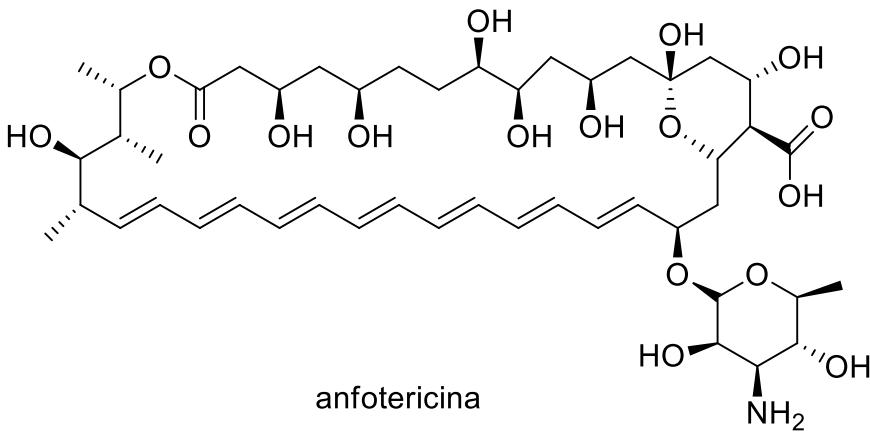
efinaconazole



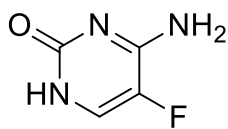
tavaborole



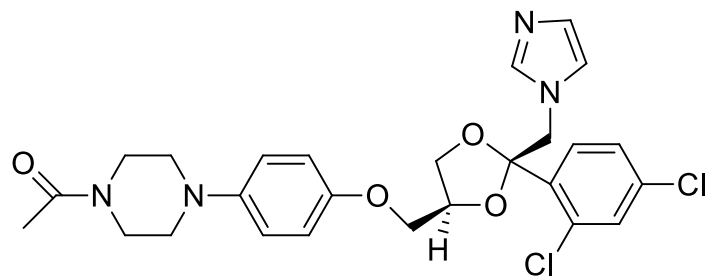
nistatina



anfotericina



flucitosina



cetoconazol

Fonte: a autora.

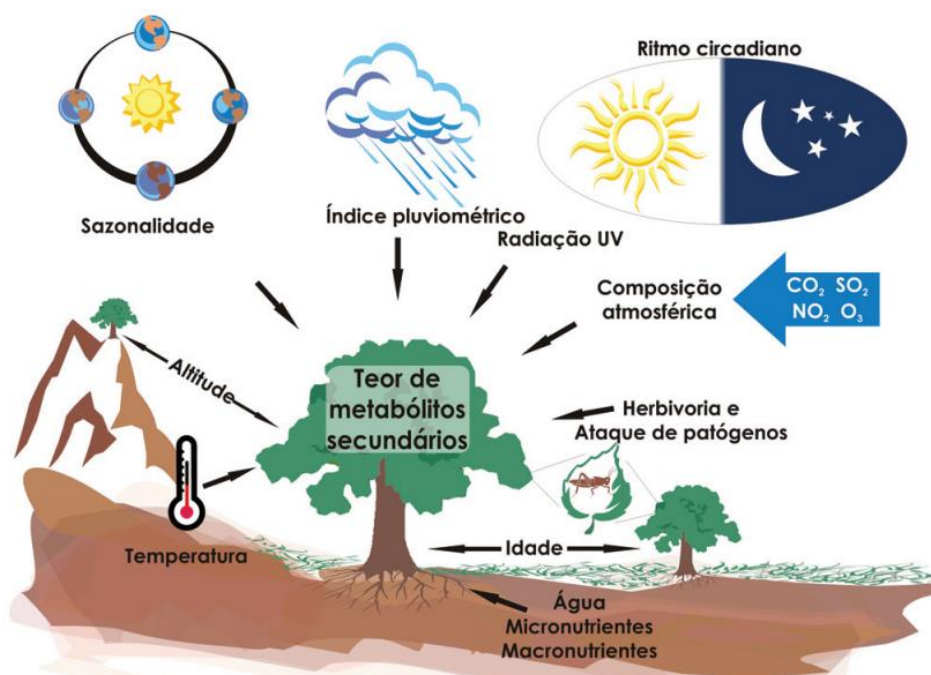
1.2.2 Metabolismo vegetal e os principais componentes biossintetizados

1.2.2.1 Metabólitos primários e secundários

Uma vez que alguns antioxidantes e alguns inibidores enzimáticos demonstraram efeitos colaterais ao organismo humano, animal e sobre o meio ambiente, e devido à resistência aos agentes antifúngicos convencionais, faz-se necessária à busca de novos fármacos. Uma alternativa seria buscar nas plantas por moléculas bioativas, uma vez que elas são consideradas atualmente uma das principais fontes de novos compostos. (FRANCO et al., 2002, SASAKI et al., 2002a, SASAKI et al., 2002b, JÚNIOR et al., 2005, LANG et al., 2008, BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014, NEWMAN; CRAGG, 2016).

Isto se deve ao fato das plantas produzirem, por meio da biossíntese, compostos orgânicos conhecidos como metabólitos primários (MP) e metabólitos secundários (MS). Os MP possuem distribuição universal e funções essenciais, sendo os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e polissacarídeos, proteínas e lipídeos, que tem por função manter o desenvolvimento e sobrevivência da planta (MANN, 1995). Ao contrário, os MS possuem distribuição restrita, grande diversidade estrutural e são micro substâncias relacionadas à sobrevivência, reprodução e competição no ambiente, são produzidas de acordo com as demandas provocadas por fatores ambientais (Figura 10) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 10 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de MS em planta



Fonte: Gobbo-Neto e Lopes, (2007).

Os MS podem ser característicos de uma ou mais espécies, sendo obtidos de um conjunto de reações químicas responsáveis pelos processos de síntese e degradação dos nutrientes na célula (CASTRO et al., 2004, GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Na síntese dos MS as enzimas agem como catalisadores biológicos, minimizando o consumo de energia na célula, garantindo um estado organizado e controlando as rotas metabólicas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, LANGE; GHASSEMIAN, 2003, CASTRO et al., 2004). São conhecidas três rotas ou vias metabólicas:

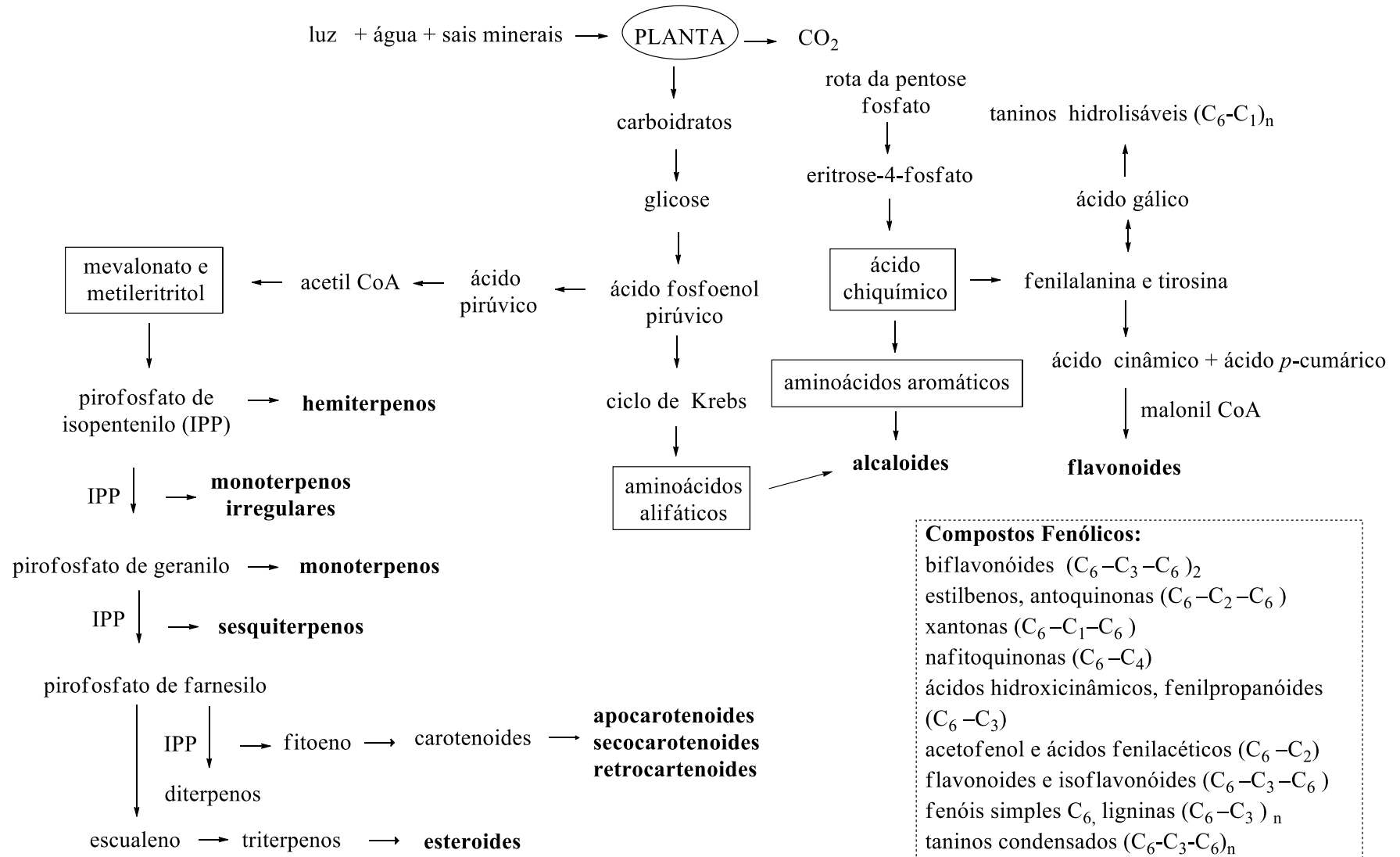
1) dos aminoácidos alifáticos oriundos do ciclo de Krebs, dos aminoácidos aromáticos e dos indólicos oriundos da via do ácido chiquímico (compostos nitrogenados, como alcaloides),

2) do ácido chiquímico e do acetato (precursores dos compostos fenólicos) e

2) do mevalonato ou do metileritritol (terpenos ou isoprenoides).

A Figura 11 mostra um esquema das relações biossintéticas entre produtos naturais de plantas. Na sequência serão apresentados alguns conceitos sobre estes compostos, ressaltando as propriedades químicas e biológicas dos mesmos.

Figura 11 - Relações biossintéticas entre produtos naturais de plantas



Fonte: Adaptado de Castro et al. (2004), Croteau; Kutchan e Lewis (2000) e Lange e Ghassemian (2003).

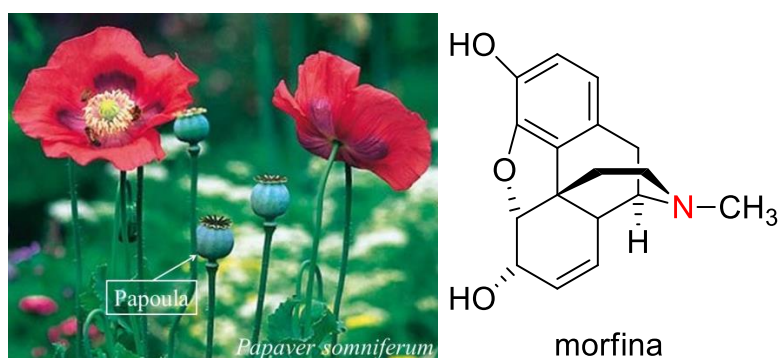
1.2.2.2 Alcaloides

Os alcaloides (de *álcali* que significa básico, com o sufixo *-oide* que significa "semelhante a") são metabólitos, geralmente, farmacologicamente ativos que possuem em sua estrutura um ou mais átomos de nitrogênio e possuem anéis heterocíclicos (CASTRO et al., 2004, ANISZEWSK, 2007).

São encontrados em plantas vasculares em sua maioria dicotiledôneas herbáceas, se armazenam nos vacúolos das células do vegetal e atuam na defesa contra predadores, em especial mamíferos, devido à sua alta toxicidade (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Um alcaloide muito conhecido é a morfina, um potente analgésico isolado do ópio (*Papaver somniferum*) em 1806 pelo farmacêutico Friedrich Serturner e cuja fórmula foi proposta em 1925 (Figura 12) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000)

Figura 12 - Morfina, isolada do látex da papoula (*Papaver somniferum*)



Fonte: Imagem: GETTY. (2011).

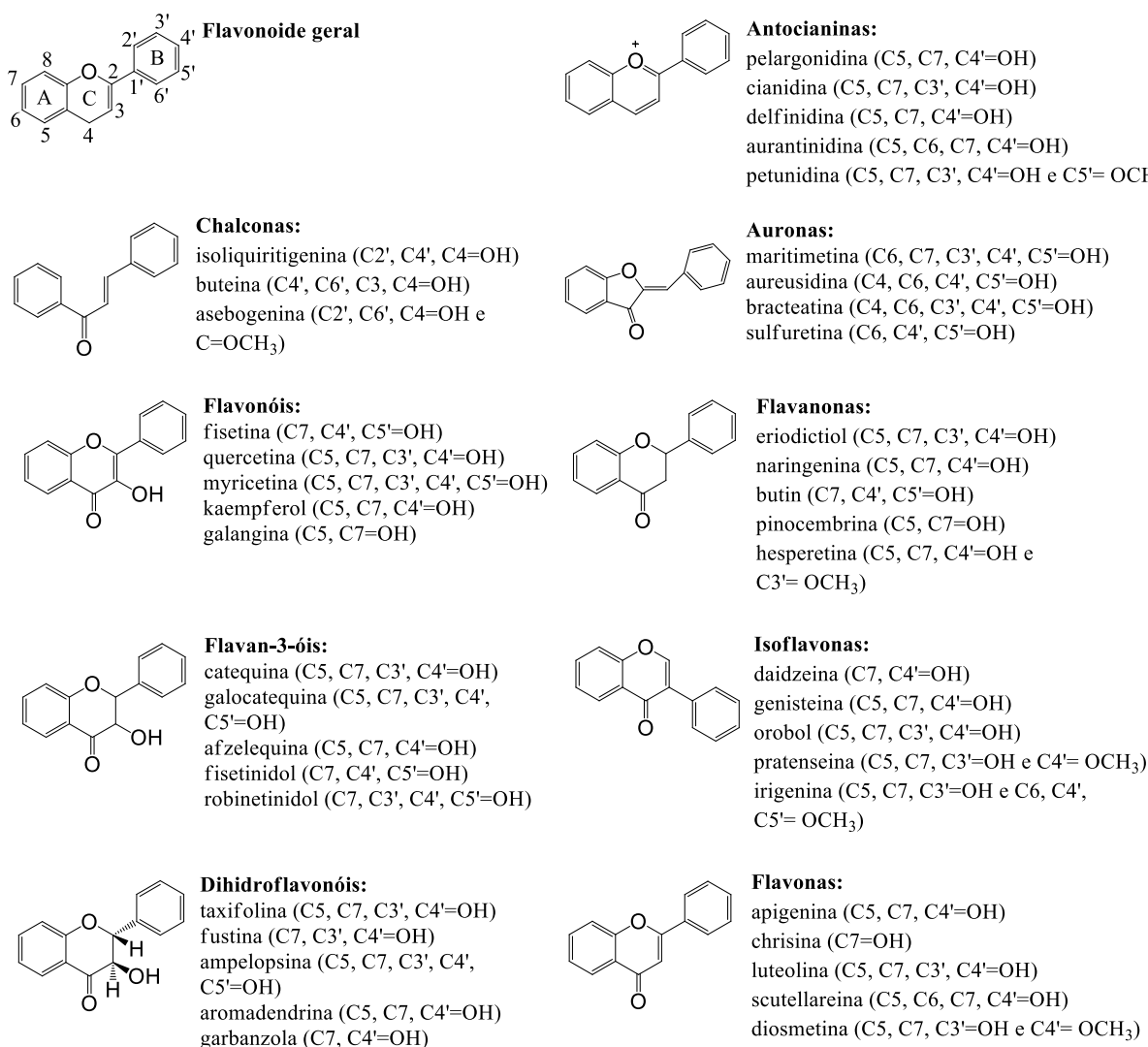
1.2.2.3 Compostos fenólicos

Na estrutura dos compostos fenólicos há presença de anel benzênico e um ou mais grupamentos hidroxílicos. Em alguns casos, a substância fenólica pode apresentar alto grau de polimerização o que contribui para uma diversidade estrutural denominados polifenóis (QUIDEAU et al., 2011).

Esse grande número de compostos implica em muitas funções nos vegetais, como proteção contra o ataque de herbívoros e crescimento de microrganismos, suporte mecânico, atração de polinizadores ou dispersores de fruto, proteção contra raios UV e competição de plantas adjacentes que venham impedir seu desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2013).

São classificados de acordo com o número e arranjo dos átomos de carbono (Figura 11). Uma classe que se destaca no grupo é a dos flavonoides (latim "*flavus*" que significa amarelo) devido à sua abundância. Esses compostos apresentam origem biossintética a partir do ácido chiquímico e do acetato, o que lhes conferem em sua maioria a mesma estrutura base que é constituída por 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6-C3-C6 (COOK; SAMMAN, 1996, HARBORNE; WILLIAMS, 2000, QUIDEAU et al., 2011). Diferem em relação ao seu poder de oxidação e ao padrão de substituição do anel C, sendo divididos em nove classes (Figura 13) (MALBERT, 2015).

Figura 13 - Classes de flavonoides: estruturas e exemplos



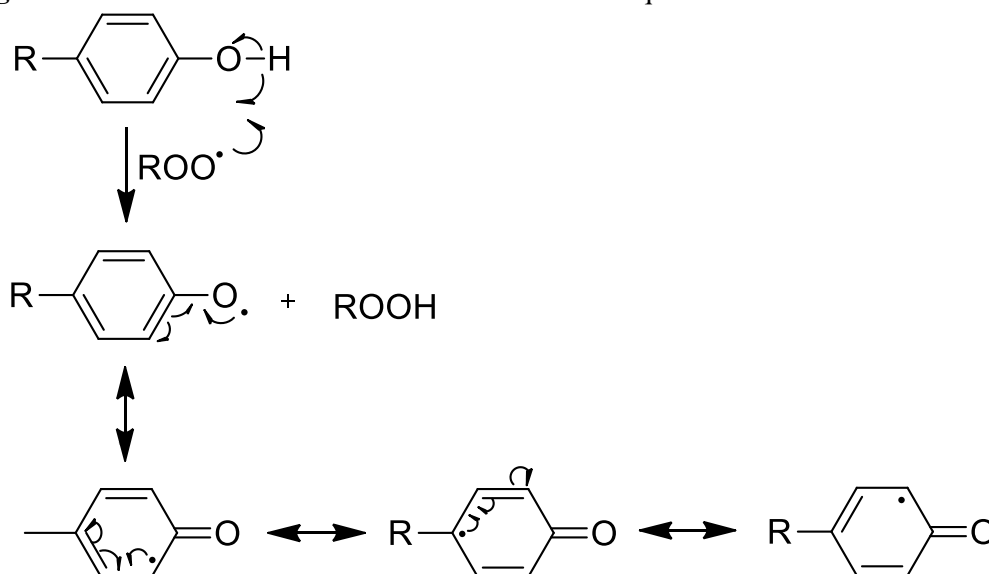
Fonte: Adaptado de Malbert (2015).

Os flavonoides são compostos bioativos que são usados na indústria de alimentos, no processamento, conservação (antioxidantes) e como aditivos de cor (BALASUNDRAM;

SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Na indústria cosmética são empregados na produção de produtos que atuam em reações oxidativas e, na indústria de alimento, inibem ou reduzem a oxidação lipídica dos mesmos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os flavonoides são doadores de radical H[•] e, devido aos grupos hidroxila presentes conjugados com o anel aromático, possibilita a estabilização por ressonância dos produtos da reação entre os radicais livres e os antioxidantes (Figura 14) (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002, AMIC et al., 2007).

Figura 14 - Estruturas de ressonância do anel aromático que estabilizam o radical formado



Fonte: a autora.

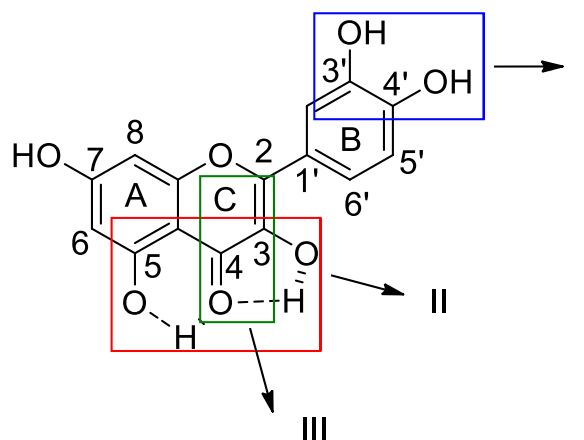
Um flavonoide irá apresentar atividade antioxidante dependendo do arranjo dos grupos funcionais da sua estrutura. Esses compostos apresentam três características importantes para o sequestro dos radicais livres e para tornar menor o potencial de oxidação dos mesmos (maior atividade antioxidante) (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002):

1) A presença do catecol ou 1,2-diidroxibenzeno no anel B (C3', C4'=OH) (Figura 15: I), sendo que as substituições dos anéis A e C, por grupos hidroxila têm pouco impacto na estabilização da molécula;

2) a presença de grupos hidroxila no C3 (anel C) e C5 (anel A) proporcionando a formação de ligações de H para o grupo oxo (Figura 15: II);

3) a presença da ligação dupla em C2-C3 em conjugação com a função oxo no C4 do anel C fornecendo a deslocalização de elétrons a partir do anel B (Figura 15: III).

Figura 15 - Características estruturais dos flavonoides (quercetina) para apresentarem atividade antioxidante



Fonte: adaptado de Malbert (2015).

Além da propriedade antioxidante apresentada por esses compostos, a indústria, em especial a farmacêutica, considera também outros potenciais biológicos. É conhecido o potencial inibitório de flavonoides contra as enzimas α -amilase e α -glicosidase (LO PIPARO et al., 2008, PEREIRA et al., 2011, LIU et al., 2013, YAO et al., 2013).

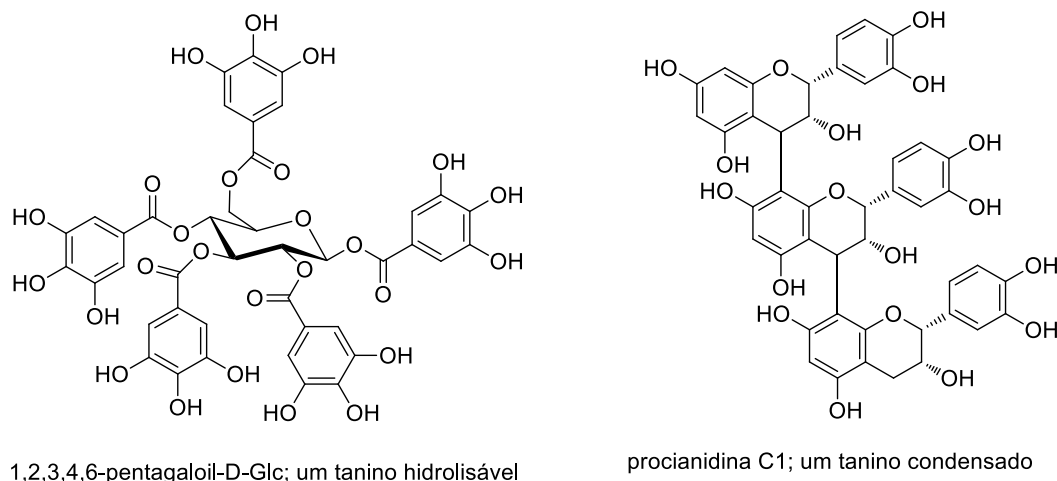
São conhecidos também os efeitos significativos na redução do câncer e doenças cardiovasculares (KARAKAYA, 2004, NINFALI et al., 2005). Além disso, apresentam atividades anti-inflamatória (DIAZ et al., 2012), citotóxica contra células KB (células de câncer da cavidade oral), MCF-7 (células da mama) e NCI-H187 (células do pulmão) (SAEWAN; KOYSOMBOON; CHANTRAPROMMA, 2011) e antifúngica contra *Oryza sativa sp.*, *Nipponbare* e *IL7* (HASEGAWA et al., 2014).

Outra classe de compostos fenólicos biossintetizados pelas plantas são os taninos, cujo nome é derivado de “tanante”, indicando que esses compostos evitam a putrefação das peles dos animais e assim elas podem ser transformadas em couros. Os taninos possuem peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos são classificados em taninos condensados (proantocianidinas) e taninos hidrolisáveis (Figura 11). Os taninos condensados são oligômeros de flavonoides, especialmente de flavan-3-ol. Sua hidrólise ácida em meios alcoólicos produz antocianidinas, daí o nome proantocianidinas ou procianidinas. A grande diversidade estrutural ocorre devido aos vários padrões de substituição e a estereoquímica das subunidades de flavonol. Os taninos hidrolisáveis são núcleos de glicose ou outro monossacarídeo esterificados com os ácidos gálico e/ ou com o ácido hexaidroxidifênico (elágico) e são divididos em galotaninos (produzem ácido gálico após hidrólise) e em elagitaninos (produzem ácido elágico após

hidrólise) (BAGCHI et al., 2000, QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002, TAIZ; ZEIGER, 2013).

Figura 16 - Exemplos de taninos hidrolisáveis e condensados



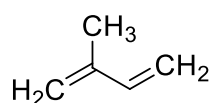
Fonte: adaptado de Croteau, Kutchan e Lewis (2000).

Os taninos apresentam diversas atividades, como antioxidante, anti-helmínticos, contra *Haemonchus contortus* (QUIJADA et al., 2015), anti-inflamatória (PARK et al., 2014); antiobesidade (SHON et al., 2014); inibitória da α -amilase (GONÇALVES; MATEUS; DE FREITAS, 2011) e antibacteriana (MAISAK et al., 2013).

1.2.2.4 Terpenos

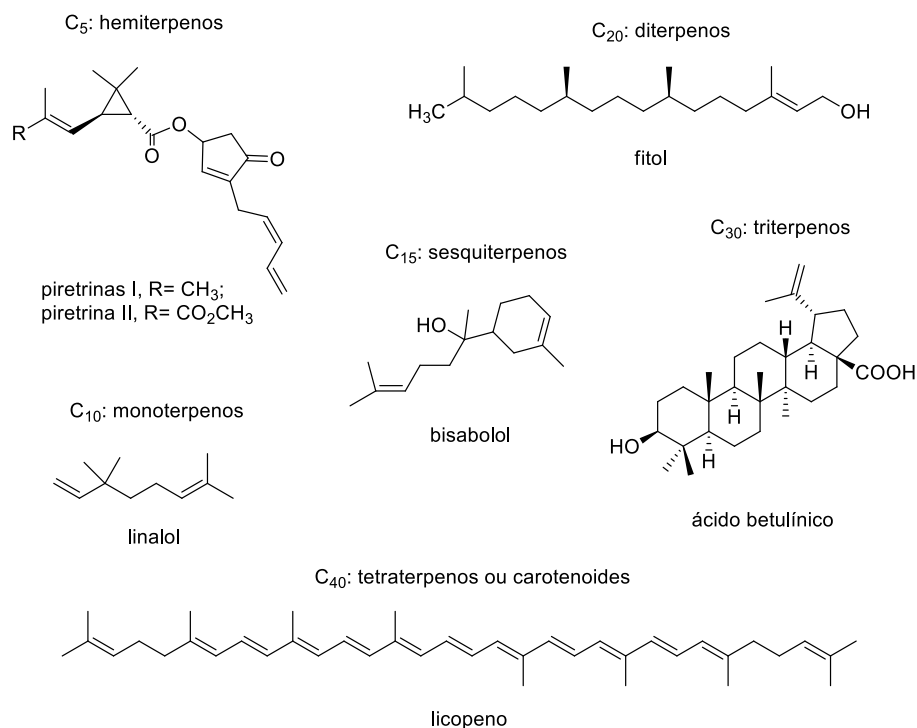
Terpenos ou terpenoides formam uma classe de MS com grande variedade estrutural, havendo compostos acíclicos, monocíclicos e policíclicos. Apresentam em sua estrutura unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) (Figura 17), proveniente da união de cinco átomos de carbono, que são incorporadas em número variado segundo um mecanismo típico cabeça cauda. Os terpenos são classificados conforme o número de unidades de isopreno (Figura 18) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, EISENREICH et al., 2004).

Figura 17 - Fórmula estrutural do isopreno



isopreno

Fonte: a autora.

Figura 18 - Classificação dos terpenos e exemplos

Fonte: a autora.

As plantas produzem esses MS com a função de defesa contra insetos e mamíferos herbívoros (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além destas atividades, apresentam atividades leishmanicida; redutase tripanotona (LIMA et al., 2015); anti-inflamatória (ROMERO et al., 2014) (ROMERO et al., 2014); anticancerígena; antioxidante; antibacteriana (ZENGIN; BAYSAL, 2014), antiviral (AREF et al., 2011) e antimicrobiana (CUNHA et al., 2013, FURTADO et al., 2014, MARTINS et al., 2015, SOUSA et al., 2015)

1.2.3 A família Malpighiaceae e os metabólitos secundários: alcaloides, compostos fenólicos e terpenos

1.2.3.1 Família Malpighiaceae

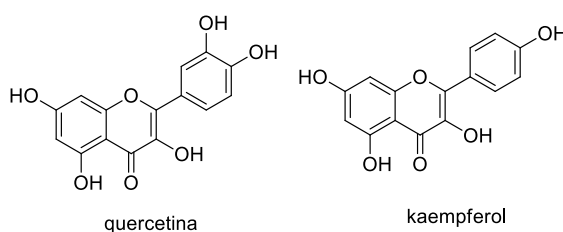
A família Malpighiaceae é um exemplo de grupo de plantas que se destacam devido ao grande número de espécies que apresentam propriedades biológicas e químicas, que estão relacionadas à presença dos MS.

Compreende 77 gêneros e cerca de 1.300 espécies, com a maior diversidade nas Américas (DAVIS; ANDERSON, 2010). No Brasil, existem 44 gêneros e aproximadamente 561 espécies, das quais 336 são endêmicas (MAMEDE et al., 2015). As espécies são

facilmente reconhecidas por causa da uniformidade floral, podendo apresentar potencial ornamental e econômico (SOUZA; LORENZI, 2008). São plantas dicotiledôneas, que têm distribuição predominantemente tropical, com habito variado. Podem ser árvores, arbustos, lianas ou ocasionalmente ervas perenes (LOMBELLO; FORNI-MARTINS, 2003).

No Brasil, os representantes comestíveis mais conhecidos dessa família são a acerola (*Malpighia glabra*) e o murici (*Byrsonima crassa*). A acerola é uma fonte rica de vitamina C e que apresenta atividades: antioxidante, antigenotoxicidade e inibitória da α -amilase (BORGES et al., 2016). Os flavonoides quercetina e kaempferol foram isolados de suas frutas (Figura 19) (HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2009).

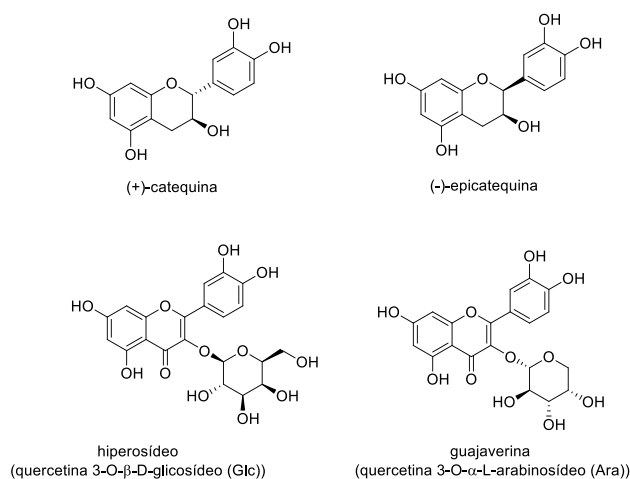
Figura 19 - Flavonoides isolados de *Malpighia glabra*



Fonte: Hoffmann-Ribani, Huber e Rodriguez-Amaya (2009).

Assim como a acerola, o murici é consumido na forma de sucos, licores, geleias e doces, e extratos de suas folhas apresentam atividades inibitória da enzima α -amilase e antiulcerogênica. A presença da (+)-catequina, (-)-epicatequina, hiperosídeo e da guajaverina podem estar relacionados com essas atividades biológicas (Figura 20) (SANNOMIYA et al., 2005, SILVA et al., 2009).

Figura 20 - Flavonoides isolados das folhas da *Byrsonima crassa*



Fonte: Sannomiya et al.(2004).

1.2.3.2 O gênero *Banisteriopsis*

Dentro da família Malpighiaceae, o gênero *Banisteriopsis* se destaca devido ao grande número de espécies. São conhecidas 92 espécies distribuídas principalmente na Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e no Brasil e apresentam flores de cores fortes que são encontradas na forma de lianas (cipós, trepadeiras), arbustos ou ainda de arvoretas (GRANDI, 2014, PLANTAMED, 2014). Esse gênero recebeu tal nome em homenagem a John Banister (1650 – 1692), um naturalista inglês do século XVII. O nome anteriormente usado para o gênero *Banisteriopsis* foi *Banisteria* (QUATTROCCHI, 1999). Muitas espécies de *Banisteriopsis* são utilizadas na medicina popular no tratamento de algumas doenças (Tabela 2).

Tabela 2 - Espécies do gênero *Banisteriopsis* utilizadas na medicina popular

Espécie/nome popular	Uso na medicina popular	Referências
<i>B. campestris</i> ; <i>B. laevifolia</i> e <i>B. argyrophylla</i> / Cipó-prata	Ramos com folhas e flores: problemas renais, cálculos dos rins e como diuréticos. Raízes: anti-inflamatórias, para hemorragias ovarianas, nefrites e blenorreias.	Rodrigues; Carvalho (2007)
<i>B. megaphylla</i> / Cideira de prata	Ramos com folhas e flores: atividade antipirética é um adstringente, e pode ser utilizada em tratamentos de doença pulmonares.	Rodrigues; Carvalho (2007)
<i>B. anisandra</i> / Cipó-de-prata	Folhas: antifúngico Folhas: potente alucinógeno	Freitas et al. (2015)
<i>B. caapi</i> / Cipó-mariri	Obs.: O chá das folhas é utilizado em rituais por povos indígenas, tendo adeptos no Brasil e exterior, o chá é conhecido como Santo Daime ou ayahuasca.	Callaway (2005); Samoylenko et al. (2010)

O estudo de atividades biológicas e química (atividade antioxidante) do gênero *Banisteriopsis* é amplamente citado na literatura, comprovando o uso na medicina popular. Três espécies de *Banisteriopsis* se destacam na literatura por ter vários estudos: 1) *B. caapi*, 2) *B. variabilis* e 3) *B. anisandra* (Tabela 3). As principais classes de compostos isolados responsáveis por essas atividades foram alcaloides, terpenos, flavonoides e taninos (Tabela 4).

Tabela 3 - Atividades biológicas e química de plantas do gênero *Banisteriopsis*

Espécie	Atividades biológicas e química	Referências
<i>B. caapi</i>	Atividade inibitória da enzima monoaminoxidase (MAO), antioxidante e tripanocida contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e antileishmanioses.	Callaway (2005) Samoylenko et al. (2010)
	Atividade contra vírus da Herpes em bovinos (tipo 1) e reovírus aviária, alelopática e citotóxica contra células MeWo, CT26, B16-F10, CHO.	Simoni (2007); Queiroz et al. (2011)
<i>B. variabilis</i>	Antifúngica contra <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i>	Freitas et al. (2015)

Tabela 4 - Metabólitos secundários bioativos isolados de algumas espécies de *Banisteriopsis*

(continua)

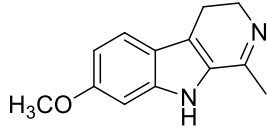
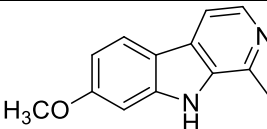
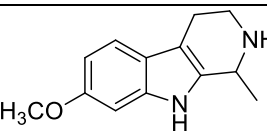
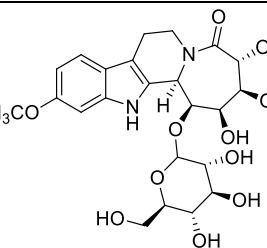
Espécies	Parte da planta	Alcaloides	Referências
<i>B. caapi</i>	Folhas Caules Ramos	 harmalina	Samoylenko et al. (2010)
		 harmina	
		 tetrahydroharmina	
		 banistenoside A	

Tabela 4 - Metabólitos secundários bioativos isolados de algumas espécies de *Banisteriopsis*

(continuação)

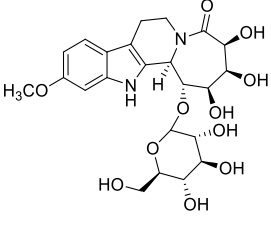
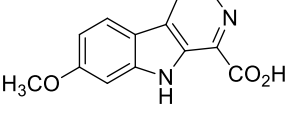
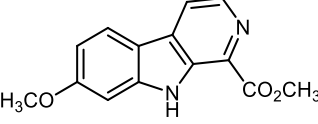
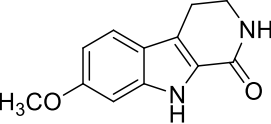
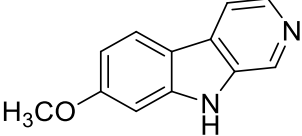
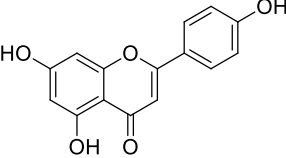
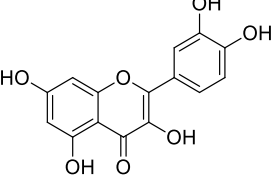
Espécies	Parte da planta	Alcaloides	Referências
<i>B. caapi</i>	Folhas Caules Ramos	 <p>banistenoside B</p>	Samoylenko et al. (2010)
	Folhas Caules	 <p>ácido harmalinico</p>	Hashimoto; kawanishi (1975)
		 <p>ácido harmico metil éster</p>	
		 <p>ceto tetrahydroharmina</p>	Hashimoto; kawanishi (1976)
		 <p>norharmina</p>	
Espécies	Parte da planta	Flavonoides	Referências
<i>B. variabilis</i>	Folhas	 <p>apigenina</p>	Queiroz et al. (2011)
		 <p>quercetina</p>	

Tabela 4 - Metabólitos secundários bioativos isolados de algumas espécies de *Banisteriopsis*

(continuação)

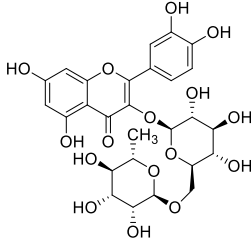
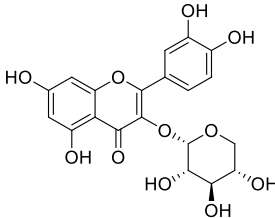
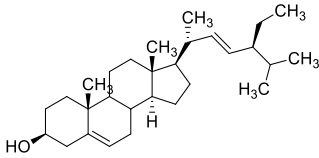
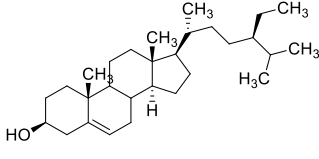
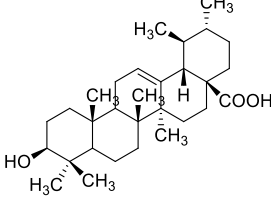
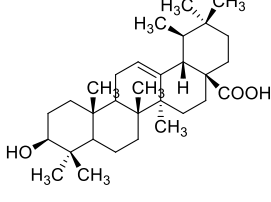
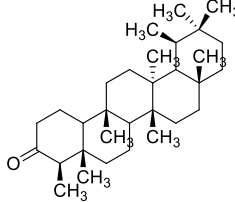
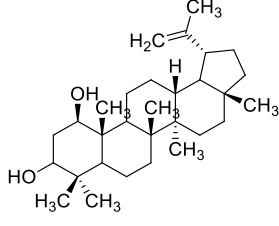
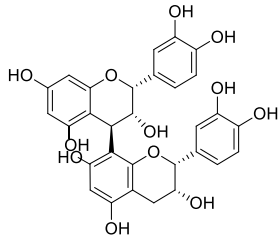
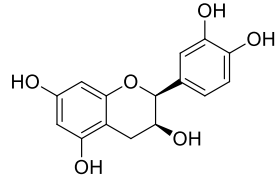
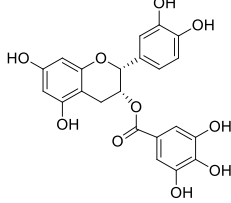
Espécies	Parte da planta	Flavonoides	Referências
<i>B. variabilis</i>	Folhas	 <p>rutoside (quercetina-3-O-Rha-Rha)</p>	Queiroz et al. (2011)
<i>B. anisandra</i>	Raízes Folhas	 <p>quercetrina (quercetina-3-O-Rha)</p>	Freitas et al. (2015)
Espécies	Parte da planta	Terpenos	Referências
<i>B. anisandra</i>	Raízes Folhas	 <p>beta-sitosterol</p>	Freitas et al. (2015)
		 <p>oleato de beta-sitosterol</p>	
		 <p>ácido oleanólico</p>	
		 <p>friedelina</p>	

Tabela 4 - Metabólitos secundários bioativos isolados de algumas espécies de *Banisteriopsis*

(conclusão)

Espécies	Parte da planta	Terpenos	Referências
<i>B. anisandra</i>	Raízes	 glochidonol	Freitas et al. (2015)
	Folhas	 lupenone	
Espécies	Parte da planta	Taninos	Referências
<i>B. caapi</i>	Folhas	 procyanidina B2	Samoylenko et al. (2010)
	Caules		
	Ramos	 (-)-epicatequina	
<i>B. variabilis</i>	Folhas	 epigallocatequina	Queiroz et al. (2011)

1.2.3.3 *Banisteriopsis argyrophylla* (A. Juss.) B. Gates

Outra espécie desse gênero é a *Banisteriopsis argyrophylla*. Sua descrição botânica foi feita com base em Gates (1982). Os ramos desta planta são finos e alongados, as flores podem

ser de cor branca e agrupadas em umbelas paniculadas, sendo encontrada principalmente em São Paulo e em Minas Gerais (PLANTAMED, 2014) (Figura 21). Grandi (2014) também descreve a planta ressaltando as seguintes características:

Arbusto semilenhoso, ereto ou semiescandente, ramificado com até 3 m de altura, com abundantes flores. Folhas opostas cruzadas, ovais, grandes, ásperas, mucronadas arredondadas na base com 4 a 8 glândulas na página inferior, de nervuras salientes; a página inferior tem a cor prateada visível à distância, quando venta. Inflorescências terminais, ramificadas, com flores amarelas, em umbelas paniculadas; pedicelo crasso, branco e tomentoso. Fruto sâmara, tomentosa. Planta nativa do campo cerrado, tolerante a solos ácidos e pobres, desenvolve-se a sol pleno. Multiplica-se por sementes. (GRANDI, 2014, p. 447).

Figura 21 - Fotografias de flores e folhas de *Banisteriopsis argyrophylla*



Fonte: a autora.

A *B. argyrophylla*, assim como a *B. campestris* e *B. laevifolia*, são chamadas de cipó-prata ou cipó-folha-de-prata, sendo usadas na medicina popular no tratamento de problemas renais (cálculos renais e diuréticos) e anti-inflamatório, para dores relacionadas à bexiga, blenorragias, clareamento da pele e manchas, hemorragias ovarianas, na gonorreia e em nefrites (RODRIGUES; CARVALHO, 2007, PLANTAMED, 2014). Há uma preocupação

com relação à diferenciação dessas espécies, uma vez que vem ocorrendo o uso indiscriminado e a falta de maiores informações nos rótulos de medicamentos vegetais comercializados em ervanarias e raizeiros brasileiras. Scheffer (2014) realizou uma investigação fitoquímica com extratos adquiridos na cidade de São Paulo cujo rótulo é mostrado na Figura 22, verificando que o material vegetal em questão era da *B. laevifolia* também conhecida como *B. gardneriana* e não da *B. argyrophylla*.

Figura 22 - Rótulo de produto comercializado na cidade de São Paulo, com identificação do material referida como “*B. argyrophylla*”



Fonte: Scheffler (2014).

Logo a investigação fitoquímica da espécie *B. argyrophylla* é de grande importância. Além disso, é interessante estudar o potencial de atividades biológicas e química da mesma, pois não há relatos na literatura. Tais estudos ainda são reforçados, visto que outras espécies do mesma família e gênero apresentaram resultados promissores (MACIEL et al., 2002, PINTO et al., 2002).

2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico biomonitorado das folhas de uma planta nativa do cerrado, a *Banisteriopsis argyrophylla*, bem como avaliar as atividades dos compostos.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Preparar o extrato em etanol 95% das folhas de *B. argyrophylla*;
- ✓ Particionar o extrato etanólico utilizando solventes de polaridade crescente;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações;
- ✓ Avaliar as atividades inibidoras das enzimas α -amilase e α -glicosidase do extrato etanólico e frações;
- ✓ Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do extrato etanólico e frações contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*;
- ✓ Identificar a classe de compostos presentes no extrato etanólico e frações;
- ✓ Avaliar os teores de fenóis, proantocianidinas e flavonoides do extrato etanólico e frações;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade em célula Vero (ATCC CCL 81) do extrato etanólico e frações;
- ✓ Realizar fracionamento cromatográfico, identificar e/ ou isolar os compostos bioativos da fração acetato de etila.

3 *Materiais e métodos*

3.1 Generalidades metodológicas

O teor de umidade das folhas foi medido utilizando uma balança de luz infravermelha Kett, modelo FD-600, com 1,0 g de amostra a 105 ± 5 °C.

As amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D.

Os solventes utilizados nas extrações, partição líquido-líquido, prospecção fitoquímica e análises por CC e CCD foram das marcas Merck, Synth e Vetec. O etanol utilizado para extração tinha grau de pureza comercial 95°GL.

As fases orgânicas foram concentradas sob pressão reduzida em um evaporador rotatório Ika, modelo RV 10.

A liofilização foi realizada no aparelho Terroni, modelo LS3000.

O banho de aquecimento foi realizado na placa aquecedora FISATOM modelo 550.

O preparo das amostras das folhas da *B. argyrophylla*, bem como as determinações dos teores de fenóis totais, proantocianidinas, flavonoides, análises por CC, CCD e CLAE e a avaliação da atividade antioxidante foram realizados no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Alberto de Oliveira. A leitura de densidade ótica para estes ensaios foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS Genesysis, modelo 10S e os resultados foram obtidos em absorbância.

Os ensaios para as atividades inibitórias do extrato etanólico e frações frente à α -amilase e α -glicosidase foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola.

Os ensaios da atividade antifúngica do extrato etanólico e frações foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da UNIFRAN em Franca aos cuidados do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

Os ensaios para determinar a atividade citotóxica do extrato etanólico e frações foram realizados no Laboratório de Biologia Celular de Tripanossomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva.

A Tabela 5 mostra alguns reagentes e marcas utilizadas nos ensaios.


Tabela 5 - Reagentes utilizadas no desenvolvimento da pesquisa

Reagentes	Marca	CAS
quercetina	Arborvita	117-39-5
Folin Ciocalteu	Cromoline	521-24-4
ácido gálico	Sigma-Aldrich	149-91-7
catequina	Sigma-Aldrich	154-23-4
cloreto de alumínio	Vetec Química Fina	7446-70-0
vanilina	Vetec Química Fina	121-33-5
substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- α -CNP)	Sigma-Aldrich	-
substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p-NPG)	Sigma-Aldrich	3767-28-0
DMSO	Sigma-Aldrich	67-68-5
2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)	Sigma-Aldrich	1898-66-4
2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol (BHT)	Sigma-Aldrich	128-37-0
C ₁₈ sílica gel	Sorbent Technologies	-

3.2 Coleta e identificação do material botânico

Folhas de *B. argyrophylla*, Malpighiaceae, foram coletadas em novembro de 2014 na fazenda Passa Três localizada no município de Monte Alegre de Minas (MG), Brasil (18°34'56.85"S e 49°2'52.61"O) mediante ao aceite de acesso ao patrimônio genético que está em vigência com o número de registro 010738/2014-2 (Figura 23). A planta foi identificada pela prof^a. Dr. Maria Cândida Henrique Mamede do Instituto de Botânica de São Paulo e depositada no herbário da UFU, com o número de registro 67.076. Foi obtido o termo de responsabilidade para o transporte de amostra.

Figura 23 - Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético

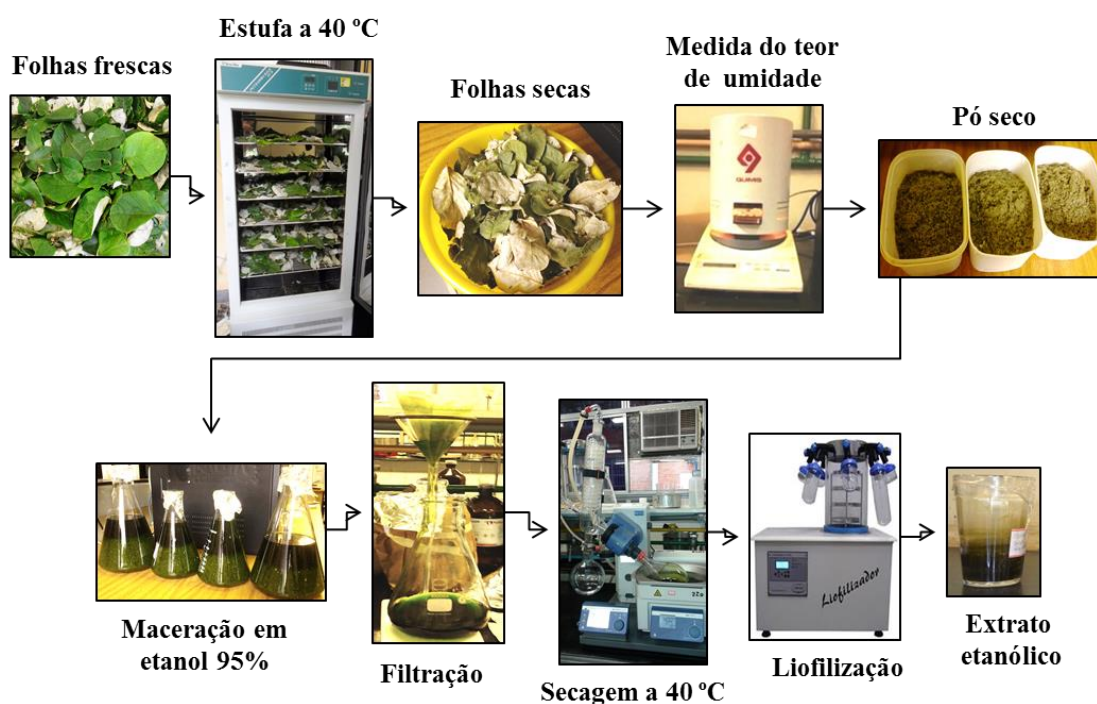
 Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica. Brasília, 24 de Outubro de 2014 Marcelo Marcos Moraes Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010	Processo: 010738/2014-2 Validade: 03/11/2014 a 03/11/2018 Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA CNPJ: 256.483.870/0001-18 Pesquisador: Alberto de Oliveira CPF: 041.291.936-27 RG: MG8708734 - SSP / MG Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 452025088956181 para recuperá-la do banco de dados do CNPq
--	--

Fonte: a autora.

3.3 Preparo do extrato

As folhas foram coletadas e deixadas em estufa a 40 °C por 48 h. Em seguida foram trituradas utilizando um multiprocessador e o pó resultante (746,1 g) foi submetido à extração com etanol 95% (5 × 2,5 L), mantendo um intervalo de 7 dias entre as extrações. O extrato foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotatório a pressão reduzida e banho a 40 °C, sendo obtido o extrato etanólico (86,7 g). O rendimento da extração foi de 11,63% (Tabela 6). A Figura 24 mostra um esquema do procedimento de extração.

Figura 24 - Esquema do preparo do extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*



Fonte: a autora.

Tabela 6 - Rendimento das extrações em etanol 95% com folhas de *B. argyrophylla*

Extração	Massa do extrato (g)
1ª Extração	34,38
2ª Extração	21,25
3ª Extração	13,78
4ª Extração	10,77
5ª Extração	6,60
Total	86,78

3.4 Determinação da atividade antioxidante

3.4.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)

Foram preparadas as seguintes soluções:

Solução A: 35,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DPPH em CH_3OH com absorvância máxima de 0,999 em 517 nm.

Solução B: solução metanólica do extrato e frações (Tabela 9, p. 55).

Solução C: 0,1 mL de solução A e 2,9 mL de B. Para obtenção do branco, foi substituído a solução B por CH_3OH . A solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 1 hora e em seguida foi registrado o decréscimo da absorvância no comprimento de onda de 517 nm.

As amostras foram preparadas em triplicata e em CH_3OH nas faixas de concentrações mostradas na Tabela 7. Como controle positivo foi considerado uma solução de BHT.

Tabela 7 - Faixa de concentração de extrato etanólico e frações na análise no ensaio do DPPH

Amostras	Concentração de amostra na cubeta ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EE	19 – 127
FH	78 – 520
FDCM	75 – 520
FAE	17 – 121
FB	17 – 127
FH ₂ O	75 – 546
BHT	46 – 320

Os cálculos do percentual do radical livre foram efetuados a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ de radical DPPH sequestrado} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH; $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra) e $\text{Abs}_{\text{branco}}$ é a absorvância da amostra em CH_3OH .

Foi plotado um gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado versus as concentrações das amostras nas cubetas e por meio da equação de reta foi calculada a concentração efetiva

(CE_{50}), que corresponde à concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH (MORAIS et al., 2008).

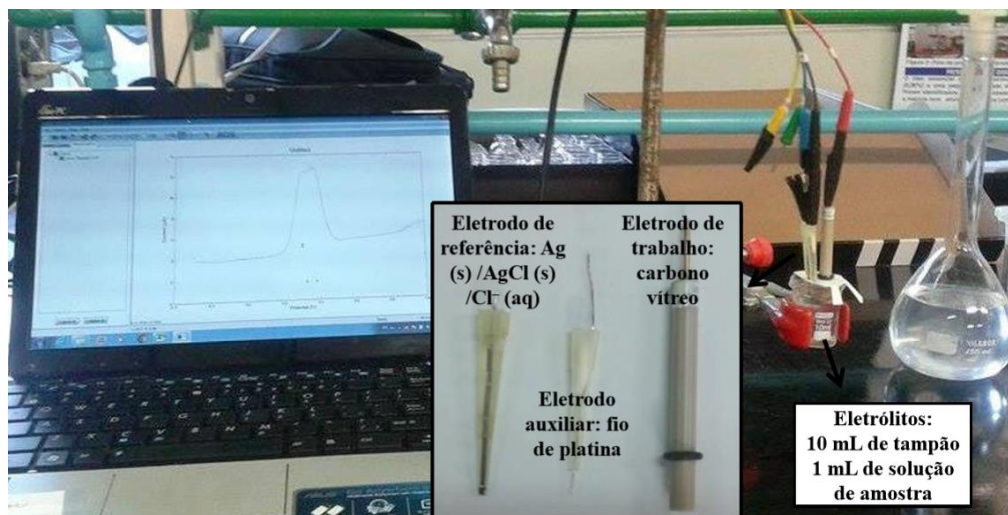
3.4.2 Voltametria por pulso diferencial (VPD)

O procedimento de VPD foi realizado considerando a metodologia proposta por Sousa (2014). Para isto, foi empregado um potenciostato Drop Sens μ Stat 200 e o software Drop View 1.0 foi utilizado para aquisição dos dados. No experimento foi utilizada uma célula eletroquímica acoplada ao potenciostato, na qual continha um sistema com três eletrodos: o de trabalho de carbono vítreo (diâmetro de 1,5 mm conectado ao sistema com um fio vermelho); o de referência de $Ag_{(s)} / AgCl_{(s)} / Cl^{-}_{(aq)}$ (saturado em cloreto de potássio (KCl) (fio azul) e o auxiliar composto por um fio de platina (fio preto).

Foi aplicado um potencial em uma taxa controlada com velocidade de varredura (S_{rate}) igual a 25 mV s^{-1} com faixa de potencial entre -0,3 a 1,0 V. A altura do potencial (E_{puls}) foi de 60 mV, a duração do pulso (t_{puls}) de 10 ms, o degrau de potencial (E_{step}) de 6 mV. O tempo de coleta da corrente (“*sampling period*”) foi de 50 ms. O eletrodo de carbono vítreo foi polido entre as medidas voltamétricas.

Foi utilizado 10 mL de solução tampão fosfato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 contendo KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e 1,0 mL de solução do extrato etanólico ou fração (na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) em CH_3OH . O procedimento foi repetido utilizando solução tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5 contendo KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,0 mL de amostra ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$). A Figura 25 mostra o sistema considerado nesse ensaio.

Figura 25 - Montagem experimental da técnica de VPD



Fonte: a autora.

3.5 Determinação das atividades inibitórias das enzimas α -amilase e α -glicosidase

3.5.1 Ensaio com a α -amilase

Para a determinação da atividade inibitória da α -amilase do extrato etanólico foi considerado o método cinético da reação dela com o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- α -CNP).

Inicialmente, foi feita a coleta de amostra de saliva humana pelo método de cuspe (DE GOUVEIA et al., 2014). Uma fração da saliva enriquecida de α -amilase (f-AS) foi diluída 1000 vezes em 50,0 mM de tampão ácido 2-(*N*-morfolino)etanossulfônico (MES), constituído por uma mistura de cloreto de cálcio (5,0 mM), tiocianato de potássio (140,0 mM) e cloreto de sódio (300,0 mM) em pH 6,0. O ensaio foi realizado em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas diluições seriadas com as concentrações finais das amostras variando entre 0,7 a 73,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO. Inicialmente, 5,0 μg das amostras do extrato etanólico/frações foram incubadas com 45,0 μg de f-AS, durante 30 minutos a 37° C. Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de 8,0 μL das amostras incubadas e 320,0 μL do substrato GAL-G2- α -CNP (12 mmol.L^{-1}). Após esta adição, foi realizada a leitura dos valores de absorbâncias que foram medidos a 405 nm, durante 3 minutos, com intervalo de 1 minuto, a 37° C.

O controle foi realizado substituindo o extrato/fração por tampão MES. A acarbose foi utilizada como controle positivo, cujo CE_{50} para esse ensaio foi igual a $0,08 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O resultado foi dado em porcentagem de inibição da α -amilase, calculado por meio da seguinte equação:

$$\text{Inibição de alfa-amilase (\%)} = \frac{\text{Asc}_{\text{controle}} - \text{Asc}_{\text{amostra}}}{\text{Asc}_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde: $\text{Asc}_{\text{controle}}$ é a área sob a curva na ausência de extrato/fração

$\text{Asc}_{\text{amostra}}$ é a área sob a curva na presença de extrato/fração.

O CE_{50} , que corresponde à concentração da amostra necessária para inibir 50% dessa enzima, foi calculado plotando gráficos não lineares da porcentagem de inibição da α -amilase versus as concentrações das amostras.

Para o cálculo do CE_{50} foi considerado o método proposto por Michaelis-Menter (pois os dados forneceram curvas hiperbólicas), considerando a equação abaixo:

$$v_0 = \frac{v_{\text{máx.}} [S]}{K_m + [S]}$$

Se $k_m = [S]$ então $v_0 = 1/2(v_{\text{máx.}})$

Onde: K_m é a constante de Michaelis- Menten que corresponde à afinidade da enzima pelo substrato $[S]$; v_0 é a velocidade inicial e v_m é a velocidade máxima.

3.5.2 Ensaio com a α -glicosidase

Para a determinação da atividade inibidora do extrato etanólico e frações frente α -glicosidase foi inicialmente preparado uma fração de pó cetônico de intestino de rato enriquecida com a enzima α -glicosidase (f-AG), considerando o método cinético da reação dessa enzima com o substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) (TOMA et al., 2014, SHAN et al., 2016).

O ensaio foi realizado em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram efetuadas diluições seriadas com as concentrações finais das amostras variando entre $0,1 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO. Inicialmente, $15,0 \mu\text{L}$ destas amostras do extrato etanólico/frações incubadas com $45,0 \mu\text{L}$ de f-AG e $30,0 \mu\text{L}$ de glutatona reduzida $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (diluída em tampão fosfato a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 6,8), durante 20 minutos a 37°C . Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de $60,0 \mu\text{L}$ das amostras incubadas e $220,0 \mu\text{L}$ do substrato *p*-NPG ($4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, em tampão fosfato de sódio a $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 6,8). Após esta adição foi efetuada a leitura dos valores de absorbâncias que foram medidos a 405 nm , durante 3 minutos, com intervalo de 1 minuto, a 37°C .

O controle foi realizado substituindo o extrato/fração por tampão MES. A acarbose foi utilizada como controle positivo, cujo CE_{50} para esse ensaio foi igual a $4,0 \times 10^{-3} \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O resultado é dado em porcentagem de inibição da α -glicosidase que foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Inibição de alfa-glicosidase (\%)} = \frac{Asc_{\text{controle}} - Asc_{\text{amostra}}}{Asc_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde: Asc_{controle} é a área sob a curva na ausência de extrato/fração, e Asc_{amostra} é a área sob a curva na presença de extrato/fração.

Foi calculado o CE_{50} da α -glicosidase analisando regressões lineares de curvas analíticas de gráficos da porcentagem de inibição dessa enzima versus concentração das amostras.

3.6 Determinação da atividade antifúngica frente à *Candida spp.*

As leveduras foram obtidas da “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Rockville MD, USA). Os seguintes micro-organismos foram utilizados neste trabalho: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126).

Os ensaios foram realizados utilizando o método da microdiluição em caldo considerando as normas preconizadas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

Soluções de estoque foram inicialmente preparadas dissolvendo as amostras dos extratos, frações e composto isolado em DMSO na concentração $192.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Diluições com as soluções de estoque foram realizadas em meio de cultura RPMI 1640 tamponado a pH 7,2 com $0,165 \text{ mol L}^{-1}$ do ácido 3-*N*-morfolinopropanosulfônico (MOPS) a $12.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo estas as soluções de trabalho. O inóculo foi preparado usando método espectrofotométrico e comparado a escala de McFarland 0,5 para se obter o valor de $6,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} . Em seguida foram realizadas as diluições recomendadas pela CLSI (2008) em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $1,2 \times 10^3$ UFC mL^{-1} .

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas diluições seriadas com as concentrações finais das amostras variando entre 1,5 a $1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. O meio de cultura utilizado foi o caldo RPMI tamponado com MOPS com pH final de 7,2. Cada poço recebeu $100,0 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo e o volume final em cada poço foi de $200,0 \mu\text{L}$. O controle positivo utilizado foi à droga anfotericina B, sendo diluída em caldo para obter concentrações entre 0,1 a $16,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O controle negativo (DMSO) foi testado com concentrações variando de 10% a 1% v/v e não influenciou no crescimento das leveduras. O meio de cultura adicionado de inóculo foi usado como controle de crescimento.

Para a validação dos ensaios, o controle positivo anfotericina B foi testado frente a cepas de referência *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) dentro de uma faixa de CIM entre 0,2 a $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a *C. Krusei* e 0,2 a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para

a *C. parapsilosis*. Caso o valor de CIM esteja dentro dessa faixa para essas leveduras, a metodologia e os resultados para as demais leveduras testadas estão validados segundo o protocolo de referência M207-A3 do CLSI (2008).

Ao final do procedimento foi calculada a CIM que corresponde à concentração mínima da amostra capaz de inibir o crescimento das leveduras (HOMANS; FUCHS, 1970, CHOMA; JESIONEK, 2015).

3.7 Determinação da atividade citotóxica contra células Vero

O teste de concentração citotóxica (CC_{50}) foi realizado com células Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África) em placas de 96 poços. Foi preparada uma solução estoque das amostras em CH_3OH e meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado a concentração de $640,0 \mu g mL^{-1}$. O meio foi suplementado com soro fetal bovino a 10%, L-glutamina (2 mM), D-glicose ($4500 mg L^{-1}$), bicarbonato de sódio ($2.000 mg L^{-1}$), HEPES ($2.380 mg L^{-1}$), piruvato de sódio ($1.100 mg L^{-1}$), penicilina ($60 mg L^{-1}$), gentamicina ($40 mg L^{-1}$) e estreptomicina ($10,0 mg L^{-1}$).

Na realização do teste foi preparada uma solução contendo 1×10^6 células em 10,0 mL de meio DMEM suplementado, desta foram pipetados $100,0 \mu L$ para cada poço da análise. A placa foi incubada em câmaras úmidas a $37^\circ C$ a 5% de CO_2 por 6 horas, então o DMEM foi retirado e adicionado às concentrações 512, 256, 128, 64, 32, 16 e $8 \mu g mL^{-1}$ da amostra a partir da solução estoque, o teor de CH_3OH não ultrapassou 3%. O volume final de cada poço foi de $100,0 \mu L$ e a quantidade de células presentes em cada poço foi de 1×10^4 células. A placa foi incubada por 48 horas a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 com atmosfera úmida.

Foram realizados os controles de crescimento celular; do solvente; das amostras; controle negativo (células lisadas 100%) e controle do meio. Após o tratamento foi adicionado $10,0 \mu L$ de solução de resazurina a 3,0 mM em *Phosphate Buffered Saline* (PBS), em cada poço. As placas foram incubadas novamente durante 24 horas nas mesmas condições anteriores (ROLÓN et al., 2016).

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplaca a 594 nm, com estes valores foi determinada a viabilidade celular em relação ao controle de crescimento.

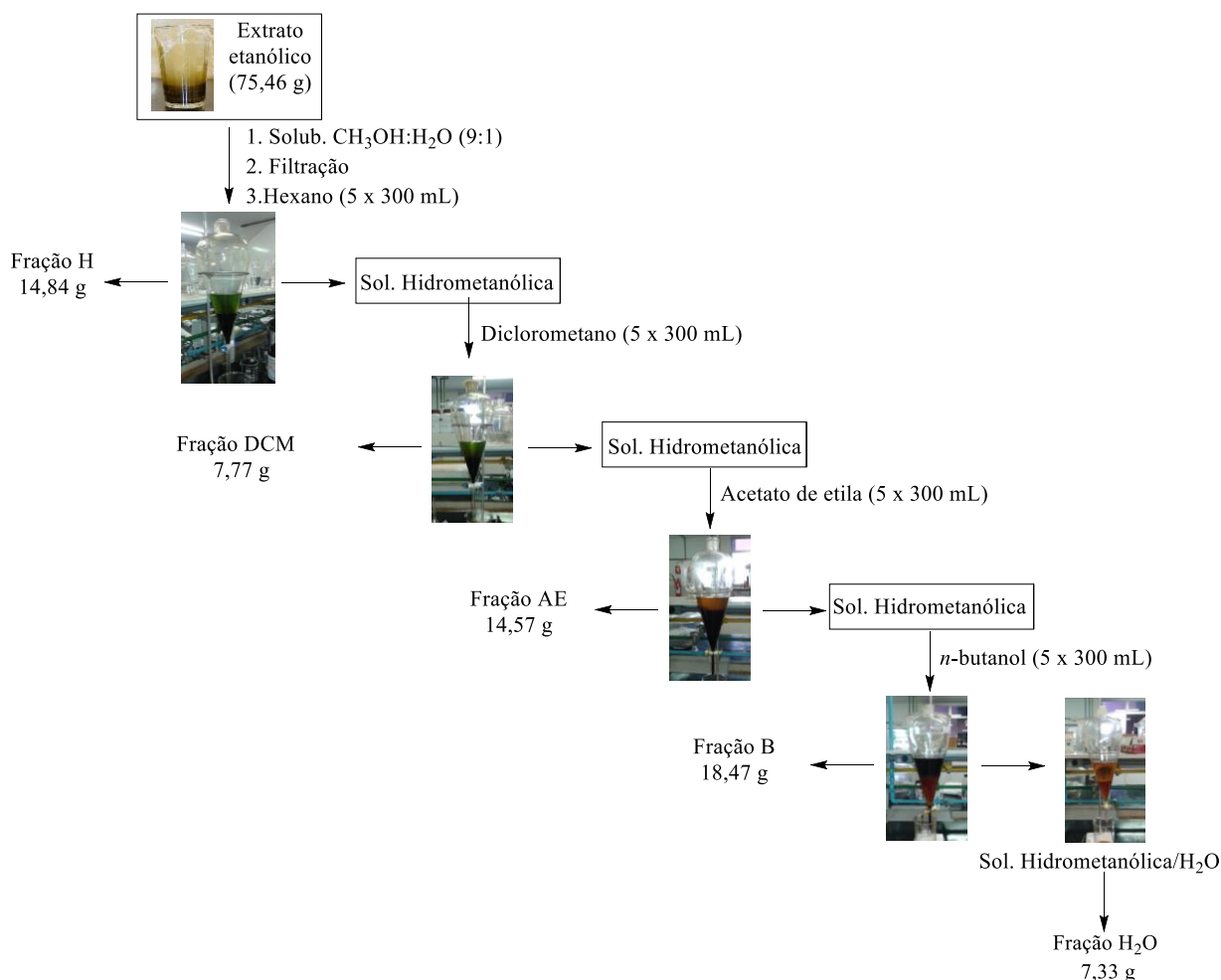
A CC_{50} que a corresponde concentração necessária para que se tenha 50% das células lisadas foi calculada por um gráfico de dose resposta (viabilidade celular versus as concentrações da amostra) com regressão não linear (CHIBALE et al., 2007).

3.8 Isolamento e identificação dos metabólitos secundários das folhas de *B. argyrophylla*

3.8.1 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*

O extrato etanólico (EE) (75,5 g) foi dissolvido em 300,0 mL de CH₃OH:H₂O (9:1), filtrado e submetido ao fracionamento via extração líquido-líquido com hexano (H) (5 × 300,0 mL), diclorometano (DCM) (5 × 300,0 mL), acetato de etila (AE) (5 × 300,0 mL) e *n*-butanol (B) (5 × 300,0 mL), sucessivamente, restando a fração aquosa. A Figura 26 e a Tabela 8 mostram os dados obtidos no final destas três extrações.

Figura 26 - Esquema da extração líquido/líquido do extrato etanólico de folhas de *B. argyrophylla*



Fonte: a autora.

Tabela 8 - Rendimentos obtidos na extração líquido/líquido do extrato etanólico de folhas de *B. argyrophylla*

Frações	Extrações					Massa (g)	Rendimento (%)
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a		
FH	8,87	3,53	1,81	0,36	0,27	14,84	19,66
FDCM	3,60	2,57	0,85	0,62	0,13	7,77	10,29
FAE	5,74	3,36	2,35	1,52	1,60	14,57	19,30
FB	9,24	5,03	1,46	1,99	0,75	18,47	24,47
FH ₂ O	7,33	-	-	-	-	7,33	9,71

3.8.2 Prospecção fitoquímica

Com o objetivo de identificar as classes dos MS presentes nas folhas da *B. argyrophylla* foram preparadas soluções em CH₃OH concentração de 1,0 mg mL⁻¹ dos extratos e frações. Em seguida, foi realizada a prospecção fitoquímica que é baseada na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos (reveladores). Foi considerada a metodologia descrita por Wagner; Bladt (2001) que propõe o uso da CCD.

Foram utilizadas as seguintes fases estacionárias (FE) e fases móveis (FM).

- ✓ FE: placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) (0,2 mm, Macherey-Nagel).
- ✓ FM1: acetato de etila: ácido acético (H₃CCO₂H): ácido fórmico (HCO₂H): H₂O (10:1,1:1,1:2,6) e FM2: clorofórmio (CHCl₃): CH₃OH: hidróxido de amônio (NH₄OH) (9:1:0,25).

Para as visualizações em placas cromatográficas foram preparadas soluções específicas para detecção de cada classe de compostos. Seguem os reveladores utilizados:

- **Detecção de flavonoides:**

Revelador NP/ PEG:

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

Solução B: Solução etanólica a 5% (m/v) de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000).

Solução estoque: Misturar A e B (10:8)

Solução spray: Misturar a solução estoque.

Observação: Após a eluição das placas, essas foram visualizadas sob radiação ultravioleta (254 e 365 nm) e os compostos de interesse separados.

- **Detecção de terpenos e esteroides:**

Revelador Liebermann-Burchard:

Solução na seguinte proporção de reagentes: anidrido acético ($C_4H_6O_3$):ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4):etanol (5:5:50) adicionados nessa mesma ordem e em banho de gelo. Após a eluição as placas foram aquecidas a 100 °C de 5 a 10 minutos.

- **Detecção de terpenos, esteroides, fenol e açúcar:**

Revelador anisaldeído:

Solução com: Anisaldeído: H_3CCO_2H : CH_3OH : H_2SO_4 (0,5:10:85:5).

Observação: os reagentes foram adicionados nessa mesma ordem e em banho de gelo. Após a eluição as cromatoplasmas foram aquecidas a 100 °C de 5 a 10 minutos.

- **Detecção de compostos fenólicos em geral**

Revelador sulfato cérico $Ce(SO_4)_2$:

Solução de 20,0 mL de H_2O com 0,7 g de $Ce(SO_4)_2$. Após a eluição foi borrifado sobre as placas solução de H_2SO_4 a 7% em H_2O (m/v).

- **Detecção de alcaloides:**

Revelador de iodocloroplatinato (ICPt):

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatínico (IV) ($H_2(PtCl_6).6H_2O$).

Solução B: Solução aquosa a 10% (m/m), de iodeto de potássio (KI).

Solução *spray*: Misturar solução A, solução B e H₂O (1:9:10).

Revelador Dragendorff:

Solução A: 0,8 g de subnitrito de bismuto (BiONO₃) numa mistura de 10,0 mL de H₃CCO₂H e 40,0 mL de H₂O.

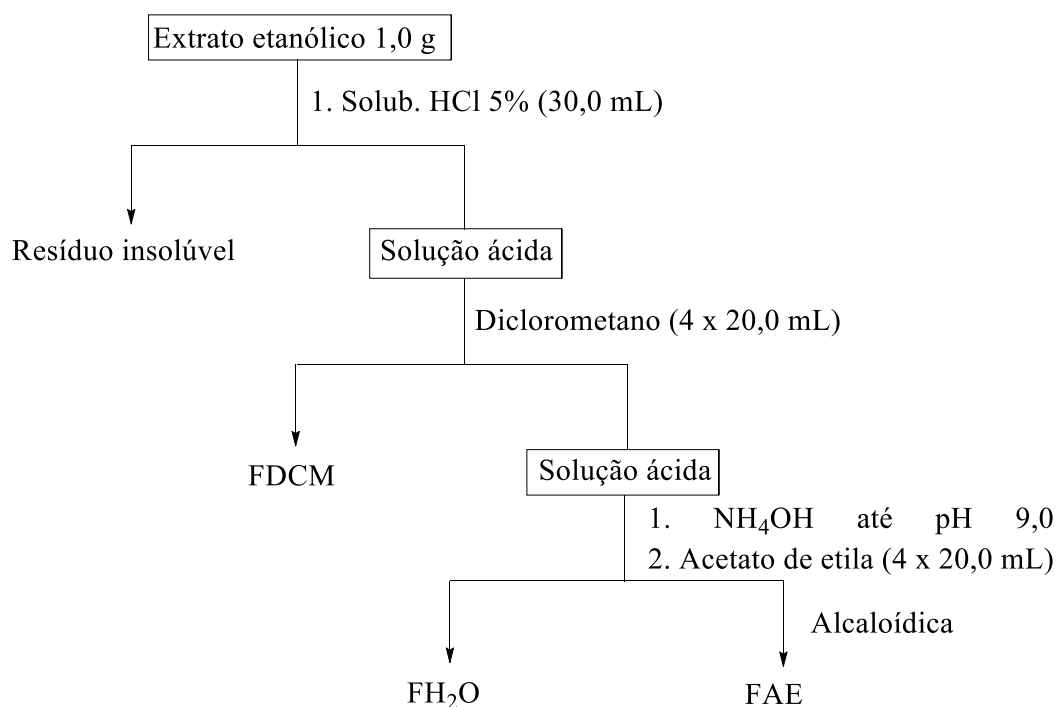
Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio em 20,0 mL de H₂O.

Solução estoque: Misturar A e B (1:1) Solução *spray*: Misturar solução estoque: H₃CCO₂H: H₂O (1:2:10).

3.8.3 Extração ácido-base

Para confirmar se havia presença de alcaloides, foi utilizado o método de extração ácido-base de Stas-Otto descrito por SRIPHONG et al. (2003). Para a extração foi pesado 1,0 g de extrato etanólico, que foi solubilizado em solução de ácido clorídrico (HCl) (5%) e particionado com DCM. Em seguida, a fase aquosa foi neutralizada com a solução de NH₄OH a 30% até pH 9,0 e particionada com acetato de etila para obter a fração alcaloídica (Figura 27).

Figura 27 - Extração ácido-base



Fonte: a autora.

3.8.4 Análise espectroscópica UV-Vis

Os espectros de UV-VIS do extrato etanólico e frações foram obtidos visando à identificação das classes de metabólitos. Amostras na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (foi realizada diluições considerando a Lei de Beer-Lambert) foram solubilizadas em CH_3OH . A linha de base do aparelho foi calibrada com CH_3OH . Os espectros de UV-VIS foram obtidos através da leitura das absorvâncias entre 200 e 800 nm, com uma velocidade de varredura de 15 nm por segundo. Foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Hitachi, modelo U-2000.

3.8.5 Determinação do teor de fenóis totais

Foi preparada uma mistura com 0,5 mL de solução metanólica das amostra (as concentrações estão na Tabela 9, foi considerado a Lei de Beer-Lambert); 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 2,0 mL de uma solução recém-preparada de carbonato de sódio 7,5% (m/v). A mistura foi mantida por 5 minutos, em banho a 50°C , e em seguida foi realizada a leitura da absorvância a 760 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a solução de amostra por CH_3OH . As amostras foram preparadas em triplicata, tendo como controle positivo, uma solução de ácido gálico, nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$. O teor de fenóis totais foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (MORAIS et al., 2008).

Tabela 9 - Concentrações de extrato e frações utilizados na determinação do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EE	100
FH	200
FDCM	500
FAE	100
FB	100
FH ₂ O	500

3.8.6 Determinação do teor de proantocianidinas

Foi preparada uma mistura com 2,0 mL de solução metanólica das amostras (Tabela 9) e 3,0 mL solução de vanilina ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) em ácido sulfúrico 70% (m/m). A mistura foi mantida por 15 minutos em banho a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, foi feita à leitura da absorvância a 500 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a solução de amostra por CH_3OH . As amostras foram preparadas em triplicata, tendo como controle positivo, uma solução de catequina, nas concentrações de 5; 10; 15; 20; 25 e $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. O teor de proantocianidinas foi expresso em miligramas de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato (MORAIS et al., 2008).

3.8.7 Determinação do teor de flavonoides

Foi preparada uma mistura com 2,0 mL de solução em metanol de amostra (Tabela 9), 1,0 mL de solução em metanol de cloreto de alumínio 5% (m v^{-1}) e 2,0 mL de CH_3OH . A mistura foi mantida por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a leitura da absorvância a 425 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a solução de amostra por metanol. As amostras foram preparadas em triplicata, tendo como controle positivo, uma solução de quercetina nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. O teor de flavonoides foi expresso em miligramas de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato (WOISKY; SALATINO, 1998).

3.8.8 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

A fração AE foi submetida à análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) que foi realizada utilizando um cromatógrafo Acquity I Class (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução modelo Synapt G2-S (Waters), operando no modo negativo. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C_{18} Acquity HSS T3 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $1,8 \text{ } \mu\text{m}$) (Waters). Todos os solventes utilizados no procedimento experimental foram de grau HPLC ou destilados previamente. Foi utilizada água purificada previamente por osmose reversa utilizando um deionizador. Para o preparo da amostra foi considerando a concentração inicial de $10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Foram feitas injeções e diluições de acordo com o sinal observado, visando determinar a melhor concentração (concentração onde é possível detectar as maiores

quantidades de substâncias sem saturar o sinal dos fragmentos mais intensos). Foi utilizado como fase móvel um gradiente de ACN e água (2:98), acidificados com HCO₂H (0,1%, v/v), conforme mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Sistema de gradiente utilizando na análise por CLUE

Tempo (min)	% de H₂O + 0,1% de HCO₂H	% de ACN + 0,1% de HCO₂H
Inicial	98,0	2,0
1,0	90,0	10,0
6,0	70,0	30,0
8,0	2,0	98,0
9,0	2,0	98,0
9,1	98,0	2,0
14,5	98,0	2,0

Foi utilizando um de espectrômetro de massas (Synapt G2-S HDMS) acoplado ao cromatógrafo líquido. As análises foram realizadas com ionização por *eletrospray* (IES) no modo negativo, considerando os seguintes parâmetros:

- Temperatura da fonte: 120 °C
- Cone de amostragem: 30 eV
- Temperatura de dessolvatação: 450 °C
- Fluxo do gás (N₂) de dessolvatação: 700.0 L Hr⁻¹

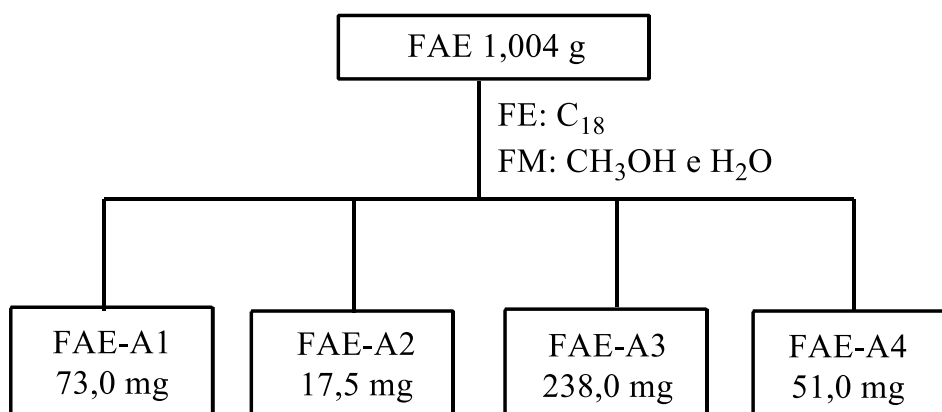
A aquisição dos dados foi feita no software: MassLynx versão 4.1, considerando os modo MS^E e DDA em modo Resolution. Nestes modos foram obtidas as massas acuradas das moléculas desprotonadas, juntamente com os respectivos fragmentos através de experimentos alternados utilizando baixa e alta energia de colisão. Adicionalmente, estes dados foram correlacionados com os tempos de retenção. E para o processamento dos dados foi considerado o software: Progenesis QI Metabolomics/Lipidomics versão 2.0.

3.8.9 Purificação da fração acetato de etila (AE) por cromatografia em coluna (CC)

A FAE (1,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) utilizando como FE C₁₈ (40–63 µm, 230–400 mesh, diâmetro de poro 60 Å) (h = 31,0 cm, diâmetro = 3,0 cm e m_{C18} = 61,2 g) e fase móvel FM um sistema de solventes em modo gradiente que consistiu de

H₂O:CH₃OH (95:05) até 100% de CH₃OH. O solvente presente nas frações coletadas foi evaporado a pressão reduzida em evaporador rotatório. Na sequência as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) (0,20 mm, Macherey-Nagel) como FE, acetato de etila:CH₃OH:hexano (3:1:2) como FM. As cromatoplasas foram inspecionadas em UV₃₆₅. As frações foram agrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f (FAE-A1–FAE-A4) considerando a presença de flavonoides, revelados com revelador NP/PEG (Figura 28) (WAGNER; BLADT, 2001) (Figura 28).

Figura 28 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (FAE) das folhas de *B. argyrophylla*



Fonte: a autora.

3.8.10 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As frações FAE-A1–FAE-A4 foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo que as amostras foram submetidas inicialmente a um tratamento prévio de “clean up”. As amostras foram pesadas (1,0 mg), solubilizadas em CH₃OH (1,0 mL) e filtradas utilizando um sistema constituído de seringa adaptada com uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), diâmetro de poro de 0,45 µm da marca Sulpelco. Em seguida, foi injetado um volume de 20 µL desse filtrado em um sistema Shimadzu LC-6AD com o detector de arranjo de diodo (DAD). Para o desenvolvimento de métodos de separação foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ (Phenomenex®, Lunna 250 × 4,6 mm, 5 µm). Foi utilizado como fase móvel um gradiente de ACN e água (5:95), acidificados com HCO₂H (0,1%, v/v), que consistiu de 5–40% de ACN (0–80 min), 40–100% de ACN (80–90 min), com fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

3.8.11 Análise por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (IES-EM)

As frações FAE-A1–FAE-A4 foram submetidas à espectrometria de massas utilizando um espectrômetro de alta resolução microQ-TOF (Bruker Daltonics), com ionização por *electrospray* (IES-EM), no modo negativo. As análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos das FCFRP/USP em Ribeirão Preto. As amostras foram solubilizadas em CH₃OH e introduzidas utilizando seringa (100,0 µL), adaptada a uma bomba de infusão com fluxo 100,0 µL h⁻¹. O capilar foi aquecido a 150 °C com fluxo de gás nebulizante 4 L min⁻¹ e 4 kV. Para as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) as energias de colisão foram ajustadas de acordo com cada íon precursor (moléculas desprotonadas, [M – H]⁻). Os dados obtidos foram medidas de alta resolução de massa e comparadas através do erro (em ppm) calculado em relação a massa exata utilizando a seguinte equação:

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

3.8.12 Análise por ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos utilizando os espectrômetros: Bruker AscendTM 600 Avance III HD (14,1 Tesla), operando a 600 MHz (¹H) e 150 MHz (¹³C) (disponível no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), da Unesp, campus de Araraquara) e Bruker AscendTM 400 Avance III HD (9,4 Tesla), operando a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C) (disponível no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU, campus de Santa Mônica). Os experimentos foram realizados a 30 °C, utilizando TMS (δ_{TMS} = 0,00) como padrão interno ou sinal residual do solvente (metanol-*d*₄ δ 3,30 e 49,0, como referência para ¹H e ¹³C, respectivamente).

3.8.13 Análise na região do infravermelho (RI)

O espectro na região do infravermelho foi registrados em um Shimadzu (PRESTIGE-21) em pastilhas de KBr (Vetec). A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU, campus de Santa Mônica.

3.9 Análise estatística

Para avaliar estatisticamente os resultados foi utilizado o programa Sigma Plot 11.0. Foi aplicado o método de Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Turkey para analisar a semelhança entre os dados, sendo considerados os valores com nível de significância menor ou igual 0,05 (5 %) para denotar diferença estatística significativa.

Foi calculado o coeficiente de correlação ou grau de relacionamento para dados amostrais pelo método de linear de Pearson que propõe o uso da seguinte equação abaixo:

$$r = \frac{n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)}{\sqrt{\left(n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 \right)} \sqrt{\left(n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 \right)}}$$

Onde: n é o número de observações e r é o coeficiente de correlação linear para uma amostra.

4 Resultados e discussão

4.1 Avaliação das atividades: antioxidante, inibitórias sobre a α -amilase e a α -glicosidase e antifúngica do extrato etanólico

Inicialmente foi avaliada a atividade antioxidante, inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase e antifúngica contra *Candida spp.* do extrato etanólico (EE) das folhas de *B. argyrophylla* através dos ensaios discutidos a seguir.

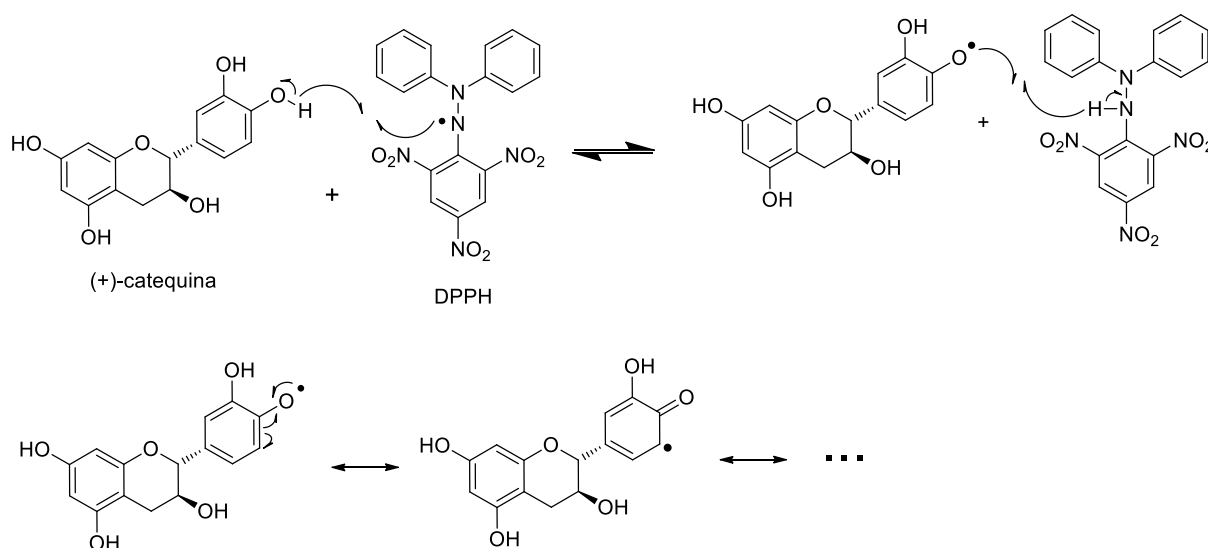
4.1.1 Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante foram realizadas as análises do sequestro do radical DPPH e determinado o potencial de oxidação e a corrente de pico através da voltametria de pulso diferencial (VPD).

4.1.1.2 Método do DPPH

O radical DPPH apresenta certa estabilidade devido ao efeito de ressonância ocasionado pela presença de ligações duplas alternadas nos anéis benzênicos e também pela presença dos grupos nitro (NO₂) (grupos retirados de elétrons) no anel picrilidrazil, pois auxiliam na estabilização do elétron desemparelhado (ALVES et al., 2010). O radical DPPH é reduzido, e com isso o elétron desemparelhado do N se emparelha com o elétron cedido pelo antioxidante. A Figura 29 mostra como exemplo, a estabilização por efeito de ressonância de um radical gerado a partir da reação de um flavonoide, a catequina, com o radical DPPH.

Figura 29 - Redução do DPPH pelo flavonoide antioxidante (+)-catequina



Fonte: a autora.

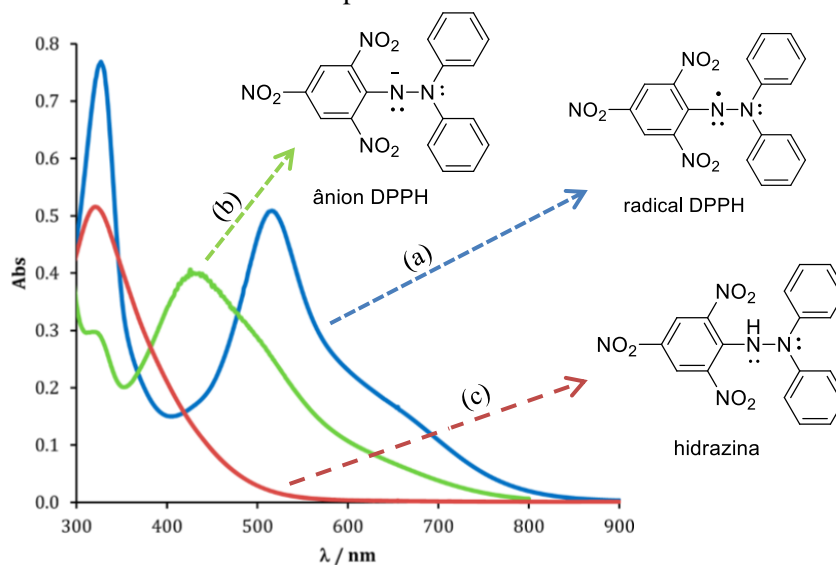
A Figura 30 ilustra o ensaio de DPPH realizado com o extrato etanólico. Foi observado um acentuado descoloramento das soluções. Isto ocorre devido às transições $\pi-\pi^*$ que são geradas durante o ensaio. A Figura 31 mostra um espectro de UV-vis com bandas de absorção. A banda (a) corresponde ao DPPH[•] que é responsável pela cor violeta. Com a redução deste radical por transferência de átomos de hidrogênio a partir de antioxidantes, há a formação da hidrazina DPPH-H, banda (c), e assim, ocorre alteração na cor da solução de violeta para amarelo (FOTI, 2015).

Figura 30 - Consumo do DPPH pelo extrato etanólico após por 1 hora em diferentes concentrações



Fonte: a autora.

Figura 31 - Espectro de soluções em CH_3OH de UV-vis do radical DPPH^\bullet , hidrazina (DPPH-H) e do ânion DPPH^- à temperatura ambiente



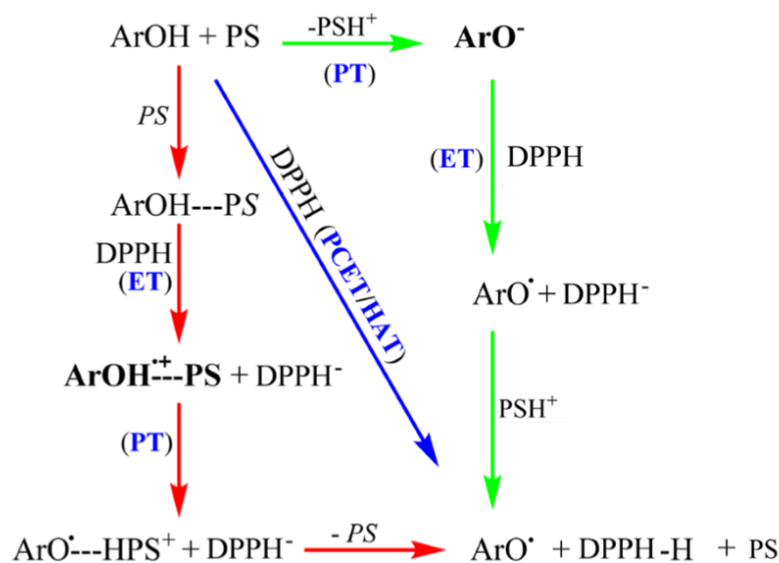
Fonte: adaptado de Foti (2015).

A fim de evitar interferências da hidrazina, o monitoramento da absorvância foi registrado em um espectrofotômetro no qual foi medido o decréscimo da absorvância do DPPH pela amostra em 517 nm, comprimento de onda no qual esse radical apresenta máximo de absorção e a hidrazina DPPH-H apresenta mínimo de absorção (FOTI, 2015).

Os radicais livres (ROO^\bullet , RO^\bullet , e DPPH^\bullet) reagem com compostos fenólicos (ArOH) por meio de três mecanismos diferentes: 1) via transferência de elétrons acoplada à transferência de próton (PCET - “*Proton Coupled Eletron Transfer*”), que ocorre transferência de hidrogênio atômico (HAT - “*Hydrogen atom transfer*”), 2) via transferência de elétrons (ET - “*Eletron Transfer*”) e por transferência de prótons (PT - “*Proton Transfer*”) ou 3) PT/ET (Figura 32). No mecanismo HAT, o átomo de H do grupo hidroxila fenólico é transferido para o radical DPPH, através da quebra homolítica da ligação O-H, formando um radical fenoxila (ArO^\bullet) e o DPPH-H (coloração amarela). Os mecanismos ET/PT e PT/ET são comumente simplificados pela transferência de elétrons pela perda de prótons (SPLET - *Sequential Proton Loss Electron Transfer*). No SPLET, ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos formando ânions fenolatos, e, em seguida, estes transferem um elétron para o radical DPPH, formando o ânion DPPH^- . O DPPH^- doa seu par de elétrons a um H^+ presente no meio reacional, formando o DPPH-H (LIU, 2010).

A predominância de um mecanismo ou outro irá depender de fatores, como polaridade média das substâncias envolvidas no sistema, potenciais de ionização, entre outros (FOTI, 2015).

Figura 32 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH e os compostos fenólicos, considerando a influência dos solventes polares (PS)



Fonte: Adaptado de Foti (2015).

O ensaio do potencial antioxidante foi expresso em CE_{50} . O CE_{50} corresponde à concentração eficiente de amostra necessária para reagir com 50% de radical DPPH que foi calculado através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado após 1 hora de reação versus as concentrações de extrato/frações. O valor médio obtido para o EE foi igual a $4,27 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, comparável ao controle positivo o BHT ($CE_{50} = 5,31 \pm 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Quanto menor o valor de CE_{50} , melhor a atividade antioxidante que a amostra irá apresentar. Como proposto por Reynertson, Basile e Kennelly (2005), que correlaciona faixas de CE_{50} com a intensidade do potencial antioxidante (Tabela 11), o valor de CE_{50} obtido para o extrato etanólico é considerado promissor.

Tabela 11 - Relação entre as intensidades de CE_{50} com a atividade antioxidante

CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intensidade do potencial antioxidante
< 50	Elevada
50 – 100	Moderada
100 – 200	Baixa
> 200	Inativa

Fonte: Reynertson, Basile e Kennelly (2005).

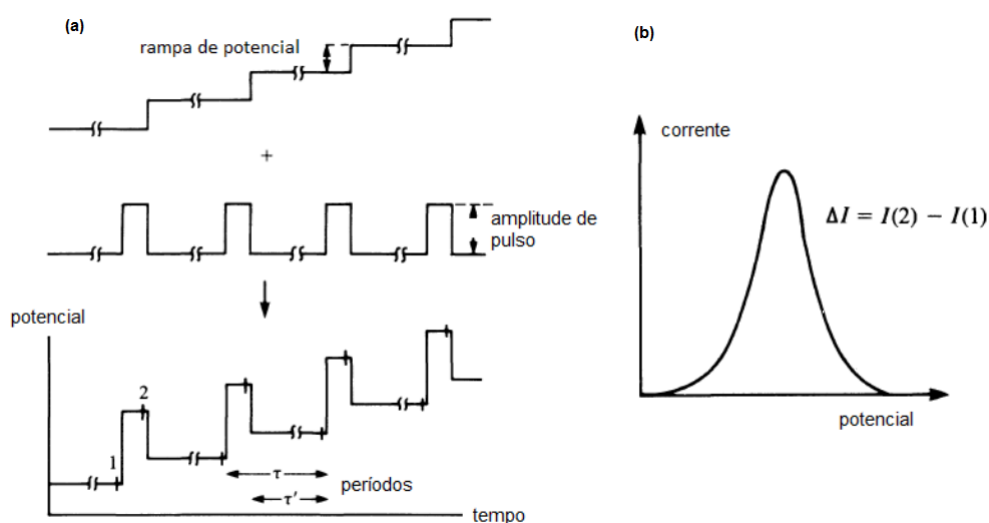
Comparando este resultado com dados da literatura foi verificado que o extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*, apresenta melhor atividade antioxidante do que extratos etanólicos das folhas da *Banisteriopsis laevifolia* ($22,05 \pm 2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e de galhos e folhas da *Banisteriopsis oxyclada* ($6,38 \pm 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $25,90 \pm 1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), espécies do mesmo gênero (FARIA et al., 2014, MARTINS et al., 2014, NUNES et al., 2014).

4.1.1.3 Método da VPD

A VPD é baseada nas propriedades elétricas de uma solução que apresenta espécies de interesse (analito). Essa solução foi colocada em um sistema contendo uma célula eletroquímica, que é constituída de três eletrodos (trabalho, referência e contra eletrodo). No eletrodo de trabalho ocorreram as reações redox de interesse. O eletrodo de referência permite que o potencial permaneça constante ao longo das medidas experimentais e o contra eletrodo minimiza as possíveis reações paralelas que poderiam ocorrer no sistema. Entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência ocorreu a medida do potencial. E entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo ocorreu à medida da corrente (OLDHAM; MYLAND, 2001).

Além disso, durante as medidas foram aplicados ao eletrodo de trabalho pulsos com uma amplitude constante (10-100 mV) que foram sobrepostos a uma rampa de potencial crescente. A Figura 33 mostra uma representação esquemática dessa combinação.

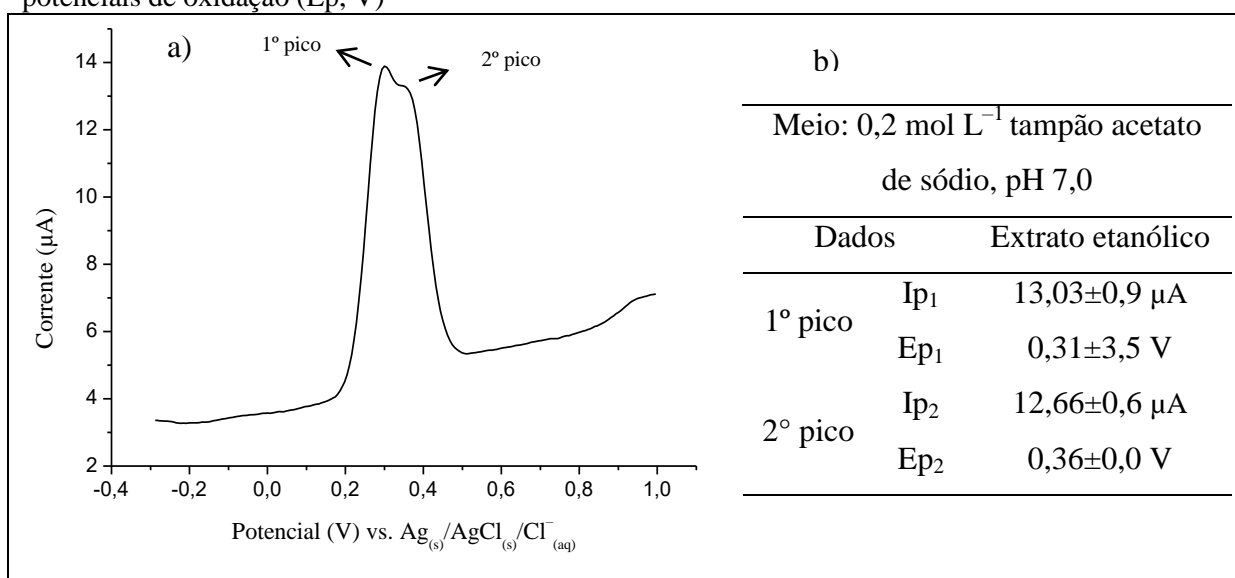
Figura 33 - Sinais de excitação para VPD: a) perfil da aplicação de potenciais em pulso e b) voltamograma



Fonte: Pacheco et al. (2013).

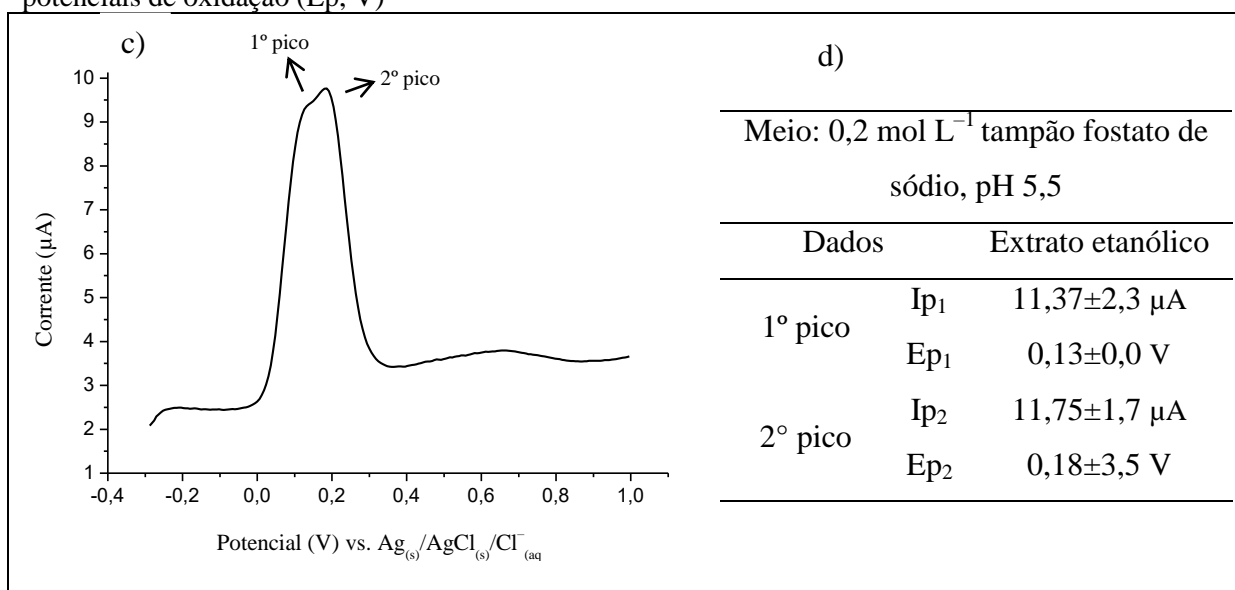
A corrente de pico (I_p) foi medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (I_1) e outra ao final do pulso (I_2). A I_1 foi subtraída de I_2 e com a diferença das correntes foi plotada um gráfico versus o potencial de oxidação aplicado (PACHECO et al., 2013). Os voltamogramas obtidos com o extrato etanólico, considerando duas soluções tampões (uma acetato de sódio e outra em fosfato de sódio) são mostrados na Figura 34 e na Figura 35.

Figura 34 – Dados obtidos utilizando o tampão acetato de sódio para o extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*: a) voltamograma de VPD e b) resultados médios de corrente de picos (I_p , μA) e potenciais de oxidação (E_p , V)



Fonte: a autora.

Figura 35 – Dados obtidos utilizando o tampão fosfato de sódio para o extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*: c) voltamograma de VPD e d) resultados médios de corrente de picos (I_p , μA) e potenciais de oxidação (E_p , V)



Fonte: a autora.

Estes dois parâmetros I_p e E_p podem ser úteis para avaliar o comportamento redox dos antioxidantes. Na análise do E_p , a correlação feita se baseia no fato de que quanto maior o seu valor, mais energia será necessária para oxidar as espécies, ou seja, menor a habilidade de doar elétrons, logo menor a atividade antioxidante da amostra. Já para I_p , quanto maior seu valor, maior é a concentração de compostos eletroativos que podem oxidar no potencial medido (TIMBOLA et al., 2006a, SANTOS; MAZO; CAVALHEIRO, 2008, ALVES et al., 2010).

A equação de Parry – Osteryoung, para um processo reversível e controlado por difusão, mostra que I_p é proporcional à concentração de espécie eletroativa presente na solução. Como observado na equação abaixo:

$$I_p = [(n^2 F^2 AC)/(4\pi t)] [D/\pi t]^{1/2} \Delta E$$

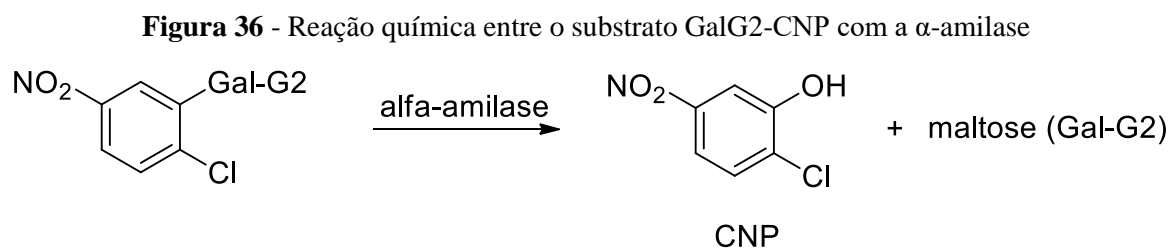
Onde: I_p é a corrente de pico, ΔE é a amplitude de pulso, A é a área do eletrodo, C é a concentração da espécie eletroativa, F é a corrente de faraday, D é o coeficiente de difusão, n o número de elétrons e t é o tempo de duração do pulso (OLDHAM; MYLAND, 2001).

Analisando os valores mostrados na Figura 34 e

Figura 35, foi verificado que o extrato etanólico apresenta uma concentração de compostos que oxidam nos potenciais medidos, fato que justifica sua atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH.

4.1.2 Avaliação da atividade inibitória sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase

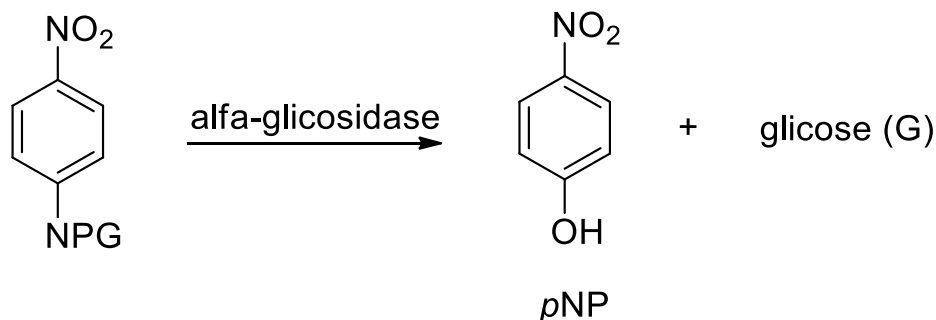
Para a quantificação da α -amilase foi feito um estudo cinético, considerando a interação entre a enzima α -amilase e o substrato GalG2-CNP, onde há a formação do 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) de cor amarela e a maltose (Gal-G2) (Figura 36).



Fonte: a autora.

Para a quantificação da α -glicosidase foi considerado a reação entre essa enzima e o substrato *p*-NPG, formando os produtos *p*-nitrofenol (*p*NP) de coloração amarela e a glicose (G) (Figura 37).

Figura 37- Reação química entre o substrato *p*NPG com a α -glicosidase



Fonte: a autora.

Os resultados foram expressos em porcentagem absoluta e foi determinado o CE_{50} que corresponde à concentração necessária para inibir 50% da enzima. O CE_{50} no ensaio com a α -glicosidase foi calculado através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de inibição dessa enzima versus as concentrações de extrato. Já no teste com a α -amilase foi calculada a constante de Michaelis-Menter, K_m , pois os dados obtidos apresentaram comportamento não linear, sendo que quando a relação da concentração do fator resposta é de 1:1, o valor de K_m corresponde ao CE_{50} (Tabela 12). Como controle positivo foi considerado acarbose.

Tabela 12 - Valores da concentração eficiente (CE_{50}) da análise da atividade inibitória da α -amilase e da α -glicosidase do extrato etanólico (EE) das folhas de *B. argyrophylla*

Enzima	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do EE	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da acarbose
α -amilase	2,89 \pm 0,1	0,08 \pm 0,1
α -glicosidase	1075,52 \pm 19,7	4,50 \pm 1,0

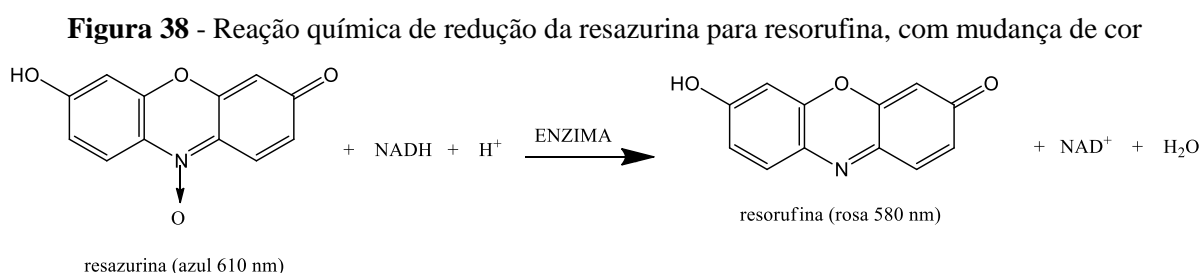
Foi possível verificar que o EE apresentou bons potenciais de inibições da enzima α -amilase comparado ao controle positivo, mas vou observado boa inibição sobre a α -glicosidase.

O EE das folhas de *B. argyrophylla* demonstrou consideráveis valores de CE_{50} frente à α -amilase, quando comparado a outros estudos com produtos naturais. O EE de casca do araticum (*Annona crassiflora*), por exemplo, apresentaram $CE_{50} = 30,44 \pm 7,6 \mu\text{g mL}^{-1}$

(JUSTINO et al., 2016). Não há relatos na literatura extratos de plantas do gênero *Banisteriopsis* com atividade inibitória enzimática.

4.1.3 Avaliação da atividade antifúngica

Para a quantificação da atividade antifúngica foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) através do ensaio denominado bioautografia. Para a revelação das cromatoplasmas foi utilizado o revelador resazurina, que atua comoceptor de elétrons, mudando de cor na presença da enzima desidrogenase ativa, oriunda do meio de cultura considerado. A cor azul representa ausência de crescimento enquanto que a cor vermelha é interpretada como presença de crescimento de leveduras (Figura 38) (HOMANS; FUCHS, 1970, CHOMA; JESIONEK, 2015).



Fonte: adaptado de Brouwer (1991).

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada com os fungos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Estas espécies de *Candida* foram escolhidas, pois são os principais fungos envolvidos na etiologia de infecções micóticas (candidíase) que vem despertando grande preocupação, em especial em ambientes hospitalares (WORTHINGTON; CLARKSON, 2002, LIMA et al., 2006, LIU et al., 2011).

A atividade antifúngica foi expressa em CIM. Valores de CIM abaixo de 100,0 µg mL⁻¹ para extratos e 10,0 µg mL⁻¹ para substâncias puras, são consideradas promissoras (RÍOS; RECIO, 2005). De acordo com Holetz et al. (2002), valores de CIM menores que 100,0 µg mL⁻¹, houve uma boa atividade antifúngica, entre 100,0 e 500,0 µg mL⁻¹, moderada; entre 500,0 e 1000,0 µg mL⁻¹, fraca; e acima de 1000,0 µg mL⁻¹, a amostra é considerada inativa. Ao observar a Tabela 13 foi verificada boa atividade antifúngica do extrato etanólico contra *C. albicans*.

Tabela 13 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antifúngica do extrato etanólico (EE) das folhas de *B. argyrophylla*²

<i>Candida spp.</i>	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do EE
<i>C. albicans</i> (ATCC 28366)	31,25
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)	>1000
<i>C. glabrata</i> (ATCC 15126)	>1000

Há relato na literatura que mostra que dentre as *Banisteriopsis*, extratos aquosos da *B. anisandra* apresentaram atividade frente a *C. albicans* e *C. Krusei* com concentração inibitória de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com CIM de $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FREITAS et al., 2015).

Outras plantas também apresentaram atividade antifúngica. Extratos hidroalcoólicos das folhas e raízes de *Hypericum havvae* apresentaram CIM frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, variando entre $3,12 \text{ mg mL}^{-1}$ e $25,00 \text{ mg mL}^{-1}$ (DULGER; DULGER, 2014). Extratos de sementes de uva da espécie *Vitis vinifera* inibiram o crescimento de diferentes cepas de *Candida* com concentrações variando entre $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ e $64,00 \text{ mg mL}^{-1}$ (SIMONETTI et al., 2014).

4.2 Avaliação das atividades: antioxidante, inibitórias sobre a α -amilase e a α -glicosidase e antifúngica das frações obtidas na extração líquido-líquido com o extrato etanólico

O extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla* apresentou atividade antioxidante, inibitória sobre a α -amilase e antifúngica frente a *C. albicans*. Mediante a isto, 75,50 g deste extrato foi submetido ao fracionamento por extração líquido-líquido, utilizando solventes de polaridades crescentes (conforme descrito no item 3.8.1), visando particionar os compostos bioativos presentes no mesmo. Em seguida, foram realizados os ensaios químicos e biológicos com as frações (F) obtidas. Os resultados são mostrados a seguir.

² Concentrações das amostras testadas: $0,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações inibitórias encontradas para as espécies *C. parapsilosis* e *C. Krusei* (*Candidas* usadas como controle do método) foram $1,0$ e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados validam o método de acordo com o CLSI (2008).

4.2.1 Avaliação da atividade antioxidante

Os valores de CE_{50} foram calculados através de regressões lineares obtida nos gráficos da concentração de amostra versus consumo do radical DPPH após 1 hora de reação (Tabela 14). Foi verificado que entre as frações, a AE e a FB apresentaram melhores atividades antioxidante, comparando com o controle positivo BHT.

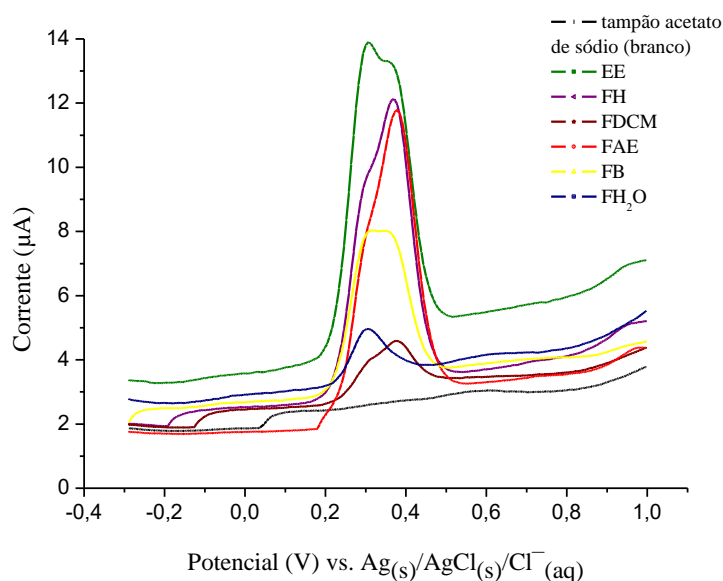
Tabela 14 - Valores de concentração eficiente (CE_{50}) da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do DPPH do extrato etanólico (EE) e frações das folhas de *B. argyrophylla*

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EE	$4,27 \pm 0,8^{a;3}$
FH	$12,02 \pm 2,0^b$
FDCM	$17,03 \pm 0,4^c$
FAE	$4,10 \pm 0,1^a$
FB	$4,80 \pm 0,1^a$
FH ₂ O	$23,07 \pm 2,3^d$
BHT	$5,31 \pm 0,2^a$

Foram obtidos também os potenciais de oxidação (E_p) e corrente de pico (I_p) das frações através da VPD. A Figura 39 e a Tabela 15 mostram os resultados de corrente de picos (I_p) e potenciais de oxidação (E_p), considerando a solução tampão acetato de sódio, e a Figura 40 e a Tabela 16, os resultados utilizando tampão fosfato de sódio. Analisando os valores de I_p e E_p , foi verificado que as frações AE a B apresentaram maiores quantidades de compostos eletroativos que oxidam nos potenciais medidos. Este resultado corrobora com as análises da capacidade antioxidante (medida pelo método do DPPH).

³ Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$)

Figura 39 - Voltamograma de VPD obtido com solução tampão acetato de sódio para o extrato etanólico (EE) e frações das folhas da *B. argyrophylla*



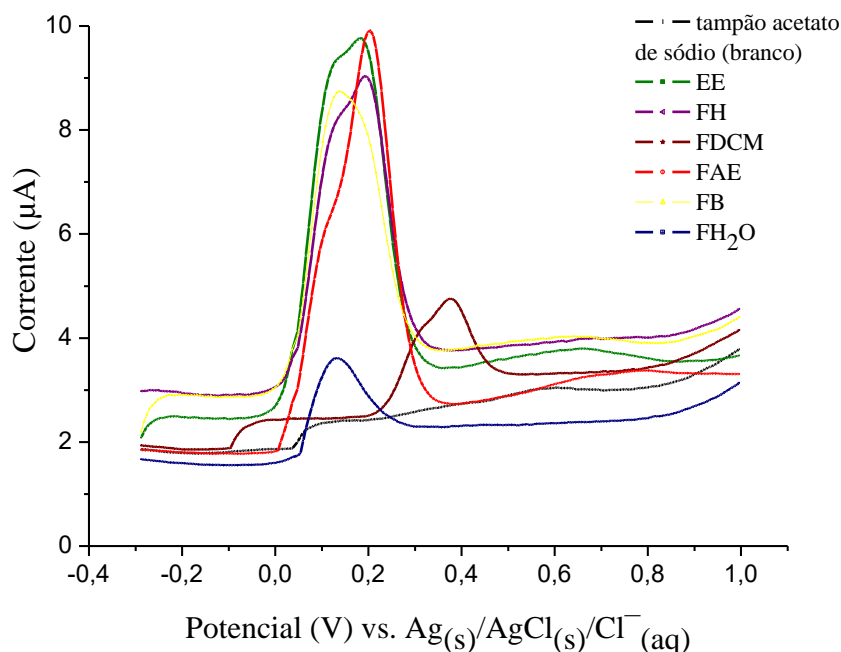
Fonte: a autora.

Tabela 15 - Corrente de picos de oxidação (I_p) e potenciais de oxidação (E_p), observados pela DPV do extrato etanólico (EE) e frações obtidas utilizando tampão em acetato de sódio

Amostras	Tampão acetato de sódio			
	1º pico		2º pico	
	I_{p1} (μA)	E_{p1} (V)	I_{p2} (μA)	E_{p2} (V)
EE	$13,03 \pm 0,9^{a;4}$	$0,31 \pm 3,5$	$12,66 \pm 0,6^a$	$0,36 \pm 0,0$
FH	$9,20 \pm 0,6^b$	$0,30 \pm 3,5$	$11,69 \pm 0,4^{b;a}$	$0,37 \pm 0,0$
FDCM	$4,04 \pm 0,1^c$	$0,31 \pm 0,0$	$4,61 \pm 0,1^c$	$0,38 \pm 0,0$
FAE	$11,55 \pm 0,4^d$	$0,31 \pm 0,0$	$16,62 \pm 0,3^d$	$0,38 \pm 0,0$
FB	$10,00 \pm 0,9^d$	$0,31 \pm 0,0$	$10,58 \pm 1,1^b$	$0,35 \pm 2,3$
FH ₂ O	$4,87 \pm 0,1^c$	$0,30 \pm 2,8$	-	-

⁴ Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Figura 40 - Voltamograma de VPD obtido com solução tampão fosfato de sódio para o extrato etanólico (EE) e frações das folhas da *B. argyrophylla*



Fonte: a autora.

Tabela 16 - Corrente de picos de oxidação (I_p) e potenciais de oxidação (E_p), observados pela DPV do extrato etanólico (EE) e frações obtidas utilizando tampão em fosfato de sódio

Amostras	Tampão fosfato de sódio			
	1º pico		2º pico	
	I_{p1} (μA)	E_{p1} (V)	I_{p2} (μA)	E_{p2} (V)
EE	$11,37 \pm 2,3^{c:5}$	$0,13 \pm 0,0$	$11,75 \pm 1,7^a$	$0,18 \pm 3,5$
FH	$4,63 \pm 2,0^{a:b}$	$0,14 \pm 0,0$	$5,31 \pm 1,9^b$	$0,19 \pm 0,0$
FDCM	$5,48 \pm 0,2^{a:b}$	$0,14 \pm 0,0$	$5,41 \pm 0,2^b$	$0,18 \pm 0,0$
FAE	$8,91 \pm 1,0^a$	$0,11 \pm 4,9$	$13,86 \pm 1,1^a$	$0,20 \pm 0,0$
FB	$7,04 \pm 1,2^{a:b}$	$0,15 \pm 4,1$	$6,89 \pm 0,1^b$	$0,18 \pm 1,0$
FH ₂ O	$2,58 \pm 0,8^b$	$0,15 \pm 2,5$	-	-

⁵ Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

4.2.1.2 Comparação estatística entre os resultados obtidos no método do DPPH e por VPD

A fim de confirmar a correlação dos resultados obtidos no ensaio com o DPPH com os realizados através da VPD, foi feito um estudo estatístico considerando o ensaio proposto por Pearson (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Neste método são avaliadas se duas ou mais variáveis variam concomitantemente. Para isto, um parâmetro considerado é a correlação ou regressão múltipla (r). O valor de r está sempre entre -1 e 1 , sendo que sua intensidade é classificada em módulo como mostrado na Tabela 17.

Tabela 17- Avaliação qualitativa do grau de correlação entre duas variáveis

$ r $	A correlação é dita
0	Nula
0 – 0,3	Fraca
0,3 – 0,6	Regular
0,6 – 0,9	Forte
0,9 – 1	Muito forte
1	Plena ou perfeita

Fonte: Callegari-Jacques (2003).

Foi calculado os coeficientes de correlação $|r|$ com os resultados de correntes de picos 1 e 2, (VPD) e valores de $1/CE_{50}$ (método do DPPH) obtidos para o extrato etanólico (EE) e frações. Foi verificada forte correlação entre os métodos do DPPH e da VPD (Tabela 18). Tal observação justificou o emprego desse método eletroquímico como parâmetro para determinação da atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. argyrophylla*. Além disso, foi verificado que os resultados de I_p e CE_{50} foram mais parecidos ao se utilizar o tampão fosfato. Isso pode ser justificado pela influência do pH do meio reacional (TIMBOLA et al., 2006, GIL; COUTO, 2013). A correlação entre os dois tampões: acetato de sódio e fosfato de sódio, considerando IP_2 , mostrou correlação perfeita ($r = 1$) entre os resultados.

Tabela 18 - Coeficiente de correlação entre os métodos DPPH e VPD para o EE e frações⁶

Relações	Coeficiente de correlação $ r $
DPPH/ VPD (Ip ₁ ; tampão fosfato)	0,730
DPPH/ VPD (Ip ₁ ; tampão acetato)	0,885
DPPH/ VPD (Ip ₂ ; tampão fosfato)	0,700
DPPH/ VPD (Ip ₂ ; tampão acetato)	0,700
VPD (Ip ₁ ; tampão acetato) / VPD (Ip ₁ ; tampão fosfato)	0,741
VPD (Ip ₂ ; tampão acetato) / VPD (Ip ₂ ; tampão fosfato)	1,0

4.2.2 Avaliação das atividades inibitórias sobre as enzimas α -amilase

Como discutido anteriormente, os resultados de inibição das enzimas α -amilase foram expressos em porcentagem absoluta e foi determinado o CE₅₀ para as amostras com melhores inibições. A FDCM apresentou baixa inibição (15,32%) e a FH₂O não apresentou inibição e as demais apresentaram inibições acima de 96%. Analisando os valores de CE₅₀ apresentados na Tabela 19, foi observado que a fração FAE e a FB apresentaram as melhores inibições contra a enzima α -amilase ao se comparar com o controle positivo (acarbose).

Tabela 19 - Valores de CE₅₀ da análise da atividade inibitória da α -amilase α -glicosidase do extrato etanólico e frações das folhas de *B. argyrophylla*

Amostras	Concentração eficiente (CE ₅₀) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	α -amilase
EE	2,89 \pm 0,1
FH	4,14 \pm 0,2
FDCM	-
FAE	2,33 \pm 0,1
FB	2,57 \pm 0,1
acarbose	0,08 \pm 0,1

⁶ Os valores de CE₅₀ foram expressos em 1/CE₅₀, visto que quanto menor o valor de CE₅₀ melhor é a atividade. As correlações entre os métodos foram realizadas através do método de linear de Pearson, utilizando o Programa Sigma Plot 11.0.

4.2.3 Avaliação da atividade antifúngica

As atividades antifúngicas apresentadas pelas frações oriundas da extração líquido-líquido também foram expressas em concentração inibitória mínima (CIM) (Tabela 20).

Tabela 20 -Valores da concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antifúngica do extrato etanólico (EE) e frações das folhas de *B. argyrophylla*⁷

<i>Candida spp.</i>	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	EE	FH	FDCM	FAE	FB	FH ₂ O
<i>C. albicans</i> (ATCC 28366)	31,25	125	31,25	31,25	31,25	500
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)	>1000	>1000	93,75	93,75	>1000	>1000
<i>C. glabrata</i> (ATCC 15126)	>1000	31,25	187,50	31,25	>1000	500

Ao observar a Tabela 21 foi verificado que as frações FDCM e FAE inibiram todas as leveduras estudadas com concentrações que variaram entre 31,25 a 187,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, a FAE apresentou resultados promissores de atividade antifúngica, exibindo os mais baixos valores de concentrações inibitórias (CIM's menores que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). *C. albicans* foi o micro-organismo mais sensível perante todas as amostras avaliadas, seguida de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Não há resultados de atividade antifúngica na literatura para comparação com o extrato etanólico e frações da espécie *B. argyrophylla*.

4.3 Avaliação da atividade citotóxica e índice de seletividade

A avaliação da toxicidade é um critério importante para avaliar o potencial terapêutico de compostos e extratos bioativos (NAKAMURA et al., 2006). Neste trabalho foi determinada a atividade citotóxica do EE e frações da espécie *B. argyrophylla*. Segundo Rogero et al. (2003), esse ensaio *in vitro* é o primeiro passo para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso terapêutico. Após comprovada a sua não toxicidade é dado continuidade ao processo de produção do fármaco, seguindo aos ensaios clínicos com animais e posteriormente com seres humanos.

⁷ Concentrações das amostras testadas: 0,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a avaliação da citotoxicidade foi determinada a concentração citotóxica (CC_{50}), empregado células Vero ATCC CCL 81. A CC_{50} indica a concentração da amostra onde 50 % das células são viáveis. A relação entre a CC_{50} e CIM foi determinada através do cálculo do índice de seletividade (IS) de acordo com a equação abaixo:

$$IS = \log [CC_{50}] / [CIM]$$

Valores positivos indicam maior seletividade contra os micro-organismos, enquanto que valores negativos indicam elevada toxicidade para células Vero (CASE et al., 2006). Então, quanto mais alto o valor de IS, mais seguros podem ser considerados os extratos para uma futura utilização terapêutica (DE MESQUITA et al., 2007). Valores de CIM maiores que 1000 e valores de CC_{50} maiores que 512 foram tomados como 1000 e 512, respectivamente. Os resultados de concentração citotóxica e índice de seletividade para o extrato etanólico e frações estão na Tabela 21. Como controle positivo foi considerado a cisplatina, cujo CC_{50} é igual a $7,01 \pm 0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 21 - Atividade citotóxica e índice de seletividade para o extrato etanólico (EE) e frações

Amostras Bioativas	Células Vero	Índice de seletividade (IS)		
	(ATCC CCL 81)	Leveduras		
	Atividade citotóxica CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>C. albicans</i> (ATCC 28366)	<i>C. glabrata</i> (ATCC 15126)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)
EE	360 ± 12	1,05	- 0,44	- 0,44
FH	> 512	0,61	1,21	- 0,29
FDCM	270 ± 5	0,93	0,15	0,45
FAE	285 ± 18	0,95	0,95	0,48
FB	302 ± 19	0,98	- 0,52	- 0,52
FH ₂ O	> 512	0,01	0,01	- 0,29

Os valores de CC_{50} encontrados para o EE e frações foram mais altos do apresentado pela cisplatina. Isso indica que as amostras testadas foram consideravelmente menos tóxicas para células Vero que o controle positivo. As frações FH e FH₂O apresentaram menor toxicidade de acordo com os valores de CC_{50} . Entretanto, mostraram IS negativos para *C. tropicalis*, pelo fato de terem sido inativas frente a essa levedura ($CIM > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). O EE e as frações FH, FB e FH₂O apresentaram IS negativo pelo menos para um dos microrganismos avaliados indicando toxicidade para células Vero, e baixa ou nenhuma atividade contra os patógenos.

As frações FDCM e FAE quando inibiram os micro-organismos em baixas concentrações ($11,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $46,87 \mu\text{g mL}^{-1}$), apresentaram valores positivos de IS para todas as leveduras, com destaque para a FAE que exibiu os maiores valores de IS. Isso indica que esta fração foi mais seletiva contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, que tóxica para células Vero. A FAE mostrou promissora como fonte de compostos contra *Candida*, uma vez que exibiu bons resultados de concentração inibitória mínima e os mais altos valores de IS. Isso reforça a busca de compostos bioativos nesta fração.

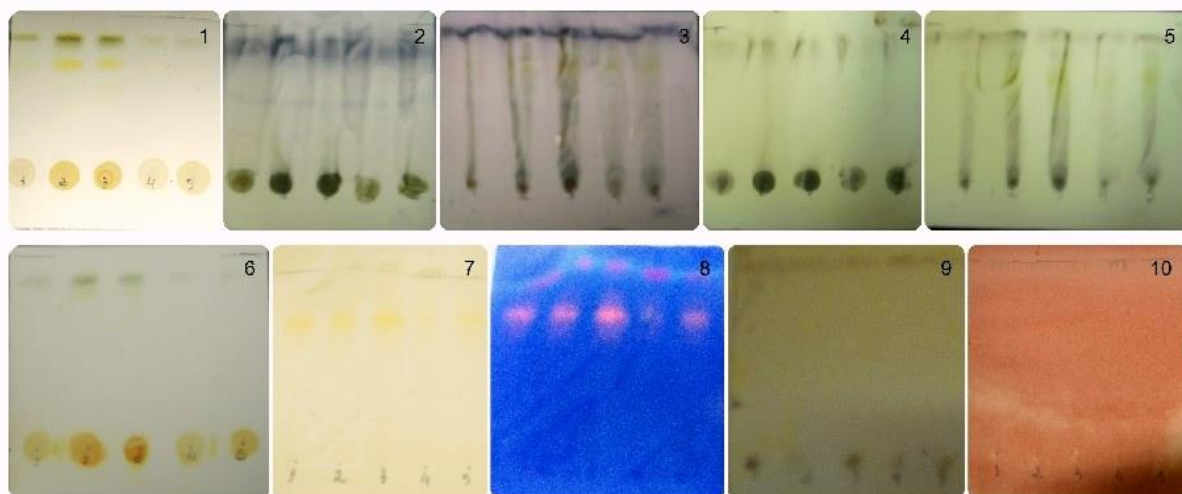
4.4 Metabólitos secundários das folhas de *B. argyrophylla*

4.4.1 Análise da prospecção fitoquímica

Como o EE e as frações apresentaram atividades antioxidante, inibitória sobre a α -amilase e antifúngica, se fez necessário investigar os compostos bioativos presentes nas folhas da *B. argyrophylla*.

Dessa forma, inicialmente foi realizada a prospecção fitoquímica com o extrato etanólico. Foi verificado, utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), como descrito no item 3.8.2, ausência de alcaloides e presença de compostos fenólicos, terpenos e esteroides (Figura 41).

Figura 41 – CCDs do extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*⁸

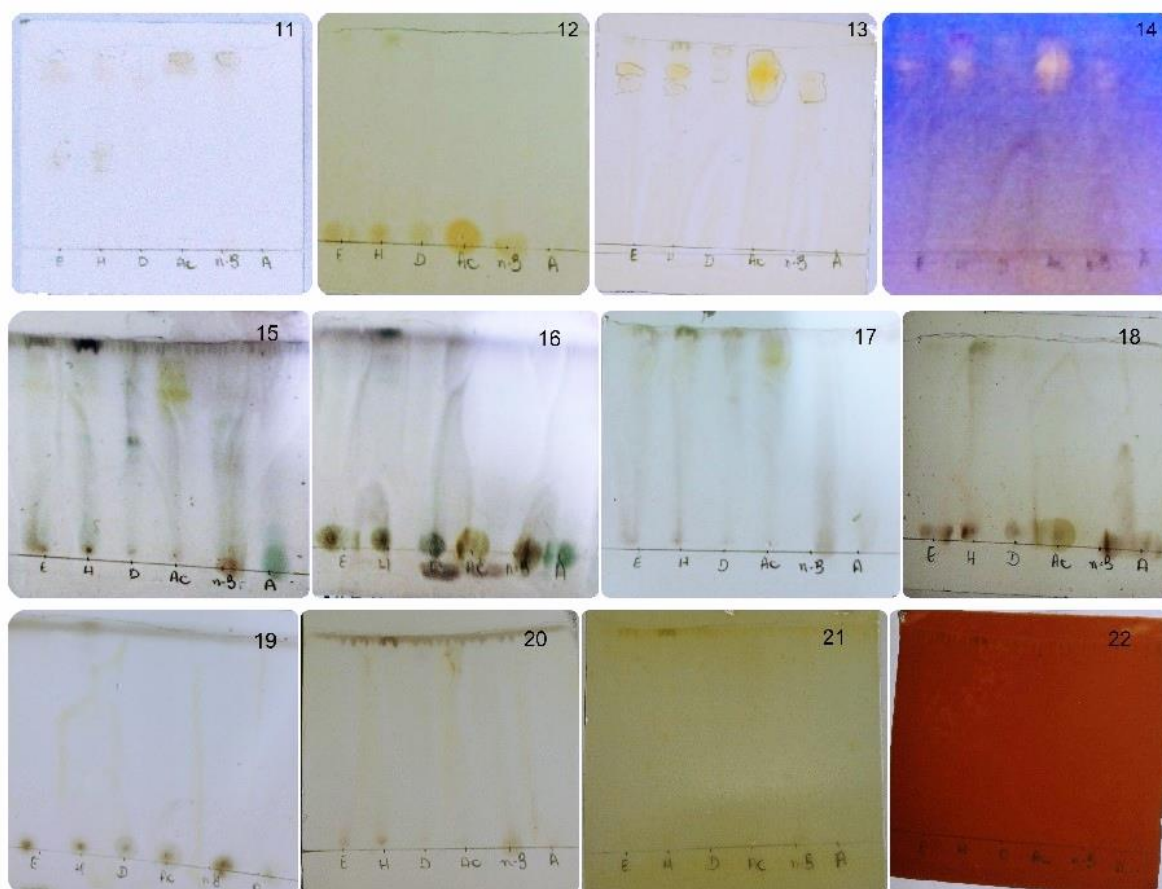


Fonte: a autora.

Em seguida, as frações (FH, FDCM, FAE, FB e FH₂O) foram submetidas à prospecção fitoquímica visando às classes de compostos presentes em cada uma. A Figura 42 e a Tabela 22 mostram os resultados obtidos.

⁸ Foram empregadas, como fase estacionária placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) e duas fases móveis (FM). FM1: acetato de etila:H₃CCO₂H:CH₂O₂:H₂O (10:1,1:1,1:2,6) e FM2: CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH (9:1:0,25). Cromatoplaça 1 foi empregada a FM1 e não foi revelada. Cromatoplaças 2 (FM2) e 3 (FM1) foram reveladas com anisaldeído. Cromatoplaças 4 (FM 2) e 5 (FM 1) foram reveladas com Libermann-Burchard. Cromatoplaças 6 (FM2), 7 (FM1) e 8 (FM1 e inspeccionadas em UV₃₆₅) foram reveladas com NP/PEG. Cromatoplaças 9 (FM1) foi revelada com sulfato cérico. Cromatoplaças 10 (FM 2) com ICpt .

Figura 42 - CCDs do extrato etanólico e frações das folhas de *B. argyrophylla*⁹



Fonte: a autora.

⁹ Cromatoplaça 11 (FM1) não foi revelada. Cromatoplaças 12 (FM2), 13 (FM1) e 14 (FM1 e inspecionadas em UV₃₆₅) foram reveladas com NP/PEG. Cromatoplaças 15 (FM1) e 16 (FM2) foram reveladas com Anisalaldeído. Cromatoplaças 17 (FM1) e 18 (FM2) foram reveladas com Liebermann-Burchard. Cromatoplaças 19 (FM1) e 20 (FM2) foram reveladas com sulfato cérico. Cromatoplaça 21 (FM2) foi revelada com Dragendorff. Cromatoplaça 22 (FM2) foi revelada com ICPT .

Tabela 22 - Prospecção fitoquímica do extrato etanólico (EE) as frações das folhas de *B. argyrophylla*¹⁰

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

A presença de flavonoides presentes no EE e nas frações foi confirmada utilizando o revelador NP/PEG. Foi observado que na FAE há maior intensidade desses compostos, seguido das frações FB, FH e FDCM (Figura 42). Este revelador foi utilizado devido a sua sensibilidade e especificidade, uma vez que o NP em CH₃OH reagiu com os flavonoides que apresentam carbonila no C-4 formando complexos fluorescentes em UV₃₆₅ de cores características (alaranjado e amarelo).

O revelador Anisaldeído é utilizado para identificar a presença saponinas no EE e frações, considerando o surgimento de manchas de coloração azul, violeta e verdes fluorescentes sob UV 365 nm (cromatoplasmas: 15 e 16).

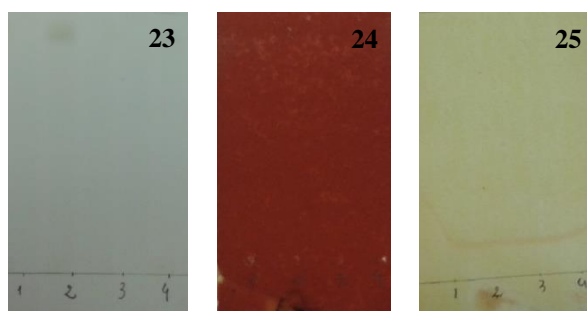
O revelador Liebermann-Burchard indicou a presença de terpenos e esteroides em todas as amostras com exceção da FH₂O. Foi observada a formação de manchas de coloração verde e de manchas azul-esverdeado a rósea depois de alguns minutos após a aplicação do revelador (Figura 42, cromatoplasmas: 17 e 18).

O reagente sulfato cérico foi usado na detecção de compostos em geral (flavonoides, terpenos, esteroides e saponinas). Foi observado em maior intensidade manchas cinza e amarelas, revelando maior presença de flavonoides (Figura 42, cromatoplasmas: 19 e 20).

¹⁰ Intensidade: - ausente, +fraca, ++ média, +++ forte.

Como algumas espécies do gênero *Banisteriopsis* apresentaram em seus extratos alcaloides, foram verificados se havia a presença desses compostos no EE e frações da *B. argyrophylla*. Foi feita a análise considerando os reveladores Dragendorff e ICIPt. No primeiro revelador há a formação de manchas de coloração alaranjada formadas pela reação de complexação entre o átomo de bismuto e nitrogênio presentes em metabólitos, como alcaloides. Enquanto que para o iodocloroplatinado, os alcaloides são detectados pelo surgimento de manchas de coloração marrom, formadas pela complexação entre a platina e os compostos nitrogenados. O EE e as frações avaliadas não apresentaram testes positivos nestes ensaios. Para verificar se haviam alcaloides, mesmo que em pequenas quantidades, o extrato etanólico foi submetido à extração ácido/base (item 3.8.3). A fração FAE (alcaloídica) foi submetida à CCD e revelada com os reveladores Dragendorff e ICIPt, sendo possível confirmar que estes compostos não estão presentes em concentrações detectáveis neste experimento (Figura 43).

Figura 43 – CCDs da extração ácido/base do extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*¹¹

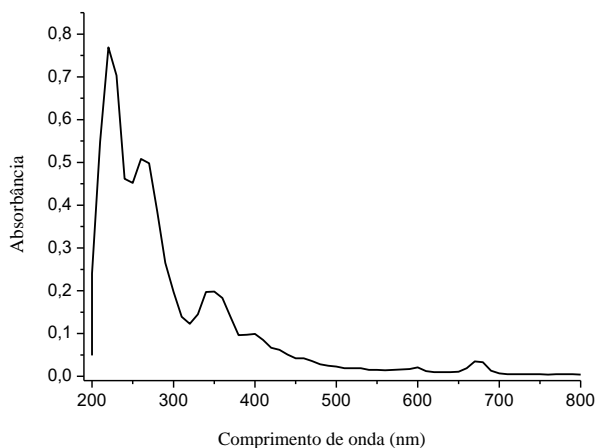


Fonte: a autora.

4.4.2 Análise do espectro de UV-VIS

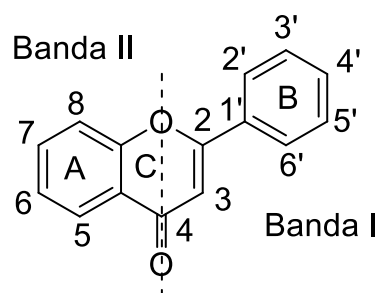
A espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma ferramenta muito importante nas análises de identificação de substâncias com ligação duplas conjugadas. Assim, inicialmente foi obtido o espectro de UV-Vis do EE (Figura 44).

¹¹ Cromatoplaça 23, não revelada. Cromatoplaça, 24 revelada com ICIPt. Cromatoplaça, 25 revelada com Dragendorff.

Figura 44 - Espectro de UV-VIS do extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*

Fonte: a autora.

Observado o perfil obtido, foi verificada a presença de flavonoides, confirmando o estudo fitoquímico realizado pela CCD. Estes compostos absorvem em pelo menos duas bandas de absorção, correspondem à radiação em $320 < \lambda_{nm} < 400$ nm (banda I) e $200 < \lambda_{nm} < 250$ (banda II). Sendo que a banda I corresponde ao sistema de conjugação cinamoil e a banda II ao benzoil, em flavonoides (SIMÕES et al., 2013). Tais absorções ocorrem em sistemas conjugados dos anéis aromáticos de transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Figura 45 - Estrutura química geral dos flavonoides (A e B anéis aromáticos e C anel benzopirano)

Fonte: a autora.

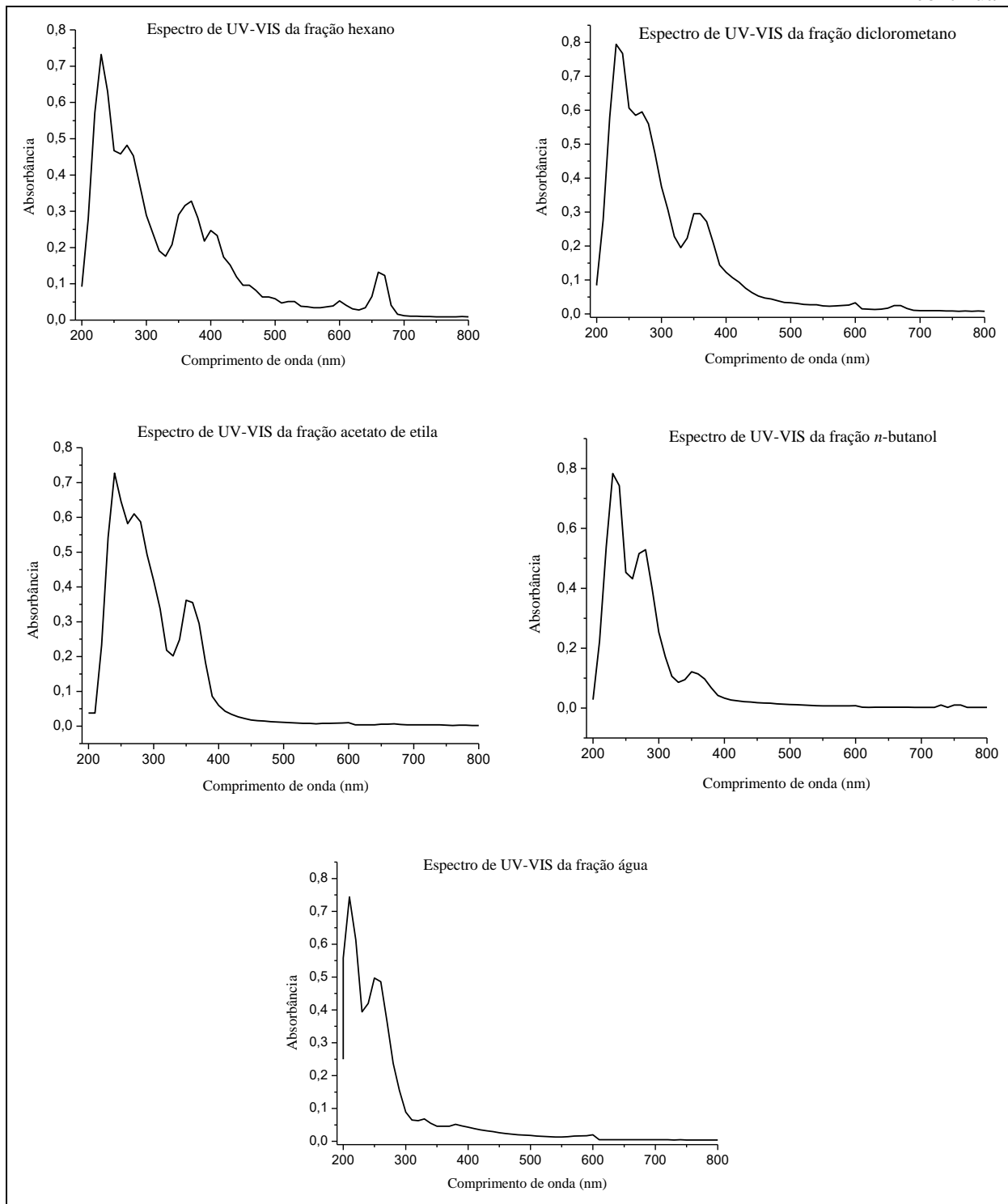
Além disso, uma banda intensa na região de 250–280 nm pode ser devida a presença de proantocianidinas, uma vez que os taninos condensados absorvem nesta região (HUANHUAN L. et al., 2015).

Em seguida, foram obtidos os espectros de UV-Vis das frações obtidas na extração líquido-líquido a partir do extrato etanólico das folhas da *B. argyrophylla*. Os flavonoides foram detectados em todas as frações que apresentaram duas bandas características, exceto na

FH₂O, que não exibe a banda I, que pode ser devido aos flavonoides da classe dos flavan-3-óis ou outras substâncias que absorvem nesta região (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Figura 46 - Espectros de UV-VIS das frações obtidas na extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*

continua



Fonte: a autora.

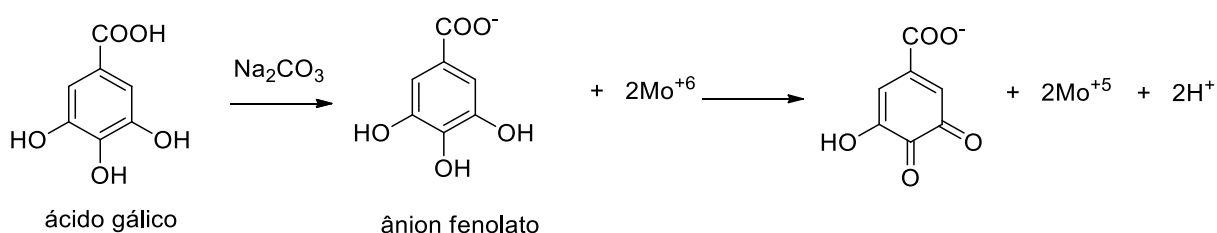
4.4.3 Análise dos teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas

4.4.3.1 Resultados dos teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas do extrato etanólico e frações das folhas da *B. argyrophylla*

Os compostos fenólicos, como os flavonoides e os taninos condensados (proantocianidinas), são importantes metabólitos produzidos pelos vegetais, visando o seu desenvolvimento e assim sua sobrevivência, estando relacionados a fatores externos, bióticos e abióticos. Assim, é importante a quantificação dessas substâncias, uma vez que fornecem informações a respeito do seu potencial fitoterápico (TALCOTT et al., 2003). Foi considerado para a quantificação dos flavonoides, inicialmente, procedimentos simples que permitiram uma análise química rápida das amostras.

Para a quantificação do teor de fenóis totais foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu, uma mistura dos ácidos fosfomolibdico $H_3P(Mo_3O_{10})_4$ e fosfotunguístico $H_3P(WO_{10})_4$, que apresenta coloração azul. Com a adição de carbonato de sódio o meio ficou básico, ocorrendo uma reação de transferência de elétrons. Os compostos fenólicos presentes na amostra foram oxidados e o molibdênio reduzido, formando complexos de molibdênio-tungstênio, com absorvância intensa próxima a 760 nm (Figura 47) (LIMA et al., 2004, MALACRIDA; MOTTA, 2005, OLIVEIRA et al., 2009).

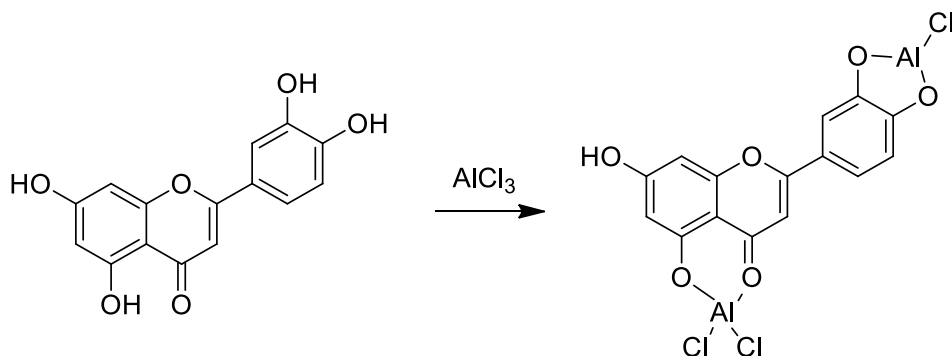
Figura 47 - Reação do ácido gálico com molibdênio



Fonte: Oliveira *et al.* (2009).

A quantificação do teor de flavonoides seguiu os procedimentos propostos por Woisky; Salatino (1998). Esta metodologia se baseia em uma reação de complexação com o alumínio (Al^{3+}), proveniente do cloreto de alumínio ($AlCl_3$), com os flavonoides dissolvido em CH_3OH (Figura 48). Através de UV-Vis a 425 nm foi feito o monitoramento dos descolamentos químicos provenientes da formação complexo Al^{3+} com os flavonoides. Isto é possível, pois o complexo apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não complexado.

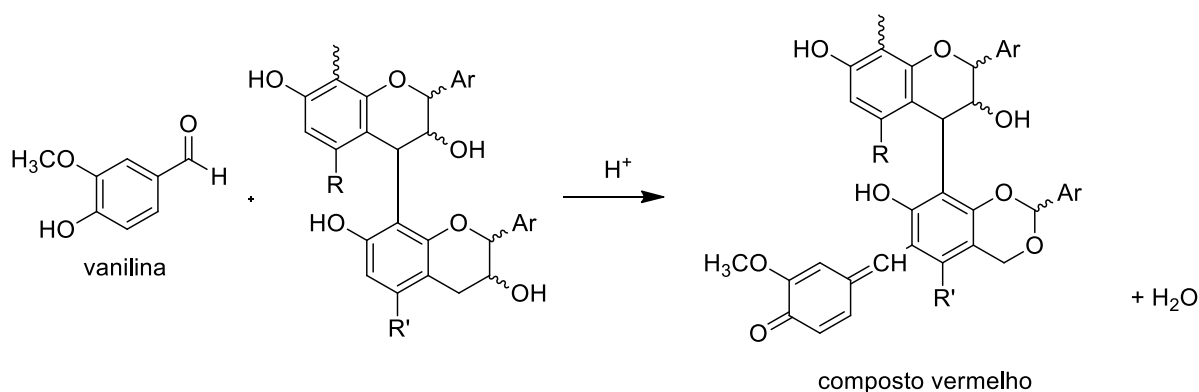
Figura 48 - Reação de complexação do cloreto de alumínio com os flavonoides



Fonte: Woisky e Salatino (1998).

Para quantificar o teor de proantocianidina (tanino condensado), foi considerada a reação que ocorre entre uma molécula de vanilina com a molécula de proantocianidina, visto que, há a formação de um composto vermelho cuja intensidade aumenta linearmente a 500 nm (Figura 49) (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

Figura 49 - Reação entre a vanilina sulfúrica e um tanino catéquico



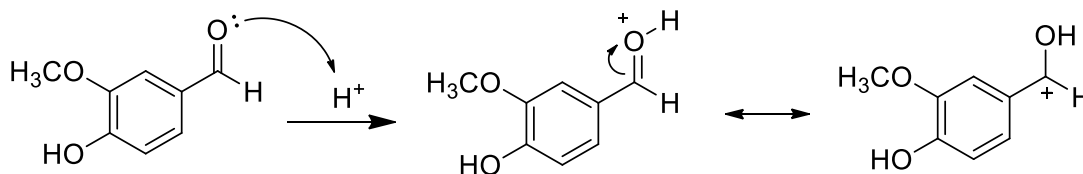
Fonte: Schofield, Mbugua e Pell (2001).

A proposta de mecanismo por etapas desta reação é mostrada na Figura 50. Essa reação depende do solvente usado, da temperatura, de tempo de reação e da concentração dos reagentes (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

Figura 50 - Mecanismo da reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéuico

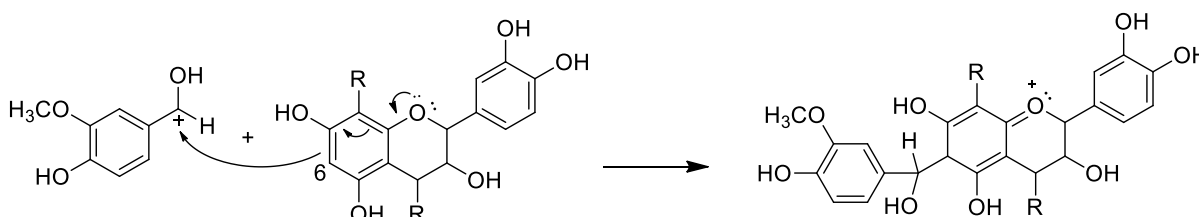
(continua)

Etapa 1



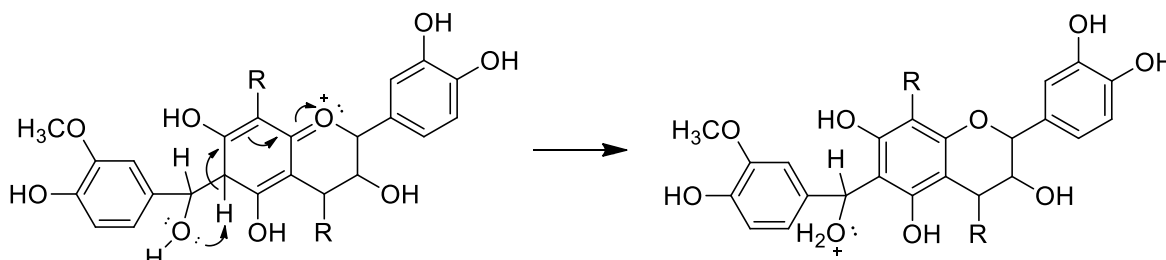
Nesta etapa, um par de elétrons do oxigênio da carbonila aceita um próton do ácido produzindo um cátion oxônio. O carbono de um cátion oxônio é mais suscetível ao ataque nucleofílico do que a carbonila do aldeído inicial (vanilina).

Etapa 2



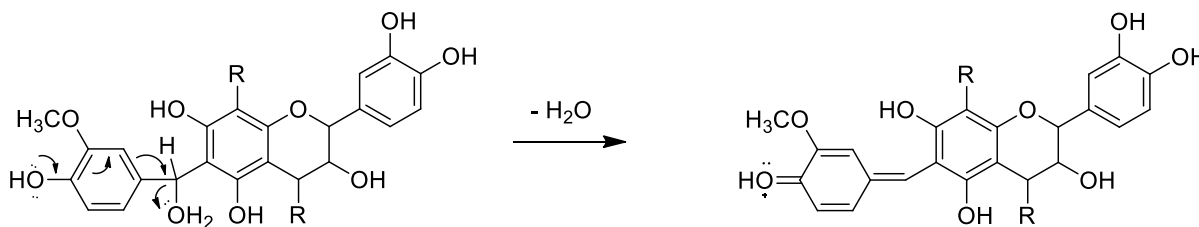
O cátion oxônio admite o par de elétrons do nucleófilo, catequina. A substituição irá ocorrer preferencialmente no C-6, pois este é o único C que é ativado duplamente por estar em orto em relação às duas hidroxilas.

Etapa 3



Nessa etapa 3 irá ocorrer o rearranjo do carbocátion.

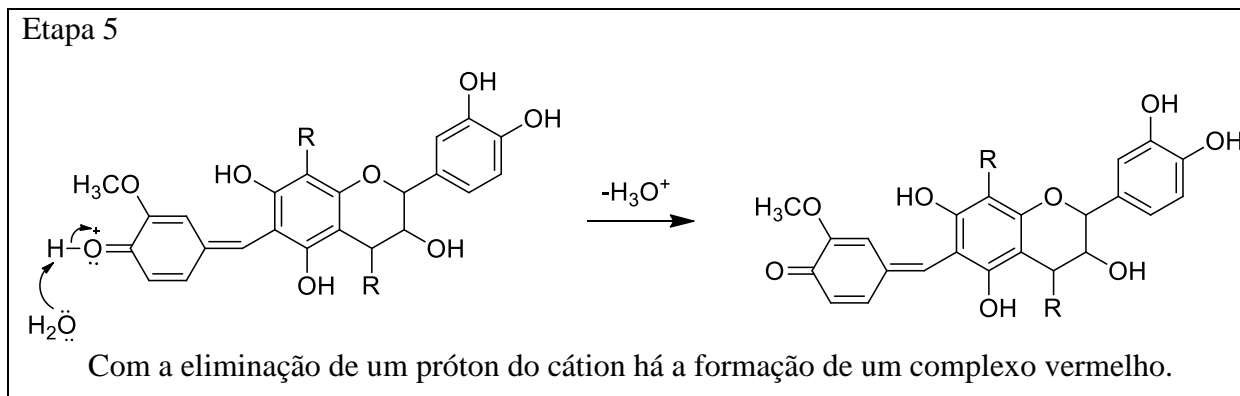
Etapa 4



A protonação de um grupo hidroxila leva à eliminação da água e a formação de cátion oxônio altamente reativo.

Figura 51 - Mecanismo da reação entre a vanilina e um monômero do tanino catéuico

(conclusão)



Fonte: adaptado de Sousa (2015).

O teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides foram calculados através de regressões lineares da curva analítica de gráficos da absorbância, das reações entre o ácido gálico e o Folin; entre a catequina e a vanilina e entre quercetina e o AlCl_3 versus as concentrações de ácido gálico, catequina e de quercetina, respectivamente.

As equações da reta e os valores do coeficiente linear considerados na quantificação estão na Tabela 23. Os resultados obtidos para o EE foram dados em mg de equivalente de ácido gálico (EAG), catequina (EC) ou quercetina (EQ) por g de extrato e por g de material vegetal seco (considera o rendimento de extração). Quanto maior este valor, maior o teor de compostos presentes nas amostras.

Tabela 23 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas do EE das folhas de *B. argyrophylla*¹²

	Equação Linear ^a $y=ax+b$	R ²	mg EAG ¹ , EQ ² ou EC ³ / g _{vegetal}	mg EAG ¹ , EQ ² ou EC ³ / g _{extrato}
Fenóis totais ¹	$y=0,015x-0,0019$	0,9998	39,90±0,17	337,13±1,44
Flavonoides ²	$y=0,0769x+0,0524$	0,9975	8,50±0,05	71,82±0,30
Proantocianidinas ³	$y=0,0274x+0,011$	0,9971	32,25±0,04	272,48±0,31

O EE apresentou maior quantidade de fenóis totais. Esse resultado pode estar relacionado ao fato da coleta das folhas da *B. argyrophylla* ter sido realizada no verão. Nesta estação há a maior incidência de raios UV (EPA, 2004). Os compostos fenólicos são

¹² a y = absorbância, x = concentração de ácido gálico¹, quercetina² ou catequina³

metabólitos secundários produzidos pelos vegetais com função de proteção contra a incidência solar (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O EE de folhas da *Banisteriopsis laevifolia* apresentaram maior teor de fenóis totais ($542,3 \pm 2,10$ mg EAG/g_{extrato}) e quantidade de proantocianidinas ($274,6 \pm 3,00$ mg EC/g_{extrato}) (NUNES et al., 2014) do que os resultados apresentados pela *B. argyrophylla*.

Uma vez que o EE de folhas da *B. argyrophylla* apresentou acentuada quantidade desses compostos, foi realizado o ensaio com as frações obtidas na extração líquido-líquido. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 24. Foi verificado que a FAE apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos e a FB, apresentou a maior quantidade de proantocianidinas, sendo que os compostos analisados possuem polaridade mediana.

Tabela 24 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas das frações das folhas de *B. argyrophylla*¹³

Amostras	Fenóis (mg EAG g _{extrato} ⁻¹)	Flavonoides (mg EQ g _{extrato} ⁻¹)	Proantocianidinas (mg EC g _{extrato} ⁻¹)
FH	174,91±1,93 ^c	71,00±1,92 ^c	99,08±2,49 ^d
FDCM	73,10±1,12 ^d	59,27±0,98 ^a	51,83±1,14 ^c
FAE	405,46±3,20 ^a	211,85±2,89 ^d	208,79±1,14 ^b
FB	229,46 ±1,07 ^b	21,40±0,64 ^{b:c}	226,59±2,86 ^e
FH ₂ O	67,48±0,45 ^e	n.i. ^e	36,01±0,65 ^a

4.4.3.2 Atividade antioxidante e inibitória sobre a α -amilase e os compostos fenólicos

Os valores da atividade antioxidante avaliada pelo método do método de sequestro do radical DPPH (1/CE₅₀) e de corrente de pico (VPD) foram correlacionados com o teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides através do coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 25).

¹³ n.i. = não identificado. Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Tabela 25 - Correlações (r) entre a capacidade antioxidante analisada pelos métodos do DPPH ($1/CE_{50}$), correntes (Ip_1 e Ip_2) com o teor de fenóis totais, flavonoides, proantocianidinas do extrato etanólico e frações¹⁴

	$1/CE_{50}$	VPD (tampão acetato)	VPD (tampão fosfato)
Fenóis	0,922	0,888	0,785
		0,895	0,895
Flavonoides	0,534	0,423	0,474
		0,727	0,727
Proantocianidinas	0,952	0,940	0,825
		0,668	0,668

Os resultados obtidos estão relacionados com a presença de compostos fenólicos nas amostras. Fato que confirma a forte correlação entre essas substâncias com a atividade antioxidante (Tabela 25). A FAE e a FB, foram as que apresentaram maiores teores de fenóis e proantocianidinas, respectivamente, e também foram as que apresentaram melhores potenciais antioxidantes.

Não foram determinados os valores de r considerando os valores de CE_{50} obtidos no ensaio com a α -amilase. Neste caso as análises que apresentaram comportamento não linear e o método de Pearson considerada a intensidade, ou grau, de um relacionamento linear. Entretanto, a presença de compostos fenólicos também está relacionada com a atividade inibitória sobre a α -amilase como destacado na literatura (LO PIPARO et al., 2008, PEREIRA et al., 2011, LIU et al., 2013, YAO et al., 2013). Fato que corrobora com as observações realizadas, sendo que em especial, a FAE e a FB apresentaram melhores atividades contra a α -amilase e apresentam a maior quantidade de flavonoides e proantocianidinas, respectivamente.

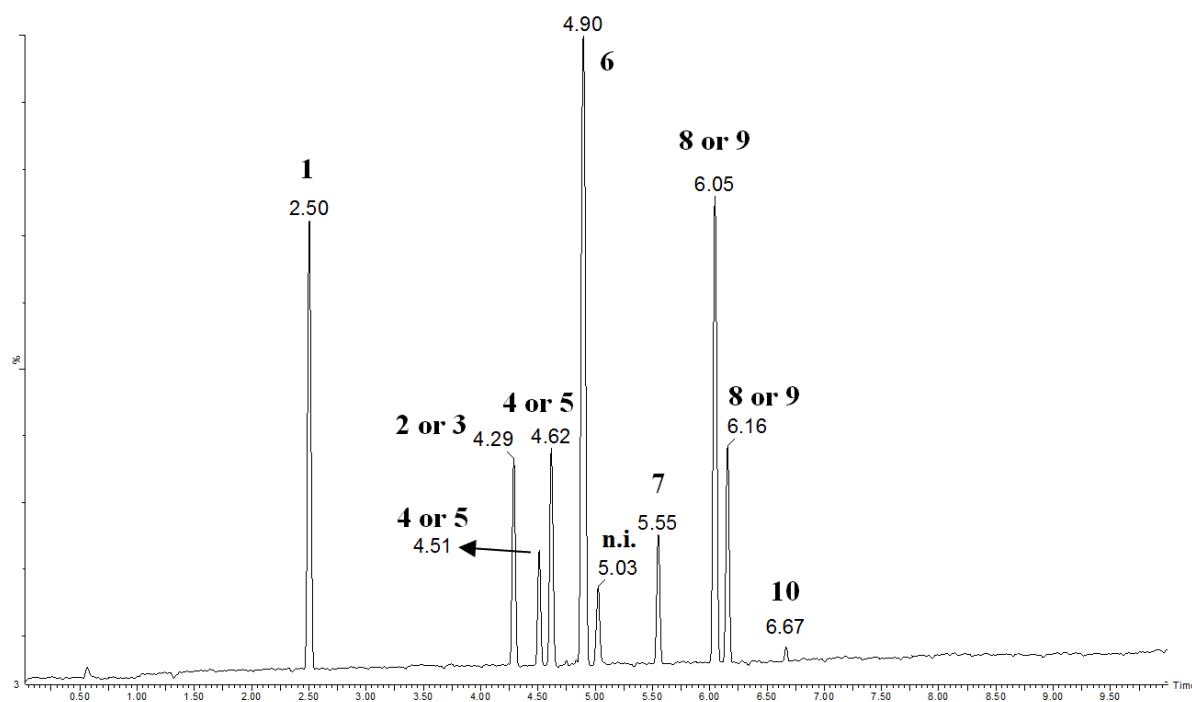
¹⁴ No caso da VPD a 1ª foi calculado com os valores de Ip_1 e a 2ª linha com os valores de Ip_2 . Os valores de CE_{50} foram expressos em $1/CE_{50}$, visto que quanto menor o valor de CE_{50} melhor é a atividade. A correlação foi realizada pelo método de Pearson através do Programa Sigma Plot 11.0. Para todas as correlações se obteve $p < 0,01$.

4.4.4 Estudo fitoquímico da FAE das folhas de *B. argyrophylla*

4.4.4.1 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e identificação dos metabólitos secundários da fração FAE

A FAE foi selecionada nesta etapa, pois apresentou os melhores resultados nos ensaios de atividades antioxidante, inibitória sobre as enzimas α -amilase e antifúngica, utilizando os fungos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A mesma foi submetida à análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas em alta resolução (CLUE/EM), com ionização por *eletrospray* (IES) no modo negativo (Figura 52). Neste cromatograma foi possível observar nove sinais (t_R), cujas análises dos EM/EM-IES em alta resolução, no modo negativo (Figura 53 – Figura 61), permitiu identificar os flavonoides **1–10** (Tabela 26) (MIKETOVA et al., 2000, SUN et al., 2007, CHA et al., 2008, QING et al., 2012, RATTMANN et al., 2012, SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, ZHAO et al., 2013).

Figura 52- Cromatograma de CLUE-EM-IES¹⁵ no modo negativo da fração FAE das folhas de *B. argyrophylla*.

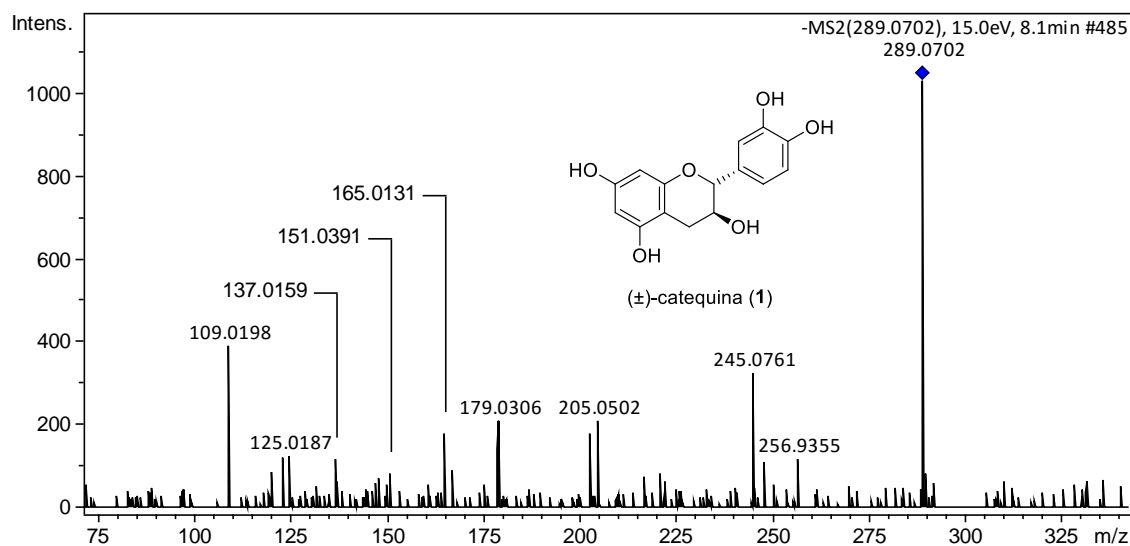


Fonte: a autora.

¹⁵ n.i. = não identificado.

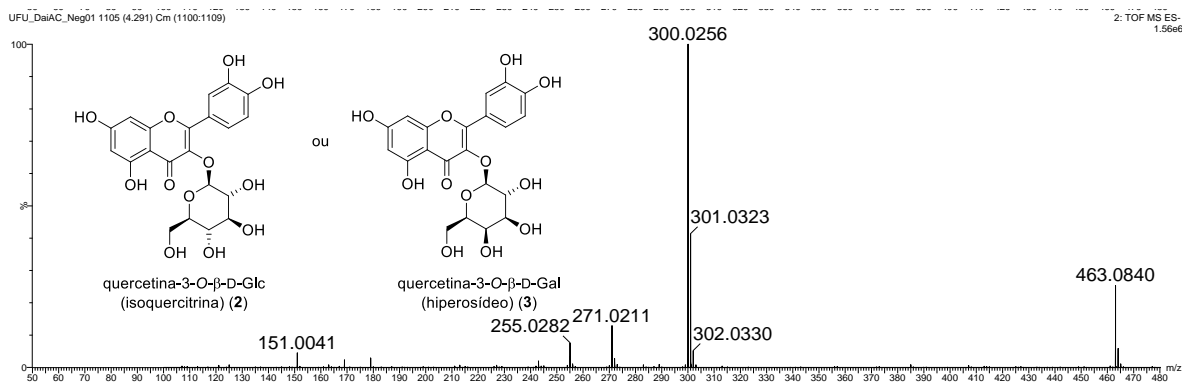
Tabela 26 - Compostos identificados na FAE das folhas de *B. argyrophylla* por CLUE/EM

t_R	$[M - H]^-$	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Composto
2,50	289,0715	1,04	$C_{15}H_{14}O_6$	(±)-catequina (1)
4,29	463,0881	0,21	$C_{21}H_{20}O_{12}$	quercetina-3- <i>O</i> -β-D-Glc (2) ou quercetina-3- <i>O</i> -β-D-Gal (3)
4,51	433,0768	1,85	$C_{20}H_{18}O_{11}$	quercetina-3- <i>O</i> -β-L-Ara (4) ou
4,62	433,0770	1,39		quercetina-3- <i>O</i> -β-D-Xil (5)
4,90	447,0937	-0,89	$C_{21}H_{20}O_{11}$	quercetina-3- <i>O</i> -α-L-Rha (6)
5,55	431,0977	1,62	$C_{21}H_{20}O_{10}$	kaempferol-3- <i>O</i> -α-L-Rha (7)
6,05	599,1037	0,83	$C_{28}H_{24}O_{15}$	quercetina-3- <i>O</i> -(2"-galoil)-α-L-Rha (8) ou
6,16				quercetina-3- <i>O</i> -(3"-galoil)-α-L-Rha (9)
6,67	583,1088	0,85	$C_{28}H_{24}O_{14}$	kaempferol-3- <i>O</i> -(2"-galoil)-α-L-Rha (10)

Figura 53 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 2,50 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*

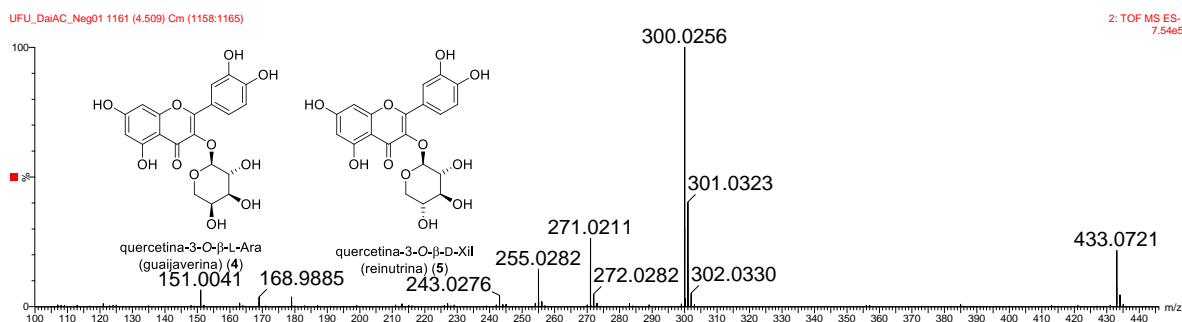
Fonte: a autora.

Figura 54 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,29 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*



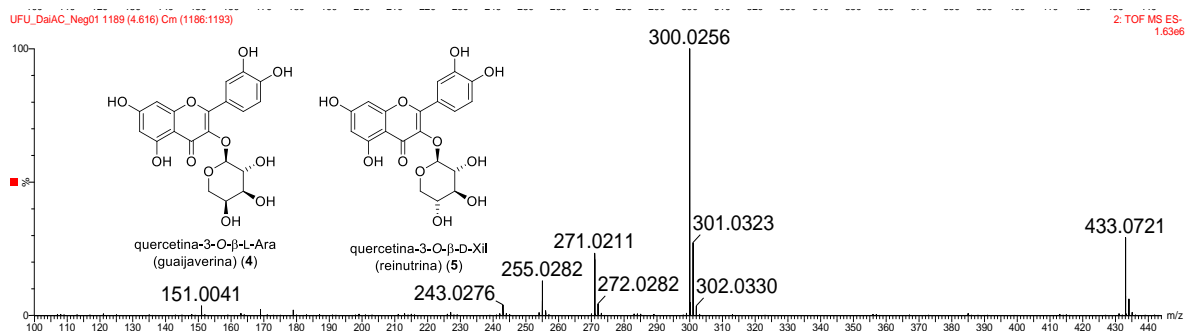
Fonte: a autora.

Figura 55 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,51 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*



Fonte: a autora.

Figura 56 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,62 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*



Fonte: a autora.

Figura 57 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 4,90 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*

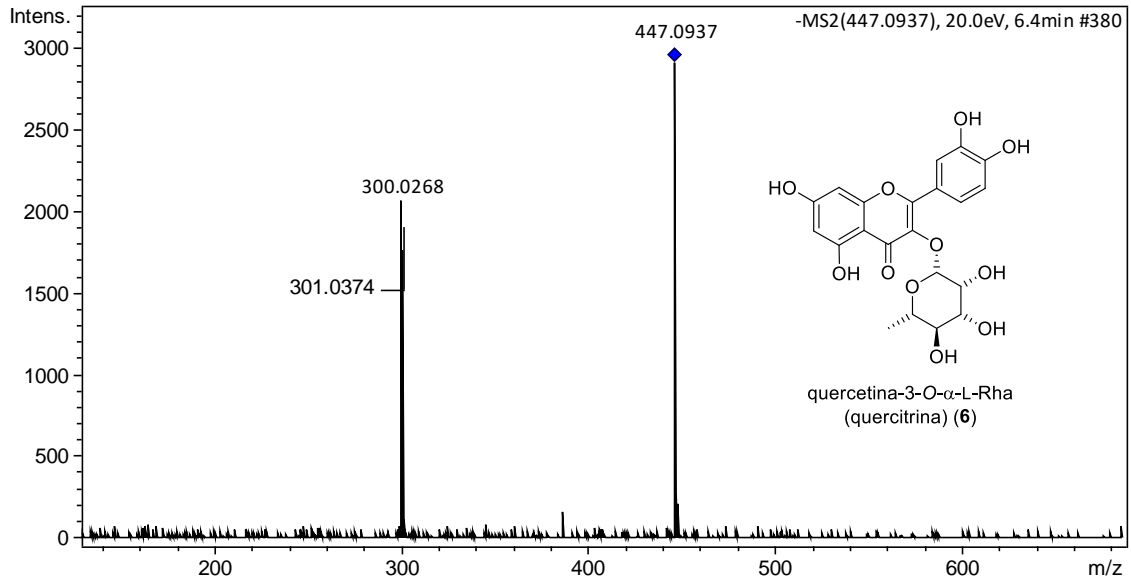


Figura 58 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 5,55 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*

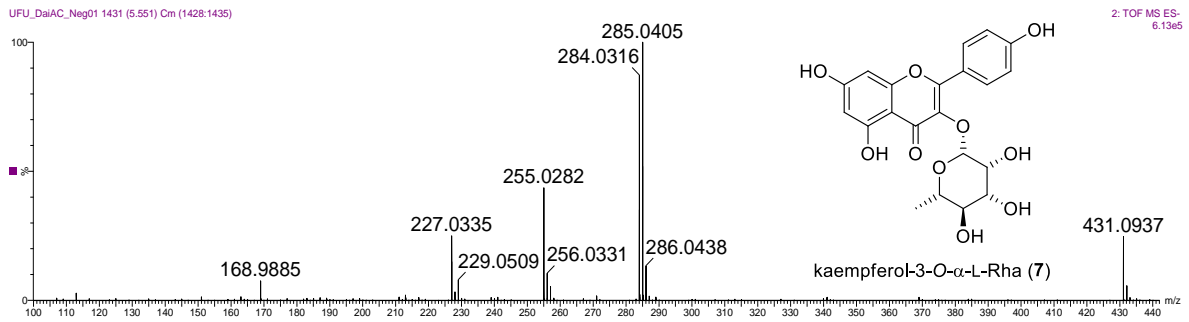


Figura 59 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 6,05 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*

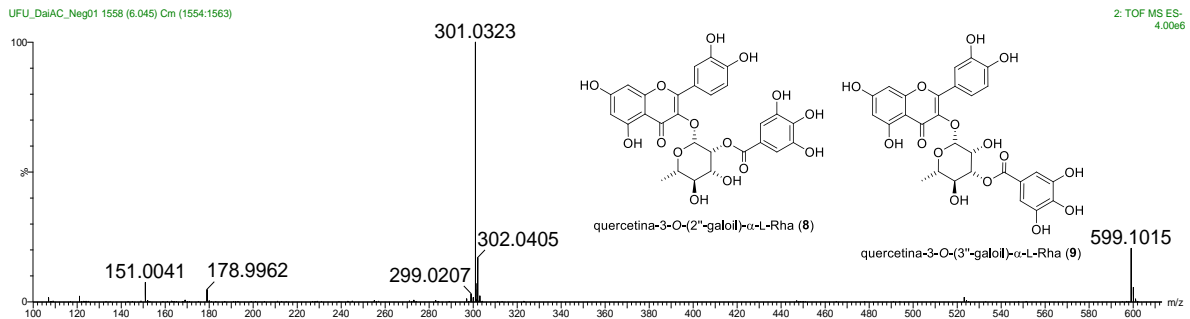
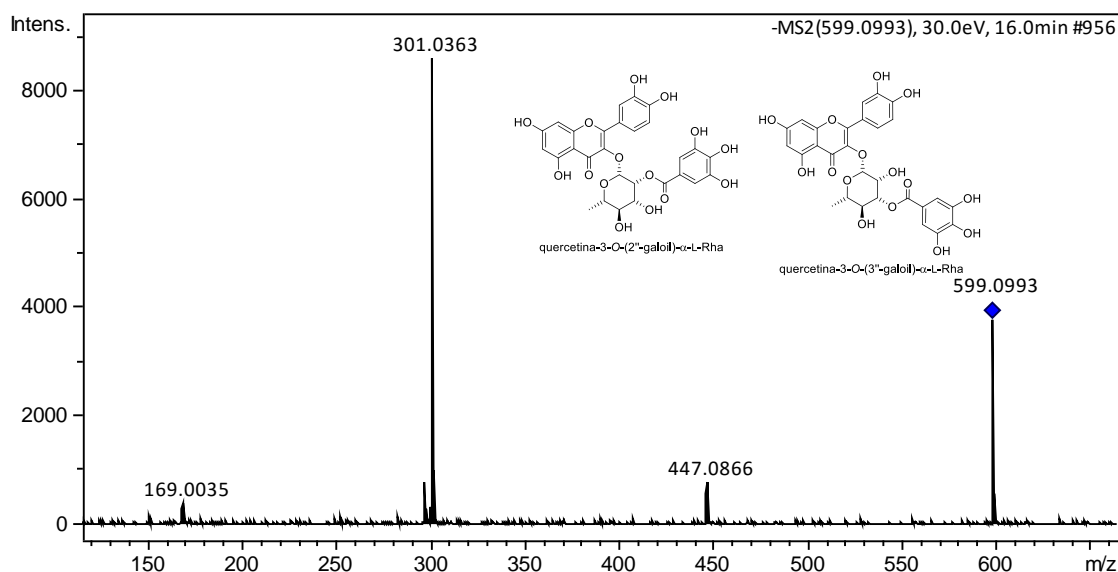
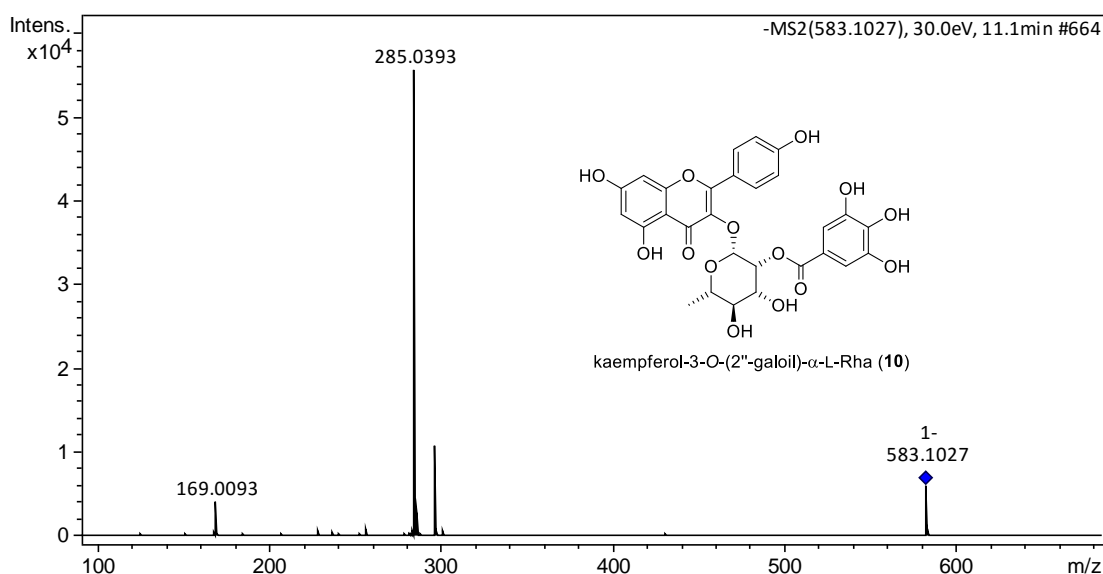


Figura 60 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 6,16 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*

Fonte: a autora.

Figura 61 - (-)-EM/EM-IES do composto com t_R 6,67 min da FAE das folhas de *B. argyrophylla*

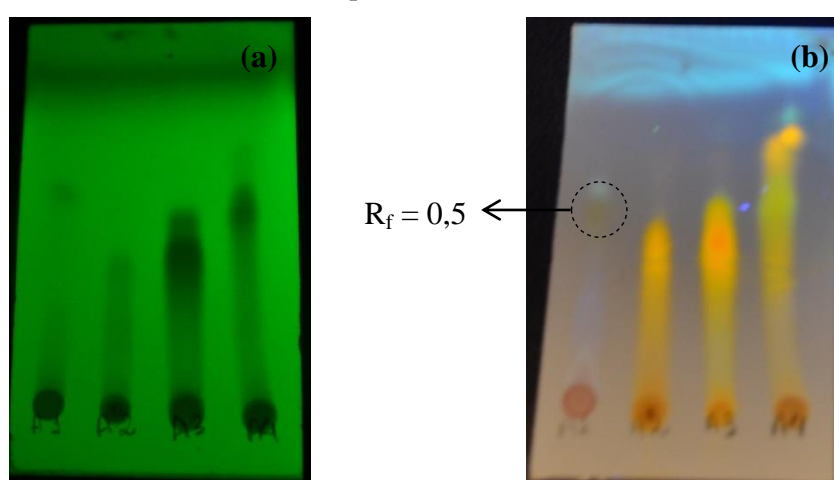
Fonte: a autora.

4.4.4.2 Purificação dos metabólitos secundários da FAE

A próxima etapa da pesquisa foi à purificação dos metabólitos secundários, que foi realizada considerando técnicas cromatográficas que envolvem a distribuição dos diferentes compostos na mistura entre duas fases, uma estacionária e a outra móvel. Também foram utilizadas diferentes técnicas instrumentais, que podem ser realizadas com pequenas quantidades de amostras e podem fornecer informações sobre a sua estrutura.

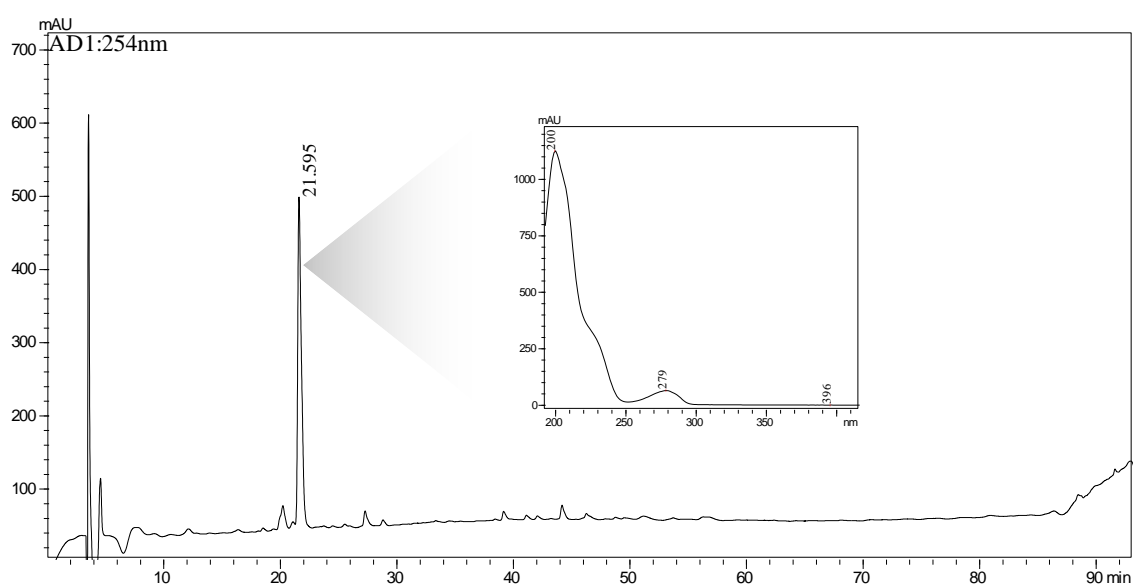
O processo de purificação das substâncias bioativas foi realizado através da cromatografia em coluna (CC) (item 3.8.9). As frações obtidas em coluna aberta foram reagrupadas por cromatografia em camada delgada (CCD), obtendo quatro frações: FAE-A1–FAE-A4 (Figura 62). Em seguida essas frações foram analisadas por CLAE (item 3.8.10) visando à obtenção de um perfil químico (Figura 63 – Figura 66). Foi verificado na FAE-A1 a presença de um composto majoritário.

Figura 62 - CCD das frações FAEA1–FAEA4 das folhas de *B. argyrophylla* (FE: sílica, FM: (10: 1,1: 1,1: 2,6) e revelador: NP/PEG e inspecionadas em luz UV a 254 nm (a) e 354 nm (b)

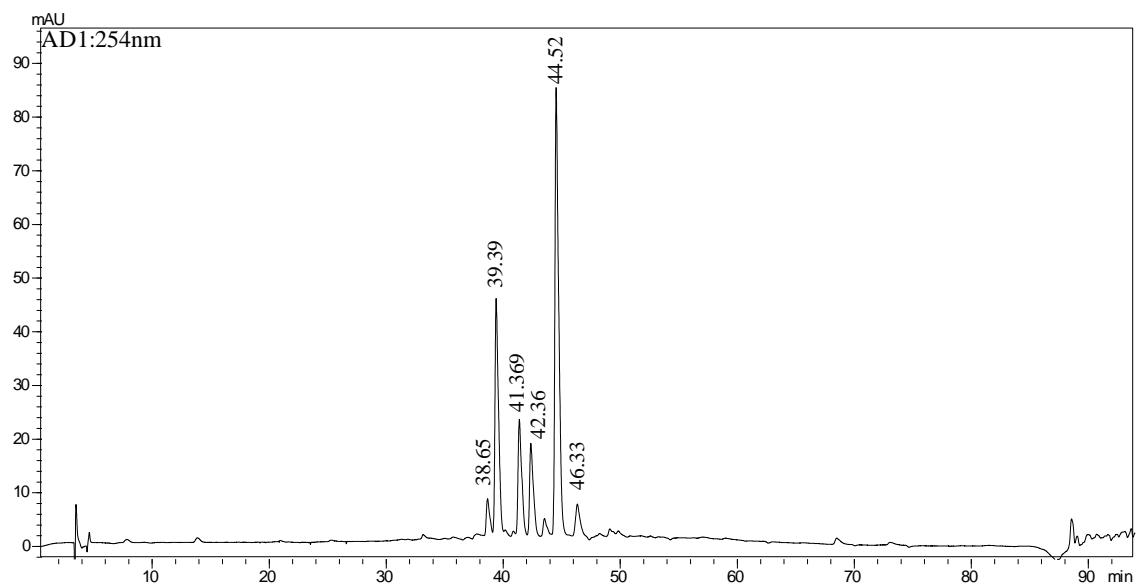


Fonte: a autora.

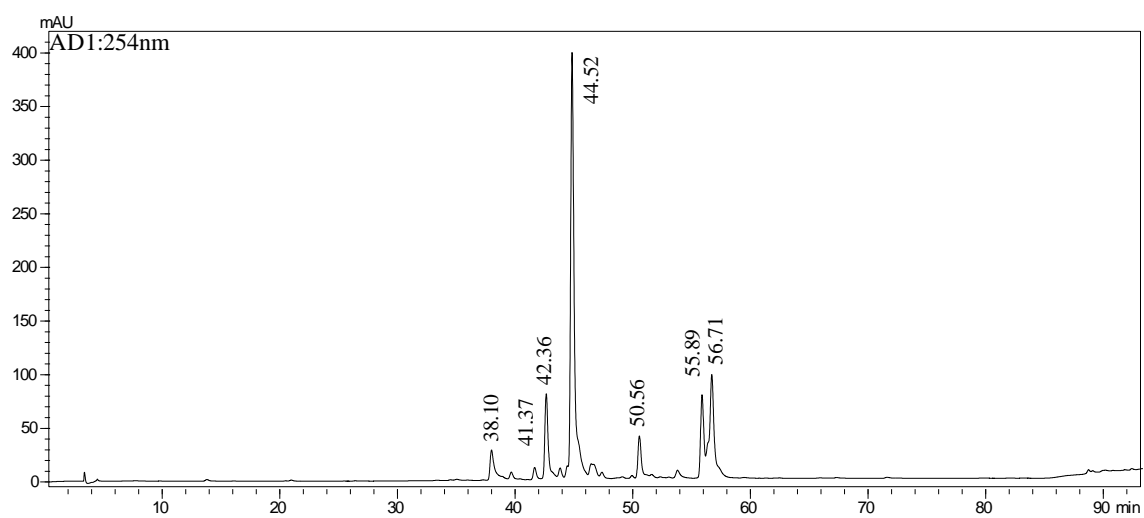
Figura 63 - Cromatograma da fração FAE-A1 (t_R 21,6 min) obtido por CLAE-UV₂₅₄



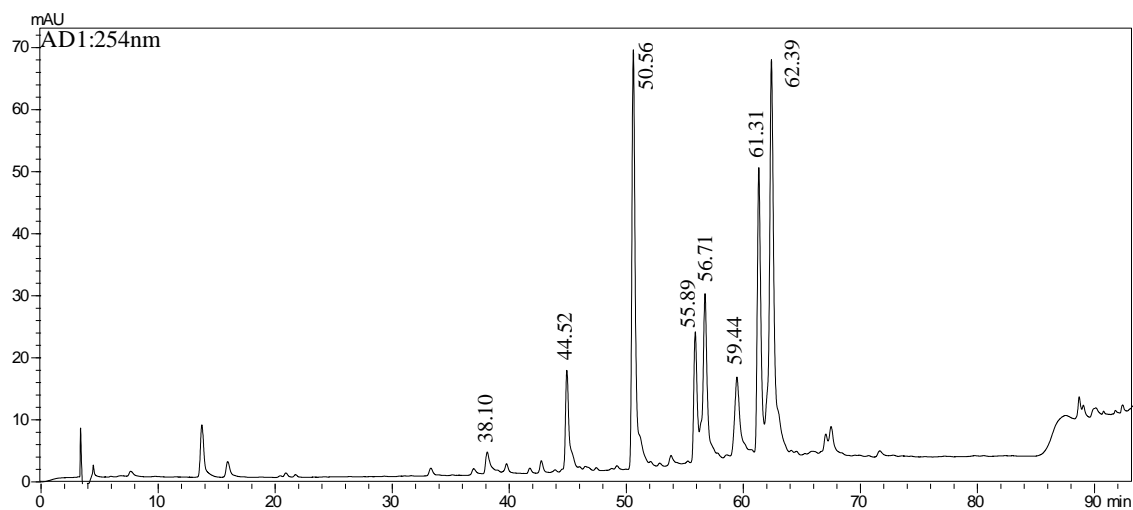
Fonte: a autora.

Figura 64 - Cromatograma da fração FAE-A2 obtido por CLAE

Fonte: a autora.

Figura 65 - Cromatograma da fração FAE-A3 obtido por CLAE

Fonte: a autora.

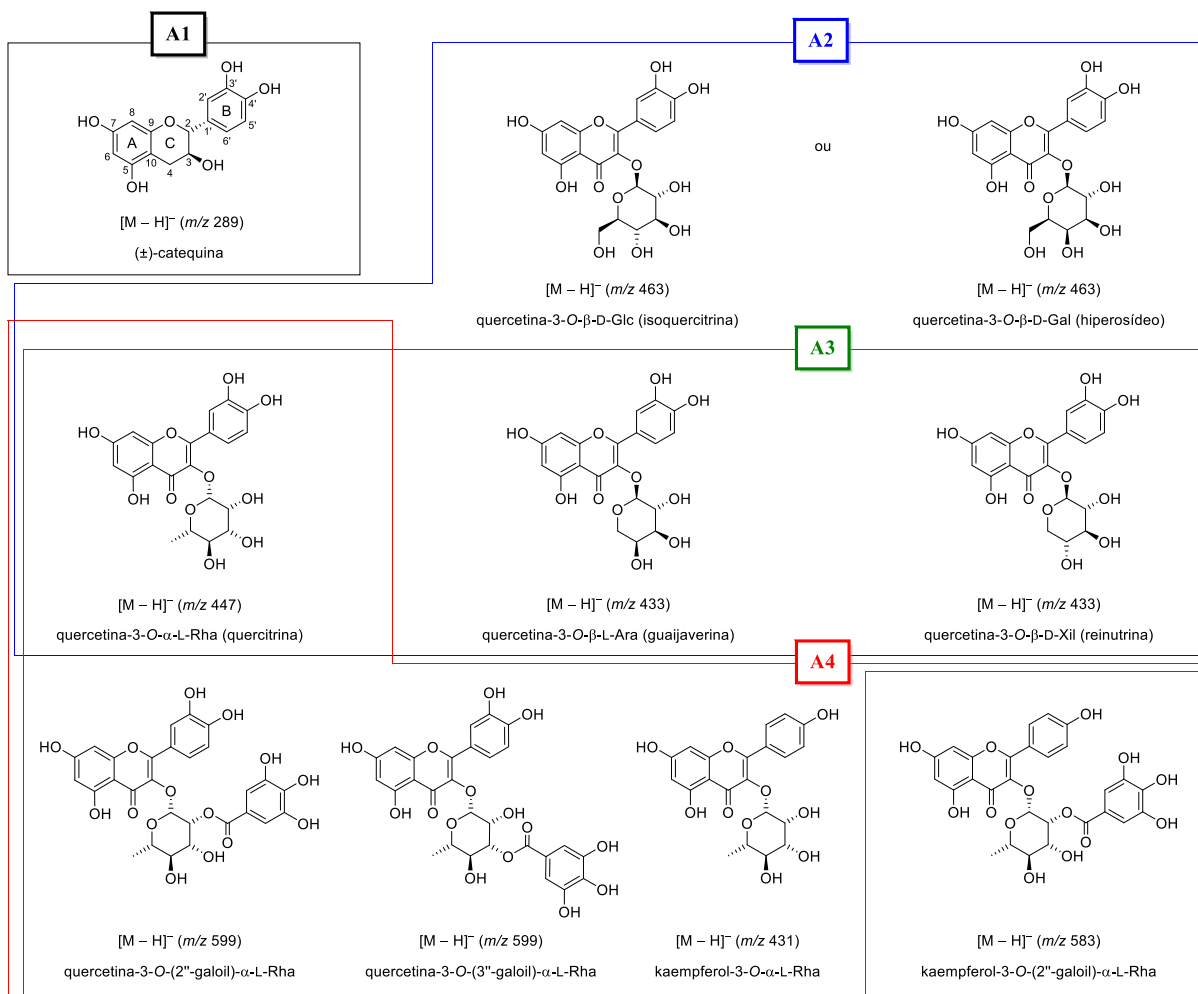
Figura 66 - Cromatograma da fração FAE-A4 obtido por CLAE

Fonte: a autora.

A análise dos EM-IES das frações: AE-A1¹⁶, AE-A2, AE-3 e AE-A4, permitiram verificar os flavonoides presentes em cada amostra como será discutido nos itens a seguir. A Figura 67 mostra as divisões observadas.

¹⁶ Para a identificação da composição química da FAE-A1 também foi importante às análises realizadas por RMN, com discutido no item 4.4.4.3.

Figura 67- Flavonoides identificados nas frações A1–A4 (obtidas da FAE), das folhas de *B. argyrophylla*



Fonte: a autora.

4.4.4.3 Identificação do composto isolado da FAE-A1

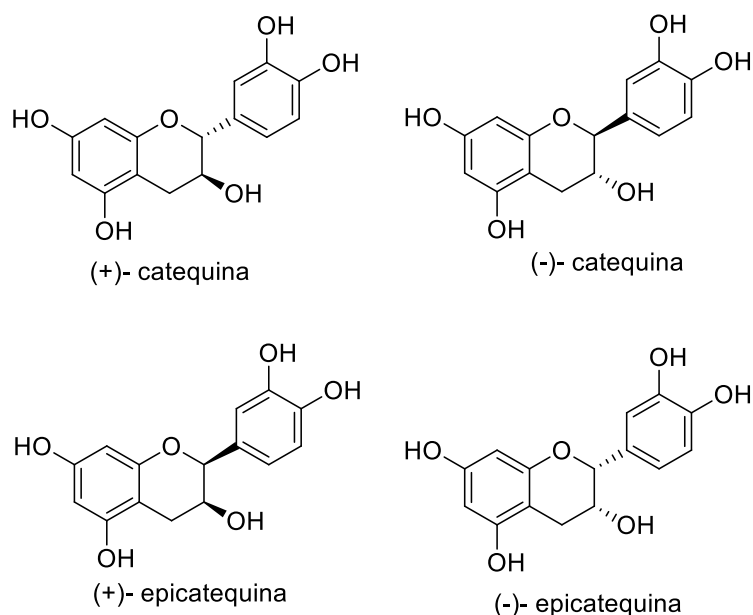
A análise do espectro de UV-vis da FAE-A1 em t_R de 21,59 min apresentado na Figura 63 foi verificado dois máximos de absorção: $\lambda_{\max 1}=200$ nm e $\lambda_{\max 2}=279$ nm. Os flavan-3-óis distinguem das demais classes de flavonoides por não possuírem a banda I, pois não há conjugação entre os anéis A e B, apresentando a banda II na faixa de 275-285 nm (JOSÉ-CHAGAS et al., 2014).

A avaliação da fração FAE-A1 por EM-IES em alta resolução no modo negativo (Figura 69), possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a nove. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 289,0710 $[M - H]^-$, calculado para $C_{15}H_{13}O_6^-$, 289,0718 ($\Delta -2,8$), correlacionado com a (±)-

catequina ou com a (\pm)-epicatequina (Figura 68) (Figura 69) (GUO-QIANG et al., 2009, HAMED et al., 2014).

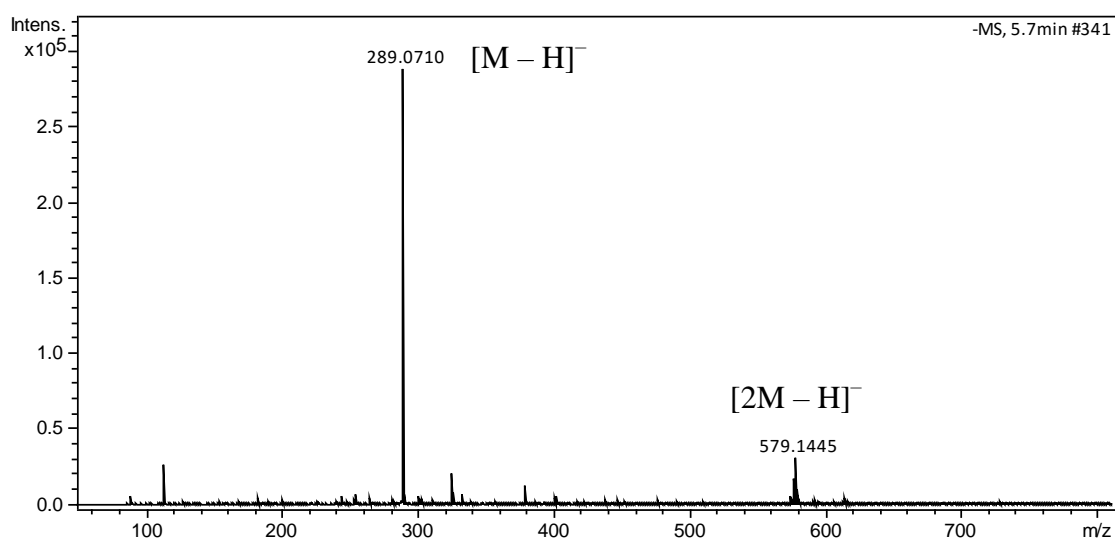
O m/z 579,1445 $[2M - H]^-$ corresponde a um íon dímérico que foi formado durante o processo, por um ânion de catequina/epicatequina e uma catequina/epicatequina neutra (SOUSA, 2015).

Figura 68 - Possibilidades de compostos presentes na FAE-A1



Fonte: a autora.

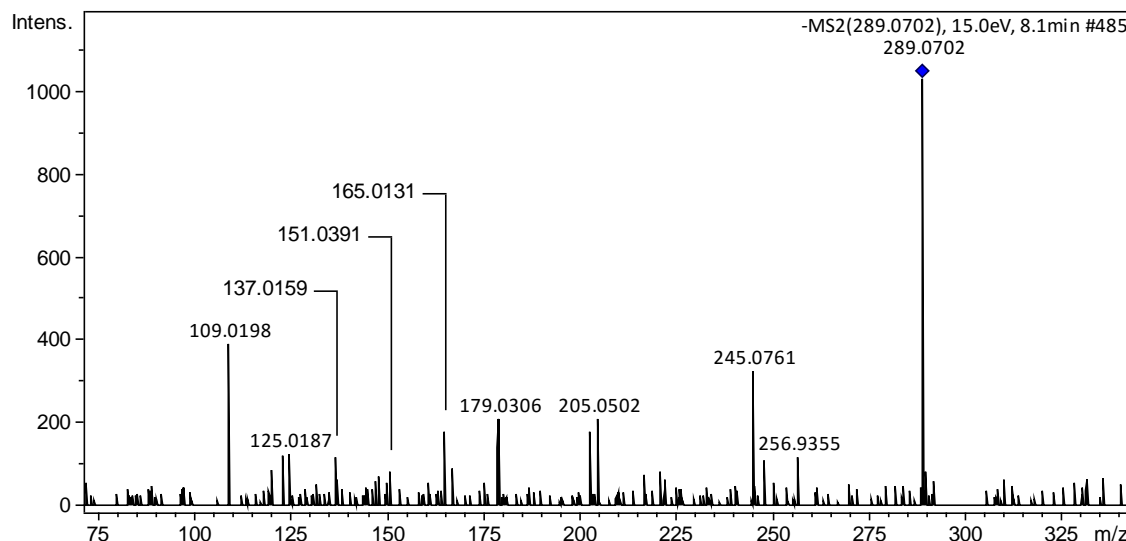
Figura 69 - EM-IES em alta resolução da fração FAE-A1



Fonte: a autora.

Quando o sinal de m/z 289 foi submetido à análise por EM sequencial (EM/EM), foram observados nove sinais majoritários de m/z 245, 205, 179, 165, 151, 137, 125 e 109 (Figura 70).

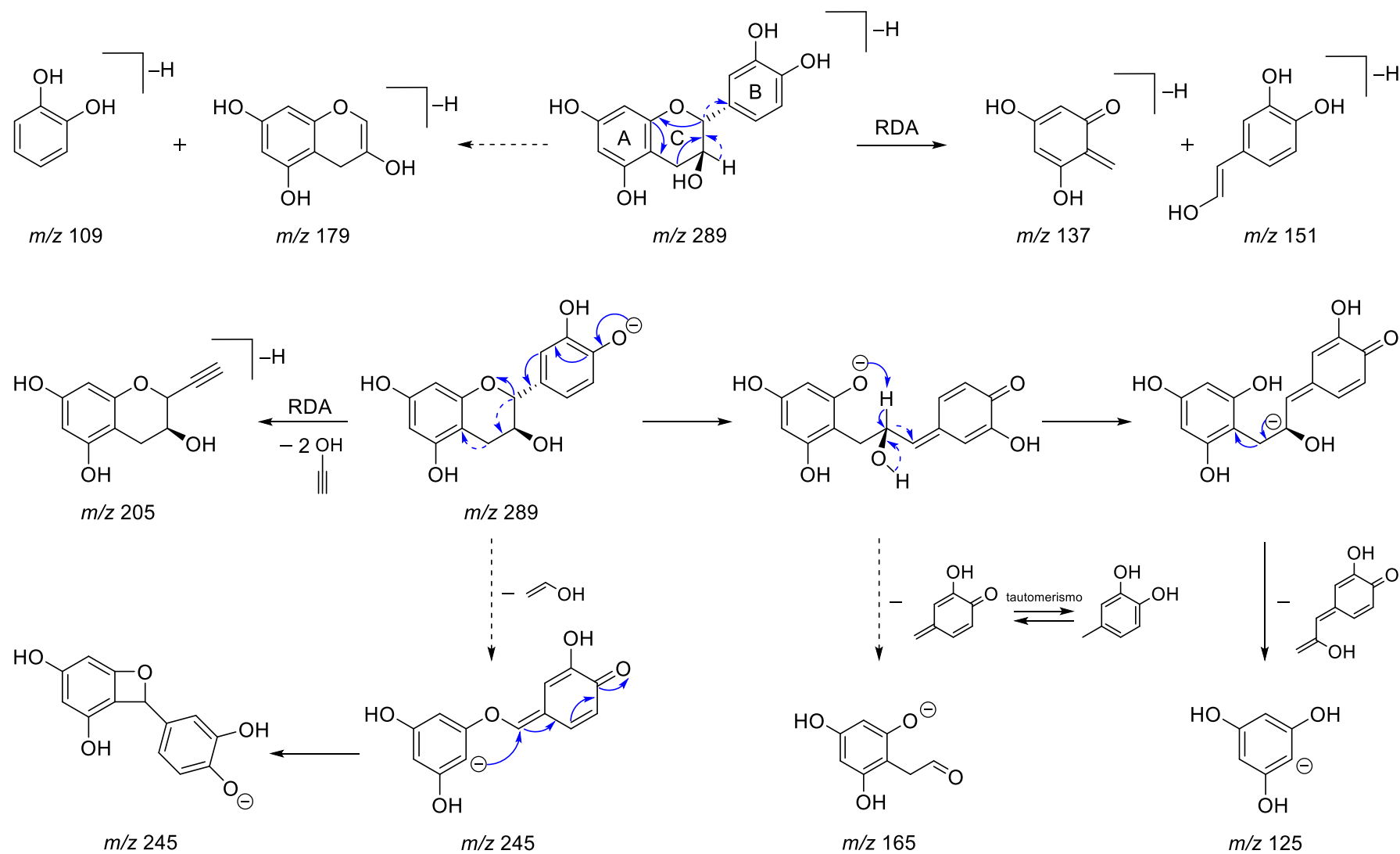
Figura 70 - (-)-EM/EM-IES em alta resolução da FAE-A1



Fonte: a autora.

A clivagem heterolítica entre os anéis B e C resultou na formação dos sinais de m/z 179 e 109, quando a carga estiver retida no fragmento do anel A-C ou B, respectivamente. A proposta de clivagem do anel C através de um mecanismo retro Diels-Alder (RDA), levou a formação dos sinais de m/z 137 e 151, quando a carga estiver retida no fragmento do anel A ou B, respectivamente (RODRIGUES et al., 2007; DEMARQUE et al., 2016). O fragmento de m/z 125 foi atribuído à clivagem do heterocíclico (anel C), auxiliada pela conjugação do par de elétrons do oxigênio (fenóxido) na posição quatro do anel B. Em seguida o fenóxido (anel A) captura o hidrogênio carbinólico (H-3), resultando na transferência da carga para C-3. Em seguida, a clivagem heterolítica entre C-4 e C-10 leva a eliminação neutra de 164 u e no fragmento de m/z 125 (MIKETOVA et al., 2000). O intermediário originado na cisão heterocíclica também pode dar origem ao fragmento de m/z 165 (HAMED et al., 2014). A clivagem heterocíclica com eliminação neutra do enol ($\text{CH}_2=\text{CHOH}$) leva a formação do sinal de m/z 245 com retenção da carga negativa no anel A ou formação de um novo heterocíclico, com a carga dispersa no anel B. O sinal de m/z 205 foi atribuído à clivagem do anel A através do mecanismo RDA com eliminação neutra de duas moléculas de $\text{HC}\equiv\text{COH}$ (GUO-QIANG et al., 2009). As propostas de fragmentação se encontram na Figura 71.

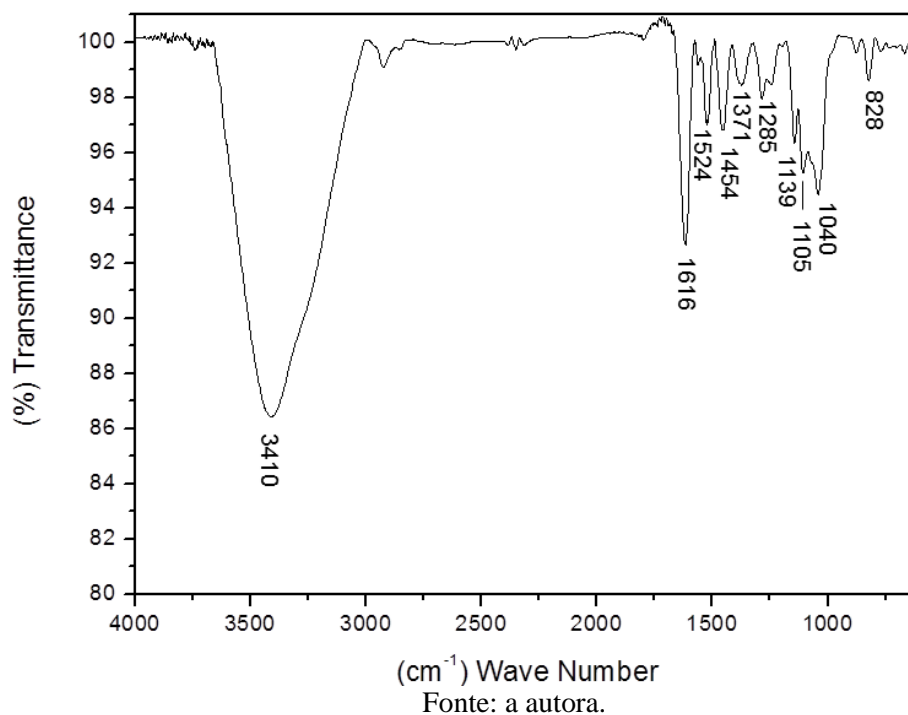
Figura 71 - Proposta de fragmentação para a (\pm)-catequina ou (\pm)-epicatequina (m/z 289)



Fonte: a autora e adaptado de Guo-Qiang et al., (2009), Hamed et al., (2014), Miketova et al. (2000) e Rodrigues et al. (2007).

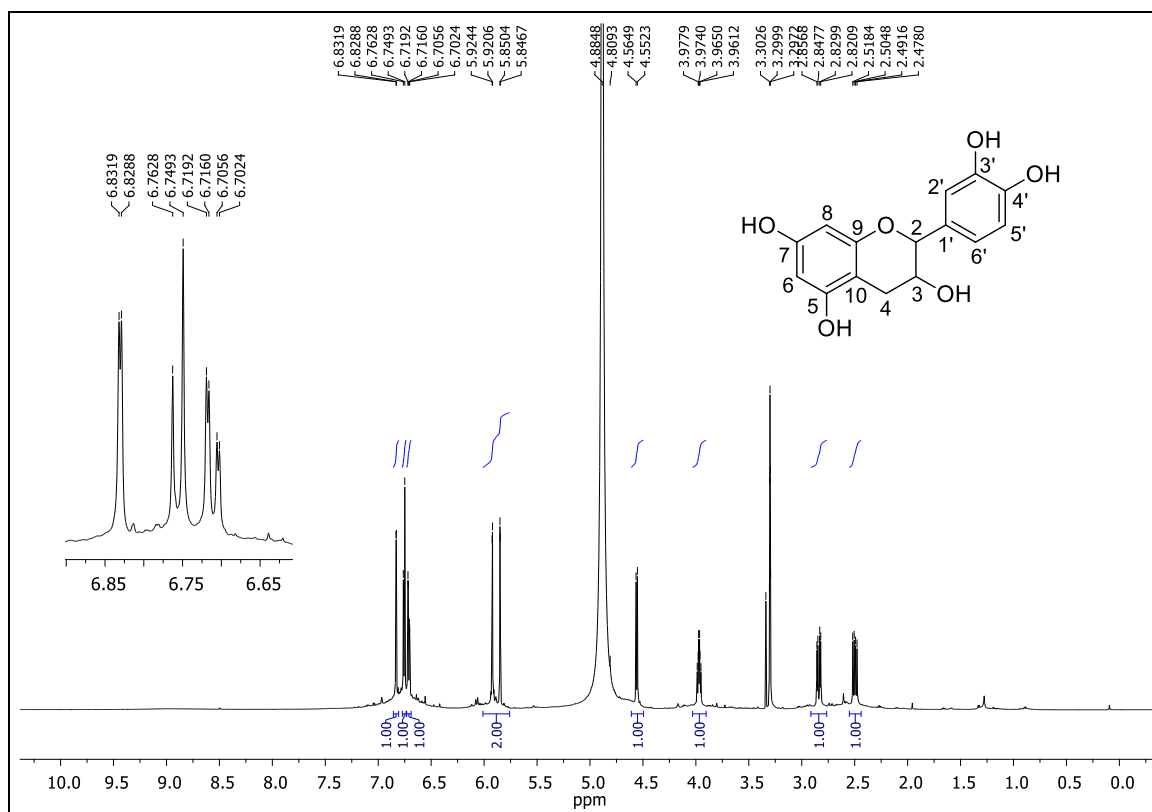
Foi obtido também o espectro na região do infravermelho da FAE-A1 (Figura 72). As principais bandas de absorção observadas foram de OH (3410 cm^{-1}), de carbono-carbono fenólico (1616 , 1524 , 1454 cm^{-1}) e de carbono-oxigênio (1040 , 1105 e 1139 cm^{-1}).

Figura 72 - Espectro de infravermelho (KBr) para a (\pm)-catequina ou (\pm)-equiccatequina (fração A1)



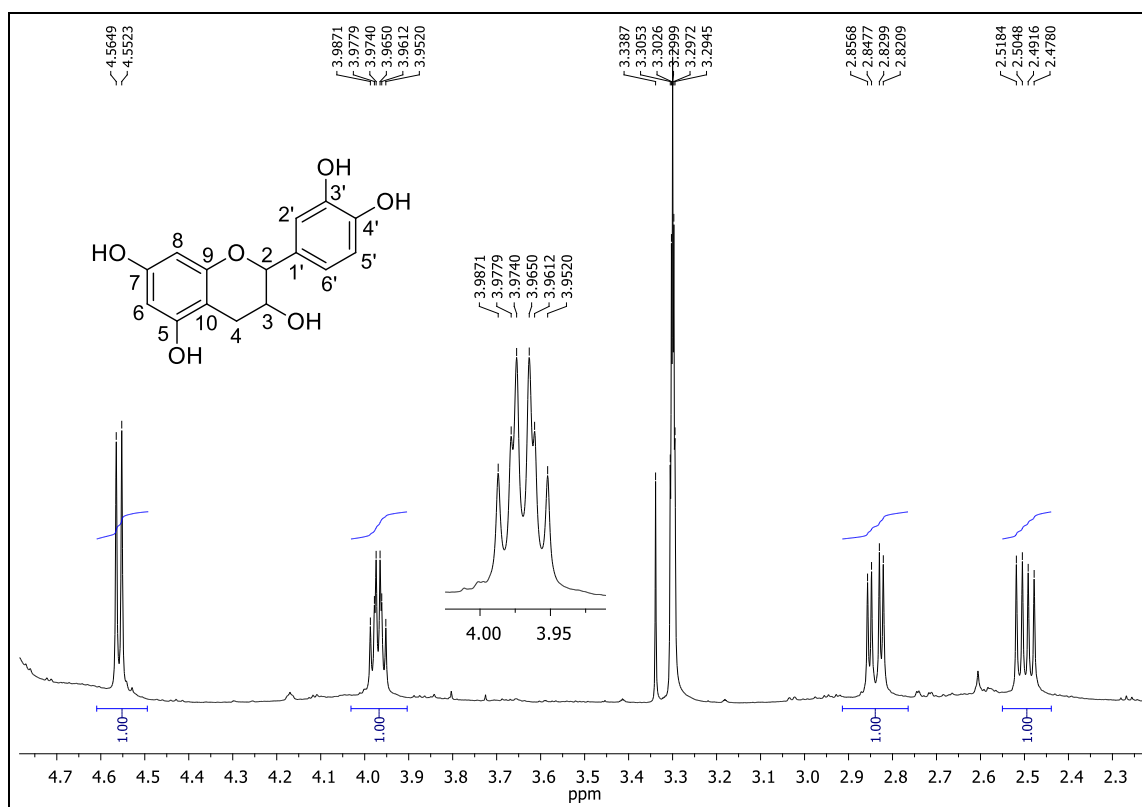
Como estas moléculas são diastereoisômeros (Figura 68) não é possível distingui-las por espectrometria de massas. Uma análise por comparação com dados de RMN pode ajudar nesse caso. Assim, o espectro de RMN ^1H da fração FAE-A1 (Figura 73– Figura 75), permitiu observar a presença de cinco sinais característicos de hidrogênios aromáticos, sendo dois dupletos em δ 5,86 ($J = 2,3\text{ Hz}$, H-6) e 5,92 ($J = 2,3\text{ Hz}$, H-8), cujas constantes de acoplamento são características de anel aromático 1,2,3,5-tetrasubstituído (hidrogênios *meta*, anel A), dois dupletos em δ 6,83 ($J = 1,9\text{ Hz}$, H-2') e δ 6,75 ($J = 8,1\text{ Hz}$, H-5') e um duplo duplete em δ 6,70 ($J = 8,1$ e $1,9\text{ Hz}$, H-6'), característicos de anel aromático 1,3,4-tetrasubstituído (anel B). Neste espectro também foi observado um duplete em δ 4,56 ($J = 7,7\text{ Hz}$, 1H, H-2) e um duplo triplete em δ 3,97 ($J = 7,7$ e $5,5\text{ Hz}$, 1H, H-3), sendo a constante de acoplamento característica de hidrogênios *trans*-diaxial, além de dois duplos dupletos em δ 2,50 ($J = 16,1$ e $8,1\text{ Hz}$, 1H, H-4a) e 2,83 ($J = 16,1$ e $5,5\text{ Hz}$, 1H, H-4b). Estes dados, aliados aos de RMN ^{13}C (Figura 76) (Tabela 28), foram comparados com aqueles disponíveis na literatura e são condizentes com aqueles da estrutura da (\pm)-catequina (Tabela 27 e Tabela 28).

Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da (\pm)-catequina (fração FAE-A1)



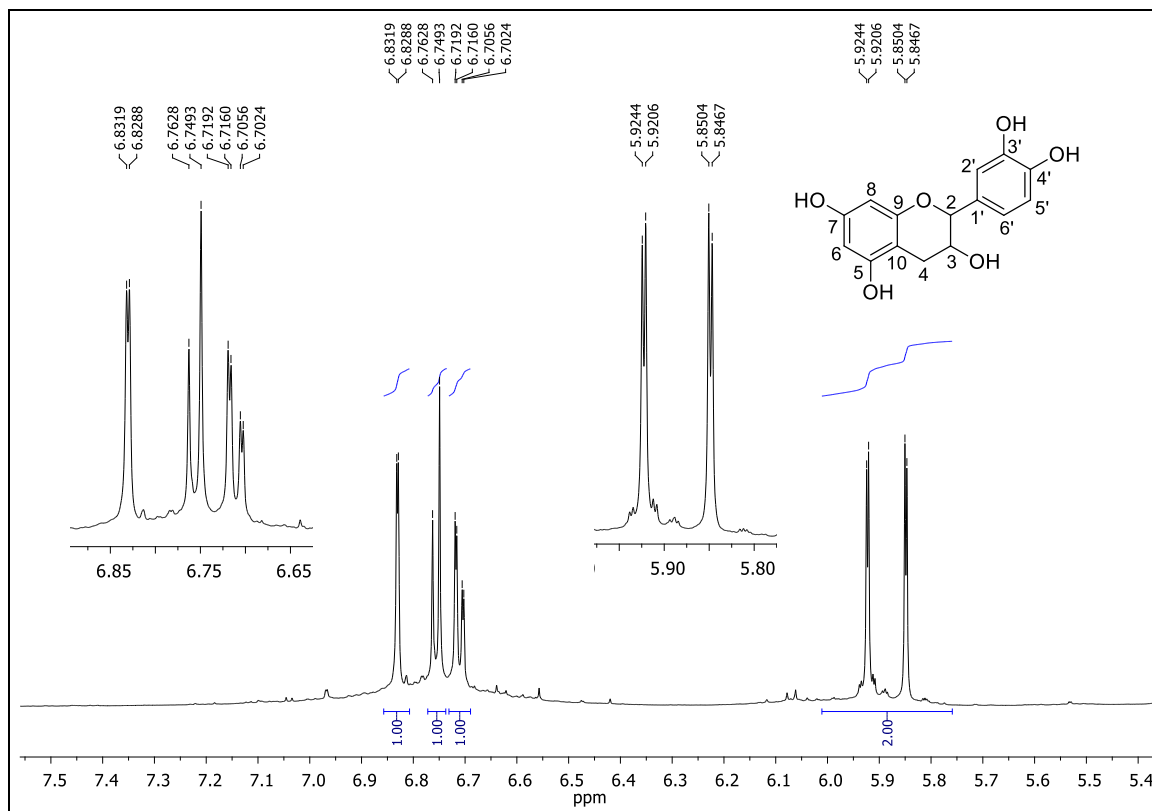
Fonte: a autora.

Figura 74 - Ampliação da Figura 73 (δ 2,3–4,7), da (\pm)-catequina (fração FAE-A1)



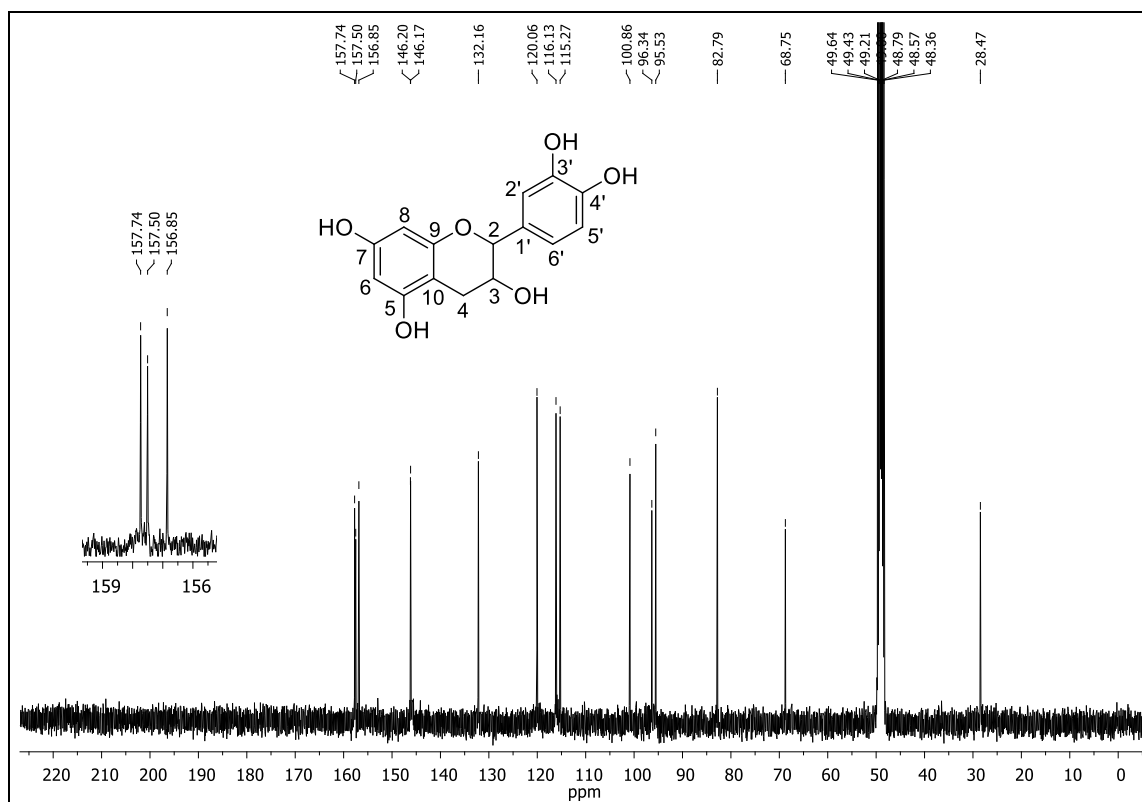
Fonte: a autora.

Figura 75 - Ampliação da Figura 73 (δ 5,4–7,5), da (\pm)-catequina (fração FAE-A1)



Fonte: a autora.

Figura 76 - Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) da (\pm)-catequina (fração FAE-A1)



Fonte: a autora.

Tabela 27 - Dados de RMN ^1H para a (\pm)-catequina e para (\pm)-epicatequina (δ em ppm)

Posição	F AE-A1	(+)-catequina		(-)-epicatequina	
	(a autora)	(LÔBO et al., 2008)	(AYRES et al., 2009)	(SHAHAT, 2006)	(SOUSA, 2015)
	(600 MHz, metanol- d_4)	(300 MHz, metanol- d_4)	(300 MHz, metanol- d_4)	(400 MHz, acetone- d_6)	(300 MHz, metanol- d_4)
	δ_{H} (mult. ^a , J em Hz)	δ_{H} (mult. ^a , J em Hz)	^1H δ (mult. ^a , J em Hz)	^1H δ (mult. ^a , J em Hz)	^1H δ (mult. ^a , J em Hz)
2	4,56 (d; 7,7)	4,57 (d; 7,5)	4,59 (d; 7,4)	4,81 (s)	4,83 (s)
3	3,97 (td; 7,7; 5,5)	3,97 (m)	4,01 (ddd; 8,0; 7,4 e 5,4)	4,17 (m)	4,16-4,18 (m)
4 _a	2,50 (dd; 16,1; 8,1)	2,51 (dd; 16,1 e 8,2)	2,52 (dd; 16,0 e 8,0)	2,73 (dd; 16,7 e 2,5)	2,7 (dd; 16,8 e 2,7)
4 _b	2,83 (dd; 16,1; 5,5)	2,85 (dd; 16,1 e 5,5)	2,84 (dd; 16,0 e 5,4)	2,85 (dd; 16,5 e 4,5)	2,86 (dd; 16,5 e 4,5)
6	5,86 (d; 2,3)	5,93 (d; 2,2)	5,96 (d; 2,2)	5,94 (d; 2,2)	5,94 (d; 2,1)
8	5,92 (d; 2,3)	5,85 (d; 2,2)	5,89 (d; 2,2)	5,91 (d; 2,2)	5,91 (d; 2,1)
2'	6,83 (d; 1,9)	6,83 (d; 1,8)	6,85 (d; 1,8)	6,97 (d; 1,7)	6,97 (d; 1,7)
5'	6,75 (d; 8,1)	6,76 (d; 8,1)	6,79 (d; 8,1)	6,74 (d; 7,5)	6,75 (d; 7,9)
6'	6,70 (dd; 8,1; 1,9)	6,71 (dd; 8,1 e 1,8)	6,72 (dd; 1,8 e 8,1)	6,78 (dd; 7,5 e 1,7)	6,79 (dd; 1,7 e 7,9)

^a multiplicidade dos sinais é dada como se segue: s simpleto; d, duplete; dd, duplo duplete; ddd, duplo duplo duplete; dt, duplo tripleto; m, multiplete.

Tabela 28 - Dados de RMN ^{13}C para a (\pm)-catequina e para (\pm)-epicatequina (δ em ppm)

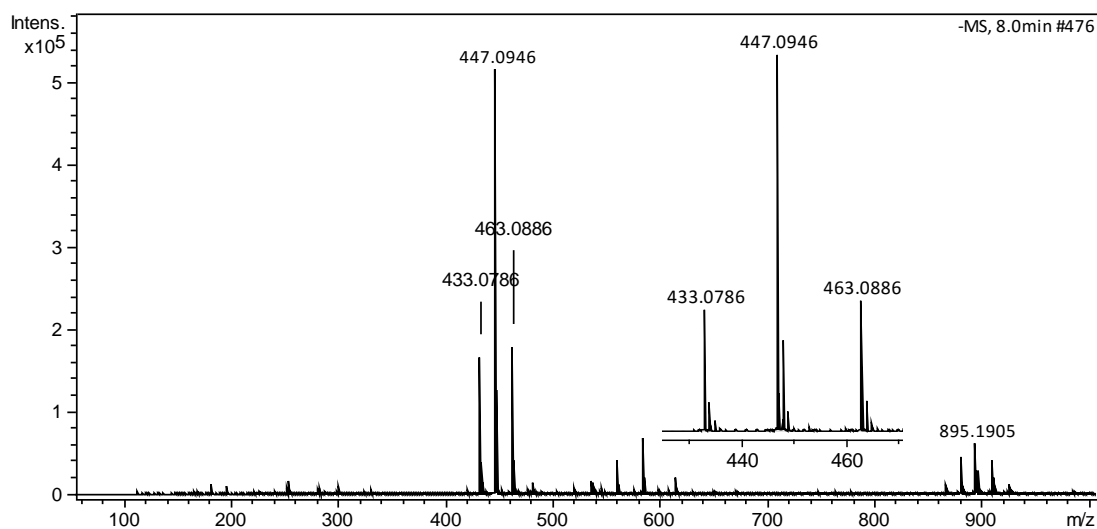
Posição	FAE-A1	(+) - catequina		(-) - epicatequina	
	(a autora)	(LÔBO et al., 2008)	(AYRES et al., 2009)	(SHAHAT, 2006)	(SOUSA, 2015)
	(400 MHz, metanol- d_4)	(75 MHz, acetone- d_6)	(75 MHz, metanol- d_4)	(100 MHz, acetone- d_6)	(75 MHz, metanol- d_4)
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
2	82,8, CH	82,4	82,6	79,8	80,0
3	68,8, CH	68,0	68,6	67,7	67,6
4	28,5, CH ₂	28,6	28,2	29,2	29,4
5	156,8, C ^a	156,6	157,3	157,9	158,1
6	96,3, CH	96,0	96,4	96,5	96,5
7	157,7, C ^a	157,5	157,4	157,6	157,8
8	95,5, CH	95,1	95,6	95,9	96,0
9	157,5, C ^a	157,0	156,7	157,3	157,5
10	100,9, C	100,3	100,9	100,1	100,2
1'	132,2, C	131,7	132,0	132,3	132,4
2'	115,3, CH	115,2	115,2	115,3	115,4
3'	146,2, C	145,6	146,0	145,9	146,1
4'	146,1, C	145,5	146,0	145,7	145,9
5'	116,1, CH	115,6	116,2	115,9	116,0
6'	116,1, CH	119,8	120,1	119,1	119,5
	121,1, CH				

^aAs atribuições destes sinais foram baseadas nos valores de δ_{C} calculados (Chem Draw Ultra 15.0) e podem estar trocados na coluna.

4.4.4.4 Identificação dos compostos das FAE-A2 – FAE-A4

A análise da fração A2 por (–)-EM-IES (Figura 77) em alta resolução permitiu observar a presença de três sinais de m/z 433,0786 (**4** ou **5**), 447,0946 (**6**) e 463,0886 (**2** ou **3**) (que foram correlacionados com as moléculas desprotonadas $[M - H]^-$ (Tabela 1).

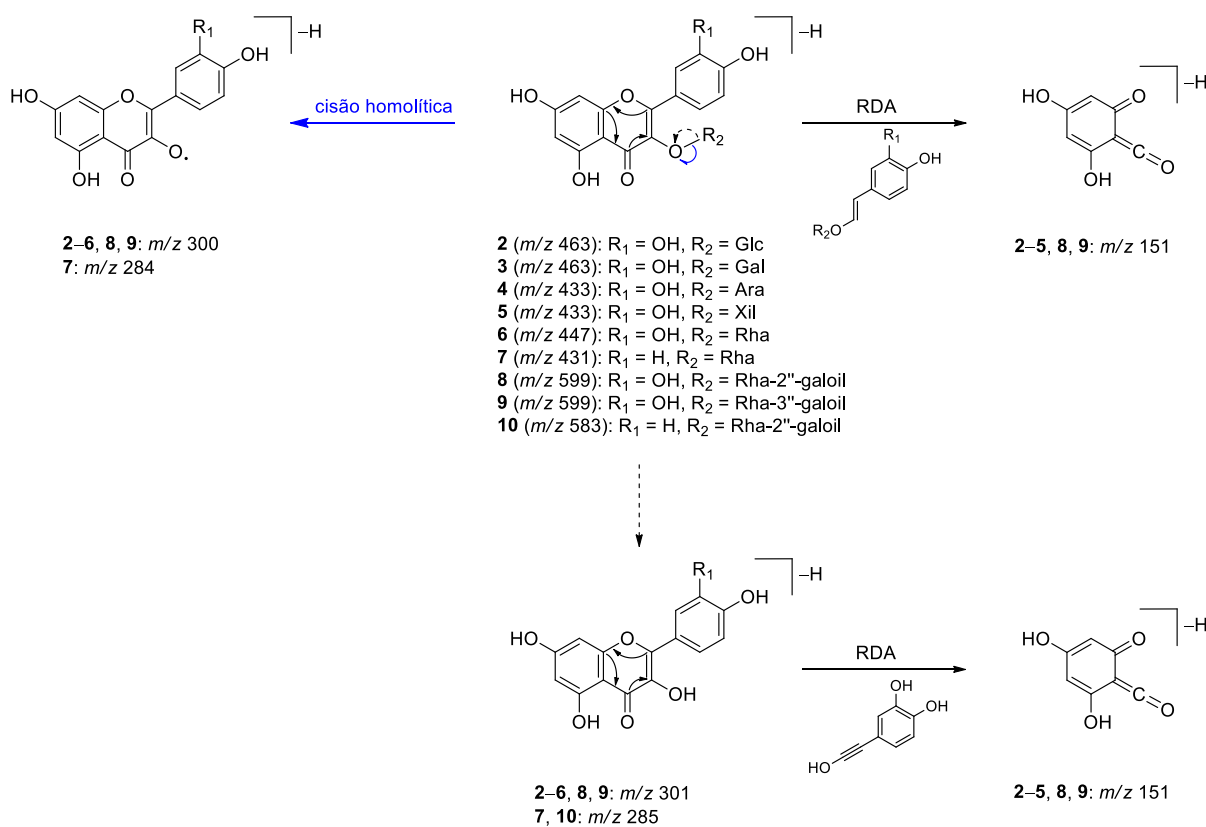
Figura 77 - (–)-EM-IES em alta resolução da fração FAE-A2



Fonte: a autora.

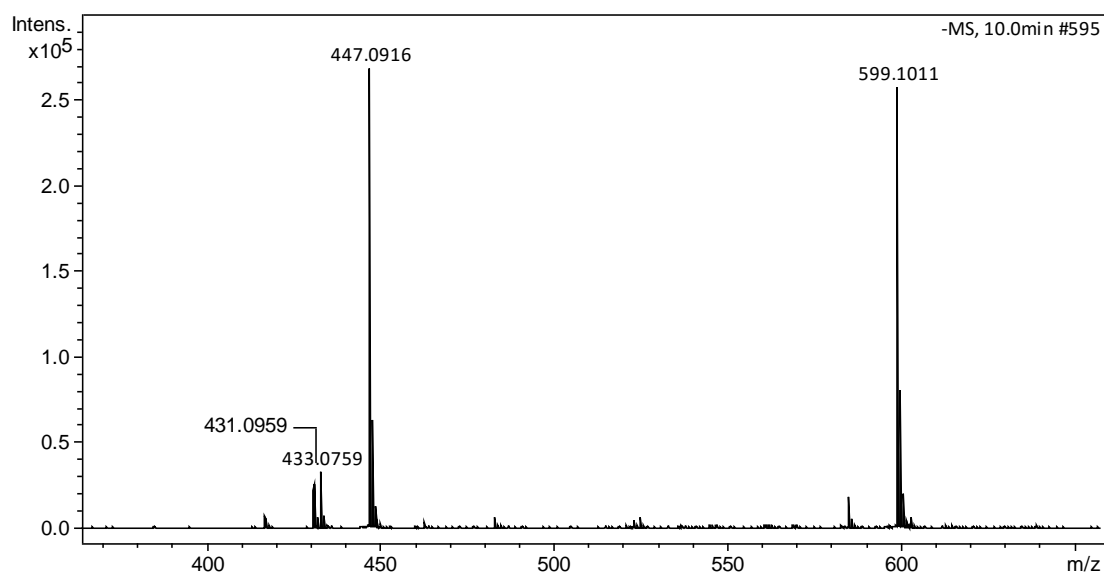
Quando estes sinais foram submetidos à análise por EM sequencial (EM/EM) (Figura 54–Figura 57 item 4.4.4.1), foi observado que os três formavam o sinal de m/z 300, atribuído à cisão homolítica entre a aglicona (quercetina) e os respectivos glicosídeos, resultando na aglicona radicalar que pode ser estabilizada por estruturas de ressonância (Figura 78). O sinal de m/z 300 foi correlacionado com a eliminação neutra do glicosídeo e o sinal de m/z 151 foi atribuído à abertura do anel C através do mecanismo de retro Diels-Alder (RDA) (SUN et al., 2007, RATTMANN et al., 2012, SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, ZHAO et al., 2013).

Figura 78 - Propostas de fragmentação para os compostos **2–10** (derivados da quercetina e do kaempferol) identificados na FAE por CLUE-EM/EM



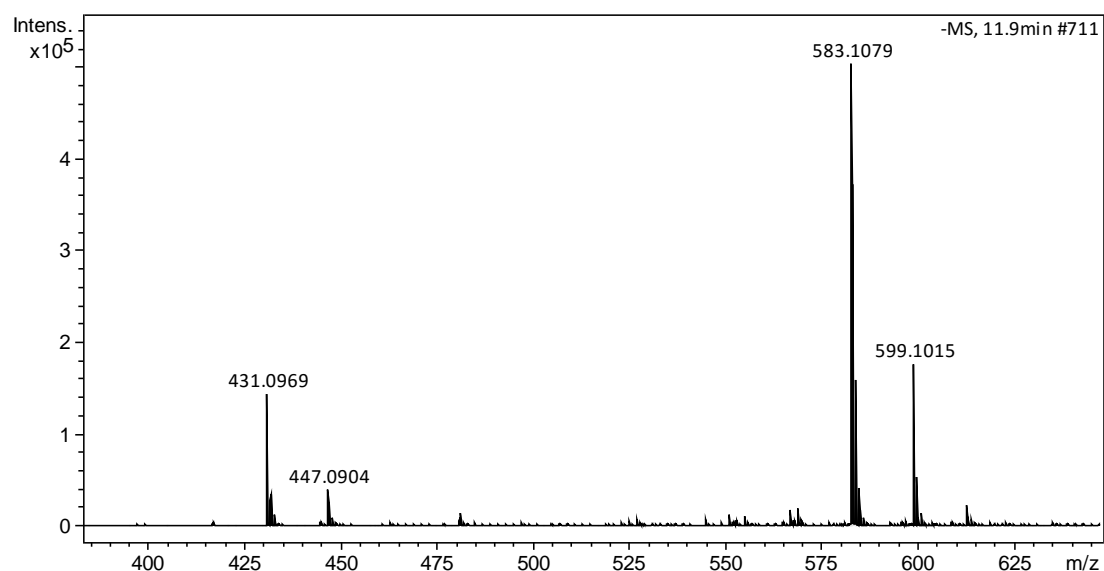
Fonte: a autora.

A análise da fração A3 por (–)-EM-IES (Figura 79) em alta resolução permitiu observar a presença de quatro sinais de m/z 431,0959 (**7**), 433,0759 (**4** ou **5**), 447,0916 (**6**) e 599,1011 (**8** ou **9**) que foram correlacionados aos flavonoides na forma desprotonada $[M - H]^-$ (Tabela 26) (CHA et al., 2008, ABREU et al., 2011, LEE et al., 2013). Padrão de fragmentação semelhante aos discutidos anteriormente foi observado para estes compostos.

Figura 79 - (-)-EM-IES em alta resolução da fração FAE-A3

Fonte: a autora.

A análise da fração A4 por (-)-EM-IES (Figura 80) em alta resolução permitiu observar a presença de quatro sinais de m/z 431,0969 (**7**), 447,0916 (**6**), 583,1079 (**10**), 599,1015 (**8** ou **9**) que foram correlacionados aos flavonoides na forma desprotonada $[M - H]^-$ (Tabela 1) (QING et al., 2012).

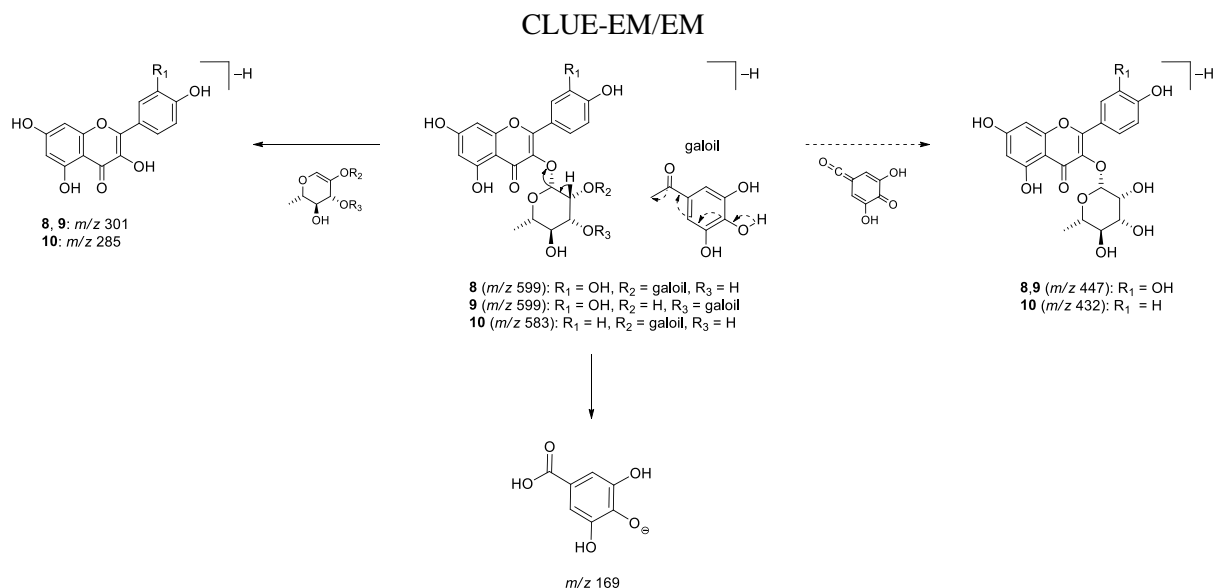
Figura 80 - (-)-EM-IES em alta resolução da fração FAE-A4

Fonte: a autora.

Padrão de fragmentação semelhante aos discutidos anteriormente foi observado para estes compostos, porém para os compostos **8**, **9** e **10** foi observado adicionalmente um sinal

de m/z 169, que foi atribuído à eliminação neutra do grupo galoil (Figura 5) (MIKETOVA et al., 2000).

Figura 81 - Propostas de fragmentação para os compostos **8–10** identificados na FAE por



Fonte: a autora.

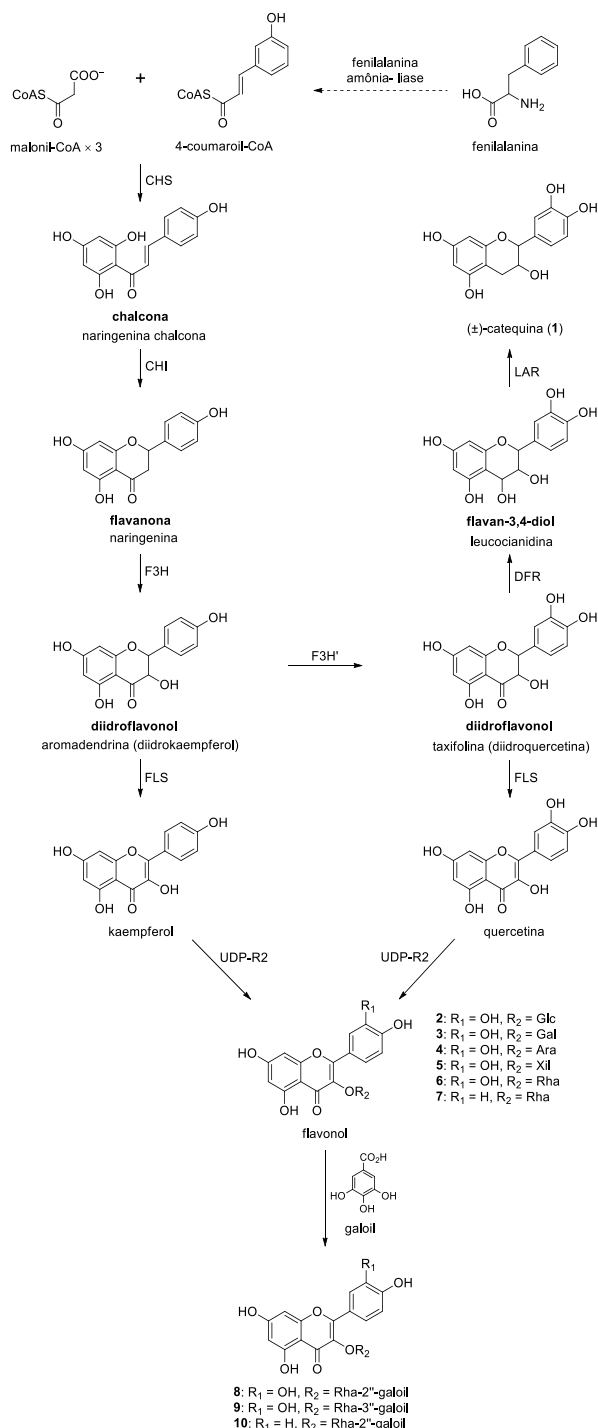
Os sinais observados nas frações FAE-A2, FAE-A3 e FAE-A4 foram correlacionados com as respectivas estruturas dos flavonoides (**2–10**), com base nas análises comparativas entre os dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos e aqueles publicados na literatura, aliados aos dados de biossíntese desta classe de substâncias (Figura 82). Dados de estereoquímica foram propostos com base comparativa e na biossíntese (MUIR et al., 2001, DEWICK, 2002, SONG et al., 2014).

4.4.4.5 Rotas biossintéticas dos flavonoides presentes na FAE das folhas de *B. argyrophylla*

A proposta de rotas biossintéticas dos flavonoides presentes na FAE (Figura 82) é iniciada com a via de fenilpropanóides. Na sequência, a enzima chalcona sintase (CHS) promove a ciclização de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula de 4-coumaroil-CoA, resultando nas chalconas. Posteriormente, as chalconas são isomerizadas em flavanonas pela enzima chalcona isomerase (CHI). Depois ocorre a hidroxilação do anel B da flavanona pela enzima flavanone-3-hidroxilase (F3H), resultando nos diidroflavonóis. A enzima flavonol sintase (FLS) promove a formação dos flavonóis (kaempferol e quercetina). Nesta etapa, dependendo do tipo de enzima que irá atuar, serão formados os metabólitos

secundários identificados nesta fração, os flavonóis glicosilados e a flavon-3-ol ((±)- catequina).

Figura 82 - Proposta de rotas biossintética¹⁷ dos flavonoides presentes na FAE



Fonte: adaptado de Muir et al. (2001) e Song et al. (2014).

¹⁷ CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, flavanone-3-hidroxilase; F3H', flavanona-3'-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; DFR, diidroflavonol-4-redutase; UDP-R₂, flavonol transferase; LAR, leucoantocianidina redutase.

4.5 Avaliação da atividade antifúngica das frações FAE-A1–FAE-A4

Os resultados de atividade antifúngica das frações FAE-A1–FAE-A4 frente à *Candida spp.* estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Atividade antifúngica das frações FAE-A1–FAE-A4

Amostras	Concentração Inibitória mínima (CIM) $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	<i>C. albicans</i> (ATCC 28366)	<i>C. glabrata</i> (ATCC 15126)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)
FAEA1	11,72	2,83	187,5
FAEA2	23,43	11,72	46,87
FAEA3	23,43	11,72	46,87
FAEA4	5,86	5,86	23,43

Concentrações das amostras testadas: 1,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O ensaio com os controles positivos *C. parapsilosis* (CIM = 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. krusei* (CIM = 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) validas o ensaios para as demais *Candida spp.* (CLSI, 2008).

A fração FAE-A1 correspondeu ao composto puro identificado como (\pm)-catequina. Este flavonoide inibiu o crescimento das três espécies de *Candida* e exibiu promissora atividade contra *C. glabrata* (CIM de 2,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Esses resultados confirmam o potencial anticandida das catequinas, uma vez que, essa classe de compostos apresentou efeito sobre cinco espécies isoladas de *Candida*, incluindo as espécies utilizadas neste trabalho (SITHEEQUE et al., 2009). Os estudos de Hirasawa e Takada (2004) e Alves et al. (2014) reforçam as propriedades anticandida das catequinas e seus derivados. Vários estudos destacam as catequinas como importantes agentes antimicrobianos (TAMURA; OCHIAI, 2012). A catequina apresentou valores de CIM mais baixos que os flavonoides licoflavona e derrona, frente a *C. albicans* e *C. glabrata* (EDZIRI et al., 2012).

As frações FAE-A2 e FAE-A3 exibiram os mesmos valores de concentração inibitória para todos os micro-organismos testados. Isso pode estar relacionado com a constituição química presente nestas frações. A análise realizada por LC-ESI-EM/EM indicou que estas frações são ricas em quercetina (quercetina-3-*O*- β -D Glc ou quercetina-3-*O*- β -D-Gal, quercetina-3-*O*- β -L-Ara, quercetina-3-*O*- β -D-Xil, quercetina-3-*O*- α -L-Rha, quercetina-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha e quercetina-3-*O*-(3"-galoil)- α -L-Rha). Flavonoides glicosilados

derivados de quercetina já foram atribuídos como potenciais agentes antifúngicos (COSTANZO et al., 2013). Em outro estudo, quercetina quando testada sozinha contra *C. tropicalis* não foi ativa, entretanto, quando combinada com fluconazol exibiu potente efeito sinérgico (DA SILVA et al., 2014). *C. tropicalis* foi à levedura mais resistente frente a todas as amostras (FAEA1-FAEA4). O efeito das amostras A2 e A3 sobre esse microrganismo pode ser devido ao sinergismo entre os compostos presentes nessas frações. Neste estudo, a presença de kaempferol-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha não promoveu diferença na atividade da fração FAE-A3, comparado com a fração FAEA2. Entretanto, derivados de kaempferol raminosídeos foram ativos contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* (TATSIMO et al., 2012). Das frações constituídas por misturas de flavonoides, a FAE-A4 foi a mais ativa com CIM's variando entre 5,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 23,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A FAE-A4 mostrou forte atividade antifúngica com valores de CIM mais baixo do que o composto isolado (\pm)-catequina para a *C. albicans* e *C. tropicalis* e também mais baixo do valor considerado promissor para um composto puro (CIM menor que 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com relação a *C. albicans* e *C. glabrata*. Os compostos identificados na fração FAE-A4 foram a quercetina-3-*O*- α -L-Rha, kaempferol-3-*O*- α -L-Rha, quercetina-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha, quercetina-3-*O*-(3"-galoil)- α -L-Rha e kaempferol-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha. Extratos ricos em derivados de kaempferol apresentaram alta atividade antifúngica, sugerindo que esse efeito possa ser atribuído a esse grupo de compostos (OMEZZINE et al., 2014). Os relevantes resultados de atividade contra *Candida* encontrados para FAE-A4 poderiam ser atribuídos à presença de quercetinas e kaempferóis presentes na fração, o que poderia sugerir o sinergismo entre esses compostos. Os flavonoides identificados mostraram forte inibição contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (BARROS et al., 2013).

4.6 Avaliação da atividade citotóxica e índice de seletividade das FAE-A1–FAE-A4

Foi avaliada a atividade citotóxica das frações A1–A4 oriundas da FAE das folhas da *B. argyrophylla* e os resultados foram correlacionados com a atividade antifúngica através do cálculo do índice de seletividade (IS) (Tabela 30).

Tabela 30 - Atividade citotóxica e índice de seletividade para frações FAEA1–FAEA4

Frações	Células Vero	Índice de seletividade (IS)		
	(ATCC CCL 81)	Leveduras		
	Atividade citotóxica CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	<i>C. albicans</i> (ATCC 28366)	<i>C. glabrata</i> (ATCC 15126)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)
A1	> 512	1,64	2,25	0,43
A2	328 ± 10	1,14	1,44	0,84
A3	> 512	1,33	1,33	1,03
A4	> 512	1,94	1,94	1,34
Cisplatina	7.01 ± 0.66	----	----	----

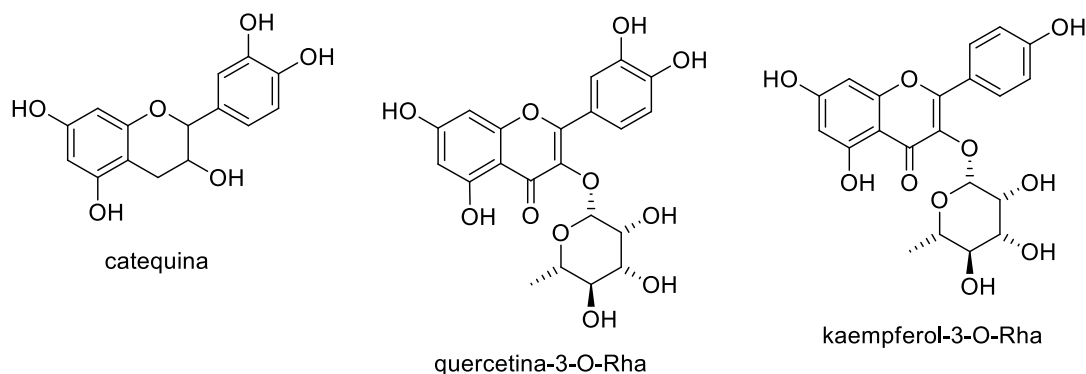
Cisplatina (Controle positivo).

As frações FAEA1–FAEA4 apresentaram menor toxicidade que FAE principalmente A1, A3 e A4 que exibiram CC₅₀ maiores que 512 µg mL⁻¹. O fracionamento de FAE promoveu aumento da atividade contra as leveduras e diminuição da citotoxicidade sobre células Vero. Essa situação pode ser comprovada pelos altos valores de IS encontrados para A1–A4. (±)-catequina (fração FAE-A1) apresentou maior valor de IS frente a *C. glabrata* (2,25) indicando baixa toxicidade na concentração que exibiu forte inibição contra esse micro-organismo (CIM de 2,83 µg mL⁻¹). Com exceção de FAE-A1 para *C. glabrata*, a FAE-A4 rica em quercetinas e kaempferóis apresentou os mais altos valores de IS comparados com as outras amostras testadas. Esses resultados mostram que FAE-A4 é muito mais seletiva contra os micro-organismos que tóxico para as células. Os altos valores de IS justificam novas etapas de estudos com o composto isolado e com as frações para futura utilização terapêutica em infecções causadas por essas leveduras.

4.7 Atividades antioxidante e inibitória da α-amilase do composto isolado e de compostos identificados da FAE

Entre os compostos identificados foram verificado na literatura que a catequina, a quercetina-3-*O*-Rha e o kaempferol-3-*O*-Rha (Figura 83) estão relacionados às atividades antioxidante e inibitória sobre a enzima α-amilase.

Figura 83 - Fórmulas estruturais da (+)-catequina, da quercetina-3-*O*-Rha e do kaempferol-3-*O*-Rha



Fonte: a autora.

Tabela 31 - Referências consultadas que relacionam propriedades biológicas e química com os compostos: catequina, quercetina-3-*O*-Rha e kaempferol-3-*O*-Rha

Atividade antioxidante
<p>catequina: apresenta em uma variedade de chás verdes e pretos (NEGISHI et al., 2004) e foi isolada de plantas do gênero <i>Vinifera</i>, cujo CE_{50} foi igual a $6,7 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (IACOPINI et al., 2008).</p> <p>quercetina-3-<i>O</i>-Rha: apresenta atividade antioxidante e foi isolado de extratos das folhas de <i>Zanthoxylum bungeanum</i>, CE_{50} igual a $0,009 \pm 0,001 \text{ mM}$ (ZHANG et al., 2014).</p> <p>kaempferol-3-<i>O</i>-Rha: foi isolado das folhas da <i>Bryophyllum pinnatum</i> e apresentou CE_{50} igual a $6,4 \pm 0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TATSIMO et al., 2012).</p>
Atividade inibitória sobre a α-amilase
<p>catequina: foi isolada de extratos das folhas de <i>Toona sinensis</i> e apresenta atividades inibitórias para essa enzima (NISHIMURA et al., 1994, ZHAO et al., 2009).</p> <p>quercetina-3-<i>O</i>-Rha: foi identificada em extratos de peles de uvas brancas, conferindo ao material vegetal atuando frente a esta enzima (LAVELLI et al., 2016).</p> <p>kaempferol-3-<i>O</i>-Rha: inibiu a α-amilase catalisada na digestão do amido através da formação de complexos de amido (TAKAHAMA; HIROTA, 2013).</p>

5 Conclusão

Devido ao uso na medicina popular da *Banisteriopsis argyrophylla* e a presença de compostos com atividades químicas e biológicas de espécies do gênero *Banisteriopsis*, foi obtido o EE das folhas. Após a confirmação de suas propriedades químicas e biológicas, este foi submetido à extração líquido-líquido, utilizando solventes de polaridade crescente.

O EE e as frações foram analisados considerando o estudo do perfil dos espectros de UV/Vis, da prospecção fitoquímica, dos teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas. Foi verificado que as FAE e FB apresentaram em suas composições maiores teores de flavonoides ($211,85 \text{ mg EQg}_{\text{extrato}}^{-1}$) e de proantocianidinas ($226,59 \text{ mg ECg}_{\text{extrato}}^{-1}$), respectivamente.

A atividade antioxidante foi analisada pelo método do DPPH e por VPD e os resultados obtidos para as amostras foram comparados com o BHT ($CE_{50} = 5,31 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). As FAE apresentou o menor valor de CE_{50} . Através da VPD foi verificado para a FAE $Ip_2 = 16,62 \text{ } \mu\text{A}$ e $Ep = 0,38 \text{ V}$, com o tampão acetato de sódio e $Ip_2 = 13,86 \text{ } \mu\text{A}$ e $Ep = 0,20 \text{ V}$, com o tampão fosfato de sódio. E pelo método do DPPH foi obtido $CE_{50} = 4,10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o ensaio de inibição sobre a α -amilase, inicialmente foi verificado que o EE apresentou atividade inibitória contra a α -amilase ($CE_{50} = 2,89 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) em relação ao controle positivo acarbose ($CE_{50} = 0,08 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e não apresentou baixa atividade sobre a α -glicosidase. Assim, na sequência foi avaliada a atividade contra a α -amilase para as frações observando que a FAE ($CE_{50} = 2,57 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e a FB ($CE_{50} = 2,33 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram melhores resultados quanto comparado com o controle o CE_{50} da acarbose. A atividade antifúngica foi avaliada frente a espécies do gênero *Candida*, sendo que a FAE apresentou melhor potencial antifúngico (CIM's entre $93,75$ e $11,72 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e maiores valores positivos de índice de seletividade para todas as leveduras.

A FAE, por apresentar as melhores atividades estudadas, foi submetida à análise por CLUE-EM, sendo identificados os seguintes flavonoides: (\pm)-catequina, quercetina-3-*O*- β -D-Glc ou quercetina-3-*O*- β -D-Gal, quercetina-3-*O*- β -L-Ara, quercetina-3-*O*- β -D-Xil, quercetina-3-*O*- α -L-Rha, kaempferol-3-*O*- α -L-Rha, quercetina-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha, quercetina-3-*O*-(3"-galoil)- α -L-Rha e kaempferol-3-*O*-(2"-galoil)- α -L-Rha. Na sequência, a FAE foi submetida à cromatografia em coluna, sendo isolada a (\pm)-catequina (FAE-A1, $73,00 \text{ mg}$) e obtidas três frações (FAE-A2 – FAE-A4), constituídas por uma mistura de flavonoides identificados por ($-$)-EM-IES.

A (±)-catequina (FAE-A1) apresentou CIM de $2,83 \mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio utilizando *C. glabrata*, quando comparada com o padrão positivo anfotericina (CIM = 1,00 e $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, os controles *C. parapsilosis* e *C. krusei*, respectivamente). E para todas as leveduras as FAE-A2 – FAE-A3, apresentaram potencial antifúngico nas concentrações avaliadas. Já a FAE-A4 apresentou os melhores resultados para *C. albicans* e *C. glabrata* com CIM = $5,86 \mu\text{g mL}^{-1}$, para ambos os fungos.

Portanto, as folhas da *B. argyrophylla* se mostraram promissoras para a produção de novos fitoterápicos, uma vez que produz metabólitos secundários que podem estar relacionados aos usos tradicionais como anti-inflamatório e outros. Assim, podem ser considerado material de estudo para a obtenção de novos fármacos e antifúngicos.

Referências

- ABREU, M. B. D.; TEMRAZ, A.; MALAFRONTA, N.; GONZALEZ-MUJICA, F.; DUQUED, S.; BRACA, A. Phenolic derivatives from *Ruprechtia polystachya* and their inhibitory activities on the glucose-6-phosphatase system. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, Switzerland v. 8, n. 11, p. 2126–2134, Nov. 2011.
- ALMEIDA, V. L. D.; LOPES, J. C. D.; OLIVEIRA, S. R. O.; DONNICII, C. L.; MONTANARI, C. A. Estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (QASR) de bis-benzamidas com atividade antifúngica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1482–1489, out. 2010.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, out. 2010.
- ALVES, C. T.; FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, London, v. 9, n. 2, p. 139–146, Feb. 2014.
- AMIC, D.; DAVIDOVIC-AMIC, D.; BESLO, D.; RASTIJA, V.; LUCIC, B.; TRINAJSTIC, N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 14, n. 7, p. 827–845, Mar. 2007.
- ANDRADE-CETTO, A.; CABELLO-HERNANDEZ, C.; CARDENAS-VAZQUEZ, R. Alpha-glucosidase inhibiting activity of five Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 79, n. 13, p. 1248–1248, Sept. 2013.
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids: secrets of life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. 12 p.
- AREF, H. L.; AOUNI, M.; CHAUMON, J. P.; SAID, K.; FEKIH, A. In vitro antiviral activities of Jirani caprifig latex and its related terpenes. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 5, n. 32, p. 5812–5818, Dec. 2011.
- ARENDT, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, Hagerstown, v. 16, n. 5, p. 445–452, 2010.
- AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; VIEIRA, G. M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1509–1512, set. 2009.
- BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S. J.; DAS, D. K.; RAY, S. D.; KUSZYNSKI, C. A.; JOSHI, S. S.; PRUESS, H. G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, Amsterdam, v. 148, n. 2–3, p. 187–197, Aug. 2000.

- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191–203, Jul. 2006.
- BARBOSA, K. B.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, jul./ aug. 2010.
- BARROS, L.; DUEÑAS, M.; ALVES, C. T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 41–45, Jan. 2013.
- BIGATON, D.; BACCHI, L. M. A.; NAZARI, A. S. N. F.; GAVASSONI, W. L.; ZANELLA, C. D. S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 4, p. 757–763, out./ dez. 2013.
- BLONDE, L. Benefits and risks for intensive glycemic control in patients with diabetes mellitus. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 343, n. 1, p. 17–20, Jan. 2012.
- BORGES, K. C.; AZEVEDO, J. C.; MEDEIROS, M. D. F.; CORREIA, R. T. P. Physicochemical characterization and bioactive value of tropical berry pomaces after spouted bed drying. **Journal of Food Quality**, Yazd, v. 39, n. 3, p. 192–200, Nov. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006. 136 p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no cerrado**. Brasília, DF, 2014. 132 p.
- BROUWER, H. Testing for chemical toxicity using bacteria: an undergraduate laboratory experiment. **Journal of Chemical Education**, Tucson Az, v. 68, n. 8, p. 695–697, Aug. 1991.
- BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, Barcelona, v. 15, n. 5, p. 701–708, May. 2013.
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, London, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, Nov. 2014.
- CALLAWAY, J. C. Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. **Journal of Psychoactive Drugs**, San Francisco, v. 37, n. 2, p. 151–155, Jun. 2005.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 1. ed. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255 p.
- 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, Jan. 2006.

CASTRO, H.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. 113 p.

CHA, S.; ZHANG, H.; ILARSLAN, H. I.; WURTELE, E. S.; BRACHOVA, L.; NIKOLAU, B. J.; YEUNG, E. S. Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **The Plant Journal**, Oxford v. 55, n. 2, p. 348–360, July 2008.

CHIBALE, K.; CHOUTEAU, F.; LATEGAN, C. A.; MAHARAJ, V. J.; PILLAY, P.; SMITH, P. J.; VLEGGGAAR, R. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, London, v. 68, n. 8, p. 1200–1205, Apr. 2007.

CHOMA, I. M.; JESIONEK, W. TLC-Direct bioautography as a high throughput method for detection of antimicrobials in plants. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 225–238, May 2015.

CLSI Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: CLSI document M 27–A3. 3. ed. Wayne: PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 27 p.

CONTI, R.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 43–44, [S.l.] 2012.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Kentucky, v. 7, n. 2, p. 66–76, Feb. 1996.

COSTANZO, C. D. G.; FERNANDES, V. C.; ZINGARETTI, S.; BELEBONI, R. O.; PEREIRA, A. M. S.; MARINS, M.; TALEB-CONTINI, S. H.; PEREIRA, P. S.; FACHIN, A. L. Isolation of flavonoids from *Anemopaegma arvense* (Vell) Steff. ex de Souza and their antifungal activity against *Trichophyton rubrum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 1–7, Jul./ Sept. 2013.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B. E. A. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250–1318.

CUNHA, L. C.; DE MORAIS, S. A.; MARTINS, C. H.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; DE AQUINO, F. J.; DE OLIVEIRA, A.; MORAES TDA, S.; MACHADO, F. C.; DA SILVA, C. V.; DO NASCIMENTO, E. A. Chemical composition, cytotoxic and antimicrobial activity of essential oils from *Cassia bakeriana* Craib. against aerobic and anaerobic oral pathogens. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 4, p. 4588–4598, Apr. 2013.

DA SILVA, C. R.; DE ANDRADE NETO, J. B.; DE SOUSA CAMPOS, R.; FIGUEIREDO, N. S.; SAMPAIO, L. S.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; GASPAR, D. M.; DE ANDRADE, G. M.; LIMA, I. S. P.; DE BARROS VIANA, G. S.; DE MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; NOBRE JÚNIOR, H. V. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis

in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 3, p. 1468–1478, Dec. 2014.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 299–315, Apr. 2015.

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

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

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 110, n. 1, p. 165–170, Mar. 2007.

DE SOUZA, P. M.; OLIVEIRA, D.; MAGALHAES, P. Application of microbial α -amylase in industry - a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 850–861, Oct./ Dec. 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd 2002. 515 p.

DIAZ, P.; JEONG, S. C.; LEE, S.; KHOO, C.; KOYYALAMUDI, S. R. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. **Chinese Medicine**, London, v. 7, n. 26, p. 2–9, Nov. 2012.

DIEHL, L. Portal Endocrino. [2013]. Disponível em: <http://www.portalendocrino.com.br/diabetes_medicamentos.shtml>. Acesso em: 20 jan. 2016.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 80, n. 1, p. S77–S112, Aug. 1998.

DULGER, G.; DULGER, B. Antifungal activity of *Hypericum havvae* against some medical *Candida* yeast and cryptococcus species. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 13 n. 3, p. 405–408, Mar. 2014.

EDZIRI, H.; MASTOURI, M.; MAHJOUR, M. A.; MIGHRI, Z.; MAHJOUR, A.; VERSCHAEVE, L. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 6, p. 7284–7293, Jun. 2012.

EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D.; ROHDICH, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 61, n. 12, p. 1401–1426, Jun. 2004.

EPA -Environmental Protection Agency. A guide to the UV index. [2004]. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/uviguide.pdf>>. Acesso em: 10 May 2016.

FARIA, C. O.; MARTINS, M. M.; ARAÚJO, H. L.; ABDALLA, C. B. M.; PIVATTO, M.; DE OLIVEIRA, A.; CHANG, R.; 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. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química., 2014, Poços de Caldas- MG. 2014.

FOTI, M. C. Use and abuse of the DPPH center dot radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 40, p. 8765–8776, Oct. 2015.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 269, n. 2, p. 397–412, Jan. 2002.

FREITAS, L. B. O.; BOAVENTURA, M. A. D.; SANTOSA, W. L.; STEHMANN, J. R.; JUNIOR, D. D.; LOPES, M. T. P.; MAGALHÃES, T. F. F.; DA SILVA, D.; RESENDE, M. A. D. Allelopathic, cytotoxic and antifungal activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 12, n. [S.I.], p. 9–10, Jun. 2015.

FURTADO, F. B.; DE AQUINO, F. J.; NASCIMENTO, E. A.; DE, M. M. C.; DE MORAIS, S. A.; CHANG, R.; CUNHA, L. C.; LEANDRO, L. F.; MARTINS, C. H.; MARTINS, M. M.; DA SILVA, C. V.; MACHADO, F. C.; DE 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.

GATES, B. **Banisteriopsis, Diplopterys (Malpighiaceae)**. 1. ed. New York: Organization for Flora Neotropica, 1982. 237 p.

GETTY. The opium poppy, *Papaver somniferum*. [2011]. Disponível em: <<http://www.theguardian.com/lifeandstyle/2011/jun/24/deadheading-alyis-fowler>>. Acesso em: 25 Jan. 2016.

GIL, E. S.; COUTO, R. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, n. 3, p. 542-558, Jun. 2013.

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

GONÇALVES, R.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Inhibition of α -amylase activity by condensed tannins. **Food Chemistry**, Washington, v. 125, n. 2, p. 665–672, Mar. 2011.

GRANDI, T. S. M. **Tratado das Plantas Medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. 1. ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014. 1204 p.

GUO-QIANG, L.; JING, D.; HONG, W.; LE-REN, W.; YUKI, H.; SHI-ZHONG, C. ESI Fragmentation studies of four tea catechins. **Chemical Journal of Chinese Universities**, Changchun, v. 30, n. 8, p. 1566–1570, [S.I.], 2009.

- HAMED, A. I.; AL-AYED, A. S.; MOLDOCH, J.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Profiles analysis of proanthocyanidins in the argon nut (*Medemia argon*: an ancient *Egyptian palm*) by LC–ESI–MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 49, n. 4, p. 306–315, Apr. 2014.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, London, v. 55, n. 6, p. 481–504, Nov. 2000.
- HASEGAWA, M.; MITSUHARA, I.; SEO, S.; OKADA, K.; YAMANE, H.; IWAI, T.; OHASHI, Y. Analysis on blast fungus-responsive characters of a flavonoid phytoalexin sakuranetin; accumulation in infected rice leaves, antifungal activity and detoxification by fungus. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 8, p. 11404–11418, Aug. 2014.
- HASHIMOTO, Y.; KAWANISHI, K. New organic bases from amazonian *Banisteriopsis-caapi*. **Phytochemistry**, London, v. 14, n. 7, p. 1633–1635, Oct. 1975.
- HASHIMOTO, Y.; KAWANISHI, K. New alkaloids from *Banisteriopsis-caapi*. **Phytochemistry**, London, v. 15, n. 10, p. 1559–1560, Jan. 1976.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, n. 10, p. 572–584, Oct. 2002.
- HEINRICH, M. Ethnopharmacology in the 21st century - grand challenges. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 1, n. 8, p. 1–3, Jun. 2010.
- HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 53, n. 2, p. 225–229, Feb. 2004.
- HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 4, p. 263–268, Jun. 2009.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, Oct. 2002.
- HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 327–329, Sept. 1970.
- HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 15, n. 12, p. 1695–1703, 2009.
- HUANHUAN L.; ZHENZHEN YUAN; XIAOYAN WANG; ZHENHUA WANG; YOURUI SUO; WANG, H. Rapid separation of three proanthocyanidin dimers from *Iris lactea* Pall. var. *Chinensis* (Fisch.) Koidz by high-speed counter-current chromatography with continuous

sample load and double-pump balancing mode. **Phytochemical Analysis**, Chichester, Sussex, v. 26, n. 6, p. 444–453, June 2015.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, n. 8, p. 589–598, Dec. 2008.

IBGE Safra de grãos. [2016]. Disponível em:

<<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3118&busca=1&t=fevereiro-ibge-preve-safra-graos-0-9-maior-que-2015>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

JOSÉ-CHAGAS, F. N.; FILHO, M. D. M. V.; PESSÔA, L. M.; COSTA, S. S. Aspectos químicos e ecológicos de espécimes masculinos e femininos de *Cecropia Loeffl.* (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p. 432–452 mar./ abr. 2014.

JÚNIOR, M. A. L.; LAZZARI, S. M. N.; FIGUEIRA, E. L. Z.; HIROOKA, E. Y. Inibidores de amilase em híbridos de milho como fator de resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 433–450, maio/ jun. 2005.

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

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; MARTINS, M. M.; SOUSA, R. M. F.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; TEIXEIRA, R. R.; ESPINDOLA, F. S. Ethyl acetate and *n*-butanol fractions from the fruit *Peel Araticum* (*Annona crassiflora* Mart) as a source of bioactive antioxidant compounds with α -Amylase, α -Glucosidase and glycation inhibitory activity. In: 45^a Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2016, Natal.

KANDRA, L. α -Amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 666–667, n. [S. l.], p. 487–498, Dec. 2003.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n. 6, p. 453–464, Mar. 2004.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, n. 9, p. 1595–1599, Sept. 2008.

LANGE, B. M.; GHASSEMIAN, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 51, n. 6, p. 925–948, Apr. 2003.

LAVELLI, V.; SRIHARSHA, P. S. C.; FERRANTI, P.; SCARAFONIA A.; LAMETTI, S. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian α -glucosidase and α -amylase: effect of food matrix and processing on efficacy. **Food and Function**, Cambridge v. 16, n. 3, p. 1655–1663, Mar. 2016.

- LEE, C. S.; JEONG, E. B.; KIM, Y. J.; LEE, M. S.; SEO, S. J.; PARK, K. H.; LEE, M. W. Quercetin-3-O-(2''-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside inhibits TNF- α -activated NF- κ B-induced inflammatory mediator production by suppressing ERK activation. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, New York v. 16, n. 4, p. 481–487, Aug. 2013.
- LIMA, G. S.; CASTRO-PINTO, D. B.; MACHADO, G. C.; MACIEL, M. A.; ECHEVARRIA, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara Benth* (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 22, n. 12, p. 1133–1137, Nov. 2015.
- LIMA, I. D. O.; OLIVEIRA, R. D. A. G.; LIMA, E. D. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. D. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197–201, abr./ jun. 2006.
- LIMA, V. L. A. G. D.; MÉLO, E. D. A.; MACIEL, M. I. S.; SILVA, G. S. B.; LIMA, D. E. D. S. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata L.*). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 53–57, jan. /mar. 2004.
- LIU, S.; LI, D.; HUANG, B.; CHEN, Y. X.; LU, X. C.; WANG, Y. W. Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 149, n. 1, p. 263–269, Aug. 2013.
- LIU, X.; LING, Z.; LI, L.; RUAN, B. Invasive fungal infections in liver transplantation. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 15, n. 5, p. 298–304, Feb. 2011.
- LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, Washington, v. 110, n. 10, p. 5675–5691, July 2010.
- LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C. J. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 51, n. 12, p. 3555–3561, June 2008.
- LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; DA SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. H.; ARRUDA, G.; SANTOS, A. S.; SOUZA, A. P. D. Allelopathic potential of catechins of the *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 493–497, Mar. 2008.
- LOMBELLO, R. A.; FORNI-MARTINS, E. R. Malpighiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 171–178, Apr./ June 2003.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., 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, maio 2002.
- MACLEAN, I. M.; WILSON, R. J. Recent ecological responses to climate change support predictions of high extinction risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 30, p. 12337–12342, July 2011.

- MAISAK, H.; JANTRAKAJORN, S.; LUKKANA, M.; WONGTAVATCHAI, J. Antibacterial activity of tannin from sweet chestnut wood against aeromonas and streptococcal pathogens of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Thai Journal of Veterinary Medicine**, Bangkok, v. 43, n. 1, p. 105–111, Mar. 2013.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. D. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 659–664, out./ dez. 2005.
- MALBERT, Y. **Flavonoid glucodiversification with engineered sucrose-active enzymes**. 2015. 257 f. (Doctorate) - Institut National des Sciences, University of Toulouse, Toulouse, 2015.
- MAMEDE, M. C. H.; SEBASTIANI, R.; ALMEIDA, R. F.; FRANCENER, A.; AMORIM, A. M. A. Malpighiaceae. Lista de espécies da flora do Brasil. [2015]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 18 Jan. 2016.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. ed. New York: Oxford University Press, 1995. 374 p.
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 449–460, set./ out. 2006.
- MARTINS, C. D. M.; NASCIMENTO, E. A. D.; DE MORAIS, S. A. L.; DE OLIVEIRA, A.; CHANG, R.; CUNHA, L. C. S.; MARTINS, M. M.; MARTINS, C. H. G.; MORAES, T. D. S.; RODRIGUES, P. V.; SILVA, C. V. D.; DE AQUINO, F. J. T. Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. essential oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2015, n. 1, p. 1–9, Apr. 2015.
- MARTINS, M. M.; ARAÚJO, H. L.; ABDALLA, C. B. M.; FARIA, C. O. M.; PIVATTO, M.; OLIVEIRA, A.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; MORAIS, S. A. L. Avaliação do potencial antioxidante e prospecção fitoquímica do extrato etanólico dos galhos de *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Poços de Caldas- MG 2014.
- MIKETOVA, P.; SCHRAM, K. H.; WHITNEY, J.; LI, M.; HUANG, R.; KERNS, E.; VALCIC, S.; TIMMERMANN, B. N.; ROURICK, R.; KLOHR, S. Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 35, n. 7, p. 860–900, July 2000.
- 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, set./ out. 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.

MUIR, S. R.; COLLINS, G. J.; ROBINSON, S.; HUGHES, S.; BOVY, A.; RIC DE VOS, C. H.; VAN TUNEN, A. J.; VERHOEYEN, M. E. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 5, p. 470–474, May. 2001.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 61–66, jan./ mar. 2006.

NEGISHI, H.; XU, J. W.; IKEDA, K.; NJELEKELA, M.; NARA, Y.; YAMORI, Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 134, n. 1, p. 38–42, Jan. 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311–335, Mar. 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 79, n. 3, p. 629–661, Mar. 2016.

NINFALI, P.; MEA, G., GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, n. 2, p. 257–266, Feb. 2005.

NISHIMURA, T.; KOMETANI, T.; TAKII, H.; TERADA, Y.; OKADA, S. Acceptor specificity in the glucosylation reaction of *Bacillus subtilis* X-23 α -amylase towards various phenolic compounds and the structure of kojic acid glucoside. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 78, n. 1, p. 37–41, Apr. 1994.

NUNES, B. C.; OLIVEIRA, A. M.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, M. M.; OLIVEIRA, A.; PIVATTO, M.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T. Atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas da espécie *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B.Gates. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Poços Caldas- MG. 2014.

OLDHAM, K.; MYLAND, J. **Fundamentals of Electrochemical Science**. ed. New York Academic Press 2001. 496 p.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39–41, fev. 2006.

OMEZZINE, F.; BOUAZIZ, M.; DAAMI-REMADI, M.; SIMMONDS, M. S. J.; HAOUALA, R. Chemical composition and antifungal activity of *Trigonella foenum-graecum* L. varied with plant ploidy level and developmental stage. **Arabian Journal of Chemistry**, Saudi Arabia, v. 13, n. [S.I.], p. 1–10, Apr. 2014.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 516–537, ago. 2013.

PARK, M.; CHO, H.; JUNG, H.; LEE, H.; HWANG, K. T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry seeds compared to grape seeds. **Journal of Food Biochemistry**, Hoboken, v. 38, n. 3, p. 259–270, June 2014.

PARREIRAS, M. A agonia do cerrado: desmatamento ameaça cerrado e caatinga em Minas. [2015]. Disponível em: <http://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2015/08/03/interna_gerais,674615/desmatamento-ameaca-cerrado-e-caatinga-em-minas.shtml>. Acesso em: 28 Jan. 2016.

PEREIRA, D. F.; CAZAROLLI, L. H.; LAVADO, C.; MENGATTO, V.; FIGUEIREDO, M. S. R. B.; GUEDES, A.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. **Nutrition**, Tarrytown, v. 27, n. 11–12, p. 1161–1167, Nov./ Dec. 2011.

PÉREZ, A. L. A. D. L.; CARDOSO, A. M. R.; CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. D. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de antissépticos bucais sobre *Candida spp*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, Paraíba, v. 15, n. 1, p. 69–74, [S.I.] 2011.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25 n. Supl.1 p. 45–61, jul. 2002.

PLANTAMED Plantas e ervas medicinais e fitoterápicos. [2014]. Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Banisteria_argyrophylla.htm>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

QING, L.-S.; XUE, Y.; ZHANG, J.-G.; ZHANG, Z.-F.; LIANG, J.; JIANG, Y.; LIU, Y. M.; LIAO, X. Identification of flavonoid glycosides in *Rosa chinensis* flowers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in combination with ^{13}C nuclear magnetic resonance. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 3, n. 1249, p. 130–137, June 2012.

QUATTROCCHI, U. **CRC world dictionary of plant names: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology**. 4. ed. Bosa Roca: Taylor & Francis 1999. 728 p.

QUEIROZ, C. R. A. D. A.; MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 493–497, ago. 2002.

QUEIROZ, M. M. F.; PILON, A. C.; NETO, F. C.; COQUEIRO, A.; PIVATTO, M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. D. S. **Deteção de constituintes micromoleculares majoritários presentes nas folhas de *Banisteriopsis variabilis* (Malpighiaceae) utilizando UHPLC-ESI-IT-EM**:34. ed. Florianópolis: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011. 23–26 p.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 50, n. 3, p. 586–621, Jan. 2011.

QUIJADA, J.; FRYGANAS, C.; ROPIAK, H. M.; RAMSAY, A.; MUELLER-HARVEY, I.; HOSTE, H. Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 28, p. 6346–6354, July 2015.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 755–760, dez. 2006.

RATTMANN, Y. D.; DE SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2012, n. 2012, p. 1–9, Dec. 2012.

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, [S.l.] 2005.

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

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Periodicals, v. 21, n. 12, p. 1907–1914, Apr. 2007.

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

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

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRU, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos v. 6, n. 3, p. 317–320, jan. 2003.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Berlin v. 99, n. 2, p. 103–107, July 2016.

ROMERO, J. C.; MARTINEZ-VAZQUEZ, A.; HERRERA, M. P.; MARTINEZ-MAYORGA, K.; PARRA-DELGADO, H.; PEREZ-FLORES, F. J.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Synthesis, anti-inflammatory activity and modeling studies of cycloartane-type terpenes derivatives isolated from *Parthenium argentatum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 22, n. 24, p. 6893–6898, Dec. 2014.

SAEWAN, N.; KOYSOMBOON, S.; CHANTRAPROMMA, K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 6, p. 1018–1025, Mar. 2011.

- SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, July 2013.
- SALES, P. M.; SOUZA, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 15, n. 1, p. 141–183, Jan. 2012.
- SAMOYLENKO, V.; RAHMAN, M. M.; TEKWANI, B. L.; TRIPATHI, L. M.; WANG, Y. H.; KHAN, S.; MILLER, L. S.; JOSHI, V. C.; MUHAMMAD, I. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 127, n. 2, p. 357–367, Feb. 2010.
- SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA, B. A. R.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 97, n. 1, p. 1–6, Feb. 2005.
- SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHOA, R. G.; SANTOSA, L. C. D.; HIRUMA-LIMAB, C. A.; BRITOC, A. R. M. S.; VILEGASA, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam v. 1035, n. 1, p. 47–51, Apr. 2004.
- SANTOS, S. X. D.; MAZO, L. H.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of a graphite silicone rubber composite electrode in the determination of rutin in pharmaceutical formulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, n. 8, p. 1600–1606, Oct. 2008.
- SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 62, n. 1, p. 10–24, Jan. 2013.
- SARWAR N, G. P.; SESHASAI, S. R.; GOBIN, R.; KAPTOGE, S.; DI ANGELANTONIO, E.; INGELSSON, E.; LAWLOR, D. A.; SELVIN, E.; STAMPFER, M.; STEHOUER, C. D.; LEWINGTON, S.; PENNELLS, L.; THOMPSON, A.; SATTAR, N.; WHITE, I. R.; RAY, K. K.; DANESH, J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **The Lancet**, London, v. 375, n. 9733, p. 2215–2222, Jun. 2010.
- SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 519, n. 1, p. 103–119, Aug. 2002.
- SCHEFFLER, A. V. **Avaliação farmacognóstica da droga vegetal cipó-prata (*Banisteriopsis gardneriana* [A.Juss.] W. R. Anderson & B.Gates)**. 2014. 76 f. (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, 2014.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1–2, p. 21–40, May. 2001.

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

SHAHAT, A. A. Procyanidins from *Adansonia digitata*. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 44, n. 6, p. 445–450, Jan. 2006.

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

SHARON, A.; SHLEZINGER, N. Fungi infecting plants and animals: killers, non-killers, and cell death. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003517, Aug. 2013.

SHON, M. S.; SHIN, Y. J.; LEE, S. C.; KIM, G. N. Anti-obese activities of kaki-tannins prepared from various persimmons through inhibition of 3t3-L1 Adipogenesis. **Korean Journal of Aesthetic and Cosmetology**, Chungcheongbuk-do, v. 12, n. 4, p. 539–546, Aug. 2014.

SILVA, E. M.; VALENCIA, A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ROCHA, T. L.; FREIRE, E.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect α -amylases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. I.], v. 95, n. 3, p. 141–146, Nov. 2009.

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

SIMÕES, V. D. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; OLIVEIRA, T. D. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, J. M.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; ANJOS, A. D. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon GA(III). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 495–501, fev. 2013.

SIMONETTI, G.; SANTAMARIA, A. R.; D'AURIA, F. D.; MULINACCI, N.; INNOCENTI, M.; CECCHINI, F.; PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; PANELLA, S.; ANTONACCI, D.; PALAMARA, A. T.; VECCHIARELLI, A.; PASQUA, G. Evaluation of anti-*Candida* activity of *Vitis vinifera* L. seed extracts obtained from wine and table cultivars. **Research Article**, New York, v. 2014, n. [S.I.], p. 1–12, Apr. 2014.

SIMONI, I. C. S. M. P.; MANHA, A. P. S.; SCIESSERE, L.; HOE, V. M. H.; H., T. V.; FERNANDES, M. J. B. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian Cerrado plants against animal viruses. **Virus Reviews and Research**, Hyderabad, v. 12, n. 1–2, p. 25–31, Jan. 2007.

SINGH, N.; RAJINI, P. S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel
Food Chemistry, Barking, v. 85, n. 4, p. 611–616, May. 2004.

SITHEEQUE, M. A. M.; PANAGODA, G. J.; YAU, J.; AMARAKOON, A. M. T.; UDAGAMA, U. R. N.; SAMARANAYAKE, L. P. Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. **Chemotherapy**, Basel, New York, Karger, v. 55, n. 3, p. 189–196, May. 2009.

SOARES, L. B.; TUCCI, E. C.; GONÇALEZ, E.; FELICIO, C.; FELICIO, J. D. Acaricide and fungicide effects of the *Artemisia vulgaris* essential oil. **Annual Research & Review in Biology**, Hooghly, v. 5, n. 4, p. 285–292, Oct. 2015.

SONG, M. C.; KIM, E. J.; KIM, E.; RATHWELL, K.; NAM, S. J.; YOON, Y. J. Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites. **Natural Product Reports**, London, England, v. 31, n. 11, p. 1497–1509, Nov. 2014.

SOUSA, R., M. F.; LIRA, C., S. LIRA; RODRIGUES, A., O.; MORAIS, S. A. L. M.; QUEIROZ, C. R. A. A. Q.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; MUÑOZ, R. A. A.; DE OLIVEIRA, A. Atividade antioxidante de extratos de folhas de *Ora-pronóbis* (*Pereskia Aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos *in vitro*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. S1, p. 448–457, June 2014.

SOUSA, R. M. F.; MORAIS, S. A. L.; VIEIRA, R. B. K.; NAPOLITANO, D. R.; GUZMAN, V. B.; MORAES, T. S.; CUNHA, L. C.; MARTINS, C. H. G.; CHANG, R.; DE AQUINO, F.; NASCIMENTO, E. A.; DE OLIVEIRA, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against bacterial. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, New York, v. 65, n. 1, p. 71–78, Mar. 2015.

SOUSA, R. M. F. D. **Estudo químico de *Eugenia calycina* cambess e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase**. 2015. 220 f. (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia,

SOUZA, P. M. D. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. 90 f. (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704 p.

SRIPHONG, L.; SOTANAPHUN, U.; LIMSIRICHAIKUL, S.; WETWITAYAKLUNG, P.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PUMMANGURA, S. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 11, p. 1054–1056, Nov. 2003.

SRIVASTAVA, P. K.; PANDEY, A. K. Natural products and derivatives: biological and pharmacological activities. **Biochemical and Cellular Archives**, Muzaffarna, v. 1, n. 15, p. 1–38, Apr. 2015.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, Porto alegre: Artmed, 2013. cap. 13, p. 312–323.

TAKAHAMA, U.; HIROTA, S. Effects of starch on nitrous acid-induced oxidation of kaempferol and inhibition of α -amylase-catalysed digestion of starch by kaempferol under conditions simulating the stomach and the intestine. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, n. 1, p. 313–319, Nov. 2013.

TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 4, p. 935–941, Feb. 2003.

TAMURA, M.; OCHIAI, K. Exploring the possible applications of catechin (gel) for oral care of the elderly and disabled individuals. **Japanese Dental Science Review**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 126–134, Oct. 2012.

TATSIMO, S. J.; TAMOKOU, J. D. D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J. R.; TANE, P. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BMC Research Notes**, London, v. 158, n. 2, p. 2–6, Mar. 2012.

TIMBOLA, A. K.; SOUZA, C. D. D.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 139–148, Feb. 2006.

TOMA, A.; MAKONNEN, E.; MEKONNEN, Y.; DEBELLA, A.; ADDISAKWATTANA, S. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, n. 180, p. 2–5, Jun. 2014.

VADIVEL, V.; BIESALSKI, H. K. Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of *Pongamia pinnata* L. *Pierre seeds*. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre, v. 46, n. 10, p. 1973–1980, Oct. 2011.

VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 9, n. 1, p. 15–32, Jan. 2003.

VINCENT, J.-L.; RELLO, J.; MARSHALL, J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D.; MORENO, R.; LIPMAN, J.; GOMERSALL, C.; SAKR, Y.; REINHART, K. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 302, n. 21, p. 2323–2329, Dec. 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 2001. 384 p.

WHO Global status report on noncommunicable diseases. [2014]. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2016.

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, Mar. 1998.

WORTHINGTON, H. V.; CLARKSON, J. E. Prevention of oral mucositis and oral candidiasis for patients with cancer treated with chemotherapy: cochrane systematic review. **Journal of Dental Education**, Washington, v. 66, n. 8, p. 903–911, Aug. 2002.

YAO, X.; ZHU, L.; CHEN, Y.; TIAN, J.; WANG, Y. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 139, n. 1–4, p. 59–66, July 2013.

YOSHIMIZU, M.; TAJIMA, Y.; MATSUZAWA, F.; AIKAWA, S.; IWAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; EDMUNDS, T.; FUJISHIMA, K.; TSUJI, D.; ITOH, K.; IKEKITA, M.; KAWASHIMA, I.; SUGAWARA, K.; OHYANAGI, N.; SUZUKI, T.; TOGAWA, T.; OHNO, K.; SAKURABA, H. Binding with parameters and thermodynamics of the interaction of imino sugars a recombinant human acid α -glucosidase (alglucosidase alfa): insight into the complex formation mechanism. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, n. 1–2, p. 68–73, May. 2008.

ZENGIN, H.; BAYSAL, A. H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by sem microscopy. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 11, p. 17773–17798, Nov. 2014.

ZHANG, Y.; WANG, D.; YANG, L.; ZHOU, D.; ZHANG, J. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. **PloS One**, San Francisco, v. 26, n. 8–9, p. e105725, Aug. 2014.

ZHAO, J.; ZHOU, X.-W.; CHEN, X.-B.; WANG, Q.-X. α -Glucosidase inhibitory constituents from *Toona sinensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, Boston, v. 45, n. 2, p. 244–246, Apr. 2009.

ZHAO, Y.; LI, X.; ZENG, X.; HUANG, S.; HOU, S.; LAI, X. Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*. **Analytical Methods**, Oxford, v. 139, n. 1–4, p. 59–66, July 2013.