

Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antibacteriana e anticolinesterásica de extratos de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae)

Caracterización fitoquímica y de las actividades antibacterianas y anticolinesterasa de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae)

Ulysses Amâncio de Frias,^I Maria Cristina Mendes Costa,^{II} Jacqueline Aparecida Takahashi^{III}

I Graduando Farmácia Generalista. Laboratórios de Pesquisas em Fungos e Química, Centro Universitário de Lavras (Unilavras). Lavras MG, Brasil.

II DSc. Professor Titular. Laboratório de Pesquisas em Fungos, Centro Universitário de Lavras (Unilavras). Lavras, MG, Brasil.

III DSc. Professor Adjunto. Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG, Brasil.

RESUMO

Introdução: o uso de plantas para fins medicinais vem crescendo a cada dia. A partir de métodos extrativos, podem-se obter extratos com diferentes atividades terapêuticas, dentre elas ação antifúngica, anticolinesterásica, antitussígena e antibacteriana, esta última, por sua vez, de grande importância comercial em vista do crescimento gradativo de casos de infecções por bactérias resistentes aos tratamentos convencionais.

Objetivos: caracterizar quimicamente os extratos foliares de *B. anisandra*, uma vez que não há relatos sobre a mesma na literatura e verificar as atividades anticolinesterásica e antibacteriana destes frente às bactérias patogênicas.

Métodos: os extratos obtidos a partir de hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol tiveram as classes fitoquímicas presentes identificadas através de métodos de identificação clássica, testados frente a bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* e avaliados quanto à capacidade de degradação da enzima acetilcolinesterase.

Resultados: os resultados encontrados revelaram a diversificação química encontrada em *B. anisandra* e o potencial farmacotecnológico de seus extratos,

especialmente em relação a alcalóides presentes e à sua atividade anticolinesterásica.

Conclusão: conclui-se que os extratos de *B. anisandra* podem ser utilizados para fins farmacotecnológico e que necessita-se de mais estudos fitoquímicos em relação a esta espécie.

Palavras-chave: atividade biológica, *Banisteriopsis anisandra*, prospecção química.

RESUMEN

Introducción: el uso de plantas con fines medicinales está creciendo cada día. De los métodos de extracción, se pueden obtener extractos con diferentes actividades terapéuticas, entre ellas, antifúngicas, anticolinesterasa, antitusivas y antibacterianas; esta última, a su vez, de gran importancia comercial en vista al aumento gradual de los casos de infecciones por bacterias resistentes a los tratamientos convencionales.

Objetivos: caracterizar químicamente los extractos de hojas de *B. anisandra*, porque no hay reportes en la literatura y verificar las actividades de la acetilcolinesterasa y la actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas.

Métodos: los extractos obtenidos a partir de la partición con hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol fueron identificados y las clases de fitoquímicos presentes en los extractos mediante métodos de identificación clásica, los cuales fueron probados contra bacterias patógenas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, y evaluados por la capacidad de degradación de la enzima acetilcolinesterasa.

Resultados: se mostró la diversidad química encontrada en *B. anisandra* y el potencial farmacotecnológico, especialmente en relación con los alcaloides encontrados y su actividad anticolinesterasa.

Conclusiones: los extractos de *B. anisandra* se pueden utilizar para fines farmacotecnológicos y se necesitan más estudios fitoquímicos en relación con esta especie.

Palabras clave: actividad biológica, *Banisteriopsis anisandra*, prospección química.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas que possuam em sua constituição química substâncias com atividades terapêuticas é tão antigo quanto a própria humanidade, sendo, em muitas culturas, considerada como manifestação divina.¹ O Brasil por sua vez possui a maior biodiversidade do planeta, tendo, em seu território, um número grande de espécies que já apresentam usos medicinais pela população local. Desta população, 80 % fazem uso de 37 % dos medicamentos disponíveis, enquanto o restante utiliza medicamentos de origem vegetal ou fitoterápicos.²⁻⁴ A utilização de plantas superiores como fonte de princípios bioativos com atividade antibacteriana, antifúngica, anticolinesterásica, imunomoduladoras, antineoplásicas, antivirais e

outras ainda é pouco explorada, uma vez que, de 250-500 000 espécies de plantas encontradas no mundo, apenas uma pequena fração teve seu estudo fitoquímico realizado.^{5,6}

Banisteriopsis anisandra A. Juss. é uma liana pertencente à família Malpighiaceae, possui ampla distribuição pantropical sendo encontrada em todo Cerrado, principalmente em bordas de mata de galeria, fragmentos e corredores florestais.⁷ É reconhecida a utilização de suas folhas na medicina popular como apresentando atividade antifúngica.⁸

O gênero *Banisteriopsis* possui 66 espécies, e é um dos gêneros com maior número de espécies em Malpighiaceae. Destas, muitas apresentam atividades biológicas de grande importância. *B. caapi*, uma espécie encontrada principalmente na América do Sul, apresenta em sua composição os alcalóides indólicos ²-carbonílicos harmina e harmalina, usados na preparação da bebida alucinógena conhecida como ayahuasca.^{9,10} O extrato de *B. virabilis* apresentou atividade antiviral tanto para o BHV-1 como para o SHV-1 ambos vírus com envoltório de DNA, porém também apresentou atividade antiviral para o retrovírus aviário.¹¹

O presente trabalho teve como objetivos a caracterização fitoquímica dos extratos foliares de *B. anisandra*, uma vez que não há relatos sobre a mesma na literatura e verificar as atividades anticolinesterásica e antibacteriana *destes* frente às bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MÉTODOS

Coleta do material vegetal e preparação dos extratos

A espécie vegetal em estudo foi coletada na Reserva Biológica Unilavras Boqueirão, localizada no município de Ingaí, Minas Gerais em fevereiro de 2009. Foram seccionadas folhas saudáveis de *B. anisandra* sendo estas acondicionadas em recipientes próprios e encaminhadas para o Laboratório Multidisciplinar de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Lavras para a secagem e elaboração do experimento. A espécie foi identificada pelo Botânico Flávio José Soares Júnior sendo que sua exsiccata esta acondicionada no Herbário Luna do Centro Universitário de Lavras catalogada pelo número de registro 2397.

As folhas foram secas e estabilizadas em estufa de ar circulante (Olidef cz) a uma temperatura de 40 °C (quantidade inicial= 555,03 g; quantidade final= 258,18 g) por um período de 10 dias sendo posteriormente trituradas em moinho de quatro lâminas (quantidade final= 253,25 g). O material obtido foi extraído através de maceração utilizando os solventes Hexano (Synth), Clorofórmio (Vetec), Acetato de Etila (AcOEt) (Vetec) e Metanol (MeOH) (Vetec) por um período de 7 dias cada, com agitação ocasional passando em seguida por um processo de filtração e concentração do filtrado em evaporador rotativo MA-120 (Marconi) obtendo-se assim os extratos hexânico (5,1105 g), clorofórmio (1,7100 g), acetato de etila (1,5274 g) e metanólico (28,5075 g). O extrato hexânico foi posteriormente ressuspenso em Éter Etílico (Lafan), filtrado e concentrado, onde a partir deste obteve-se a substância Iso1 (27,6 mg).

Soluções dos extratos brutos foram solubilizadas em 4:4:2 DMSO:H₂O:Acetona (Sigma/Vetec) na concentração de 1 mg/mL para testes antibacterianos através da

técnica de disco, em clorofórmio para a avaliação anticolinesterásica e em etanol para a caracterização fitoquímica.

Caracterização fitoquímica

A caracterização fitoquímica se deu através de reações de coloração e precipitação descrita por Simões e colaboradores¹² utilizando reagentes específicos para cada classe analisada, sendo elas alcalóides,¹³ antraquinonas, flavonóides, saponinas e taninos.¹⁴⁻¹⁶

Atividade antibacteriana

Para a realização da atividade antibacteriana, utilizou-se o método de difusão em disco, seguindo uma metodologia padronizada recomendada pelo NCCLS descrita originalmente por Bauer et al.¹⁷ Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus mutans* ATCC 21135, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* foram incubadas em meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) overnight a 37 °C para ativação das mesmas. A padronização do inóculo teve sua reprodutividade assegurada através da comparação com a escala nefelométrica de 0,5 de McFarland segundo Bier,¹⁸ o que equivale a um inóculo de 1,5 x 10⁸ UFC. Para este fim, adicionou-se 0,5 mL de cloreto de bário a 1% em 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1 %. A densidade do inóculo foi determinada por comparação em espectrofotometria a um comprimento de onda de 530 nm a uma transmitância de 88%.¹⁹

Alíquotas de 100 µL aproximadamente destas suspensões foram transferidas com o auxílio de swab para placas de petri contendo 15 mL do meio de cultura Miller-Hünton, com uma espessura aproximada de 4 mm.²⁰ Foram adicionados discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro contendo 50 µL de solução de cada extrato a uma concentração de 1mg/mL solubilizadas em 4:4:2 DMSO:H₂O:Acetona. Como padrão positivo utilizou-se Penicilina G 10 U e, como padrão negativo, o próprio solvente. As placas foram adicionadas em estufa a 37° C por 24 horas. Os testes foram feitos com 4 repetições avaliando-se o diâmetro dos halos de inibição formados.

Ação anticolinesterásica

A avaliação da ação anticolinesterásica dos extratos de *B. anisandra* foi realizada seguindo a metodologia qualitativa em cromatografia em camada delgada (TLC) descrita por Rhee et al,²¹ onde as mostras de cada extrato bruto foram solubilizadas em CHCl₃ a uma concentração de 1 µg/mL, sendo 5 µL destas aplicadas em placas cromatográficas de sílica alumina 60 F254, 0,2 mm. Borrifou-se sobre esta uma solução 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (reagente de Ellman ou DTNB) e 1mM de uma solução de iodeto de acetilcolina (ACTI). Posteriormente, borrifou-se a enzima acetilcolinesterase (AChE) 3 U/mL sendo esta solubilizada em 50 mM de Tris/HCl pH 8 contendo 0,1 % de albumina sérica bovina (BSA) fração V. A ação anticolinesterásica foi avaliada pelo aparecimento de halos brancos 10 min após a adição da enzima, evidenciando a inibição desta e persistindo por 20-30 min.

RESULTADOS

A caracterização fitoquímica foi realizada ressuspensando-se os extratos brutos em soluções etanólicas. Alcalóides foram determinados através de precipitação com os Reativos de *Mayer* (iodo-mercurato de potássio-K₂(HgI₄)), *Hager* (ácido pícrico concentrado), *Dragendorff* (iodo-bismutato de potássio-K(BiI₄)) e *Bouchardat* (iodo-iodato de potássio) sendo encontrados resultados positivos para a presença destes em todos os extratos. O extrato hexânico apresentou maior confiabilidade dos resultados, uma vez que este obteve resultados positivos para todos os reativos de precipitação. Posteriormente, este foi ressuspenso em éter etílico resultando no isolamento do alcalóide Iso1, este também sendo caracterizado através dos mesmos reativos e por TLC utilizando vanilina como revelador. Para a presença de antraquinonas, utilizou-se a Reação de Bornträger a partir de NH₄OH para a caracterização dos fenatos de amônio. Apenas o extrato metanólico apresentou resultados positivos para este.

Os flavonóides foram caracterizados através do teste da cianidina ou Shinoda utilizando HCl concentrado e magnésio em pó caracterizando os núcleos á-benzopirona sendo encontrados resultados positivos nos extratos Hexânico, AcOEt e MeOH. A indicação de presença de saponinas foi realizada através da agitação de uma alíquota dos extratos com água em tubos de ensaio em vortex, o resultado positivo é indicado pela formação de uma espuma persistente, porém esta não foi evidenciada em nenhum dos extratos.

A presença de taninos foi verificada utilizando reações tradicionais de precipitação com proteínas (gelatina), alcalóides (sulfato de quinina) e sais de metais pesados (cloreto férrico, acetato neutro de chumbo e acetato de cobre). Todos os extratos apresentaram presença de taninos em sua composição. A distinção entre taninos pirogálicos e catéquicos foi realizada através da Reação de Stiasny. Taninos pirogálicos foram encontrados nos extratos mais polares AcOEt e MeOH e catéquicos foram caracterizados principalmente nos extratos apolares em hexano e clorofórmio, porém encontrado também no extrato MeOH. O Isolado 1 (Iso1) foi submetido à identificação fitoquímica através das técnicas descritas por *Simões et al*,¹² sendo caracterizado como um alcalóide. Os resultados são encontrados descritos na tabela 1.

Tabela 1. Classes fitoquímicas encontradas nos extratos de *Banisteriopsis anisandra* nos diferentes métodos de identificação estabelecidos

Classe	Extratos				
	Hexânico	Iso1	Clorofórmio	AcOEt	MeOH
Alcalóide (RM)	++	++	-	-	-
Alcalóide (RD)	+++	+++	+++	+++	+++
Alcalóide (RB)	++	++	-	-	-
Alcalóide (RH)	++	++	-	-	-
Flavonóides	+	-	-	++	++
Taninos (A)	-	-	-	+	+
Taninos (B)	++	-	+	++	+++
Taninos (C)	+	-	-	-	-
Taninos (D)	+	-	-	-	-
Taninos (E)	+	-	-	-	+
Taninos (F)	-	-	-	++	+++
Taninos (G)	++	-	-	-	+++
Antraquinonas	-	-	-	-	+
Saponinas	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo; reativos: (RM) Mayer, (RD) Dragendorff, (RB) Bouchardat, (RH) Hager, (A) FeCl_3 2%, (B) $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10%, (C) sulfato de quinino 1%, (D) gelatina 2,5%, (E) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, (F) tanino pirogálico NaCH_3COO 1% (G) tanino catéquico formaldeído + HCl concentrado.

A partir dos resultados obtidos para a avaliação da atividade antibacteriana frente a *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae* e *B. cereus*, observou-se que os extratos a uma concentração de 1 mg/mL não promoveram a formação de halos de inibição com valores significativos quando comparados com os controles, sendo avaliados pelo teste de *Tukey* em um nível de significância de 5 %. Os resultados para inibição podem ser observados pela tabela 2.

Tabela 2. Diâmetros médios de inibição do crescimento das espécies de bactérias frente a diferentes frações

Substâncias	Bactérias					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Controle negativo	0,000±0,00 a1	0,000±0,00 a2	0,000±0,00 a3	0,000±0,00 a4	0,000±0,00 a5	0,000±0,00 a6
Iso1	0,000±0,00 a1	0,000±0,00 a2	0,000±0,00 a3	0,000±0,00 a4	0,000±0,00 a5	1,000±1,00 a6
Hexânico	0,000±0,00 a1	0,000±0,00 a2	0,000±0,00 a3	0,000±0,00 a4	0,000±0,00 a5	0,666±1,15 a6
Clorofórmio	0,000±0,00 a1	0,500±1,00 a2	0,000±0,00 a3	0,000±0,00 a4	0,000±0,00 a5	1,000±1,52 a6
AcOEt	2,000±1,63 a1	1,750±0,50 a2	0,000±0,00 a3	0,000±0,00 a4	0,000±0,00 a5	0,000±0,00 a6
MeOH	3,500±1,00 b1	2,000±2,30 a2	0,000±0,00 a3	0,000±0,00 a4	0,000±0,00 a5	0,000±0,00 a6
Controle positivo	24,000±1,15 b1	5,000±1,63 a2	11,333±2,30 b3	13,666±4,04 b4	15,333±0,57 b5	1,666±0,57 a6

Obs: Médias seguidas por letras diferentes em uma mesma linha indica resultados significativos ($\alpha = 0,05$) pelo teste de Tukey.

A tabela 3 elucida a relação existente entre os extratos obtidos e a avaliação da atividade anticolinesterásica dos mesmos. A enzima acetilcolinesterase hidrolisa o substrato de acetilcolina gerando como produto a tiocolina que após reagir com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] produz o 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato gerando uma coloração amarela. A formação de halos brancos indica inativação da enzima acetilcolinesterase pelo extrato de *B. anisandra* não gerando os produtos de degradação da mesma. Essa atividade foi apenas evidenciada em Iso1 e no extrato MeOH.

Tabela 3. Inibição da enzima acetilcolinesterase por extratos brutos de *Banisteriopsis anisandra* em cromatografia de camada delgada (CCD)

Extrato	Inibição da Enzima
Hexânico	-
Iso1	+
Clorofórmio	-
AcOEt	-
MeOH	+

+: inibição, -: não inibição.

DISCUSSÃO

Os alcalóides são um grupo de substâncias químicas semelhantes a outras amins, podendo formar sais complexos com compostos de mercúrio, ouro, platina e outros sais. Devido à sua alta heterogeneidade química, estes não podem usualmente ser identificados por apenas um critério cromatográfico, portanto, a necessidade do uso de vários reativos de precipitação para determinar a presença destes. A formação de sais quartenários identificando seu núcleo com um nitrogênio em estado de oxidação negativa é a base para a precipitação deste grupo de substâncias. Podem ser encontrados resultados falso positivos para a presença destes em extratos que contenham proteínas, purinas, betainas, alga-pironas, hidróxi-fenóis e lignanas.¹²

Este grupo representa um vasto grupo de substâncias naturais descritas, podendo chegar a cerca de 20 % destas. É vastamente encontrada em todas as plantas, desde os grupos mais basais como briófitas e pteridófitas até as Angiospermas. Neste último podem ser encontradas em todos os órgãos da planta, atuando principalmente como proteção frente a herbívoros, insetos, microrganismos e vírus. Alcalóides farmacologicamente ativos são encontrados em diversas plantas, como ajmalicina (antidiurética), atropina (antiespasmódico e midriático), iombina (hipotensiva), codeína (antitussígena), morfina (analgésico), nicotina (inseticida), pilocarpina (parasimpaticomemético), sanguinarina (inibidor plaquetário), escapolamina (sedativo), tubocurarina (miorelaxante), vincristina e vimblastina (antitumorais).²²⁻²⁴ Em Malpighiaceae, o gênero *Banisteriopsis* é conhecido pela diversidade de alcalóides psicoativos, como os alcalóides indólicos β -carbonílicos harmina e harmalina encontradas em *B. caapi* sendo este último utilizado em rituais religiosos juntamente com folhas de *Psycotria viridis* que possui em sua constituição química triptaminas, juntamente com estes alcalóides resultam em um potente alucinógeno usados em cultos no Brasil, Bolívia, Equador e Peru.^{9,10} Compostos contendo nitrogênio, é uma das características marcantes da família Malpighiaceae.²⁵ A atividade biológica deste grupo está diretamente relacionada com a variedade estrutural encontrada nestes. A partir disto, são caracterizados em grupos: alcalóides não heterocíclicos, pirrólicos, pirrolidínicos, piridínicos, piperidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, quinolizidínicos, quinoleínicos, isoquinoleínicos, fenantrênicos, indólicos e glioxalínicos, cada qual com suas características estruturais e bioatividades.¹²

Outros grupos de substâncias com inúmeras atividades biológicas são flavonóides e saponinas. Estes apresentam desde ação antioxidante, antineoplásica e anti-inflamatória a ação hemolítica e antivirais.^{12,26} A família Malpighiaceae é conhecida também por serem grandes fontes de taninos, o que corrobora o fato dos resultados encontrados.²⁷ A utilização de proteínas para esta caracterização se dá a partir da capacidade de formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os grupamentos amida das proteínas. Também ocorre a formação de ligações hidrofóbicas entre as cadeias alifáticas ou aromáticas das proteínas e núcleo aromático dos taninos, assim causando a complexação.²⁸

A família Malpighiaceae é conhecida como fonte promíscua de compostos com atividade antimicrobiana,²⁷ sendo comumente relacionada com terpenóides e óleos essenciais,²⁹ alcalóides,³⁰ substâncias fenólicas, polifenóis e quinonas, flavonóides, flavonóis e flavonas,³¹ cumarinas³² e taninos.³³ O uso de extratos vegetais para fins antimicrobianos é relatado em muitas espécies como *Ipomoea cairica*,³⁴ *Baccharis uncinella* e *B. dracunculifolia*.² Folhas de *Juniperus oxycedrus* também mostraram atividade antibacteriana frente a grande número de bactérias.³⁵

Algumas classes fitoquímicas podem levar a formação de falsos positivos quanto à degradação da enzima acetilcolinesterase, como a presença de taninos e compostos fenólicos, por promoverem a desnaturação da enzima e sua inativação.²⁶

O uso de plantas para curar males é uma alternativa terapêutica para os mais diversos problemas, inclusive aquelas infecciosas, como as causadas por *S. mutans*, *S. aureus*, *Salmonella thyphymurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*.³⁶ Com crescente aumento de infecções é necessário encontrar meios alternativos para o combate destas, e o uso das plantas medicinais se torna de suma importância.³⁷

De acordo com os resultados obtidos para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *B. anisandra* frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* pode-se concluir que a uma concentração de 1 mg/mL os extratos não obtiveram a capacidade de impedir significativamente o crescimento microbiano, sendo que os extratos vindos da extração com Acetato de Etila e Metanol foram os que tiveram melhor atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *S. mutans*, enquanto Iso1 e os extratos Hexânico e Clorofórmio apresentaram uma melhor atividade frente a *P. aeruginosa*, porém não foram resultados eficientes para a inibição do crescimento bacteriano. Iso1 e o extrato MeOH apresentaram resultados positivos para ação anticolinesterásica. Testes fitoquímicos demonstram que *B. anisandra* é uma planta com alta diversidade química sendo encontrados alcalóides, taninos pirogálicos e catéquicos, antraquinonas e flavonóides.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais FAPEMIG pela bolsa concedida.

Instituição patrocinadora: Centro Universitário de Lavras Unilavras Lavras, Minas Gerais, Brasil

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yamada CSB. Fitoterapia: sua historia e importancia. Rev Racine. 1998;43:50-1.
2. Ferronato R, Marchesan ED, Pezanti E, Bednarski F, Onofre SB. Antimicrobial activity of essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). Brazilian J Pharmacognosy. 2007;17(2):224-30.
3. Funari CS, Ferro VO. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. Brazilian J Pharmacognosy. 2005;15:178-82.
4. Stangarlin RJ, Schwan-Estrada KRF, Nozaki MH. Plantas medicinais e controles alternativos de fitopatógenos. Biotecnol Cienc Des. 1999;11:16-21.

5. Carlos IZ, Lopes FCM, Benzatti FP, Carli CBA, Marques MF, Jordão-Júnior CM, et al. Action of *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) methanolic and ethanolic extracts in the immune response. *Brazilian J Pharmacognosy*. 2005;15(1):44-50.
6. Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 1991;30:3864-74.
7. Gates B. *Banisteriopsis*, *Diplopterys* (Malpighiaceae). *Flora Neotropica Monograph*, New York Botanical Garden, Nova Iorque; 1982 p. 150-2
8. Anderson WR, Davis CC. Expansion of *Diplopterys* at the expense of *Banisteriopsis* (Malpighiaceae). *Harvard Pap Bot*. 2006;11:1-16.
9. Callaway JC, Raymon LP, Hearn WL, Mckenna DK, Grob CS, Brito GS, et al. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J Analytical Toxicology*. 1996;20:492-7.
10. Freedland CS, Mansbach RS. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Dependence*. 1999;54:183-93.
11. Sciescere L, Fernandes MJB, Vieira CJ, Simoni IC, Hoe VMH. Antiviral activity of plant extract against avian Reo-virus. In: XIV Encontro Nacional de Virologia. Florianópolis: Anais do XIV Encontro Nacional de Virologia; 2003.
12. Simões CMO, Schenkel EO, Gosman G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia Da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC.; 1999.
13. Culvenor CC, Fitzgerald JS. Field test for alkaloids in plant material. *J Pharm Sci*. 1963;52:303-4.
14. Matos FJ. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 19881. p. 26.
15. Mouco GB, Bernadino MJ, Cornélio ML. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2003;31(2):68-73.
16. Trease GE, Evans WC. *A textbook of pharmacognosy*. 14th ed. London: Bailliere Tindall Ltd; 1996.
17. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45:493.
18. Bier O. *Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações à medicina e à higiene*. São Paulo: Ed. Melhoramentos; 1981.
19. Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Andrade e Silva ML, Cunha WR, et al. Comparative study of screening techniques for antibacterial activity evaluation of plant crude extracts and pure compounds. *Quim Nova*. 2008;31(5):1224-9.
20. Shadomy S, Spinel-Ingrof A. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: Lennette, E. *Manual of clinical microbiology*. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology; 1980. p. 647-53.

21. Rhee IK, Van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte RJ. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatography A*. 2001;915:217.
22. Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*. 2001;15(3):183-205.
23. Henriques JA, Kerber VA, Moreno PRH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões CMI, editor. *Farmacognosia Da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC; 1999.
24. Pelletier SW. The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids and Biological Perspectives*. New York: Ed. John Wiley; 1983. p.1-31.
25. Finnegan RA, Stephani RA. Structure of hiptagin as 1,2,4,6-Tetra-O-(3-nitropropanoyl)-beta-D-glucofuranoside, its identity with endecaphyllin X, and the synthesis of its methyl ether. *J Pharm Sci*. 1968;57(2):353-4.
26. Trevisan MTS, Macedo FVV. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quim Nova*. 2003;26(3):301-4.
27. Taylor RS, Manandhar NP, Towers GH. Screening of selected medicinal plants of Nepal for antimicrobial activities. *J Ethnopharmacol*. 1995; 46(3):153-9.
28. Sticher O. Phenolische Verbindungen. In: Hänsel R, Sticher O, Steinegger E. (Hrsgb.) *Pharmakognosie phytopharmazie*. Berlin: Springer; 1999. p. 771-934.
29. Torssell BG. Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. New York: Ed. John Wiley; 1989. p. 401.
30. Fessenden RJ. *Organic Chemistry*. Boston: Wilard Grant Press; 1983.
31. Hergert HL. Economic importance of flavonoid compounds; wood and bark. In: *The chemistry of flavonoid compounds*. New York: The Macmillan company; 1962. p. 553-95.
32. O'Kennedy R, Thornes RD. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. New York: Ed. John Wiley; 1997.
33. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991;30:2875-3883.
34. Ferreira AA, Oliveira PM, Evangelista EA, Alves RB, Pizziollo VR, Brasileiro BG, et al. Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae) *Rev Bras PI Med Botucatu*. 2006;8(2):14-8.
35. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Sengül M, Adygüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol*. 2003;85:231-5
36. Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova*. 2005;28:85-94.

37. Carriconde C, Mores D, Von Fritschen M, Cardozo-Junior EL. Plantas medicinais e alimentícias. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular; Universidade Federal Rural de Pernambuco; 1996. p. 45-7.

Recibido: 12 de julio de 2010.

Aprobado: 30 de diciembre de 2010.

Ulysses Amâncio de Frias. Laboratórios de Pesquisas em Fungos e Química Centro Universitário de Lavras, Lavras, MG, Brasil. endereço: Rua Padre José Poggel, 506, Centenário, Lavras, Minas Gerais, Brasil, cep 37200-000 telefone para contato: (35)36948125 (35)88086884. Email: ulyssesmanzo@gmail.com