

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDOS FITOQUÍMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bauhinia*
(FABACEAE) DA REGIÃO AMAZÔNICA

PRISCILA MORAES DOS SANTOS

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PRISCILA MORAES DOS SANTOS

ESTUDOS FITOQUÍMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bauhinia*
(FABACEAE) DA REGIÃO AMAZÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS

2013

Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Santos, Priscila Moraes dos

S237e Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Bauhinia* (Fabaceae) da Região Amazônica / Priscila Moraes dos Santos. - Manaus: UFAM, 2013.
124 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

Orientadora: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

1. *Bauhinia* 2. Flavonóides 3. Cromatografia 4. Fitoquímica 5. Farmacologia I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 852.736(811.3)(043.3)

PRISCILA MORAES DOS SANTOS

ESTUDOS FITOQUÍMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bauhinia*
(FABACEAE) DA REGIÃO AMAZÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química orgânica.

Aprovada em 10 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior – Presidente (UFAM)



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro – Membro (UFAM)



Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães – Membro (UFAM)

“Dedico este trabalho a toda minha família, em especial à minha avó, Maria Aparecida *in memoriam*, e aos meus pais, Sandra e Paulo; aos meus tesouros na terra, meus amigos; e a todos que colaboraram para a realização deste projeto.”

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por me conceder sabedoria e saúde para conseguir mais esta vitória;
- À minha mãe Maria Sandra e meu pai Paulo Maurício por todo o apoio, ajuda e conselhos nos momentos em que mais precisei, e principalmente por seus ensinamentos e educação que acolho com todo respeito e privilégio;
- Aos meus avós paterno e materno, Manuel e Natal, por serem homens exemplares, com corações maravilhosos e sinceros, sempre exemplos de vida para mim. Amo-os demais! E minhas avós já não mais presentes em carne, Maria Aparecida e Maria Filomena, a falta de vocês é algo que nunca será preenchido, mas o amor, as lições e as bênçãos recebidas me confortam frente à ausência. Vocês fizeram jus ao nome e foram, para mim, Maria. Amo sempre.
- À minha família, que é a melhor e mais doida de todas, tios Lourenço e Daniel, tias Gorete, Rita, Fátima e Louise, primas Sahmara, Sahmira e Manuela, primos João Vinícius e Mateus, e minha querida irmã Priscielly, obrigada por toda compreensão, suporte e incentivo para a concretização desta dissertação, amo vocês!
- Ao meu orientador, prof. Dr. Valdir Veiga, por ser um “pai científico” e me oferecer todo suporte necessário, acompanhamento e disposição para a realização deste trabalho na nossa rica, admirada e bela região amazônica. Além de também oferecer uma oportunidade única de conhecer e ampliar novos horizontes durante a realização deste projeto. Obrigada por tudo!
- À prof. Dr. Lígia Valente e seus alunos do Laboratório 627 do Departamento de Química da UFRJ, Vinícius, Bianca, Rodolfo, Adriana e Isabela que me acolheram tão bem e compartilharam conhecimento e experiência, os quais, sem sombra de dúvida

contribuíram e muito para o enriquecimento deste trabalho e profissionalmente. Eternamente grata a todos vocês pela paciência e disposição em ajudar!

- Aos meus amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, em especial a todos do sempre B-09, às que me receberam e acolheram em todo momento: Lidiam, Klenicy, Priscilla, Paula e Milena, que me orientaram desde o comecinho, lá nas IC's em 2008. Aos mais recentes, companheiros e aos que já defenderam e aos breves doutores e mestres: Carol, Igor, Dayana, André, Iuri e Fabiano. Obrigada pelas dicas, conselhos e todo o apoio no desenvolvimento da minha pesquisa!
- Ao Victor Augusto por todo apoio e incentivo nesses anos; às grandes amigas desde a faculdade, Aline, Allana, Vanessa e Oneide, meninas, vamos conquistar o mundo como excelentes e belas químicas! Aos amigos Rodrigo e Renyer, obrigada por toda ajuda durante esses anos. Sem vocês não poderia ter realizado essa conquista!
- Amigas desde o ensino médio, Patrícia e Giselle, presentes em mais esta conquista, tenho o prazer em cultivar a nossa amizade por todos esses anos.
- Aos que vim conhecendo na estrada da vida, Ana Lúcia, Jackieline, Lucianna e Filipe, suas histórias de superação, garra e conquistas sempre me fascinarão e serão exemplos para mim! E após 15 anos, reencontrei este tesouro na terra, na mesma área de atuação e em instituições próximas: Lorena, querida, Deus devolveu esta amizade tão boa no momento mais certo de minha vida! Obrigada a todas vocês, meninas, mulheres, que enfeitam o meu jardim com tanta alegria, sabedoria, companheirismo e não menos importante, obrigada pelos ombros amigos nos momentos mais difíceis de minha jornada!
- Ao Professor Emerson, por conceder seu laboratório para realização dos ensaios biológicos e pelas dicas oferecidas, aos seus alunos Patrícia Danielle, Rayanne e Arleilson, obrigada por todo o auxílio, paciência e explicações, meus queridos!

- E a todos não citados, professores, colegas de outros laboratórios, mas que fazem parte de minha vida, meu muito obrigado por tudo! Sou soma de tudo o que vivo e aprendo com todos que passam em minha vida!

AGRADEÇO

"Porque nada há encoberto que não
haja de ser manifesto; e nada se faz
para ficar oculto, mas para ser
descoberto." (Marcos 4:22)

Resumo

Espécies do gênero *Bauhinia* são utilizadas em diversas partes do mundo para tratamento de diversas doenças, principalmente para o tratamento da diabetes, devido a atividade hipoglicemiante já comprovada para a espécie *Bauhinia forficata*, a qual é associada à presença do flavonoide kaempferitrina. Entretanto, outras espécies também apresentam o mesmo efeito e a este é associada a presença de outros flavonoides glicosilados. Neste trabalho buscou-se elaborar o perfil fitoquímico de quatro espécies de *Bauhinia* da Região Amazônica a partir de seus extratos brutos, frações flavonoídicas e alcaloídicas, a fim de promover uma varredura inicial para projetos biotecnológicos mais específicos. Além disso, *Bauhinia coronata* (Manaus-AM), *B. purpurea* (Manaus-AM), *B. acreana* (Manacapuru-AM) e *B. purpurea* (S. Gabriel da Cachoeira) foram analisadas para determinação do potencial antioxidante frente os radicais livres DPPH[•], ABTS^{•+} e O₂⁻, assim como a inibição de enzimas lipoxigenase, α -amilase, lipase, α -glicosidase e tirosinase. Dentre estes ensaios antioxidantes e biológicos como tirosinase e α -glicosidase, destacaram-se as espécies *B. coronata* e *B. purpurea* com os valores mais baixos para CI₅₀ (CI₅₀ do extrato bruto de folha de *B. coronata*: 1,91±0,55 μ g/mL). A toxicidade dos extratos brutos também foi testada frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, com valores de DL₅₀ superiores a 250 μ g/mL, indicando a baixa toxicidade dos mesmos. Entretanto, na análise do seu potencial citotóxico e antibacteriano nenhuma espécie foi ativa, o que é contrário aos relatos da literatura em que a *Bauhinia purpurea* já foi mencionada com estes potenciais. No perfil de flavonoides foram identificados, utilizando CCD, CLAE-DAD-UV e espectrometria de massas, os flavonoides rutina e isoquercitrina nas espécies *B. coronata* e *B. purpurea*, sendo este último flavonoide já relacionado à atividade hipoglicemiante de outras espécies de *Bauhinia*, além de ação antiinflamatória. O flavonoide kaempferitrina não foi encontrado em nenhuma espécie, como nenhuma substância relativa à classe alcaloídica. Os resultados obtidos a partir da atividade antioxidante, baixa toxicidade e a presença de flavonoides com potencial fitoterápico estimulam futuras pesquisas específicas para fins biotecnológicos.

Palavras chave: *Bauhinia*, rutina, isoquercitrina, flavonoides, cromatografia.

Abstract

Species of the genus *Bauhinia* are used in various parts of the world to treat various diseases, especially for the treatment of diabetes due to hypoglycemic activity has proven to *Bauhinia forficata* species, which is associated with the presence of the flavonoid kaempferitrina. However, other species also have the same effect and this is associated with the presence of other flavonoids glycosides. In this study we sought to prepare the phytochemical profile of four species of *Bauhinia* Amazon region from their crude extracts, alkaloid and flavonoids fractions in order to promote an initial scan for more specific biotechnology projects. Furthermore, *Bauhinia coronata* (Manaus-AM), *B. purpurea* (Manaus-AM), *B. acreana* (Manacapuru-AM) and *B. purpurea* (S. Gabriel da Cachoeira) were analyzed for antioxidant activity front free radicals DPPH[•], ABTS⁺ and O₂⁻, as well as the inhibition of enzymes lipooxygenase, α -amylase, lipase, α -glycosidase and tyrosinase. Among these assays as biological antioxidants and tyrosinase and α -glycosidase, stood the species *B. coronata* and *B. purpurea* with lower values for IC₅₀ (IC₅₀ of *B. coronata* leaf's crude extract: $1.91 \pm 0.55 \mu\text{g} / \text{mL}$). The toxicity of crude extracts was also tested against *Artemia salina*, with LD₅₀ values of greater than 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicating the low toxicity of them. However, the analysis of their potential cytotoxic and antibacterial no species has been active, which is contrary to reports in the literature that *Bauhinia purpurea* was mentioned with these potentials. The profile of flavonoids were identified, using TLC, HPLC-DAD-UV and mass spectrometry, and the rutin and isoquercitrin flavonoids in the species *B. coronata* and *B. purpurea*, the latter being related to the flavonoid has hypoglycemic activity of other species of *Bauhinia*, and anti-inflammatory action. The kaempferitrin flavonoid wasn't found in any species, as no substance of the alkaloidal class. The results from the antioxidant activity, low toxicity and the presence of flavonoids with potential herbal stimulate future research for specific biotechnological purposes.

Keywords: *Bauhinia*, rutin, isoquercitrin, flavonoid, chromatography.

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Auguste de Saint-Hilaire e um manuscrito de seus trabalhos. Fonte: <guiajaguariaiva.com.br> e <www2.far.fiocruz.br> , ambos acessados em 18/10/12.....	27
Figura 2. Esquema representativo da estrutura geral dos flavonoides, caracterizada pela presença de 2 anéis aromáticos (A e B), ligados por uma ponte de 3 átomos de carbono que formam o anel heterocíclico oxigenado (C) (PIMPÃO, 2009; ROSS, 2002).	30
Figura 3. Rota biossintética dos flavonoides. (DEWICK, 2002)	31
Figura 4. Principais classes majoritários dos flavonoides (COOK E SAMMAN, 1996).	32
Figura 5. Alguns flavonoides glicosilados: rutina e robinina.....	33
Figura 6. Imagem do galho e folhas de <i>Bauhinia sp.</i>	35
Figura 7. Alcaloides isolados do gênero <i>Bauhinia</i> . Da esquerda para direita: a partir de <i>Bauhinia candicans</i> (trigonelina) e <i>Bauhinia unguolata</i> (harmano e eleagnina).....	46
Figura 8. Estrutura química dos flavonoides kaempferitrina e miricetina.	48
Figura 9. Substâncias com caráter antioxidante usadas como padrões para avaliação do potencial antioxidante.	53
Figura 10. Reação e esquema representativo da redução do DPPH. (MOLYNEUX, 2004; LEANDRO, 2010).....	54
Figura 11. Formação do cátion 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), ABTS ⁺ (VASCONCELOS <i>et al</i> , 2007).	54
Figura 12. Estrutura do radical NBT ⁺ (Nitro Blue Tetrazolium) (ALVES <i>et al</i> , 2010).....	55
Figura 13. Esquema geral da metodologia empregada.	58
Figura 14. Placa para ensaio qualitativo da atividade antioxidante de DPPH.....	60

Figura 15. Placa cromatográfica dos extratos brutos revelados com NP-PEG, em UV- 365 nm. 1) CBc; 2) FBp2; 3) FBa2; 4) FBa1; 5) kaempferitina (padrão); 6) FBp1; 7) FBc; 8) GBa1; 9) GBa2; 10) GBp1. Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27)..... 86

Figura 16. Placa cromatográfica dos extratos brutos (1-9), padrões (K e R) e respectivas frações flavonóicas (1-F a 9-F) revelados com NP-PEG, em UV- 365 nm. 1) CBc; 2) FBc; 3) FBp1; 4) GBp1; 5) FBa1; 6) GBa1; 7) GBa2; 8) FBa2; 9) FBp2; K) kaempferitina; R) rutina; 1-F) CBc-F; 2-F) FBc-F; 3-F) FBp1-F; 4-F) GBp1-F; 5-F) FBa1-F; 8-F) FBa2-F; 9-F) FBp2-F. Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27)..... 88

Figura 17. Placa cromatográfica das frações flavonoídicas: 1-F) CBc-F; 2-F) FBc-F; 3-F) FBp1-F; 4-F) GBp1-F; 5-F) FBa1-F; 8-F) FBa2-F; 9-F) FBp2-F) e padrão isoquercitrina (Iq). Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27)..... 89

Figura 18. Placa cromatográfica das amostras 1) CBc; 2) FBc; 3) FBp1; 4) GBp1; 5) FBa1; 6) kaempferitina; 7) quercetina; 8) GBa1; 9) GBa2; 10) FBa2; 11) FBp2; 12) CBc-Fc. Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27)..... 90

Figura 19. Placa cromatográfica revelada com FeCl₃ para verificação da presença do padrão catequina (P) na amostra GBp1-F (1). Eluente: AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10)..... 90

Figura 20. Placa cromatográfica para identificação do alcaloide harmano na amostra CBc-A. A) 1- presença de mancha azul característica de alcaloide em CBc-A em UV-365 nm; B) comparação da eluição do CBc-A (1) e padrão harmano (2) em UV- 365 nm, onde apresentaram Rfs diferentes; C) CBc-A (1) e padrão harmano (2) revelados com Dragendorff, apresentando características divergentes. Eluente: BuOH/C₃H₆O/H₂O (4:1:5)..... 91

Figura 21. Cromatogramas comparativos das amostras CBc-SPE (A) e CBc-F (B) possibilita a análise somente com as amostras obtidas a partir do fracionamento em AcOEt..... 92

Figura 22. Espectros UV-VIS dos padrões rutina ($T_r = 24,987$ min) e kaempferitrina ($T_r = 27,167$ min), respectivamente, com absorção característica em aproximadamente 280 e 350 nm.	93
Figura 23. Espectros UV das amostras em intervalos característicos de grupos flavonóicos: 1) CBc-F ($T_r = 24,447$ min), 2) FBc-F ($T_r = 35,578$ min), 3) FBp1-F ($T_r = 25,854$ min), 4) GBp1-F ($T_r = 15,93$ min), 5) GBa2-F ($T_r = 29,924$ min), 6) FBp2-F ($T_r = 36,178$ min).....	94
Figura 24. Cromatogramas das amostras 1)CBc-F, 2) FBc-F, 3) FBp1-F, 4) GBp1-F, 5) FBa1-F, 6) GBa1-SPE, 7) GBa2-SPE, 8) Rutina, 9) Kaempferitrina, 10) FBa2-F, 11) FBp2-F.	96
Figura 25. Espectro das amostras FBp1-F (A), FBp2-F (B) e GBp1-F (C), respectivamente, com a presença do pico m/z 609, relativo ao flavonoide rutina, e m/z 463, relativo ao flavonoide isoquercitrina, identificados por CCD e/ou CLAE.....	98
Figura 26. Fragmentação dos íons m/z 609 e m/z 301 do padrão rutina.	99
Figura 27. Respectivas fragmentações do íon m/z 609 (MS^2) e do íon m/z 301 (MS^3) das frações FBp1-F, FBp2-F e GBp1-F referentes à rutina e proposta de fragmentação de acordo com Dubber <i>et al</i> , (2005).	100
Figura 28. Análise do padrão isoquercitrina (MS) com detecção do pico m/z 463 $[M-H]^-$..	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Terpenos identificados em óleos essenciais de <i>Bauhinia sp.</i> (Fonte: Duarte-Almeida <i>et al.</i> , (2004); Sartorelli e Correa, (2007))	36
Tabela 2. Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Bauhinia</i>	37
Tabela 3. Espécies de <i>Bauhinia</i> coletadas no Amazonas e catalogadas no INPA. (Acessado em 06/01/12, http://brahms.inpa.gov.br/bol/INPA)	51
Tabela 4. Espécies de <i>Bauhinia</i> utilizadas no projeto, respectivos locais de coleta e as partes da planta estudadas.	73
Tabela 5. Extratos das amostras de <i>Bauhinia</i> e seus respectivos rendimentos.....	74
Tabela 6. Resultado das análises de DPPH qualitativo.....	76
Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante quantitativa dos extratos metanólicos de <i>Bauhinia</i> frente o radical livre DPPH, ABTS ⁺ e O ₂ ⁻	78
Tabela 8. Resultados das CI ₅₀ enzimáticas utilizando os extratos metanólicos de <i>Bauhinia</i> . .	80
Tabela 9. Resultado dos ensaios de toxicidade em <i>Artemia salina</i> a partir das soluções de extrato bruto de espécies de <i>Bauhinia</i>	81
Tabela 10. Percentual do potencial de inibição para extratos metanólicos de <i>Bauhinia</i>	82
Tabela 11. Linhas bacterianas testadas e inibição do antibiótico para cada bactéria.	84
Tabela 12. Relação das frações flavonoídicas obtidas a partir dos extratos brutos de espécies de <i>Bauhinia</i>	85
Tabela 13. Relação das frações alcaloídicas obtidas a partir dos extratos brutos de espécies de <i>Bauhinia</i>	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- Abs amostra = absorbância da amostra;
- Abs controle = absorbância do controle;
- Abs_{final} amostra = absorbância final da amostra;
- Abs_{inicial} da amostra = absorbância inicial da amostra;
- AbsT₀ amostra = absorbância inicial da amostra (em 0 minuto);
- AbsT₂₀ amostra = absorbância final da amostra (em 20 minutos);
- AbsT₀ controle = absorbância inicial do controle (em 0 minuto);
- AbsT₂₀ controle = absorbância final do controle (em 20 minutos);
- ABTS⁺ = 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato);
- ACN = acetonitrila
- AcOEt = acetato de etila;
- BuOH = butanol;
- CCD = cromatografia em camada delgada
- CI₅₀ = concentração inibitória 50%
- CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência
- DCM = diclorometano;
- DL₅₀ = dose letal 50%;
- DMSO = dimetilsufóxido;
- DPPH = 2,2'-difetil-1-picrilhidrazil;
- EM = espectrometria de massas
- EtOH = etanol;
- IMP = imipenem;
- L-DOPA = levodopa (dihidroxifenilalanina);

- LOX = lipoxigenase;
- MeOH = metanol;
- NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo;
- NBT = azul de nitrotetrazólio;
- NP-PEG = revelador para flavonoides (solução de difenilboriloxietilamina com polietilenoglicol);
- PMS = fenazina metassulfato;
- RMN ^1H = Ressonância magnética nuclear de ^1H
- T_r = tempo de retenção;
- $\bar{x}_{\text{controle}}$: média da triplicata do controle;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 Medicina tradicional e seu papel atual	26
3.2 Plantas medicinais no Brasil	26
3.3 A família Fabaceae	28
3.4 Flavonoides	29
3.5 O gênero <i>Bauhinia</i> : utilização e constituição química geral	33
3.5.1 Flavonoides e Alcaloides em <i>Bauhinia</i>	45
3.5.2 Atividade hipoglicemiante	46
3.5.3 Kaempferitrina: um marcador químico dentro do gênero	47
3.5.4 Aplicações biotecnológicas.....	49
3.5.5 O gênero <i>Bauhinia</i> na Amazônia.....	49
3.6 Análises de atividades antioxidantes	52
3.6.1 DPPH [·]	53
3.6.2 ABTS ^{·+}	54
3.6.3 Superóxido	54
3.7 Ensaio de inibição da atividade enzimática.....	55
3.7.1 Tirosinase	55

3.7.2 α -amilase	56
3.7.3 Lipase, lipoxigenase e α -glicosidase	56
4. EXPERIMENTAL	58
4.1 Coleta e preparo do material	58
4.2 Obtenção dos extratos.....	59
4.3 Análise da atividade antioxidante	59
4.3.1 Inibição do radical livre DPPH	59
4.3.2 Inibição do radical livre ABTS ⁺	61
4.3.3 Inibição do radical livre O ₂ ⁻	62
4.4 Atividade de inibição enzimática	63
4.4.1 Inibição da enzima tirosinase	63
4.4.2 Inibição da enzima α -amilase.....	64
4.4.3 Atividade de inibição da enzima lipase	64
4.4.4 Atividade de inibição da enzima lipoxigenase	65
4.4.5 Atividade de inibição da enzima α -glicosidase.....	66
4.5 Ensaio avaliativo de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	67
4.6 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais	67
4.7 Análises antimicrobianas	68
4.8 Fracionamento por extração múltipla.....	69
4.8.1 <i>Flavonoides</i>	69
4.8.2 <i>Alcaloides</i>	69

4.9 Perfil Cromatográfico utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	70
4.9.1 Flavonoides.....	70
4.9.2 Alcaloides.....	71
4.9.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	71
4.10 Identificação por espectrometria de massas (EM)	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 Identificação e rendimento dos extratos	73
5.2 Análise da atividade antioxidante	74
5.2.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante frente o radical DPPH	75
5.2.2 Análise quantitativa das atividades antioxidantes frente os radicais DPPH [•] , ABTS ^{•+} e O ₂ ⁻	77
5.3 Atividade de inibição enzimática.....	79
5.4 Ensaio avaliativo de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	81
5.5 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais	82
5.6 Análises antibacterianas	83
5.7 Fracionamento por extração múltipla.....	84
5.7.1 Flavonoides	84
5.7.2 Alcaloides.....	85
5.8 Perfil cromatográfico utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	86
5.8.1 Flavonoides	86

5.8.2 Alcaloides.....	91
5.8.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	92
5.9 Identificação por espectrometria de massas (EM)	97
6. CONCLUSÃO	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de estudos vinculados à busca dos metabólitos responsáveis pelas ações terapêuticas de plantas medicinais nas últimas décadas vem sendo um dos principais alvos dentro das indústrias farmacêuticas, já que a utilização de plantas medicinais é relatada desde os povos antigos, sendo o único recurso terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos da época (MACIEL *et al*, 2002). É conhecido que ainda hoje grande parte da população mundial continua utilizando este recurso, sendo que em nosso país grande influência na disseminação do conhecimento popular descende da união de diferentes etnias e culturas de imigrantes e indígenas, o que expandiu o conhecimento acerca das plantas medicinais (LORENZI E MATOS, 2002). Com isso, pesquisas no intuito de conhecer as substâncias responsáveis pelas relatadas ações fitoterápicas aumentam a cada dia e tornam-se alvo de muitos pesquisadores no intuito de conhecer os constituintes químicos responsáveis pela eficácia frente a certas enfermidades (ENGEL e FERREIRA, 2008).

No Brasil, o grande impulso para a pesquisa neste âmbito foi o lançamento da Portaria n.º 212 do Ministério da Saúde, publicada em 11 de setembro de 1981, onde o estudo de plantas medicinais se tornou prioridade dentro das pesquisas clínicas, sendo criado em 1982 o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (PPPM/Ceme). Com o Parecer n.º 04/92 do Conselho Federal de Medicina, em 1992, a fitoterapia foi reconhecida como um método terapêutico válido, sendo somente em 1996, através do Relatório final da 10ª Conferência Nacional de Saúde, impulsionada a ser implementada na rede pública de saúde. Com a Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa (RDC/Anvisa) nº 48 em 2004 foi permitido então o registro de medicamentos fitoterápicos (RODRIGUES *et al*, 2005).

Abrigando uma grande diversidade de plantas, a região amazônica tornou-se destaque para pesquisas com fins de avaliação do potencial farmacológico de muitas espécies utilizadas dentro do costume local, como por exemplo, o uso de mais de 200 espécies como já relatado em Barcarena-PA, para fins medicinais (AMOROZO E GELY, 1988).

A partir da grande quantidade de plantas acessíveis e deste conhecimento regional, a comercialização de diversas partes de plantas para o preparo de chás e infusões é muito disseminada por todo o Brasil, sendo grande parte deste material não conhecido cientificamente quanto a sua constituição química. Tal fato representa perigo para a população consumidora devido a possível presença de compostos tóxicos, o que se torna um ponto importante para o incentivo de mais pesquisas científicas (CAPASSO *et al*, 2000; CALIXTO, 2000)

Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS), a partir do documento chamado Política Nacional de Medicina Tradicional e Regulamentação de Medicamentos Fitoterápicos, relacionou a medicina tradicional e o uso de fitoterápicos, a fim de que houvesse um controle neste contexto. Neste documento foi incluído o Brasil, já que o mesmo possui “a maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies” além do fato de ter uma grande tradição no uso de plantas medicinais (RODRIGUES *et al*, 2005).

Desde o primeiro grupo de plantas medicinais para estudo clínico da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde, em 1982, a espécie *Myrcia uniflora* foi incluída devido ao seu potencial antidiabético o chá de suas folhas, juntamente com a *Bauhinia forficata*.

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) encontra-se neste perfil de medicina tradicional. As espécies são conhecidas como “pata-de-vaca” ou “unha-de-boi”, e é muito utilizada em nossa região, assim como em muitas outras localidades, como África, Ásia e América Central e do

Sul (ENGEL e FERREIRA, 2008), para tratamentos de processo inflamatório, em distúrbios digestivos, reumatismo e principalmente antidiabética (ALBUQUERQUE *et al*, 2005; ALMEIDA *et al*, 2005). Possui grande variedade de espécies, cerca de 300, e em nosso país é possível encontrar aproximadamente 20% desse total (HAVER, 2002; SILVA E CECHINEL FILHO, 2002).

Apesar do gênero ser estudado há décadas no Brasil, as espécies da região amazônica são pouco estudadas, denotando a necessidade do conhecimento de nossa flora. Tal fato contribuiria na verificação de compostos presentes nas espécies do gênero *Bauhinia* locais, tornando-se uma pesquisa inédita a fim de constatar a presença de flavonoides como a kaempferitrina, que possam ser a causa da ação hipoglicemiante (SILVA, 2002; FUENTES, 2004; ENGEL e FERREIRA, 2008).

Estudos já realizados anteriormente no projeto de iniciação científica nos anos de 2009 a 2010 com as espécies locais *B. coronata* e *B. purpurea*, a fim de constatar presença de substâncias fenólicas, revelaram a possibilidade destas espécies conterem tais compostos a partir da eluição em placa cromatográfica usando agente revelador específico para esta classe (WAGNER, 1996). A verificação do potencial antioxidante, inibição enzimática, potencial citotóxico e a elaboração de um perfil fitoquímico com os compostos majoritários são passos iniciais para o estudo deste gênero na Amazônia.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Estudar a composição química e atividades biológicas de extratos das espécies de *Bauhinia* da Amazônia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar os compostos majoritários através de análise dos extratos por CLAE, EM e CCD;

- Verificar a presença de flavonoides considerados marcadores do gênero por CCD;

- Identificar flavonoides e alcaloides presentes por meio de técnicas cromatográficas e espectrométricas;

- Verificar a atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH, ABTS⁺ e O₂⁻;

- Analisar a citotoxicidade em modelo de *Artemia salina* e em células tumorais;

- Determinar o potencial antibacteriano;

- Calcular a atividade inibitória das enzimas lipoxigenase, α -amilase, lipase, α -glicosidase e tirosinase.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Medicina tradicional e seu papel atual

A necessidade da busca por plantas medicinais pelo homem é datada desde tempos antigos ao redor do mundo, onde essa procura tinha como objetivo sua própria sobrevivência (RODRIGUES *et al*, 2005). Ao longo do tempo foram encontradas evidências que apontam cada vez mais esse costume tradicional por muitos povos, como na medicina chinesa (QIAO *et al*, 2002), indiana (HOWES e HOUGHTON, 2003), e até mesmo como relatado recentemente o uso de plantas medicinais por Neandertais - os quais viveram há mais de 30.000 anos atrás – diante de vestígios da presença destas na arca dentária de fósseis desses primitivos, indicando uma antiga seleção natural por parte deles para uma automedicação (HARDY *et al*, 2012).

O uso de medicamentos sintéticos em geral, teve aumento e tornou-se mais significativo do que o uso da medicina alternativa para os países considerados desenvolvidos, visto a viabilidade e segurança na medicação. Porém, países que estão em desenvolvimento ainda utilizam chás e infusões de plantas, e na maior parte das vezes esses são os principais recursos no momento da medicação, já que a obtenção destes medicamentos sintéticos torna-se muitas vezes inviável devido à condição econômica existente (SOUZA-MOREIRA, 2010).

3.2 Plantas medicinais no Brasil

Após a ocupação dos portugueses no Brasil, os relatos de plantas utilizadas para fins medicinais foi efetivo, principalmente por impressionarem os novos ocupantes das terras com a riqueza de espécies e sua utilidade dentre os indígenas, como é relatado pelo botânico francês Auguste de Saint-Hilaire, o qual foi o primeiro cientista a ter permissão de viajar pelo território brasileiro com objetivo de pesquisar e relatar as espécies nativas, entre 1816 a 1822.

Cerca de 7.000 amostras de espécies foram depositadas no Muséum national d'Histoire naturelle, em Paris, onde cerca de 4.500 eram desconhecidas naquela época (BRANDÃO *et al*, 2012).



Figura 1. Auguste de Saint-Hilaire e um manuscrito de seus trabalhos. Fonte: <guiajaguariaiva.com.br> e <www2.far.fiocruz.br> , ambos acessados em 18/10/12.

Documentos acerca das viagens e descobertas sobre a flora brasileira foram escritos por Saint-Hilaire, como os livros *Plantes usuelles des Brasiliens* (SAINT-HILAIRE, 1824a), *Histoire des plantes les plus remarquables du Brésil et du Paraguay* (SAINT-HILAIRE, 1824b), e *Flora Brasiliae Meridionalis* (SAINT-HILAIRE *et al*, 1825–1833)

Com toda a riqueza de diversidade de espécies de plantas e com a crescente chegada de imigrantes, o conhecimento dos usos populares dos indígenas se associou ao dos estrangeiros, sendo este disseminado de geração em geração ao longo do tempo, onde o uso de plantas medicinais se tornou parte da cultura brasileira (ENGEL e FERREIRA, 2008).

A necessidade da criação de um controle frente a esse uso incontrolável de muitas espécies levou à formação de políticas públicas através do Ministério da Saúde, já que muitas espécies não foram estudadas quanto à sua composição e veracidade da ação terapêutica vinculada. A Anvisa é um dos principais órgãos neste âmbito, responsável pela regulamentação e fiscalização nas pesquisas de plantas medicinais (RODRIGUES *et al*, 2005).

Atualmente, os programas e fiscalizações não são suficientes, principalmente na região amazônica, por conta do uso popular de plantas medicinais ser ainda maior devido o isolamento de muitas comunidades ribeirinhas e pela condição econômica e dificuldade de deslocamento para um atendimento público (AZEVEDO E SILVA, 2006). Indicativos deste comportamento são as grandes feiras a céu aberto que vendem diversas partes de plantas para chás ou infusões (LIMA *et al*, 2011).

Alguns desses locais são em Belém, no mercado Ver o Peso, e na feira da Manaus Moderna, em Manaus, locais onde não há controle sobre a qualidade dos produtos vendidos, como a adulteração do mesmo, por exemplo, um problema observado não só em nossa região mas em muitos outros lugares no mundo, onde não há fiscalização ou verificação da constituição dos produtos vendidos (CHOI *et al*, 2002; ABOU-ARAB *et al*, 1999; ELVIN-LEWIS, 2001; ZUCCOLOTTO *et al*, 1999)

Devido a grande diversidade de flora presente e o uso da medicina tradicional pela população regional, o estudo das espécies com relatos de efeitos terapêuticos se tornou não mais uma expectativa ou simplesmente um objeto de estudo, mas sim necessidade para prevenir e alertar um possível uso errôneo de espécies que possam conter substâncias tóxicas, possível contaminação ou adulteração no preparo do material (LANINI e DUARTE-ALMEIDA, 2009).

3.3 A família Fabaceae

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, é uma das maiores famílias botânicas de interesse devido aos relatos de seus gêneros serem utilizados na medicina tradicional. Contempla cerca de 18.000 espécies em 619 gêneros, ocupando o lugar de terceira maior família. É dividida em quatro grandes subfamílias: Caesalpinioideae, Cercideae, Faboideae, Mimosoideae (WATSON, 1992; GUSSON, 2008),

No relato de Auguste de Saint-Hilaire durante a viagem pelo Brasil permitida pela coroa portuguesa para averiguar as espécies nativas entre 1816 a 1822, das 53 famílias descritas, Fabaceae representava 20 famílias, sendo considerada a família mais abundante dentro do território explorado (BRANDÃO *et al*, 2012).

Principal família dentro dos tipos vegetacionais (LEWIS, 1987), em território brasileiro possui cerca de 180 gêneros e 3.170 espécies (BARROSO *et al*, 1991), o que representa quase 20% do total de espécies do mundo, sendo que na região amazônica estão presentes 148 gêneros, relativo a um terço do total da família e cerca de 21 gêneros provavelmente endêmicos (SILVA E SOUZA, 2002).

Sendo alvo de muitos estudos, com raras exceções, esta família é a única a apresentar isoflavonas. Os benefícios como atividades antifúngicas e antibacterianas, além de inseticida, apresentados pelas espécies de Fabaceae, são associados a essa classe (SIMÕES *et al*, 1999)

3.4 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos nas plantas, abrangendo cerca de metade dos oito mil compostos fenólicos que ocorrem na natureza (BALASUNDRAM, 2006).

Essas substâncias são produzidas em diferentes espécies em prol de sua adaptação e sobrevivência em diferentes ambientes, desempenhando diversas funções, como de defesa contra os fatores externos: parasitas, herbívoros ou outras plantas competidoras; de sinalização, para atrair agentes polinizadores ou dispersores de sementes; de proteção contra a radiação ultravioleta (UV) ou de oxidantes (DAAYF E LATTANZIO, 2008); promovem o crescimento do tubo polínico e a reabsorção de nutrientes minerais das folhas em senescência (ANDERSEN E MARKHAM, 2006).

Possuem extrema utilidade para as plantas, sendo encontradas nas angiospermas, as quais investem quantidades significativas de energia metabólica para a produção destes compostos (ANDERSEN E MARKHAM, 2006). A estrutura química geral desta classe é representada na Figura 2. Diferentes compostos de cada classe podem ser formados a partir das substituições nos anéis aromáticos. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (BALASUNDRAM, 2006).

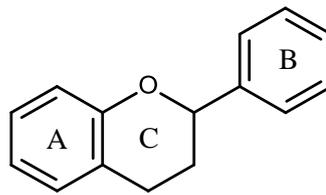


Figura 2. Esquema representativo da estrutura geral dos flavonoides, caracterizada pela presença de 2 anéis aromáticos (A e B), ligados por uma ponte de 3 átomos de carbono que formam o anel heterocíclico oxigenado (C) (PIMPÃO, 2009; ROSS, 2002).

Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos a partir de uma rota biossintética mista constituída das vias do chiquimato e acetato, como é visto na figura 3 a seguir (DEWICK, 2002).

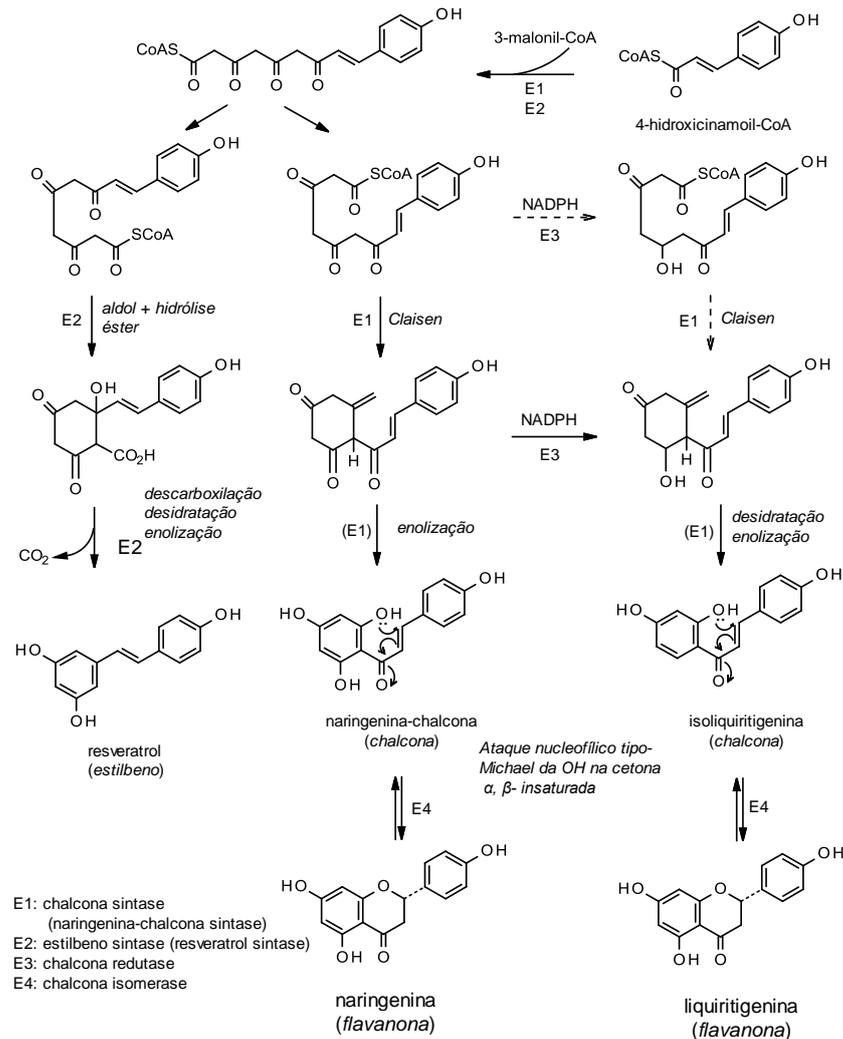


Figura 3. Rota biossintética dos flavonoides. (DEWICK, 2002)

As classes majoritárias mais comuns deste grupo são apresentadas na figura 4 a seguir. Muitas mudanças estruturais destes compostos são obtidas a partir das substituições por glicosídeos, o que é mais comum na natureza. Dentro dos flavonoides glicosilados, geralmente são encontradas a inclusão da D-glucose, L-rhamnose, galactose e arabinose, sendo os flavonoides mais usuais na alimentação a rutina e robinina (figura 5), as quais são absorvidas pelo organismo após sua hidrólise no intestino (KIJHNAU, 1976; HAVSTEEN, 1983).

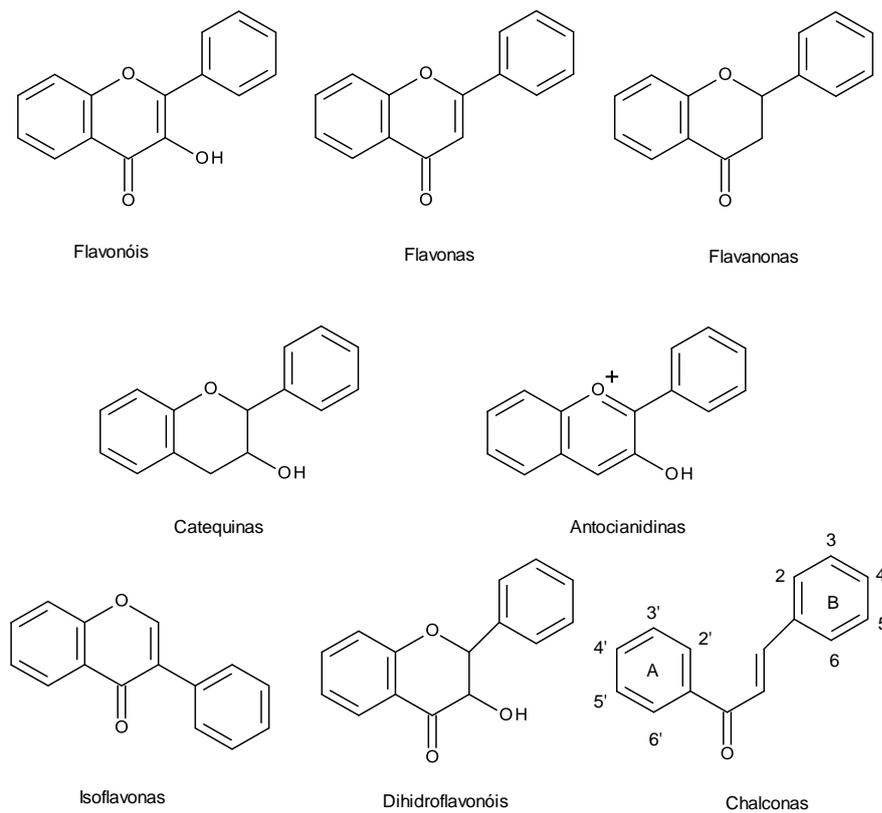


Figura 4. Principais classes majoritários dos flavonoides (COOK E SAMMAN, 1996).

Encontrados em plantas e integrantes da dieta humana (COOK e SAMMAN, 1996), após a descoberta dos benefícios dos flavonoides para a saúde humana, as pesquisas à procura de fontes naturais destes compostos se tornaram importantes vertentes do mundo científico. Alguns dos benefícios vinculados a esta classe são ligados às ações hepatoprotetiva, antioxidante, antiinflamatório e antineoplásicos (NARAYANA *et al*, 2001; HACKETT, 1986; HOPE *et al*, 1983), além de outras atividades biológicas como ação antimicrobiana e antiviral (NIJVELDT *et al*, 2001; HANASAKI *et al*, 1994).

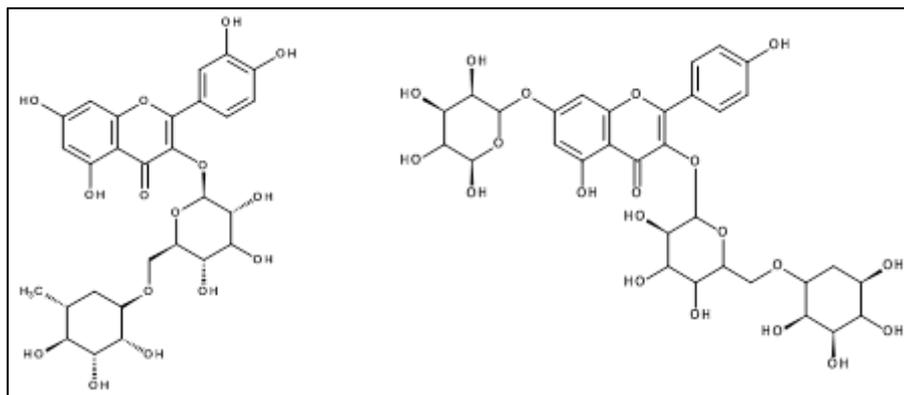


Figura 5. Alguns flavonoides glicosilados: rutina e robinina.

Diversos setores da indústria, como a cosmética e farmacêutica, vem apresentando maior interesse a cada nova descoberta dos benefícios destes compostos, fazendo com que haja um estímulo maior nas pesquisas relacionadas a tais substâncias fenólicas. Prova disso é que somente no período que compreende os anos de 2007 a 2009 houve um aumento de mais de 30% nos estudos relacionados a este grupo de substâncias, tornando esta classe um alto interesse dentro dos produtos naturais (VEITCH E GRAYER, 2011).

3.5 O gênero *Bauhinia*: utilização e constituição química geral

O gênero *Bauhinia* compreende cerca de 300 espécies distribuídas no planeta (MAIA NETO *et al*, 2008), sendo uma boa parte deste índice podendo ser encontrada em nosso país (JOLY, 1993; POLHILL, 1981).

Sendo esta espécie natural da Ásia, a sua adaptação em território brasileiro foi muito bem consolidada, apresentando fácil desenvolvimento em terras com clima tropical (Pepato *et al*, 2002). Recebendo diversos nomes relacionados ao formato das folhas e do cipó, a *Bauhinia* é conhecida por vários nomes, como: “pata-de-vaca”, “casco de vaca”, “unha de boi”, “pata de boi” (STASI e HIRUMA-LIMA, 2002), “ceroula de homem”, “capa bobe”,

“escada de jabuti”, “mororó”, “cipó de escada”, “escada de macaco” (ROSADO E ROSADO, 1960).

Além do uso para fins alimentícios de suas sementes, que são fonte de vitamina A (BALOGUN e FETUGA, 1989), são também utilizadas para fins ornamentais como paisagismo de praças e ruas em alguns estados do Brasil (CARVALHO, 2003).

Muitos relatos medicinais são apresentados no gênero *Bauhinia*, como para ação anti-infecciosa (SILVA e CECHINEL-FILHO, 2002), diurética, hipoglicemiante, tônica, depurativa, no combate à elefantíase (MARTINS, 1995), analgésica, antidiabética, antiinflamatória, antimicrobiana, adstringente (GONZALEZ-MUJICA *et al*, 1998; CARVALHO *et al*, 1999; WILLAIN FILHO, 1997), para o tratamento de inchaços e tumores estomacais, diarreia, úlcera (KUMAR e CHANDRASHEKAR, 2011).

Em Juliani (1929, 1931), os estudos fitoquímicos relacionados à espécie *Bauhinia forficata* e sua atividade hipoglicemiante ganharam notoriedade e despertaram interesse de pesquisadores já que em muitas partes do mundo essa planta é administrada para diferentes enfermidades. Como por exemplo, na Ásia e Índia, esse gênero também é utilizado nas chamadas “doenças das mulheres”, que inclui problemas menstruais e no tratamento de leucorréia (DAS *et al*, 2008).

No Brasil, as espécies do gênero *Bauhinia* (figura 6) utilizadas principalmente para tratamento de diabetes, processos inflamatórios e dolorosos, em forma de chá ou infusão são *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheilantha* e *B. splendens*. Já as mais estudadas quanto à fitoquímica se localizam nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil, com destaque para *B. manca*, *B. glabra*, *B. rufa*, *B. candicans*, *B. uruguayensis*, *B. purpurea*, *B. forficata* e *B. splendens* (MACEDO, 2004; SOUSA, 1998; VIANA *et al*, 2000; SILVA e SOUSA, 2002).



Figura 6. Imagem do galho e folhas de *Bauhinia sp.*

Devido ao fácil reconhecimento da planta pelo formato das folhas e abundância do gênero em diferentes locais, a propagação do uso medicinal dentre as comunidades se tornou muito comum, levando a um uso desordenado de muitas espécies sem o conhecimento químico prévio das substâncias presentes dentro do material consumido (LANINI E DUARTE-ALMEIDA, 2009).

Apesar de não ser documentado o início do uso das espécies do gênero por parte dos povos antigos, sua utilização é empregada ao longo do tempo por muitas comunidades (SOUZA, 2003), seja em forma de chá, infusão ou partes individuais da planta aplicadas ao local de enfermidade.

Destacam-se na constituição química de algumas espécies do gênero, compostos de diferentes classes de compostos orgânicos com interesse medicinal, como lactonas, flavonoides, terpenoides, taninos, quinonas (SILVA E CECHINEL FILHO, 2002) e alcalóides (MELO E NASCIMENTO, 2004; MAIA NETO *et al*, 2008).

Na espécie *Bauhinia championii* foi isolado o ácido gálico (CHIEN-CHIN *et al*, 1985). Muitos terpenos - classe pouco avaliada dentro da família Fabaceae - foram verificados nos óleos essenciais das espécies a seguir:

Tabela 1. Terpenos identificados em óleos essenciais de *Bauhinia sp.* (Fonte: Duarte-Almeida *et al.*, (2004); Sartorelli e Correa, (2007))

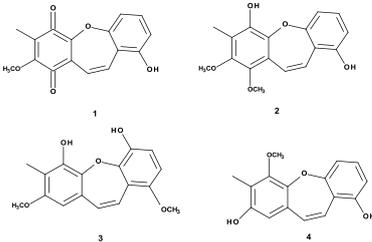
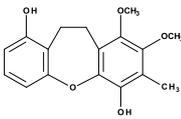
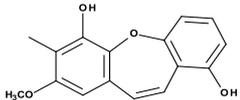
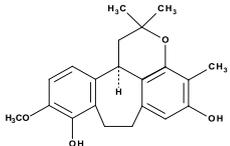
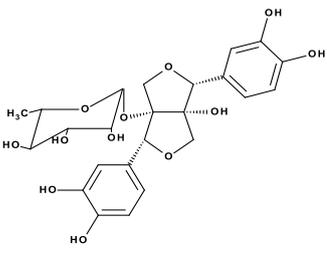
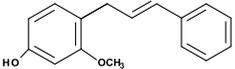
<i>Bauhinia forficata</i>	α -pineno, α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno, biciclogermacreno, α -humuleno, com traços de γ -elemeno, β -pineno, β -ocimeno
<i>Bauhinia aculeata</i>	β -bourboneno, β -elemeno, lepidozenol, eremofileno, e traços de <i>cis</i> - α -bergamoteno, β -cariofileno, aromadendreno, óxido de cariofileno, ledeno e valenceno
<i>Bauhinia brevipes</i>	α -copaeno, β -elemeno, germacreno D, β -selineno, γ -elemeno, δ -cadineno, viridifloral, α -cadinol, γ -cadineno, traços de β -bourboneno, α -humuleno
<i>Bauhinia longifolia</i>	β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, α -humuleno, isômero de copaeno
<i>Bauhinia pentandra</i>	β -cariofileno, γ -elemeno, óxido de cariofileno, e traços de α -humuleno, β -elemeno e <i>cis</i> - α -bergamoteno
<i>Bauhinia rufa</i>	α -pineno, <i>allo</i> -aromadendreno, α -amorfenol, germacreno D, germacreno B, biciclogermacreno, δ -cadineno, viridiflorol, α -cadinol, com traços de β -pineno, α -fencheno, α -gurjuneno
<i>Bauhinia variegata</i>	α -copaeno, β -elemeno, β -cariofileno, isocariofileno, <i>allo</i> -aromadendrene, germacreno D, γ -elemeno, δ -cadineno, ledeno, e traços de β -bourboneno, aromadendreno e α -humuleno

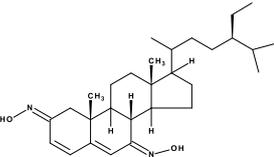
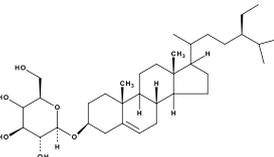
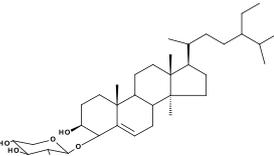
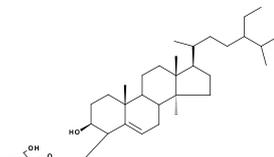
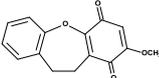
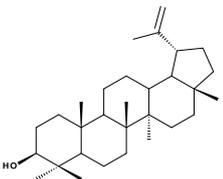
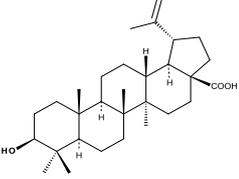
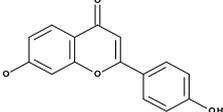
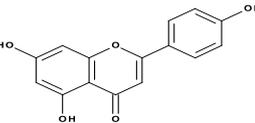
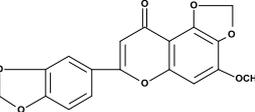
Outra classe de metabólitos de grande interesse que já foi detectada no gênero é a dos aminoácidos, em *Bauhinia purpurea*, e oxepinas, classe muito rara de ser encontrada na natureza, também isolada de *Bauhinia purpurea*, os quais foram vinculados a ótimas atividades inibitórias contra o crescimento de células tumorais, atividade biológica pouco

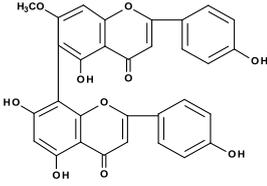
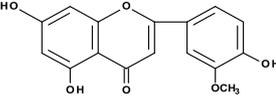
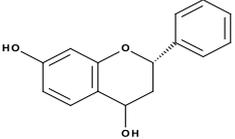
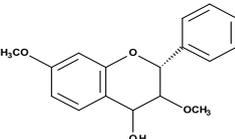
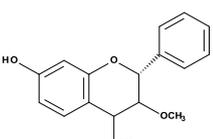
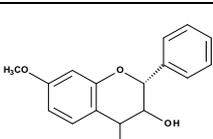
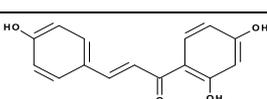
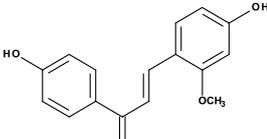
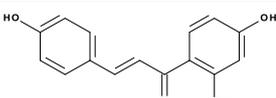
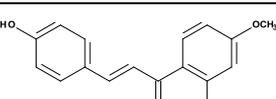
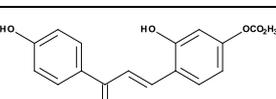
relatada com compostos isolados do gênero (VIJAYAKUMARI *et al*, 1997; IRIBARREN E POMILIO, 1989; PETTIT *et al*, 2006).

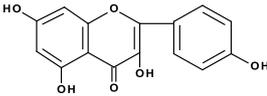
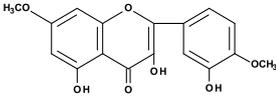
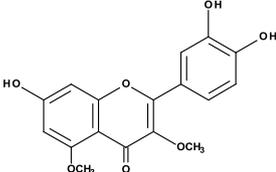
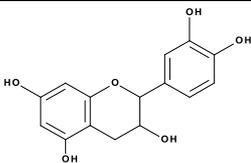
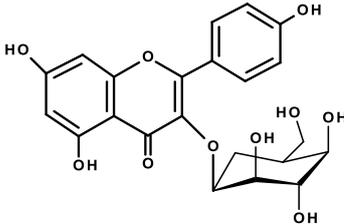
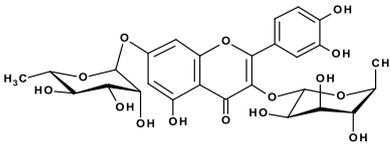
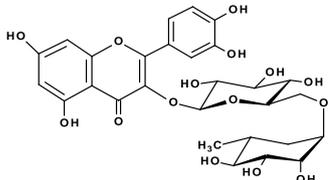
Na tabela abaixo são encontrados os principais compostos isolados das espécies de *Bauhinia*.

Tabela 2. Metabólitos secundários isolados do gênero *Bauhinia*.

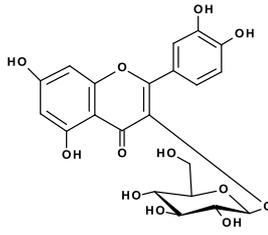
Classe	Composto	Estrutura	Espécie	Referência
Oxepinas	Bauhinias-tatinas1-4		<i>Bauhinia purpurea</i>	Pettit <i>et al</i> , 2006; Kumar e Chandrashekar, 2011
	5,6b dihidro-1,7-dihidro-1,7-dihidroxi-3,4-dimetóxi-2-metildibenzeno		<i>Bauhinia variegata</i>	Reddy <i>et al</i> , 2003
Cromanos	Pacharina		<i>Bauhinia racemosa</i>	Prabhakar <i>et al</i> , 1994
	Racemosol		<i>Bauhinia racemosa</i>	Prabhakar <i>et al</i> , 1994
Lignanás	2,6-di(4',5'-dihidroxifenil)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano-1-hidroxi-5-O-ramnopiranosí dio		<i>Bauhinia retusa</i>	Semwal e Sharma, 2011
Estilbenóides	Obtustireno		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988

Esteroides	Estigmasta-3,5-dieno-7-ona		<i>Bauhinia candicans</i>	Iribarren e Pomilio, 1983
	Sitosterol 3-O- β -glucosido		<i>Bauhinia candicans</i> ; <i>B. manca</i>	Iribarren e Pomilio, 1983; Cragg <i>et al</i> , 1997
	Sitosterol 4-O- β -D-xilopiranosido		<i>Bauhinia uruguayensis</i> ; <i>Bauhinia manca</i>	Iribarren e Pomilio, 1989; Iribarren e Pomilio, 1984
	Sitosterol 4-O- α -D-glucopiranosido		<i>Bauhinia uruguayensis</i>	Iribarren e Pomilio, 1989
Dihidrodibenzoxepina	Bauhinoxepina J		<i>Bauhinia purpurea</i>	Boonphong <i>et al</i> , 2007
Triterpenoides	Lupeol		<i>Bauhinia variegata</i>	Gupta <i>et al</i> , 1980
	Ácido betunílico		<i>Bauhinia vahlii</i>	Sultana <i>et al</i> , 1985
Flavonas	4-hidroxi-7-metoxiflavona		<i>Bauhinia guianensis</i>	Viana <i>et al</i> , 2000
	Apigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988
	Bausplendina		<i>Bauhinia splendens</i>	Laux <i>et al</i> , 1985

Agathisflavona		<i>Bauhinia vahlii</i>	Sultana <i>et al</i> , 1985	
Chrisoeriol		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
(2S)-7,4-Dihydroxiflavona		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
(2S)-7,3-Dimetoxi-4-hidroxi-flavona		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
(2S)-3,4-Dimetoxi-7-hidroxi-flavona		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
(2S)-7,4-Dimetoxi-3-hidroxi-flavona		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
Chalconas	Isoliquiritigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988
Echinatina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
2-metoxi-isoliquiritigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
4-metoxi-isoliquiritigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	
2,4-di-hidroxi-4-metoxi-dihidrochalcona		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988	

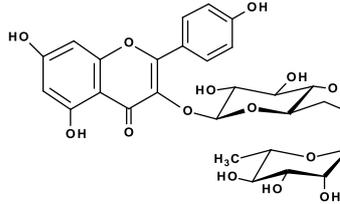
Flavonoides e derivado	Kaempferol		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988
	Ombuina		<i>Bauhinia variegata</i>	Yadava e Reddy, 2003
	5,3-dimetoxi-luteolina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach <i>et al</i> , 1988
	(+)-Catequina		<i>Bauhinia racemosa</i> ; <i>B. aurea</i> ; <i>B. championii</i>	Sashidara <i>et al</i> , 2012; Shang <i>et al</i> , 2007; Chen <i>et al</i> , 1994
Flavonóides glicosilados	Astragalina		<i>Bauhinia purpurea</i>	Vijayakumari <i>et al</i> , 1997
	Kaempferitrina		<i>Bauhinia forficata</i>	Silva e Cechinel-Filho, 2002; Pizzolatti <i>et al</i> , 2003; Sousa <i>et al</i> , 2004
	Rutina		<i>Bauhinia vahlii</i> , <i>B. tomentosa</i> ; <i>B. splendens</i> ; <i>B. retusa</i> ; <i>B. tomentosa</i> ; <i>B. purpurea</i>	Sultana <i>et al</i> , 1985; Subramanian e Nair, 1963; Cechinel Filho <i>et al</i> , 1995; Tiwari <i>et al</i> , 1978; Row <i>et al</i> , 1974; Abd-El-Wahab <i>et al</i> , 1987

Isoquercitrina



Bauhinia purpurea; *B. tomentosa*; *B. retusa*; *B. vahlii*; *B. racemosa*

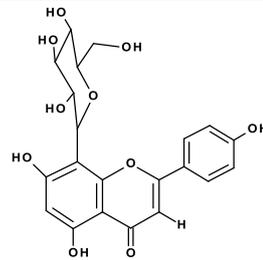
Ramachandran e Joshi, 1967; Subramanian e Nair, 1963; Row *et al*, 1954; Tiwari *et al*, 1978

Kaempferol 3-O- β -rutinosídeo

Bauhinia candicans

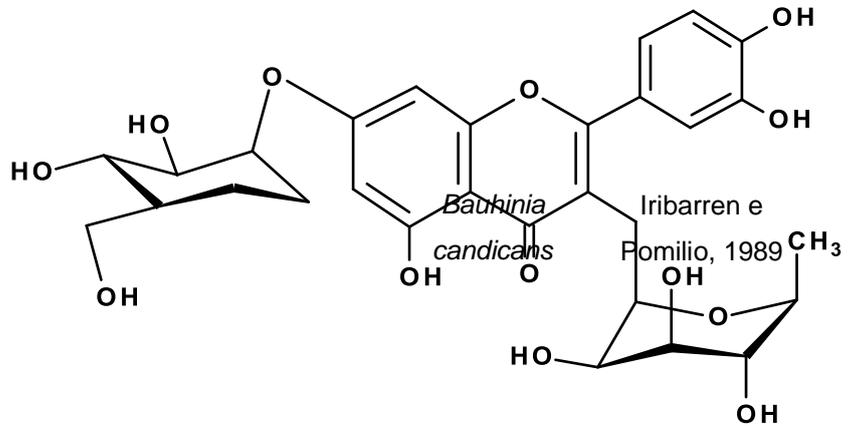
Iribarren e Pomilio, 1983

Vitexina



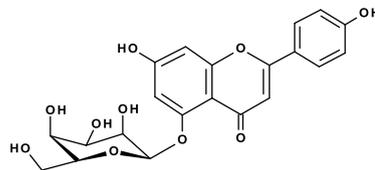
Bauhinia microstachya

Bianco e Santos, 2003

Quercetina - 3,7-O- α -L-ramnopiranosídeo

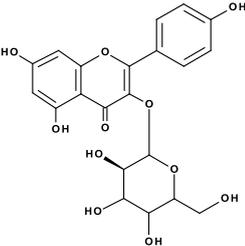
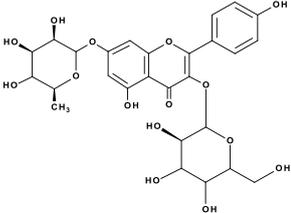
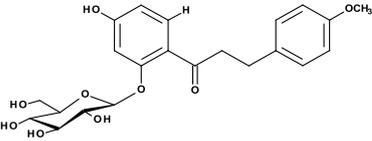
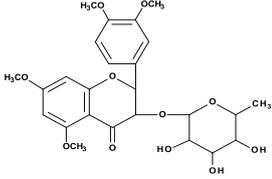
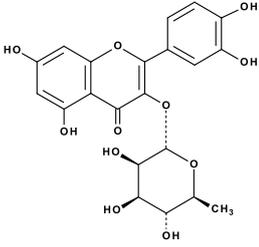
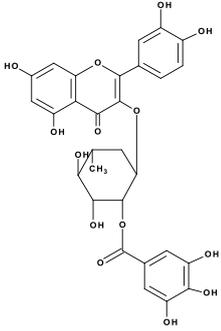
Bauhinia candicans

Iribarren e Pomilio, 1989

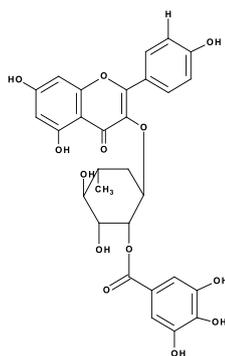
Kaempferol - 5-O- α -L-ramnopiranosídeo

Bauhinia candicans

Iribarren e Pomilio, 1989

Kaempferol-3-galactosídeo		<i>Bauhinia variegata</i> ; <i>Bauhinia purpurea</i>	Gupta <i>et al</i> , 1980; Rahman e Begun, 1966; Vijayakumari <i>et al</i> , 1997
Kaempferol-3,7-ramnoglucosídeo		<i>Bauhinia variegata</i>	Gupta <i>et al</i> , 1980; Rahman e Begun, 1966
Bauhinasídeo A		<i>Bauhinia glauca</i>	Wu <i>et al</i> , 2009
Astilbina		<i>Bauhinia megalandra</i>	González-Mujica, 2011
Quercetina 3-O- α -ramnosídeo		<i>Bauhinia megalandra</i>	González-Mujica, 2011
Quercetina 3-O- α -(2''-galoil)ramnosídeo		<i>Bauhinia megalandra</i>	Estrada <i>et al</i> , 2005; González-Mujica, 2011

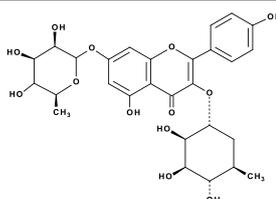
Kaempferol 3-O- α -(2''-galoil)ramnosídeo



Bauhinia megalandra

Estrada *et al*, 2005;
González-Mujica, 2011

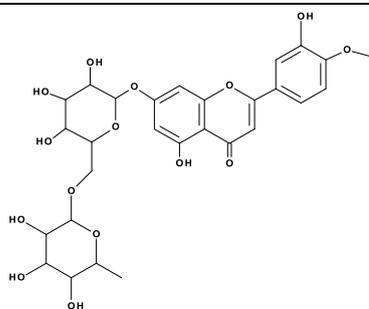
Kaempferol-3,7-O- α -Diraminosídeo



Bauhinia forficata

Sousa *et al*, 1998

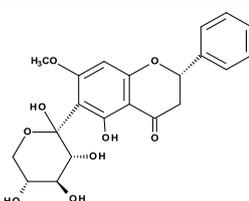
Hesperidina



Bauhinia variegata

Yadava e Reddy, 2003

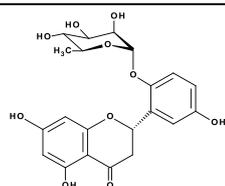
5,6-di-hidroxi-7-metoxi-flavona-6-O- β -D-xilopiranosídeo



Bauhinia variegata

Yadava e Tripathi, 2000

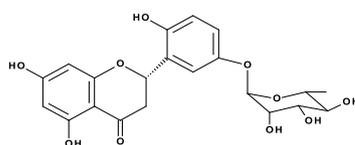
5,7,5'-tri-hidroxi-2'-O-ramnosil-flavona



Bauhinia megalandra

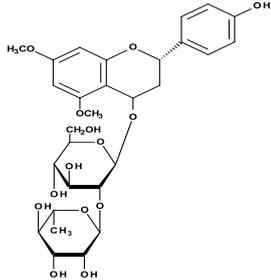
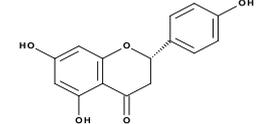
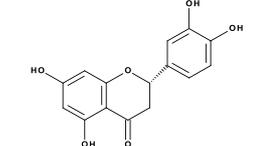
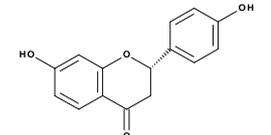
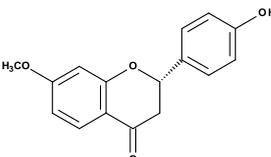
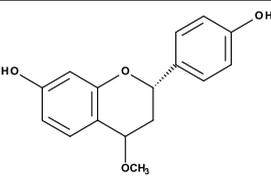
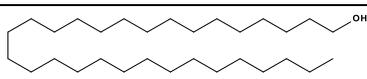
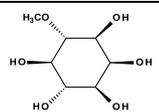
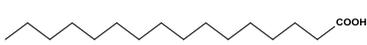
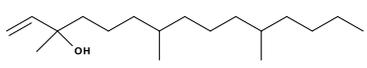
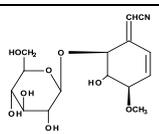
Gonzalez-Mujica *et al*, 2000

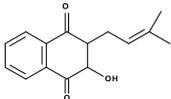
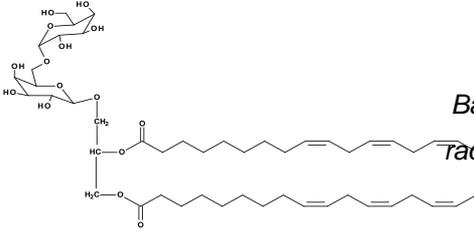
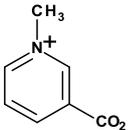
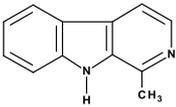
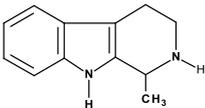
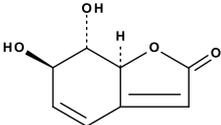
5,7,2'-tri-hidroxi-5'-O-ramnosil-flavona



Bauhinia megalandra

Gonzalez-Mujica *et al*, 2000

	Narigenina-5,7-dimetoxi-4-ramnoglucosídido		<i>Bauhinia variegata</i>	Rahman e Begun, 1966
Flavanona	(2S)-Narigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach et al, 1988
	(2S)-Eriodictiol		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach et al, 1988
	(2S)-Liquiritigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach et al, 1988
	7-metoxi-(2S)-liquiritigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach et al, 1988
	4-metoxi-(2S)-liquiritigenina		<i>Bauhinia manca</i>	Achenbach et al, 1988
Álcoois	Triacontanol		<i>Bauhinia candicans</i>	Iribarren e Pomilio, 1983
Poliálcoois	D-pinitol		<i>Bauhinia candicans</i>	Iribarren e Pomilio, 1983
Ácidos graxos	Ácido esteárico		<i>Bauhinia splendens</i>	Laux et al, 1985
	Isofitol		<i>Bauhinia forficata</i>	Sartorelli e Correa, 2004
Glicosídios	Bauhinina		<i>Bauhinia championii</i>	Chien-Chin et al, 1985

Quinonas	Lapachol		<i>Bauhinia guianensis</i>	Viana <i>et al</i> , 2000
Galactolípideo	(2S)-1, 2-di-O-linoleoil-3-O-a-sil-(1/6)-O-b-galactopirano sil glicerol		<i>Bauhinia Tacemosa</i>	Sashidhara <i>et al</i> , 2012
Alcaloides	Trigonelina		<i>Bauhinia candicans</i>	Iribarren e Pomilio, 1987
	Harmano		<i>Bauhinia unguolata</i>	Maia Neto <i>et al</i> , 2008
	Eleagnina		<i>Bauhinia unguolata</i>	Maia Neto <i>et al</i> , 2008
Lactona	Grifonilida		<i>Bauhinia variegata</i>	Okwute e Ndukwe, 1986

3.5.1 Flavonoides e Alcaloides em *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* apresenta como compostos majoritários os flavonoides, o que pode corresponder à sua grande capacidade antioxidante já verificada em muitos estudos e que podem contribuir para as ações terapêuticas vinculadas ao gênero (GONZÁLEZ-MUJICA, 2011; PIZZOLATTI, 2003; ORTIZ, 2009; BRACA, 2001).

Entretanto, a presença de alcaloides neste gênero é rara, visto que somente três foram isolados em duas espécies: na *Bauhinia candicans*, com o isolamento da trigonelina (IRIBARREN E POMILIO, 1987), e em *Bauhinia unguolata*, os alcaloides harmano e eleagnina (MAIA NETO *et al*, 2008).

Segundo Maia Neto *et al* (2008), os alcaloides harmano e eleagnina haviam sido relatados somente nos gêneros *Acacia* (*Acacia baileyana* e *Acacia complanata*) (REPKE *et al.*, 1973; JOHNS *et al.*, 1966) e *Prosopis* (*Prosopis nigra*) (MORO *et al.*, 1975) da família Mimosaceae, *Burkea* (*Burkea africana*) (FERREIRA, 1973), Caesalpiniaceae; *Desmodium* (*Desmodium pulchellum*) (GHOSAL *et al.*, 1972), Desmodiaceae; e *Petalostylis* (*Petalostylis labicheoides*) (BADGER E BEECHAM, 1951), Detarieae. Tal relato denota a pouca frequência desta classe em Fabaceae.

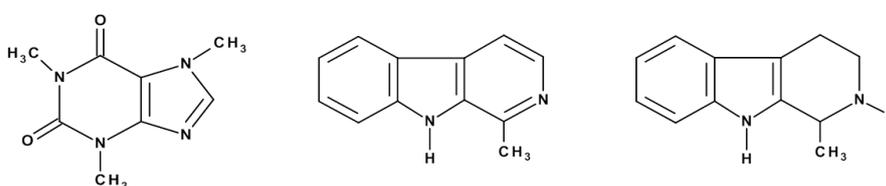


Figura 7. Alcaloides isolados do gênero *Bauhinia*. Da esquerda para direita: a partir de *Bauhinia candicans* (trigonelina) e *Bauhinia unguolata* (harmano e eleagnina).

3.5.2 Atividade hipoglicemiante

A descoberta e inserção de medicamentos para o tratamento da diabetes é considerada recente dentro da indústria farmacêutica. Todavia, na medicina popular, a utilização dos chás de folhas das plantas *Bauhinia forficata* e também de *Averrhoa carambola* (carambola) para o tratamento desta doença é bastante comum, sendo este costume passado de geração em geração (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005; ENGEL e FERREIRA, 2008; ACHENBACH *et al.*, 1988; TESKE E TRENTINI, 1995; WILLAIN FILHO *et al.*, 1997; GONZALEZ-MUJICA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2000).

Entre todas as ações terapêuticas apresentadas pelo gênero *Bauhinia*, a que é mais relatada e investigada comumente na literatura é a sua ação hipoglicemiante.

Porém, resultados contraditórios também foram encontrados, por Pepato *et al* (2010), onde extratos etanólicos de *Bauhinia forficata* não demonstraram atividade hipoglicemiante

em ratos, sendo esta espécie considerada como a “pata de vaca verdadeira” por ter mais estudos comprovando seu efeito hipoglicemiante (SILVA E CECHINEL-FILHO, 2002).

Assim, com os diferentes resultados apresentados desde os estudos iniciais, ao longo do tempo foram sendo estudadas outras espécies de diferentes localidades utilizadas com o mesmo propósito hipoglicemiante ou por apresentar relato de outros fins medicinais.

Como apresenta Gupta *et al* (1980), o extrato aquoso da espécie *Bauhinia divaricata* mostrou um significativo efeito em ratos referente ao teste de atividade hipoglicêmica. Com o avanço das análises para verificação deste efeito, recentemente foi divulgada a análise do extrato de *Bauhinia variegata*, o qual apresentou atividade de secreção de insulina (insulinotrópica) em linhagens de células testadas (FRANKISH *et al*, 2010).

A ação farmacológica da espécie *B. variegata* a partir de seus extratos etanólico e aquoso também foi confirmada a partir da diminuição da taxa glicêmica, como também do colesterol (THIRUVENKATASUBRAMANIAM e JAYAKAR, 2010; WAHAB *et al*, 1987).

Outras espécies também avaliadas, *Bauhinia monandra*, *Bauhinia megalandra* e *Bauhinia cheilantha* apresentaram ação hipoglicemiante em ratos induzidos a diabetes, onde foi verificado em alguns casos a redução da produção hepática da glucose e a sua absorção intestinal (GONZALEZ-MUJICA, 2011; MENEZES, 2007; ALMEIDA *et al*, 1997)

Alguns estudos exploram ainda mais a razão para tais atividades apresentadas, como é relatado em Estrada *et al* (2011): os flavonóides isolados da espécie *Bauhinia megalandra* não apresentaram atividade inibitória sobre a glucose-6-fosfatase, enzima responsável pela hidrólise da glucose, e sim sobre o transportador desta enzima, propondo um novo meio ao modo de atividade hipoglicemiante (FERNANDEZ-PENA, 2008).

3.5.3 *Kaempferitrina: um marcador químico dentro do gênero*

A presença de um marcador facilita a identificação do material exposto no mercado, já que há a fácil adulteração do material vegetal processado com outras espécies de *Bauhinia* ou

outros agentes, principalmente nos comércios livres e feiras, o que exige uma verificação do controle de qualidade. (SILVA *et al.*, 2000; SILVA e CECHINEL-FILHO, 2002; PIZZOLATTI *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2004; ENGEL e FERREIRA, 2008). Prova disso é a facilidade de encontrar a venda de produtos a base de *Bauhinia* até mesmo na Internet, o que exige atenção máxima e fiscalização da rotulagem, composição química e outras informações básicas do produto (BRASIL, 2004).

A kaempferitrina, figura 8, é um flavonoide isolado das folhas de *B. forficata*, a qual foi vinculada a ação hipoglicemiante do extrato, tornando-o um marcador químico para as amostras comercializadas desta espécie e sendo até esse flavonoide considerado como uma fonte natural de insulina para o controle de diabetes (SILVA *et al.*, 2000; SILVA E CECHINEL FILHO, 2002; PIZZOLATTI *et al.*, 2003; LINO *et al.*, 2004; MIYAKE *et al.*, 1986; JORGE *et al.*, 2004; DA CUNHA *et al.*, 2010).

Porém nem todas as espécies possuem este flavonóide e ainda assim apresentam a mesma ação, o que permite dizer que diferentes compostos existentes em outras espécies do gênero podem apresentar o mesmo efeito.

A procura por marcadores químicos para espécies deste gênero não é só uma preocupação brasileira, em Ferreres *et al.* (2012), a presença de miricetina em folhas de *Bauhinia longifolia* serviu como marcador em comparação com amostras comerciais deste gênero, já que este flavonoide está presente somente nas folhas desta espécie.

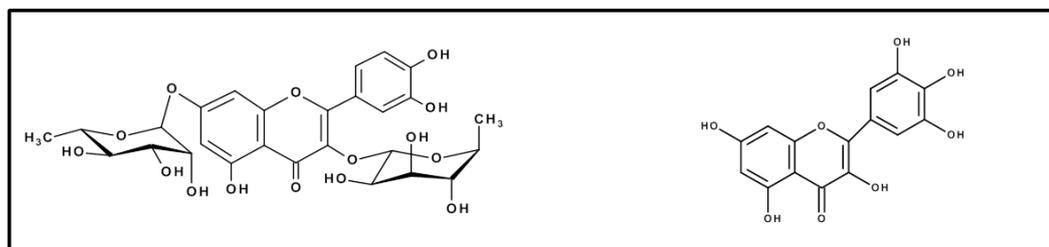


Figura 8. Estrutura química dos flavonoides kaempferitrina e miricetina.

3.5.4 Aplicações biotecnológicas

Diversos estudos a partir de substâncias isoladas de espécies do gênero *Bauhinia* em prol de aplicações biotecnológicas são cada vez mais comuns.

Por exemplo, a lectina isolada do extrato de *B. monandra* nomeada de BmoLL, apresentou atividade cupimicida para a espécie *Nasutitermes corniger*, cupim endêmico da região neotropical, que destrói construções de madeiras, e também exibiu atividade antifúngica, chegando até a 30% de inibição contra o crescimento de *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. lateritium* e *F. decemcellulare* (SOUZA *et al.*, 2011).

Em diversas áreas biotecnológicas, a presença de flavonóides como constituintes no gênero, os quais possuem como característica a ação antioxidante, desperta muito interesse. Como por exemplo, no tratamento da catarata, onde o principal fator reconhecido para o surgimento é o dano oxidativo na lente ocular. Na catarata, há o deslocamento para o estresse oxidativo no equilíbrio natural de oxidação-antioxidação. Assim, o flavonóide rhamnocitrina, isolado da *Bauhinia variegata*, possui efeitos antioxidantes fortes, podendo ser utilizada com grande utilidade para regular a catarata (Bodakhe *et al.*, 2012).

A área cosmética também já foi avaliada como grande potencial para o gênero *Bauhinia*. Em Takatori (1997), a verificação de uma quantidade favorável de vitaminas em extratos de *Bauhinia variegata* é dita como um agente promovedor de crescimento e fortalecimento dos cabelos, podendo ser utilizado em shampoos, tônicos ou cremes, estabelecendo a variedade de aplicações dos usos bio e tecnológicos do material obtido a partir de espécies do gênero *Bauhinia*.

3.5.5 O gênero *Bauhinia* na Amazônia

O uso popular mais comumente relatada neste gênero no Brasil é a ação hipoglicemiante obtida através dos chás das folhas de *Bauhinia forficata*, dita como a

“verdadeira pata-de-vaca”, sendo esta já comprovada e atribuída à presença do flavonoide glicosilado kaempferitrina, o qual é considerado como um marcador químico dentro do gênero (JULIANI, 1931; SILVA e CECHINEL-FILHO, 2002; SILVA *et al.*, 2000; PIZZOLATTI *et al.*, 2003).

Na região amazônica o uso de espécies desse gênero não é diferente, sendo descrito o mesmo uso para o tratamento de diabetes no Acre, Amazonas e Pará, e encontrado em muitas feiras e comércios a céu aberto material como folhas de *Bauhinia* para uso como chá para obter a ação medicinal (MING, 2006; BORRÁS, 2003, BARBOSA *et al.*, 2009). Tal fato incentiva a necessidade de estudos acerca da verificação da presença do marcador kaempferitrina, já que tal ação poderia estar vinculada a este marcador também nas espécies locais.

Na Amazônia poucos estudos acerca da constituição fitoquímica das espécies de *Bauhinia* foram realizados. Aparentemente sendo o único relato, em Laux *et al.* (1985), é relatado estudos a partir de *Bauhinia splendens*, onde é isolada a bausplendina 5',6',3',4'-dimetilenodioxí-7-metoxiflavona, assim como outras substâncias desta classe química, sem apresentar outras características para tal espécie.

Em 1993, foi realizado um amplo trabalho de campo da área de interesse biológico com a presença deste gênero dentro da área amazônica, onde foram catalogadas as principais espécies endêmicas e também a sua área de ocupação, expondo o risco das queimadas na eliminação destas espécies e o conseqüente desconhecimento de muitas frente a esta devastação e a grande área abrangente ainda pouco explorada. Este estudo apontou a necessidade de pesquisas voltadas para essa região, a qual é visada por muitos pesquisadores internacionais, se tornando um alvo fácil de exploração e biopirataria (Vaz, 1993).

Atualmente, no catálogo do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, é possível consultar as espécies já coletadas e registradas por este órgão federal, sendo relatadas 21 espécies, apresentadas na tabela 1.

Tabela 3. Espécies de *Bauhinia* coletadas no Amazonas e catalogadas no INPA. (Acessado em 06/01/12, <http://brahms.inpa.gov.br/bol/INPA>)

Espécie	Local de coleta*
<i>Bauhinia acreana</i>	Manacapuru
<i>Bauhinia alata</i>	Itapiranga, Manaus, Presidente Figueiredo
<i>Bauhinia altiscandens</i>	Manaus
<i>Bauhinia cinnamomea</i>	Presidente Figueiredo, Itapiranga, Alvarães
<i>Bauhinia coronata</i>	Pau D'Árco
<i>Bauhinia cupreonitens</i>	-
<i>Bauhinia erythrantha</i>	Manaus
<i>Bauhinia forficata</i>	Manaus, São Paulo de Olivença
<i>Bauhinia glabra</i>	Coari, Humaitá
<i>Bauhinia grandifolia</i>	Manaus
<i>Bauhinia guianensis</i>	Barcelos, Fonte Boa, Novo Airão, Manaus
<i>Bauhinia kunthiana</i>	Manaus
<i>Bauhinia longicuspis</i>	Manaus, Manicoré, Coari, Nova Olinda, Careiro-Castanho
<i>Bauhinia longipetala</i>	Barcelos, Careiro, Pauini, São Paulo de Olivença, Careiro, Maués
<i>Bauhinia monandra</i>	Manaus
<i>Bauhinia platycalyx</i>	Coari, Manaus, Humaitá, Presidente Figueiredo
<i>Bauhinia purpurea</i>	-
<i>Bauhinia rutilans</i>	Manaus, Presidente Figueiredo, Humaitá
<i>Bauhinia splendens</i>	Lábrea, Manaus, Barcelos, Itapiranga, Humaitá, Novo Airão
<i>Bauhinia unguolata</i>	Humaitá

* : espécies cuja cidade, ou comunidade, não foi mencionada, somente o estado.

Dentre estas, o hábito da população em comumente fazer a utilização das espécies *B. purpurea* e *B. coronata* pôde ser comprovado através dos relatos das próprias pessoas na cidade de Manaus, sendo que não é encontrado dentro da literatura o estudo fitoquímico para estas espécies de *Bauhinia* da região. Assim, a possibilidade da existência de compostos ativos é válida, já que a disseminação do uso ainda hoje é repassada para outras pessoas uma vez que foram obtidos bons resultados para fins terapêuticos.

3.6 Análises de atividades antioxidantes

O objetivo de quantificar a ação antioxidante de extratos e substâncias são muito comuns dentro da fitoquímica. Estas análises estão relacionadas ao potencial de captura de radicais livres expostos em um meio onde é observado se o material apresenta ou não tal inibição.

Radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), são gerados a partir de funções metabólicas do organismo vivos (DOTAN *et al*, 2004). O desequilíbrio nesta taxa de formação com o aumento do número de espécies metabolizadas implica em uma série de malefícios, como estresse, câncer, artrite reumatóide, doenças hepáticas, neurodegenerativas e pulmonares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O interesse por parte da comunidade científica na descoberta de espécies antioxidantes, figura 9, provem do crescente número das “doenças modernas” desencadeadas através da alta produção de radicais livres. A classe de substâncias fenólicas vem ganhando destaque dentro deste contexto por apresentar prevenção de doenças relacionadas ao excesso de radicais livres como o Mal de Alzheimer e retardo do envelhecimento, entre outros, devido à sua elevada capacidade antioxidante (CALABRESE *et al*, 2007; CHOE E MIN, 2006).

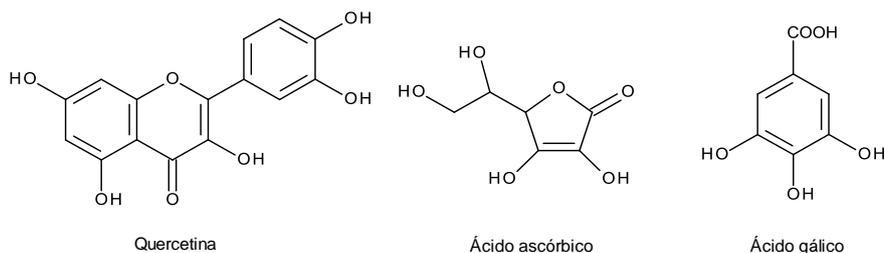


Figura 9. Substâncias com caráter antioxidante usadas como padrões para avaliação do potencial antioxidante.

Métodos que se baseiam nas reações de estabilização de radicais livres, como 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH \cdot) e 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolína-6-sulfonato) (ABTS $^{+}$), são os mais viáveis para uma avaliação inicial do comportamento inibitório dos extratos, onde a partir do cálculo da CI₅₀ (concentração inibitória de 50%) é obtida a concentração da amostra que captura 50% da quantidade total de radical existente no meio, demonstrando sua capacidade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

3.6.1 DPPH

O teste é baseado na reação do radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH \cdot), figura 10, o qual possui coloração púrpura, que ao receber um hidrogênio de uma espécie doadora (caráter antioxidante), é estabilizado e a molécula gerada, difenil-picril-hidrazil, possui coloração amarelada, expressando visualmente o resultado da análise antioxidante (MOLYNEUX, 2004).

No método quantitativo, a atividade antioxidante é medida através da diferença na absorvância apresentada entre a absorvância do próprio DPPH \cdot , o qual absorve em 517nm, e as amostras após reagir com o radical por 30 minutos. Esta taxa apresentada é utilizada para o cálculo da ação antioxidante CI₅₀, tendo como referência um padrão com alto caráter de inibição, como o flavonoide quercetina.

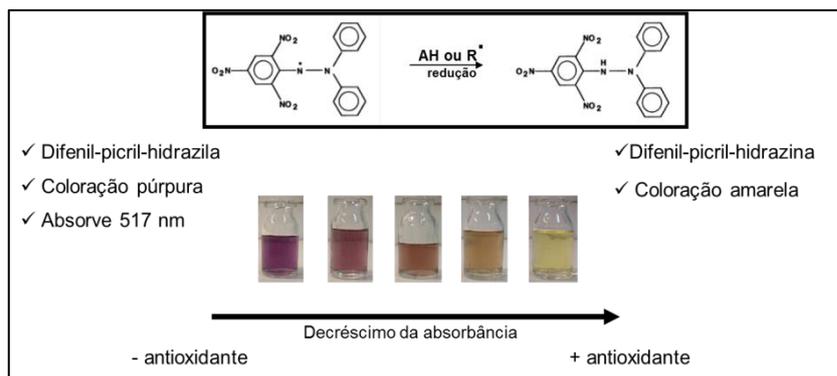


Figura 10. Reação e esquema representativo da redução do DPPH. (MOLYNEUX, 2004; LEANDRO, 2010)

3.6.2 ABTS⁺

Tendo o mesmo princípio do DPPH, o teste é baseado na utilização de um radical livre, o 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺), figura 11, o qual possui coloração azul escuro, e que ao ser estabilizado por uma espécie doadora tem como característica a incolor (RE *et al*, 1999).

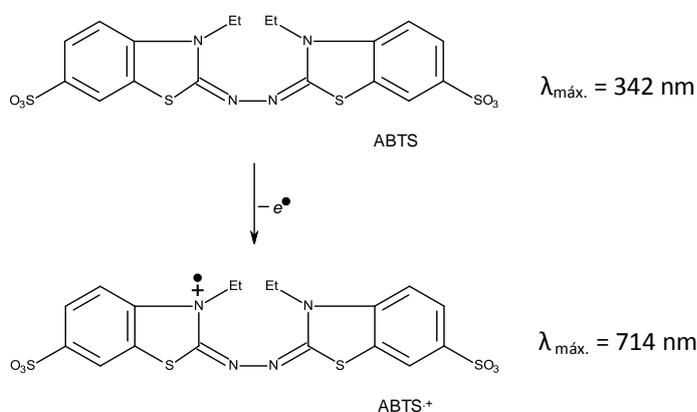


Figura 11. Formação do cátion 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), ABTS⁺ (VASCONCELOS *et al*, 2007).

3.6.3 Superóxido

O radical superóxido, O₂⁻, é formado em vários processos metabólicos dos organismos aeróbicos e é responsável por ser fonte potencial de lesões, já que pode agir diretamente sobre

alvos biológicos ou indiretamente iniciando a produção de espécies altamente reativas de oxigênio, como por exemplo o radical hidroxila (VARGAS, 2008). Além disso há relatos da participação de superóxidos em linhas de células relacionadas à desordens neurológicas, como Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, câncer, entre outros (NOOR *et al*, 2002).

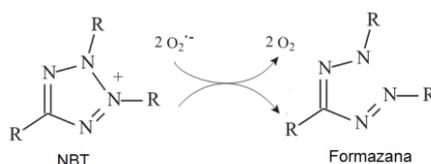


Figura 12. Estrutura do radical NBT⁺ (Nitro Blue Tetrazolium) (ALVES *et al*, 2010).

A atividade é avaliada de acordo com a presença de antioxidante no meio, onde há uma competição com o substrato NBT⁺ (coloração amarela), figura 12, pelo ânion radical superóxido gerado. Assim, com a presença de substâncias antioxidantes no extrato, a redução do NBT à formazana (púrpura) através do sequestro do radical é diminuída, indicando o potencial da amostra (ALVES *et al*, 2010).

3.7 Ensaios de inibição da atividade enzimática

A avaliação inibitória dos extratos frente às enzimas possui como objetivo avaliar o potencial dos mesmos para possíveis aplicações industriais, como a farmacêutica, as quais buscam novas fontes para o tratamento de doenças dermatológicas, como no clareamento de pele (SU, 1999) e digestivas, como a obesidade (PEREIRA *et al*, 2011).

3.7.1 *Tirosinase*

Essa enzima é responsável pela síntese da melanina, e no sistema nervoso participa da síntese da dopamina, sendo implicada em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkson (SHIMIZU *et al*, 2003)

A hiperpigmentação da pele é um fator bastante comum e que provem da disfunção de síntese de melanina, sendo um perigoso problema estético e necessitando de inibidores desta enzima para o tratamento da doença (DE SOUZA, 2011).

A procura por compostos que inibam a enzima tirosinase é visada para muitas aplicações tecnológicas, principalmente na área farmacêutica, em prol da criação de produtos cosméticos para o tratamento de clareamento e desordens dermatológicas existentes atualmente (KARIOTI *et al*, 2007).

3.7.2 α -amilase

A inibição desta enzima é visada pelas áreas da medicina e farmacêutica em prol da diminuição do nível de glicose no sangue, muito importante para o controle em pacientes com diabetes do tipo 2, que necessitam monitorar tal taxa, uma vez que não possuem a capacidade necessária para absorção do açúcar (ALI *et al*, 2006).

A busca de plantas que contenham inibidores desta enzima é crescente, e dentro do gênero *Bauhinia* já foram obtidos resultados positivos, como para as espécies

3.7.3 Lipase, lipoxigenase e α -glicosidase

Dentro do estudo de produtos naturais uma das áreas mais visadas é a relacionada à farmacologia, com o intuito de promover novas possibilidades no tratamento de doenças como obesidade e diabetes.

Inicialmente, testes inibitórios frente a enzimas direta ou indiretamente envolvidas no processo de obtenção destas doenças são avaliadas para determinar o potencial do material estudado, como a inibição da lipase. Esta enzima é responsável pela degradação e absorção de lipídeos no corpo humano, e novos fármacos que promovam a sua inibição são procurados, principalmente para o tratamento da obesidade (PEREIRA *et al*, 2011).

Atividades inibitórias das enzimas lipoxigenase e α -glicosidase estão envolvidas diretamente com o processo de diabetes, pois as mesmas são responsáveis pelo processamento de carboidratos e amido atuando em suas quebras, assim como absorção do amido e monossacarídeos formados (GUYTON e HALL, 2002). Assim, com sua inibição há redução na taxa glicêmica por não haver a absorção de glicose (PEREIRA *et al*, 2011).

4. EXPERIMENTAL

4.1 Coleta e preparo do material

As coletas do material botânico das quatro espécies do gênero *Bauhinia* foram realizadas na Vila Olímpica e na Reserva Ducke, *Bauhinia purpurea* e *Bauhinia coronata* respectivamente, em Manaus; na área urbana de São Gabriel da Cachoeira, *Bauhinia purpurea*; e nas comunidades interioranas de Bom Senhor Jesus e Nossa Senhora de Nazaré, no município de Manacapuru, *Bauhinia acreana*. A identificação das espécies foi realizada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e no Herbário da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

As partes da planta foram separadas em folhas e galhos/cipó, limpas para retirada de possíveis fungos ou microorganismos e secas à temperatura ambiente por sete dias, sendo em seguida trituradas.

O procedimento geral é exposto na figura 13 abaixo.

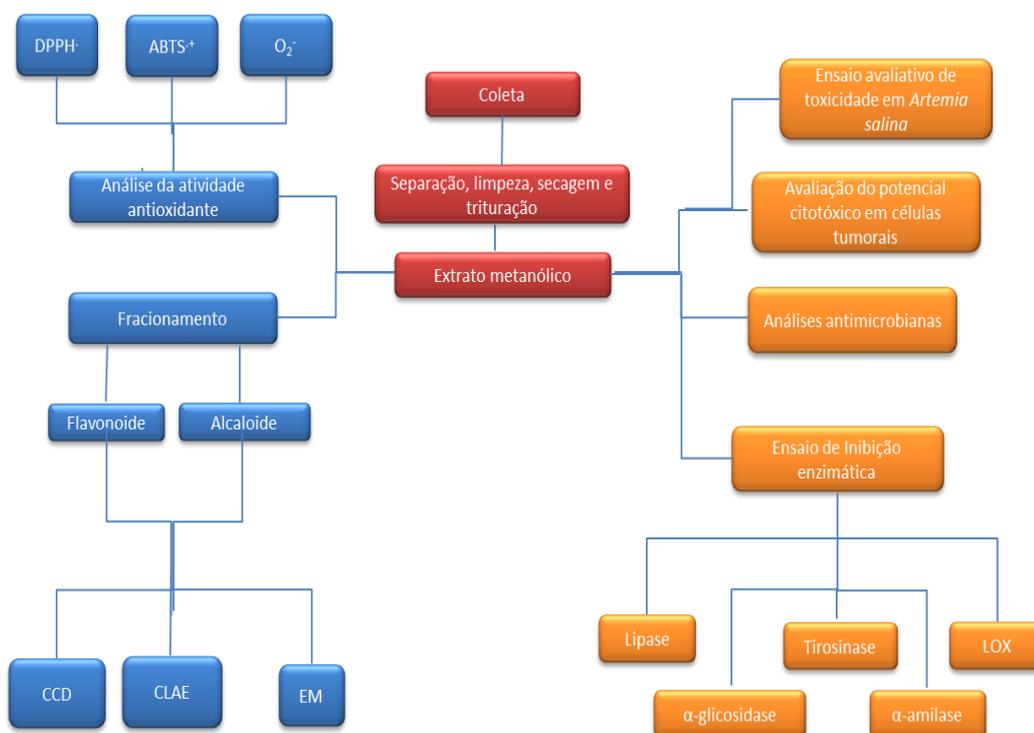


Figura 13. Esquema geral da metodologia empregada.

4.2 Obtenção dos extratos

O mesmo padrão para extração foi adotado para as diferentes partes das espécies. Após o período de sete dias da adição de metanol destilado (MeOH) ao material macerado, realizou-se a filtração do material através de um papel filtro em funil, onde o material líquido obtido foi extraído sob pressão reduzida de em um banho com temperatura em torno de 40°C, utilizando aparelho rotaevaporador.

Individualmente, o material concentrado em cada extração foi armazenado, identificado e pesado em balança analítica digital para calcular o rendimento para posteriormente ser utilizado nos testes e prospecção. O solvente obtido após a extração retornou ao recipiente com material vegetal, o qual permaneceu protegido da exposição à luz e após 72h foi realizado o mesmo procedimento, pelo período de 45 dias.

4.3 Análise da atividade antioxidante

Neste projeto os extratos brutos metanólicos de galhos e folhas de *Bauhinia sp* foram submetidos a três análises para avaliação das atividades antioxidantes frente a três radicais livres: DPPH, ABTS⁺ e O₂⁻. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Estresse Oxidativo e Aterogênese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão do Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

4.3.1 Inibição do radical livre DPPH

A verificação da atividade inibidora foi determinada para todos os extratos a partir dos testes qualitativos inicialmente (MONTENEGRO, 2006; SOLER-RIVAS, 2000) e de acordo com os resultados positivos, é realizada a técnica quantitativa (MOLYNEUX, 2004).

4.3.1.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante

O teste consiste em aplicar 15 μ L do extrato metanólico de *Bauhinia sp* com concentração de 10 mg/mL em uma placa de sílica com dimensões de 2cm x 2cm para cada área destinada às amostras (figura 14). Além do extrato também são aplicados o padrão quercetina e o branco (MeOH), para verificação da interferência do mesmo no procedimento.



Figura 14. Placa para ensaio qualitativo da atividade antioxidante de DPPH.

Após aplicar todas as amostras teste é borrifada a solução de DPPH 3mM em MeOH, onde a placa fica com a coloração roxa característica da solução de DPPH. Foi observada a atividade positiva ou negativa para as amostras evidenciadas pela presença de manchas amarelas ou brancas decorrentes da redução do DPPH, contra a coloração púrpura de fundo, indicando atividade positiva. A ausência de manchas denota um resultado negativo.

4.3.1.2 Análise quantitativa da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de captura do radical DPPH foi realizada conforme a metodologia descrita por Molyneux (2004), com modificações. Primeiramente foi realizado o monitoramento da solução de DPPH, 0,3 mM/mL, no aparelho leitor de microplaca modelo DTX 800, Beckman, em comprimento de 492 nm até obter a absorbância 1,00(\pm 0,1). Na microplaca de 96 poços foram aplicados em triplicata, 270 μ L da solução hidroalcolica de DPPH e 30 μ L da amostra nas concentrações iniciais de 50, 100, 250, 500 e 1000 μ g/mL (sendo estas minimizadas quando apresentavam alta atividade), sendo realizado o mesmo procedimento também para o controle negativo, dimetilsufóxido (DMSO).

Após ser incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz, foi realizada a leitura em 492 nm.

A substância quercetina foi utilizada como padrão referência e o cálculo do CI_{50} foi obtido através da seguinte fórmula utilizando-se o programa Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{abs amostra}}{\text{abs controle}} \right) \times 100$$

Onde *abs amostra* é a absorbância da amostra e *abs controle* é a absorbância do controle.

4.3.2 Inibição do radical livre $ABTS^{\bullet+}$

A análise foi realizada segundo Re *et al.*,(1999), com algumas modificações. A solução catiônica de ABTS (7 mM, 50% de solução de ABTS, 50% solução de persulfato de potássio 5 mM) foi preparada e mantida em temperatura ambiente e com ausência de luz. Após 12 horas, é obtido o radical $ABTS^{\bullet+}$ (coloração azul escura).

Após a formação do radical foi realizado primeiramente o monitoramento da solução, sendo adicionados na microplaca: 270 μ L da solução hidroalcolica de ABTS (diluição 1:7 da solução original) e 30 μ L de etanol (EtOH). A leitura foi efetuada em comprimento de onda de 417 nm através do leitor de microplaca modelo DTX 800, Beckman. Ao obter absorbância aproximadamente 1,00 ($\pm 0,1$) foi realizado o ensaio em triplicata através da adição de 270 μ L da solução hidroalcolica de ABTS com 30 μ L da amostra em diferentes concentrações, concentrações iniciais de 50, 100, 250, 500 e 1000 μ g/mL. Para o controle negativo foi utilizado DMSO em concentração única e seguindo todo o procedimento restante. Após incubar por 15 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz realizou-se a leitura no leitor de microplaca em 417 nm.

A substância trolox foi utilizada como padrão referência e o cálculo do CI_{50} foi obtido através da seguinte fórmula utilizando-se o programa Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{abs amostra}}{\text{abs controle}} \right) \times 100$$

4.3.3 Inibição do radical livre O_2^-

O procedimento foi descrito por Ewing e Janero (1995), baseada na reação entre NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo), PMS (fenazina metassulfato) e NBT (azul de nitrotetrazólio), onde é formado o ânion radical superóxido. Assim, dois radicais superóxido doam, cada um, um elétron para o NBT, reduzindo e formando a formazana, a qual é monitorada em um comprimento de onda de 560 nm, em espectrofotômetro UV-Vis.

O ensaio foi realizado conforme Öztürk (2007), com modificações. São preparados inicialmente os reagentes NBT (250 μM), NADH (390 μM) e PMS (10 μM) em tampão Tris-HCl (16 mM, pH=8,0). Em uma placa de 96 poços são adicionados 50 μL de solução dos extratos metanólicos de *Bauhinia sp* nas concentrações de 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, 100 μL de NADH e 100 μL de NBT. A absorbância inicial é obtida a partir da leitura da microplaca a 560 nm.

Em seguida é adicionado 100 μL de PMS. A mistura é então incubada a 25°C por 5 minutos e logo após é realizada a leitura da absorbância final a 560 nm.

Como padrão foi utilizado ácido gálico e atividade foi calculada através da seguinte fórmula utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{abs}_{\text{final amostra}} - \text{abs}_{\text{inicial amostra}}}{\text{abs controle}} \right) \times 100$$

4.4 Atividade de inibição enzimática

Os extratos brutos foram testados frente a cinco modelos de inibição enzimática: tirosinase, α -amilase, lipase, lipoxigenase e α -glucosidase utilizando concentrações iniciais de 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo estas diminuídas a partir dos resultados positivos. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Estresse Oxidativo e Aterogênese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão do Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

4.4.1 Inibição da enzima tirosinase

A atividade da inibição enzimática da tirosinase foi realizada segundo descrito em Hearing (1987), com modificações. Inicialmente foi realizado o controle da solução enzimática com concentração de 0,1 mmol/L adicionando-se 80 μL da mesma, 20 μL de DMSO e 100 μL da solução do reagente de cor L-DOPA 1 mmol/L em uma microplaca. Esta solução foi monitorada a cada 5 minutos durante 20 minutos até que a sua absorvância fosse de aproximadamente 1,00.

O teste compôs-se inicialmente da adição de 20 μL da amostra a ser analisada com 80 μL da solução enzimática de tirosinase, sendo incubado a 37°C e por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 100 μL da solução do reagente L-DOPA e novamente incubado a 37°C, sendo a leitura realizada a cada 5 minutos por 20 minutos em comprimento de onda de 420 nm em aparelho leitor de microplaca modelo DTX 800, Beckman.

A substância ácido kójico foi utilizada como padrão referência e o cálculo do CI_{50} é dado através da seguinte fórmula utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{abs}T_{20} \text{ amostra} - \text{abs}T_0 \text{ amostra}}{\text{abs}T_{20} \text{ controle} - \text{abs}T_0 \text{ controle}} \right) \times 100$$

Onde $absT_0$ = absorvância inicial (tempo: 0 minuto) e $absT_{20}$ = absorvância final (tempo: 20 minutos).

4.4.2 Inibição da enzima α -amilase

O método de inibição da α -amilase foi baseado segundo Subramanian *et al*, (2008) com modificações. O teste consistiu na adição de 20 μ L do extrato nas concentrações de 1 a 1000 mg/ mL diluído em DMSO, juntamente com 200 μ L de amilase diluída em água deionizada na concentração 0,1mg/mL.

Para o padrão positivo foi adicionado 20 μ L de acarbose diluída em DMSO e 20 μ L de amilase. Para o controle adicionou-se somente 40 μ L de DMSO. Após incubar por 5 minutos em estufa a 37° C foram acrescentados 200 μ L da solução do substrato da α -amilase em cada um dos poços, e em seguida efetuada a primeira leitura a 406 nm.

A microplaca foi incubada novamente a 37° C por mais 10 minutos e assim efetuar a segunda leitura na mesma absorvância. A porcentagem de inibição da α -amilase foi avaliada a partir da seguinte equação utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{absT_{20} \text{ amostra} - absT_0 \text{ amostra}}{absT_{20} \text{ controle} - absT_0 \text{ controle}} \right) \times 100$$

4.4.3 Atividade de inibição da enzima lipase

Para a determinação da inibição da lipase foi utilizado a metodologia descrita por Lee *et al*, (1993). Foi utilizada solução de lipase com concentração de 1 mg/mL em tampão fosfato 10mM com pH ajustado para 8,0. Para o substrato cromogênico utilizou-se uma solução de 1-2-o-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico (6-metilresorufina)-ester em tampão fosfato. Como padrão utilizou-se xenical a 1mg/ mL.

Foram adicionados nos poços individuais, 25 µL de extrato nas concentrações de 1 a 1000 mg/mL, 25 µL de tampão fosfato para análise do controle negativo. Em seguida adicionou-se 75µL da solução enzimática em cada poço e após 5 minutos de incubação a 37° C, 80µL do tampão fosfato foi adicionado e assim efetuada a primeira leitura no leitor de microplaca a 405nm.

Em seguida, 20µL do substrato cromogênico foi adicionado, sendo a reação submetida à incubação novamente a 37° C por mais 20 minutos. Após esse tempo foi realizada a leitura da absorbância final.

Como padrão utilizou-se xenical (orlistat) e o cálculo da inibição foi efetuada a partir da seguinte equação utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{abs}T_{20} \text{ amostra} - \text{abs}T_0 \text{ amostra}}{\text{abs}T_{20} \text{ controle} - \text{abs}T_0 \text{ controle}} \right) \times 100$$

4.4.4 Atividade de inibição da enzima lipoxigenase

A metodologia utilizada neste ensaio foi descrita por Ngoc *et al*, (2008) com modificações. Os extratos metanólicos foram diluídos em DMSO para chegar à concentração de 1mg/mL, em seguida foram preparados os seguintes reagentes: tampão fosfato de sódio 20mM com pH= 8,0, o ácido linoleico em solução hidroalcolica com concentração 40µM e a enzima lipoxigenase (100.000U/mL) em solução tampão fosfato de sódio já preparada.

Em uma cubeta de quartzo adicionou-se respectivamente: 940 µL do tampão fosfato de sódio, 20µL do extrato metanólico em DMSO, 20µL do ácido linoleico 40µM e 20µL da enzima lipoxigenase (LOX). Imediatamente após a adição da enzima foi realizada a leitura em aparelho espectrofotômetro (modelo T70 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd.) em absorbância de 234 nm. Para o cálculo do controle foi utilizado DMSO ao invés do extrato.

A partir da diferença na absorvância obtida no instante inicial e após 5 minutos de monitoramento da enzima e para cada amostra foi realizada leitura em triplicata.

O padrão utilizado foi a quercetina, e através da seguinte equação calculou-se a porcentagem de inibição para cada amostra:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\bar{x}_{\text{controle}} - \text{abs}_{\text{amostra}}}{\bar{x}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Onde:

$\bar{x}_{\text{controle}}$: média da triplicata do controle;

4.4.5 Atividade de inibição da enzima α -glicosidase

A análise foi baseada no método segundo Andrade-Cetto *et al*, (2008) com modificação. Nos poços teste foram adicionados 20 μL dos extratos metanólicos de *Bauhinia sp* nas concentrações de 1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 180 μL enzima da solução de α -glicosidase para incubação. Os extratos foram diluídos com DMSO, sendo também utilizado tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 6,9.

Após incubar por 5 minutos em estufa com temperatura de 37° C, foi efetuada a leitura inicial em absorvância de 405nm, e em seguida adicionou-se em cada poço 100 μL da solução de substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo.

A microplaca foi incubada então por mais 15 minutos e efetuou-se a segunda leitura (leitura final). Como padrão utilizou-se a acarbose, e o cálculo da inibição é dado através da equação utilizando os programas Microsoft Excel 2010 e OriginPro8:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\text{abs}_{\text{final amostra}} - \text{abs}_{\text{inicial amostra}}}{\text{abs}_{\text{final controle}} - \text{abs}_{\text{inicial controle}}} \right) \times 100$$

4.5 Ensaio avaliativo de toxicidade em *Artemia salina*

Para avaliar a toxicidade dos extratos Meyer *et al* (1982), foram incubados ovos de *Artemia salina* em solução marinha 37% juntamente com DMSO por 48 horas. Em seguida, foram transferidas 10 unidades dos náuplios para soluções diluídas dos extratos de *Bauhinia*.

Após a incubação por 24 horas na solução do extrato, foi verificada a concentração letal de 50% (CL50) a partir da contagem dos náuplios sobreviventes e o registro no método Probit, onde calculou-se a CL50. Dentro deste ensaio o padrão utilizado foi solução de lapachol juntamente com DMSO, com as concentrações correspondentes às utilizadas para os extratos analisados.

4.6 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais

Realizada em parceria com o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob supervisão da Prof. Dra. Cláudia Pessoa, o método utilizado foi descrito primeiramente por Mossman (1983), onde a determinação do potencial antitumoral das amostras foi verificada através da análise dos extratos em 3 linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). Substâncias puras foram testadas na concentração única de 5µg/mL, os extratos na concentração de 50µg/mL e as frações na concentração de 25µg/mL.

Após adição dos extratos diluídos nas amostras, incubou-se por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

4.7 Análises antimicrobianas

Os testes, em duplicata, foram realizados pelo DSc. Fábio Alessandro Pieri na Fundação Oswaldo Cruz, em Manaus, por meio da difusão em ágar pela técnica do orifício, com adaptações das técnicas descritas por Cursino *et al* (2011) e Pieri *et al* (2010).

Foram utilizadas placas de Petri de 90mm previamente preparadas com uma camada inferior de 10mL de ágar bacteriológico e uma superior de 15mL de ágar Müeler Hinton. Na camada superior foram feitos seis orifícios com o auxílio de ponteiros estéreis de 200µL de forma equidistante para a posterior pipetagem de 40µL das soluções do extrato bruto testado individualmente (concentração de 10 mg/mL em DMSO), do controle positivo (imipenem a 10 µg/mL) e do controle negativo (DMSO e água destilada estéril 1:1).

As culturas bacterianas foram caracterizadas por: sete espécies Gram-positivas: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA); *Streptococcus oralis* (*Streptococcus sanguis*); *Streptococcus pyogenes* grupo A tipo 1 e *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*); e três espécies Gram-negativas: *Escherichia coli* enterohemorrágica; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis e *Shigella flexneri*.

A partir de culturas novas (18-24h), produzidas a partir de uma única colônia crescida em meio ágar BHI, adequadas a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foram preparados os inóculos seguindo-se a semeadura nas placas preparadas com o auxílio de suabes estéreis. Após as soluções inoculadas em seus respectivos orifícios, as placas foram incubadas a 37°C por 24h em estufa bacteriológica.

Após o tempo de incubação verificou-se a presença de halos de inibição circulares. Quando identificada a formação de halo acrescentou-se a placa uma sobrecamada de 10mL de solução de trifeniltetrazólio a 0,1%, um indicador colorimétrico, que passa de transparente a vermelho quando há crescimento bacteriano, acrescido de Agar bacteriológico 1% para

evidenciação destacada do halo de inibição. Foi considerada inibição microbiana quando houve formação de halo de inibição.

4.8 Fracionamento por extração múltipla

Foram realizadas partições utilizando sistemas de solventes de diferentes polaridades para verificação de compostos flavonoídicos, de acordo com a metodologia utilizada com *Bauhinia forficata* por Engel e Ferreira (2008), ou alcaloídicos, segundo descrito por Giordani *et al* (2008), ambos descritos a seguir.

4.8.1 Flavonoides

A partir da metodologia utilizada por Engel e Ferreira (2008), com modificações, inicialmente foi pesado aproximadamente 1 g do extrato bruto seco obtido, e em seguida a diluição da amostra em 20 mL de MeOH/H₂O (9:1). Em seguida, o material foi transferido para um funil de separação sendo extraído com 20 mL de diclorometano (DCM) por quatro vezes, onde a fração DCM obtida foi concentrada em evaporador rotatório e armazenada. A fração hidroalcolica resultante foi extraída então com 20 mL de acetato de etila (AcOEt) por quatro vezes, sendo retirada a fração AcOEt e concentrada em evaporador rotatório. Sendo esta a fração flavonoídica, a qual foi então utilizada para as análises de identificação.

4.8.2 Alcaloides

A metodologia utilizada foi adaptada de Giordani *et al* (2008), consistindo em ressuspensão de 1 g do extrato bruto de *Bauhinia* em HCl 10% em aparelho ultrassom. Após, foi particionada com hexano (25 mL) por cinco vezes (fração Hex), e em seguida com diclorometano nas mesmas condições (fração DCM).

A fração foi então basificada com NH_4OH até atingir $\text{pH} = 8$ e logo após extraída com diclorometano (25 mL). Esta fração diclorometano foi então lavada quatro vezes com água destilada (20 mL) para retirar o excesso de base ainda presente (fração DCM básica) e em seguida concentrada em aparelho rotaevaporador e armazenada na geladeira devidamente vedada, sendo esta dita como a fração alcaloídica.

4.9 Perfil Cromatográfico utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.9.1 Flavonoides

Para realização da placa cromatográfica (CCD) utilizou-se placa de sílica com espaçamento de 0,5 cm nos lados e entre as amostras, assim como o próprio espaço para aplicação da amostra também com essa dimensão. Nas margens inferior e superior da placa foi demarcado 1 e 0,5 cm respectivamente, sendo 8 cm o espaço total percorrido pelas amostras na placa.

Após aplicar 15 μL da fração obtida com concentração de 50 mg/mL, assim como os padrões kaempferitrina (isolada das folhas da espécie *Uncaria guianensis*) (Tese Rodolfo, 2012), rutina (Aldrich) e isoquercitrina (Aldrich) (1 mg/mL), a placa de sílica foi eluída com o seguinte sistema: AcOEt/HCOOH/CH₃COOH/H₂O (100:10:10:27).

Em seguida, foram borrifados os reveladores NP-PEG (difetilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol) e verificou-se a presença da classe química ao observar sob UV 360 nm, o aparecimento de manchas de coloração amarelada e laranja.

4.9.1.2 Catequina

Foram aplicadas as mesmas condições propostas para CCD de flavonoides anterior, exceto ao eluente utilizado, AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10), e sendo revelado com FeCl₃ verificou-se a presença de catequina nas amostras a partir da comparação com o R_f do padrão (+)-catequina (Aldrich) utilizado (GRÜNER *et al*, 2012).

4.9.2 Alcaloides

A análise por cromatografia em camada delgada utilizou as frações obtidas e os seguintes parâmetros para detecção de alcaloides: utilização de sistema de eluente BuOH/C₃H₆O/H₂O (4:1:5), e como revelador, solução de Dragendorff. Foram aplicados 15 µL da fração (50 mg/mL) e do padrão harmano (Aldrich) (1 mg/mL).

4.9.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.9.3.1 Preparo das amostras

A realização desta parte experimental foi elaborada em parceria com a Prof. Dr. Ligia Valente, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Laboratório de Pesquisa 627. Inicialmente, foi realizada a extração em fase sólida (SPE) a partir de 25 mg de cada extrato bruto, diluído em 3 mL de etanol para CLAE, sendo em seguida transferido para um balão volumétrico de 10 mL com etanol e água Milli-Q (8:2). Após o condicionamento da coluna usando-se metanol, o material foi extraído em cartuchos de C18 utilizando-se um sistema com bomba a vácuo.

A fim de comparação de perfil, foram utilizadas também as frações flavonoídicas obtidas a partir do fracionamento por extração múltipla, previamente filtradas em filtro de membrana para CLAE para retirar possíveis interferentes.

4.9.3.2 Condições da análise e do equipamento

Foram injetadas 20 µL de cada amostra com concentração de 10 mg/mL em aparelho cromatógrafo da marca Agilent Technologies, modelo 1200, com as seguintes condições: bomba com fluxo de 0,8 mL/min, a 121 bar, temperatura da coluna de 40°C, detector de arranjo de diodo ($\lambda = 190$ a 320 nm), utilizando como fase móvel os eluentes acetonitrila (ACN) e água (H₂O/HCOOH, pH= 3,0), onde de 0-30 minutos foi utilizado 5 a 25% de ACN e 95 a 75% de H₂O/HCOOH, de 30 a 50 minutos, 25 a 80% de ACN e 75 a 20% de H₂O/HCOOH, de 50 a 55 minutos, 80 a 95% de ACN e 20 a 5% de H₂O/HCOOH.

4.10 Identificação por espectrometria de massas (EM)

Foram analisadas por meio de inserção direta no aparelho espectrômetro *ion trap* LCQ Fleet™ (Thermo Scientific), equipado com uma fonte de *electrospray*, localizado na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão do Msc. Felipe Moura. As frações obtidas por extração múltipla em AcOEt e os padrões de rutina (Aldrich), isoquercitrina (Aldrich) e (+)-catequina (Aldrich) foram diluídas em MeOH grau HPLC, com concentração de 10 ppm, onde 200 µL foram injetados no operando no modo positivo e negativo.

Após identificação em CCD e/ou CLAE, os íons de relação *m/z* característicos de flavonoides já encontrados no gênero *Bauhinia*, rutina e isoquercitrina, foram fragmentados (MSⁿ) para confirmação da presença dos mesmos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação e rendimento dos extratos

Após as amostras serem coletadas, limpas, trituradas e colocadas junto ao solvente metanol, individualmente, foram organizadas siglas para identificação a partir do local de coleta e a parte referente à planta, como é exposto na tabela 4:

Tabela 4. Espécies de *Bauhinia* utilizadas no projeto, respectivos locais de coleta e as partes da planta estudadas.

Espécie	Local de coleta da amostra da <i>Bauhinia</i> sp	Parte Estudada	Sigla
<i>Bauhinia acreana</i>	Comunidade Bom Jesus (Manacapuru- AM)	Folha	FBa1
<i>Bauhinia acreana</i>	Comunidade Bom Jesus (Manacapuru- AM)	Galho	GBa1
<i>Bauhinia acreana</i>	Comunidade N. Senh. Nazaré (Manacapuru- AM)	Folha	FBa2
<i>Bauhinia acreana</i>	Comunidade N. Senh. Nazaré (Manacapuru- AM)	Galho	GBa2
<i>Bauhinia coronata</i>	Reserva Ducke (Manaus- AM)	Folha	FBc
<i>Bauhinia coronata</i>	Reserva Ducke (Manaus- AM)	Cipó	CBc
<i>Bauhinia purpurea</i>	Vila Olímpica (Manaus- AM)	Folha	FBp1
<i>Bauhinia purpurea</i>	Vila Olímpica (Manaus- AM)	Galho	GBp1
<i>Bauhinia purpurea</i>	São Gabriel da Cachoeira- AM	Folha	FBp2

O cálculo do rendimento médio dos extratos feitos para cada parte estudada encontra-se na tabela 5. A espécie *B. purpurea*, coletada na Vila Olímpica de Manaus foi a que apresentou melhor rendimento, tanto para o extrato das folhas como dos galhos.

Tabela 5. Extratos das amostras de *Bauhinia* e seus respectivos rendimentos.

Sigla	Rendimento (g)	Rendimento percentual (%)
FBa1	3,5497	7,55
GBa1	0,4511	1,15
FBa2	1,4433	8,38
GBa2	0,6073	0,57
FBc	51,1000	13,71
CBc	34,4000	8,43
FBp1	1,5681	21,50
GBp1	26,7803	19,76
FBp2	2,6703	9,07

Com exceção de GBa1 e GBa2, que apresentaram rendimento menor que 900 mg, todas os outros extratos apresentaram bom rendimento para realização de todos os testes propostos incluindo o fracionamento com extrações múltiplas.

Os menores rendimentos observados, em geral, foram para os extratos GBa1, GBa2 e FBa2, todos pertencentes à espécie *Bauhinia acreana*, sendo dois relativos à parte dos galhos, indicando que o rendimento desta parte específica da planta é menor que o relativo às folhas. A espécie *B. purpurea*, entretanto, demonstrou os melhores rendimentos dentre os extratos metanólicos, com índices superiores a 19%, onde o relativo aos galhos novamente demonstrou um índice menor quando comparado ao extrato de folhas, 21%.

5.2 Análise da atividade antioxidante

Nas últimas décadas é verificada a crescente procura por compostos de fontes naturais com potencial antioxidante, principalmente para a prevenção de doenças como cardíacas, vasculares, estresse, gastrite, entre outras, decorrentes do desequilíbrio na quantidade de

radicais livres produzidos a partir do próprio metabolismo humano (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS *et al*, 2007).

Para avaliar o potencial antioxidante de extratos e substâncias foram utilizados métodos baseados na captura de radicais livres, como o DPPH \cdot e ABTS $^{+}$, os quais são mais comuns por serem métodos simples e viáveis para execução em laboratórios químicos e biológicos.

5.2.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante frente o radical DPPH

A análise antioxidante frente ao radical DPPH \cdot é uma das mais utilizadas por ser um teste colorimétrico rápido, fundamentado na reação de redução do difenil-picril-hidrazila. Este composto possui coloração púrpura, e quando o mesmo adquire estabilidade a partir de sua redução, é formado o difenil-picril-hidrazina, o qual possui coloração amarelada (MOLYNEUX, 2004):

Compostos que estabilizam este radical são considerados ativos e são detectados na placa de sílica a partir da coloração amarelada obtida após borrifar a solução de DPPH \cdot . Compostos que não inibem este radical conseqüentemente não apresentam mudança na coloração e continuam com a cor da solução do radical, como o branco (metanol) (MONTENEGRO, 2006; SOLER-RIVAS, 2000). A figura 15 abaixo apresenta o ensaio com algumas das amostras ativas:

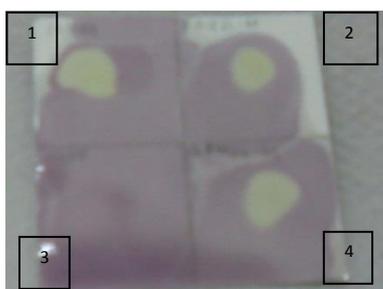


Figura 15. 1) Amostra GBa2 ativa; 2) Amostra FBa2 ativa; 3) Branco (solvente metanol); 4) Padrão quercetina.

A forte coloração apresentada pelas amostras ativas demonstra a alta atividade antioxidante quando comparada ao padrão quercetina utilizado para o teste em placa de sílica, sendo então necessária a avaliação quantitativa de tal atividade para melhor determinação do potencial desses extratos brutos.

Nos ensaios qualitativos realizados para observação da atividade dos extratos frente ao radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), foi observado que apenas uma mostrou-se inativa, de acordo com a tabela 6, a seguir.

Tabela 6. Resultado das análises de DPPH qualitativo.

Amostra analisada	Resultado
FBc	POSITIVO
CBc	POSITIVO
FBa1	NEGATIVO
GBa1	POSITIVO
FBa2	POSITIVO
GBa2	POSITIVO
FBp1	POSITIVO
GBp1	POSITIVO
FBp2	POSITIVO

Com os resultados obtidos (Tabela 6), foram realizados os testes quantitativos de inibição do radical livre para todas as amostras exceto para a amostra FBa1 que não apresentou atividade antioxidante nesta varredura inicial.

Para as amostras que apresentaram atividade nesta avaliação inicial (exceção da amostra FBa1, a qual não apresentou inibição) foi realizado o ensaio quantitativo deste método antioxidante frente o radical DPPH:

Tais resultados positivos para a maioria dos extratos já eram previstos, uma vez que já foram relatados estudos sobre grupos fenólicos característicos do gênero *Bauhinia* que

apresentam atividade antioxidante, podendo ser afirmado devido a presença de flavonoides (JOSHI *et al*, 2009; BIANCO e SANTOS, 2010; RAJANI e ASHOK, 2009; NASCIMENTO *et al*, 2011).

5.2.2 Análise quantitativa das atividades antioxidantes frente os radicais DPPH, ABTS⁺ e O₂⁻

Os ensaios antioxidantes quantitativos foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM com o intuito de analisar a concentração necessária dos extratos para obter-se o índice de concentração capaz de inibir em 50% os radicais livres em teste (CI₅₀) para cada extrato bruto individualmente.

Os resultados são observados na tabela 7, onde é possível observar maiores atividades, no geral, para os extratos FBp2, FBc e CBc, os quais apresentam as médias mais baixas de concentração para o CI₅₀ frente os três tipos de radicais livres.

Dentre as espécies, a que obteve destaque é a *B. coronata* (FBc e GBc), a qual apresentou os menores índices contra os três radicaise, exibindo maior atividade que os próprios padrões Trolox, no teste contra ABTS⁺ e ácido gálico utilizado no teste contra O₂⁻.

A espécie *B. purpurea* coletada em S. Gabriel da Cachoeira (FBp2) apresentou o menor resultado inibitório contra o radical DPPH[•], com CI₅₀ = 17,234 ± 2,07 µg/mL, resultado diferente ao obtido da mesma espécie coletada em Manaus, FBp1, com CI₅₀ = 195,804 ± 5,66 µg/mL, demonstrando perfis antioxidantes distintos entre extratos de mesma espécie porém de locais diferentes. Este fato pode estar relacionado à própria diferença na composição de tais amostras ou à presença de substâncias antioxidantes em uma amostra e em outra a ausência ou pouca quantidade das mesmas, o que propõe futuros estudos acerca dessa diferença nestas espécies de cidades diferentes.

Os extratos das folhas de *B. purpurea* apresentaram diferença quanto o perfil antioxidante em relação ao radical analisado, onde foi possível observar inibição contra o radical DPPH[•] mais eficiente que para o radical O₂^{-•}.

A *B. acreana*, FBa1 (2) e GBa1 (2), coletada em dois locais diferentes, apresentou resultados distintos, apesar de corresponder à mesma espécie, como é possível observar na tabela 7. A diferença entre os resultados apresentados pelas amostras da mesma espécie *B. acreana*, onde FBa2 apresenta inibição de 31,241 ± 0,83 µg/mL e a respectiva amostra coletada em outra comunidade, FBa1, não apresenta, demonstra um curioso aspecto que pode estar vinculado às condições do ambiente natural.

Tabela 7. Avaliação da atividade antioxidante quantitativa dos extratos metanólicos de *Bauhinia* frente o radical livre DPPH[•], ABTS^{•+} e O₂^{-•}.

Amostra	DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/mL)	O₂^{-•} (µg/mL)
GBp1	38,291 ± 1,21	22,131 ± 1,44	36,745 ± 1,12
FBp1	195,804 ± 5,66	45,760 ± 8,10	694,019 ± 13,66
GBa1	134,085 ± 9,28	34,511 ± 1,61	54,623 ± 3,00
FBa1	-	75,070 ± 5,11	-
GBa2	98,131 ± 4,09	15,628 ± 1,30	-
FBa2	135,915 ± 3,64	15,199 ± 0,74	31,241 ± 0,83
CBc	23,491 ± 0,59	3,409 ± 0,49	11,240 ± 0,70
FBc	20,973 ± 0,88	6,480 ± 0,35	55,308 ± 0,4
FBp2	17,234 ± 2,07	42,683 ± 5,56	343,195 ± 15,90
Padrão	2,57 ± 0,10 Quercetina	6,99 ± 0,08 Trolox	11,67 ± 0,57 Ácido gálico

-: sem atividade para a concentração de 10-1000µg/mL.

A inibição de radicais livres a partir do teste com extratos do gênero *Bauhinia* é bem comum, como por exemplo, para as espécies *B. forficata* (MANSUR, 2011), *B. variegata*

(NASCIMENTO *et al*, 2011), *B. purpurea* (KUMAR e CHANDRASHEKAR, 2007), *B. rufa* (PIERONI *et al*, sem ano), *B. mycrostachia* (SILVA *et al*, 2007).

Para todos os extratos testados foi utilizada a faixa de concentração de 10 a 1000µg/mL. É possível notar uma considerável atividade antioxidante dos mesmos frente aos radicais analisados, apresentando melhores desempenhos contra os radicais DPPH[·] e ABTS^{·+}, do que contra O₂⁻. Tal fato pode ser justificado ao fato de que o radical superóxido possui um mecanismo específico de reação, já que este é considerado um “metabolismo produzido a partir de reações enzimáticas ou produto celular secundário de reações redoxes” (VARGAS, 2008, p. 87).

Como são testes colorimétricos, é possível observar a mudança na coloração das amostras testadas após o tempo de incubação de cada análise, como observado nas figuras abaixo, e visualmente já obter indício da atividade ou não frente os radicais livres analisados.

A espécie *Bauhinia purpurea* apresentou diferença entre os resultados obtidos em análises contra um mesmo radical, onde FBp1 e FBp2 obtiveram valores bem distintos, apesar de pertencerem a uma mesma espécie, indagando-se um possível perfil de composição diferente.

5.3 Atividade de inibição enzimática

Os extratos metanólicos de *Bauhinia* foram analisados frente às enzimas tirosinase, lipase, lipoxigenase, α-glicosidade e α-amilase, utilizando concentrações dos extratos entre 10 e 1000µg/mL. Na tabela 8 a seguir com as respectivas concentrações de inibição 50% (CI₅₀).

As espécies que apresentaram atividade nos testes inibitórios enzimáticos foram *B. purpurea* e *B. coronata* (FBp1, FBp2, FBc e GBc), onde foi verificada inibição contra tirosinase e α-glicosidase. Dentre tais análises, o melhor índice obtido foi a partir da *B.*

coronata, com considerável inibição da α -glicosidase utilizando o extrato obtido a partir de suas folhas.

No teste de inibição da tirosinase foi observado que somente a espécie *B. coronata* exibiu atividade, FBc ($CI_{50}= 209,65 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$) e CBc ($CI_{50}= 696,97 \pm 1,27 \mu\text{g/mL}$). Tais valores são considerados como baixa atividade, entretanto são resultados inéditos a partir do estudo de espécies locais, onde a espécie *B. coronata* não é relatada na literatura.

Tabela 8. Resultados das CI_{50} enzimáticas utilizando os extratos metanólicos de *Bauhinia*.

Amostra	TIROSINASE ($\mu\text{g/mL}$)	α -AMILASE ($\mu\text{g/mL}$)	LIPASE ($\mu\text{g/mL}$)	LIPOXIGENASE ($\mu\text{g/mL}$)	α -GLICOSIDASE ($\mu\text{g/mL}$)
GBp1	SI	SI	SI	SI	SI
FBp1	SI	SI	SI	SI	$26,09 \pm 1,47$
CBc	$696,97 \pm 1,27$	SI	SI	SI	$4,07 \pm 0,93$
FBc	$209,65 \pm 0,91$	SI	SI	SI	$1,91 \pm 0,55$
GBa1	SI	-	-	-	SI
FBa1	SI	SI	SI	SI	SI
GBa2	SI	-	-	-	SI
FBa2	SI	SI	SI	SI	SI
FBp2	SI	SI	SI	SI	$2,55 \pm 0,70$
PADRÃO	$56,60 \pm 0,16$	$740,66 \pm 4,21$	$0,08 \pm 0,01$	$7,26 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$	$0,84 \pm 0,01$
	Ácido Kojico	Acarbose	Orlistat	Quercetina	Acarbose

SI : sem inibição; - : extratos não testados;

Nenhum extrato analisado frente às enzimas α -amilase e lipoxigenase apresentou inibição na faixa de concentração 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. O teste frente à α -glicosidase apresentou alguns extratos inibitórios como a partir de FBp1, FBp2, FBc e CBc, sendo estes últimos os que apresentaram os melhores desempenhos, podendo ser considerados como extratos com atividade moderada.

5.4 Ensaio avaliativo de toxicidade em *Artemia salina*

Como relatado na tabela a seguir, as concentrações utilizadas para atingir o índice de dose letal 50% foi alta, podendo-se verificar a baixa toxicidade dos extratos brutos de *Bauhinia* frente aos náuplios, a qual é demonstrada pela necessidade de aumento na concentração das soluções de extrato bruto para atingir o índice de DL₅₀.

A menor taxa foi obtida com a espécie *B. purpurea*, FBp1, que apresentou DL₅₀ = 170 µg/mL, as demais espécies apresentaram índices superiores a 250 µg/mL.

Tabela 9. Resultado dos ensaios de toxicidade em *Artemia salina* a partir das soluções de extrato bruto de espécies de *Bauhinia*.

Amostra analisada	Concentração Letal 50% (µg/mL)	Concentrações utilizadas (µg/mL)
FBc	280	500, 300 e 200
CBc	270	500, 300 e 200
FBa1	370	400, 350 e 300
GBa1	280	500, 300 e 200
FBa2	320	500, 300 e 200
GBa2	400	500, 300 e 200
FBp1	290	400, 350 e 300
GBp1	170	250, 200 e 150
FBp2	350	500, 300 e 200

Tais resultados obtidos a partir das espécies locais de *Bauhinia* correlacionam com o que já foi relatado na literatura acerca das espécies em outros lugares, onde os extratos de *Bauhinia* não apresentaram toxicidade frente o microcrustáceo, sendo considerados extratos “atóxicos” e com valores superiores a de outros extratos de plantas de uso comum no Brasil (FIGUEIRA *et al*, 2012).

Outros relatos como em ensaios *in vivo* realizados com ratos, inclusive durante o período gestacional dos mesmos, também demonstrou que os extratos não apresentaram risco ou alteração no período de consumo, sendo considerado um potencial biotecnológico na área de cosméticos ou afins, outra vertente proposta a partir desta pesquisa inicial (PEPATO *et al*, 2004; MENDES *et al*, 2010).

5.5 Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais

Alíquotas dos extratos foram enviadas para o Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina na Universidade Federal do Ceará, e após os testes citotóxicos contra as três linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), os resultados obtidos podem ser vistos relatados na tabela 10 a seguir, onde são relatados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

Tabela 10. Percentual do potencial de inibição para extratos metanólicos de *Bauhinia*.

Amostras	HCT-8		MDA/MB-435		SF-295	
	Média	DPM	Média	DPM	Média	DPM
CBc	28,46%	1,51%	6,98%	3,89%	17,52%	2,63%
FBc	0,85%	2,39%	-	6,38%	-	5,44%
GBa2	40,09%	0,25%	21,50%	5,13%	33,14%	3,07%
FBa2	21,31%	2,82%	-	3,26%	21,87%	0,45%
GBa1	16,56%	5,15%	-	5,41%	13,49%	7,30%
FBa1	38,22%	1,26%	16,10%	4,72%	24,86%	1,60%
FBp2	39,55%	2,76%	17,77%	3,75%	29,75%	0,96%
FBp1	28,19%	2,39%	1,48%	5,97%	25,67%	0,96%
GBp1	33,56%	1,19%	5,85%	7,70%	26,17%	2,95%

A partir dos dados obtidos é perceptível a baixa capacidade antitumoral dos extratos das espécies de *Bauhinia*, onde a maior taxa alcançada a partir dos extratos brutos foi de 40,09% para a espécie *B. acreana* (GBa2). O valor necessário para a continuação dos testes dentro desta técnica para demais linhas requer ≥ 90 % de potencial antitumoral, o que não foi alcançado pelos extratos.

Na literatura é possível encontrar relato de potencial antitumoral para esse gênero, como em *B. racemosa* (GUPTA *et al*, 2004) e *B. variegata* (RAJKAPOOR *et al*, 2003), onde a partir dos extratos metanólicos foi observado o retardo no crescimento dos tumores.

Outros estudos a partir de substâncias isoladas dos extratos de *Bauhinia* também foram obtidos bons resultados, como em *B. purpurea*, relatado em Pettit *et al*, (2006), com ação antitumoral contra células leucêmicas, e *B. variegata* segundo Pandey e Agrawa, (2010), onde foi exibida ação contra linhagens tumorais gástricas.

5.6 Análises antibacterianas

Todos os extratos brutos foram testados frente a 10 culturas bacterianas, tendo como padrão o antibiótico relativo (IMP). A inibição obtida a partir do antibiótico utilizado no teste está disposta na tabela 12 a seguir.

Na literatura é encontrado resultados a partir de extratos de *Bauhinia racemosa* e *Bauhinia purpurea* para atividades antimicrobianas, onde tais extratos foram eficientes, principalmente frente às mesmas bactérias utilizadas no ensaio: *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis* (KUMAR *et al*, 2005; ANNEGOWDA *et al*, 2011). Outra espécie, *Bauhinia variegata*, também já foi relatada com mesma ação antimicrobiana (POKHREL E ADHIKARI, 2002; PAREKH *et al*, 2006; DE SOUZA *et al*, 2004).

Tabela 11. Linhas bacterianas testadas e inibição do antibiótico para cada bactéria.

BACTÉRIAS	ANTIBIÓTICO (IMP)	
	Replicata 1	Replicata 2
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	33	32
<i>Escherichia coli</i>	18	21
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	18	15
<i>Shigella flexneri</i>	19	17
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	21
<i>Streptococcus oralis</i> (<i>Streptococcus sanguis</i>)	18	20
<i>Streptococcus pyogenes</i> grupo A tipo 1	19	20
<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	20	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	18

Os extratos brutos das espécies *B. coronata*, *B. acreana* e *B. purpurea* locais não apresentaram eficácia contra as bactérias testadas, diferenciando-se do que foi relatado na literatura para as outras espécies do gênero e quanto à própria *B. purpurea*, a qual apresentou potencial antibacteriano.

Assim, apesar de ser a mesma espécie com ação já comprovada na literatura, os espécimes de *Bauhinia purpurea*, coletada em Manaus e S. Gabriel da Cachoeira, não exibiu a mesma eficiência para o teste como a espécie da Malásia analisada em Annegowda *et al* (2011) e na Índia (NEGI *et al*, 2012; SHILPA *et al*, 2011), o que torna um indício de critério duvidoso a afirmação de que uma espécie pode apresentar determinada eficácia em testes biológicos, uma vez que foram alcançados resultados diferentes para uma mesma espécie.

5.7 Fracionamento por extração múltipla

5.7.1 Flavonoides

Todos os extratos, com exceção das amostras GBa1 e GBa2, possuíram rendimento suficiente (maior que 1 g) para a realização do fracionamento.

As amostras obtidas a partir deste fracionamento foram designadas inicialmente com as respectivas siglas do extrato bruto relativo, com mudança no final da sigla, como mostrado na tabela 12 abaixo.

Tabela 12. Relação das frações flavonoídicas obtidas a partir dos extratos brutos de espécies de *Bauhinia*.

Extrato bruto	Fração flavonoídica
CBc	CBc-F
FBc	FBc-F
FBp1	FBp1-F
GBp1	GBp1-F
FBa1	FBa1-F
FBa2	FBa2-F
FBp2	FBp2-F

5.7.2 Alcaloides

Além das amostras GBa1 e GBa2, FBa1 e FBa2 também não possuíram rendimento suficiente para realização deste fracionamento. Sendo o rendimento suficiente para realização das demais análises que requeriam massa menor que 50 mg.

As frações obtidas a partir das extrações foram nomeadas da mesma forma que as frações flavonoídicas, sendo somente a última letra alterada, conforme mostrado na tabela 13 a seguir.

Tabela 13. Relação das frações alcaloídicas obtidas a partir dos extratos brutos de espécies de *Bauhinia*.

Extrato bruto	Fração alcaloídica
CBc	CBc-A
FBc	FBc-A
FBp1	FBp1-A
GBp1	GBp1-A
FBp2	FBp2-A

5.8 Perfil cromatográfico utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

5.8.1 Flavonoides

Foram realizadas placas cromatográficas para detecção e verificação de flavonoides utilizando primeiramente os extratos brutos e padrão (kaempferitrina). É possível observar o padrão kaempferitrina em UV- 365 nm após utilizar o revelador próprio para flavonoides, NP-PEG (figura 16, (5)).

Outras colorações associadas a muitos grupos fenólicos e flavonoides (amarelo, laranja e azul) (WAGNER, 1996) presentes nas amostras também podem ser observadas na figura 16 a seguir.

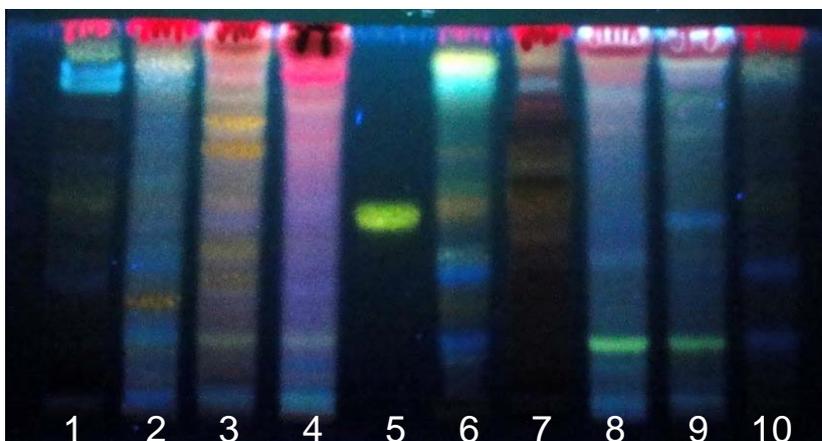


Figura 156. Placa cromatográfica dos extratos brutos revelados com NP-PEG, em UV- 365 nm. 1) CBc; 2) FBp2; 3) FBa2; 4) FBa1; 5) kaempferitrina (padrão); 6) FBp1; 7) FBc; 8) GBa1; 9) GBa2; 10) GBp1. Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27).

É perceptível a verificação da presença de manchas fenólicas reveladas a partir do uso de NP-PEG, o que demonstra que as espécies locais de *Bauhinia* coincidem com o que é relatado na literatura acerca da presença desta classe química dentro do gênero.

O perfil de coloração revelado na figura 16 demonstra diferença entre as mesmas espécies de locais diferentes analisadas, como FBp1 e FBp2 (figura 16-6 e 16-2), e principalmente entre as amostras FBa1 e FBa2 (figura 17-4 e 17-3). Dentre essas amostras é demonstrado uma diferença dentro da composição majoritária dentre elas, uma possível vertente de estudos futuros acerca da diferença composicional entre amostras de mesmas espécies porém de locais diferentes.

É possível observar ainda na figura 16 que não há indicativo da presença do padrão kaempferitrina utilizado, o qual não é verificado em nenhuma das quatro espécies de *Bauhinia* analisadas.

Outra placa cromatográfica, utilizando-se amostras obtidas a partir da extração em fase sólida (SPE) dos extratos brutos (procedimento realizado para eliminação da parte relativa aos compostos graxos e assim obter uma amostra com mais “límpida”) e as relativas amostras fracionadas em AcOEt, foi eluída com as mesmas condições descritas com o objetivo de notar diferença no perfil cromatográfico entre os mesmos, como é possível observar na figura 17.

Na figura 17 também é possível notar um perfil flavonoídico para as amostras analisadas, porém foi obtido perfil mais intenso nas frações AcOEt (1-F a 9-F) do que nas frações SPE (1 a 9), partindo-se do princípio da coloração mais viva apresentada.

Uma explicação para este fato pode estar atribuída ao fato de que a extração em fase sólida é caracterizada por reter muitas substâncias graxas, porém a possibilidade de reter outras substâncias, bem como as de classes desejáveis para detecção, não é descartável, implicando em uma menor quantidade das substâncias desejáveis, perdidas ocasionalmente durante o procedimento. Assim, as amostras obtidas a partir do fracionamento se tornam as mais indicadas para a elaboração do perfil cromatográfico.

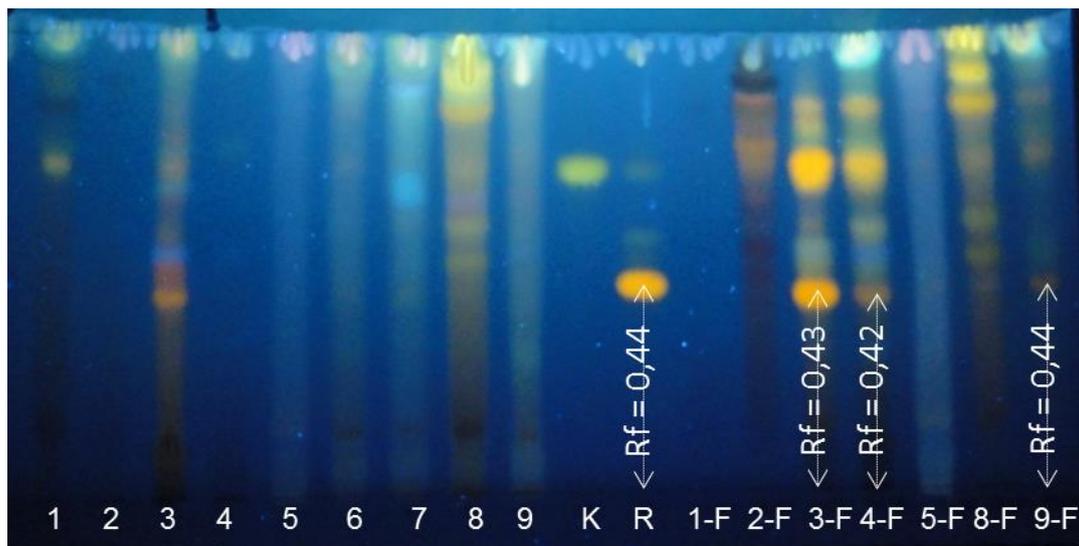


Figura 17. Placa cromatográfica dos extratos brutos (1-9), padrões (K e R) e respectivas frações flavonóicas (1-F a 9-F) revelados com NP-PEG, em UV- 365 nm. 1) CBc; 2) FBc; 3) FBp1; 4) GBp1; 5) FBa1; 6) GBa1; 7) GBa2; 8) FBa2; 9) FBp2; K) kaempferitrina; R) rutina; 1-F) CBc-F; 2-F) FBc-F; 3-F) FBp1-F; 4-F) GBp1-F; 5-F) FBa1-F; 8-F) FBa2-F; 9-F) FBp2-F. Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27).

É também observado novamente que não há kaempferitrina nas amostras de *Bauhinia* estudadas (figura 17-K). Entretanto, é possível visualizar manchas características do padrão rutina na espécie *B. purpurea* de ambas localidades coletadas (FBp1-F, GBp1-F e FBp2-F). Tal suspeita coincide com a literatura, onde este flavonoide já foi encontrado na espécie *B. purpurea* (ABD-EL-WAHAB *et al*, 1987).

Os diferentes Rfs apresentados entre o padrão e a mancha relativa a este nas frações de *B. purpurea* pode ser associado ao efeito de matriz, onde algumas características físico-químicas do material, como os componentes do extrato em si, prejudicam na eluição efetiva do material (SHABIR, 2003; PINHO *et al*, 2012).

A partir da realização de outra placa cromatográfica, nesta utilizando-se o padrão isoquercitrina, foi observada a presença deste flavonoide nas mesmas amostras onde foi detectado o padrão rutina anteriormente: *B. purpurea*, figura 18 (FBp1-F, GBp1-F e FBp2-F).

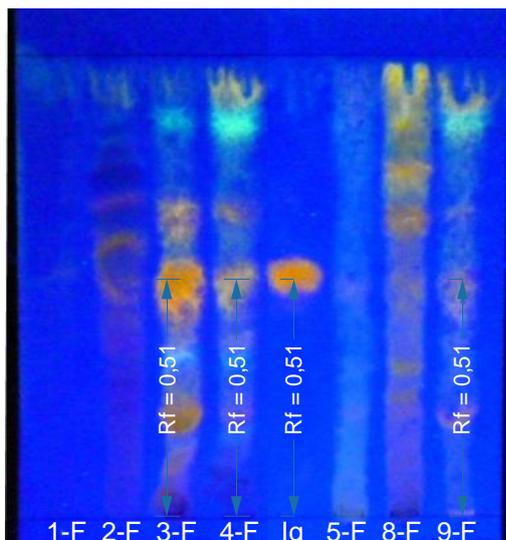


Figura 18. Placa cromatográfica das frações flavonoídicas: 1-F) CBc-F; 2-F) FBc-F; 3-F) FBp1-F; 4-F) GBp1-F; 5-F) FBa1-F; 8-F) FBa2-F; 9-F) FBp2-F) e padrão isoquercitrina (Iq). Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27).

A presença de isoquercitrina em *B. purpurea* também já foi relatada anteriormente (RAMACHANDRAN E JOSHI, 1967), porém ainda não havia sido detectada em uma espécie amazônica.

Para confirmação da presença dessas substâncias encontradas, rutina e isoquercitrina, foram realizadas análises por espectrometria de massas (item 5.9).

Também foi realizada uma placa cromatográfica utilizando como padrão o flavonoide quercetina, como é observado na figura 19 abaixo. Aparentemente a presença do mesmo nas amostras é relativamente pequena, já que as manchas obtidas não apresentaram o mesmo perfil que o padrão utilizado.

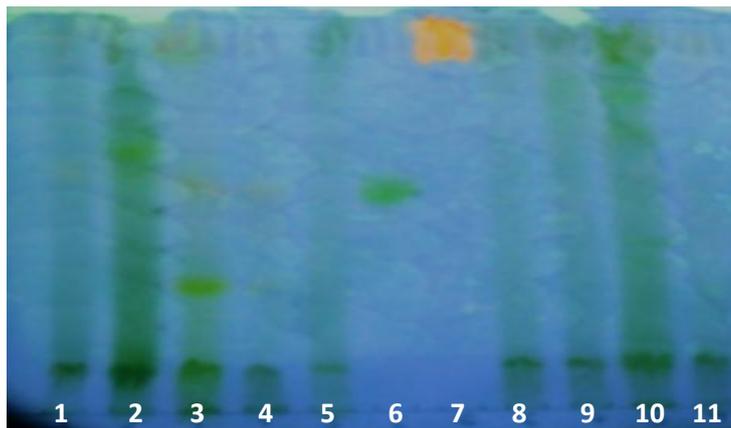


Figura 16. Placa cromatográfica das amostras 1) CBc; 2) FBc; 3) FBp1; 4) GBp1; 5) FBa1; 6) kaempferitrina; 7) quercetina; 8) GBa1; 9) GBa2; 10) FBa2; 11) FBp2. Eluente: AcOEt / AcOH / COOH / H₂O (100:11:11:27).

5.8.1.2 Catequina

A partir da verificação deste padrão na análise por espectrometria de massas na amostra GBp1-F (item 5.9), realizou-se CCD com condições para a detecção de catequina, figura 20, já que a mesma não é revelada nas condições anteriores de flavonoides.

Este padrão foi detectado somente na amostra GBp1-F na análise por espectrometria de massas (item 5.9, figura 35), realizou-se a placa cromatográfica utilizando esta amostra GBp1-F (1) e o próprio padrão catequina (P), e após revelar com FeCl₃, figura 23, foi possível observar que o padrão não era exibido na amostra.



Figura 20. Placa cromatográfica revelada com FeCl₃ para verificação da presença do padrão catequina (P) na amostra GBp1-F (1). Eluente: AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10)

5.8.2 Alcaloides

A placa cromatográfica para as amostras obtidas a partir do fracionamento para alcaloide não demonstrou a presença desta classe, exceto para a espécie *B. coronata*, amostra CBc-A, como é mostrado na figura 21-A, onde há a imagem da CCD com esta amostra em UV-365 nm.

Ao observar a placa no UV – 365nm, figura 21-A, foi possível detectar uma mancha com coloração azul, a qual é característica do alcaloide harmano (WAGNER, 1996), e que somente havia sido relatado na espécie *Bauhinia unguolata* (MAIA NETO *et al*, 2008), sendo incomum a presença desta classe em *Bauhinia*.

Para constatar a presença de harmano, realizou-se uma nova CCD utilizando a amostra e o próprio padrão para verificar o Rf de ambos, como mostrado na figura 21B. Em seguida, utilizou-se o revelador Dragendorff para confirmação da classe alcaloídica da fração CBc-A, figura 21C.

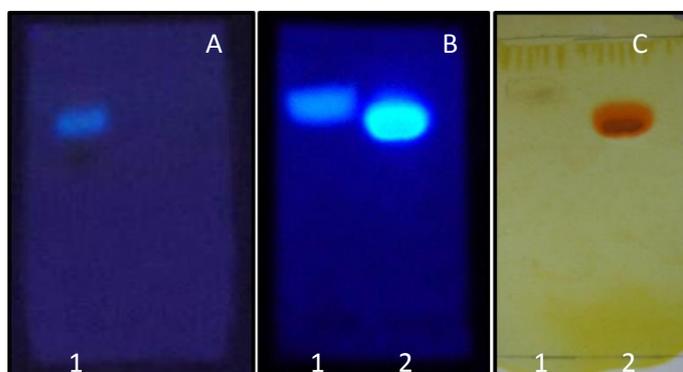


Figura 171. Placa cromatográfica para identificação do alcaloide harmano na amostra CBc-A. A) 1- presença de mancha azul característica de alcaloide em CBc-A em UV-365 nm; B) comparação da eluição do CBc-A (1) e padrão harmano (2) em UV- 365 nm, onde apresentaram Rfs diferentes; C) CBc-A (1) e padrão harmano (2) revelados com Dragendorff, apresentando características divergentes. Eluente: BuOH/C₃H₆O/H₂O (4:1:5)

Na figura 21C, é possível observar que o padrão harmano utilizado, além de apresentar o Rf diferente da amostra CBc-A (figura 21-B), também apresentou a devida coloração

laranja característica para substâncias alcaloídicas após borrifar o revelador Dragendorff na placa.

Esse comportamento apresentado foi contrário à obtida com a amostra CBc-A, a qual não demonstrou a coloração respectiva (laranja ou marrom escuro) após a utilização do revelador. Para comprovação foi realizado EM com a fração o que indicou não se tratar de um alcaloide.

5.8.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Inicialmente, foram utilizadas as frações obtidas a partir da extração do extrato bruto em fase sólida (SPE), porém, com exceção de poucas amostras, não foi possível obter uma solução límpida apropriada para ser injetada no equipamento, pois ao passar a amostra pelo filtro de membrana surgiam pequenos precipitados.

Com isso, foram utilizadas as respectivas frações AcOEt (obtidas no fracionamento por extração múltipla), já que as mesmas não apresentaram mudança alguma após passar pelo filtro de membrana. Para saber se haveria mudança no perfil utilizando-se a fração AcOEt ao invés da fração SPE (extrato bruto que passou por coluna SPE) comparou-se essas duas frações obtidas a partir do extrato bruto de CBc, figura 22.

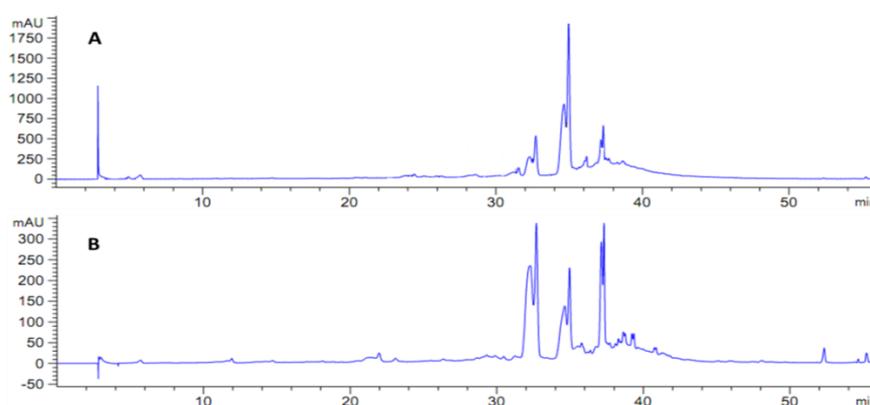


Figura 22. Cromatogramas comparativos das amostras CBc-SPE (A) e CBc-F (B) possibilita a análise somente com as amostras obtidas a partir do fracionamento em AcOEt.

A similaridade entre as duas frações, CBc-SPE e CBc-F, possibilitou a análise em CLAE a partir das frações flavonoídicas, já que as mesmas não apresentavam precipitados ao passar pela membrana. Para os extratos brutos que não possuíam esta fração (GBa1 e GBa2) por não terem tido um rendimento mínimo, utilizou-se as frações obtidas por SPE.

Para verificar a presença de flavonoides detectados no gênero, utilizou-se como padrões dois flavonoides glicosilados já relatados: o marcador químico kaempferitrina e a rutina.

A partir do resultado das placas cromatográficas realizadas anteriormente - que revelaram a presença de grupos flavonoídicos ao utilizar o revelador NP-PEG - nos resultados obtidos nas análises em CLAE, verificando os tempos de retenção (figura 25) assim como os respectivos espectros UV, figura 23, foi possível, aliado aos resultados da espectrometria de massas, propor a presença dessas substâncias nas espécies regionais estudadas neste projeto.

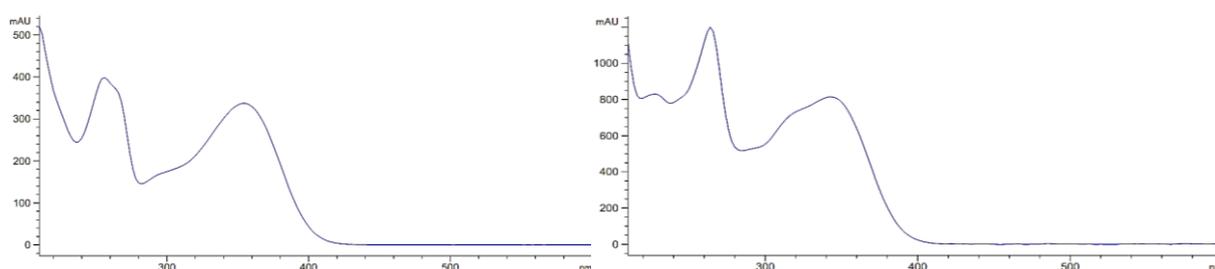


Figura 183. Espectros UV-VIS dos padrões rutina ($T_r = 24,987$ min) e kaempferitrina ($T_r = 27,167$ min), respectivamente, com absorção característica em aproximadamente 280 e 350 nm.

A partir da apresentação do mesmo tempo de retenção e espectro UV obtidos para os flavonoides, figura 23, pôde-se comparar nas frações injetadas a presença destes padrões, sugerindo-se assim a presença dos mesmos. Tal absorção dos padrões (aproximadamente 280 e 350 nm) é confirmada na literatura como absorção de grupos fenólicos, a qual é compreendida nas regiões de 210 a 290 nm e 320 a 380 nm (ou 470 a 540 nm) (RICE-EVANS e PACKER, 2005).

Esta técnica de detecção favorece a identificação desta classe química em amostras analisadas, como de alimentos e para a própria composição de substâncias em plantas, colaborando na padronização destas (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

Demais frações analisadas, apesar de não apresentarem rutina ou kaempferitrina em seu perfil cromatográfico, podem conter outras substâncias referentes à classe flavonoídica, já que em outros tempos de retenção foram apresentados espectros UV relativos a grupos fenólicos (figura 24) (RICE-EVANS e PACKER, 2005).

Nas CCDs anteriores, foi possível a visualização de manchas com colorações associadas à tal grupo químico a partir do uso do revelador NP-PEG, o que poderia ser confirmado ao utilizar outros padrões já relatados na literatura para este gênero.

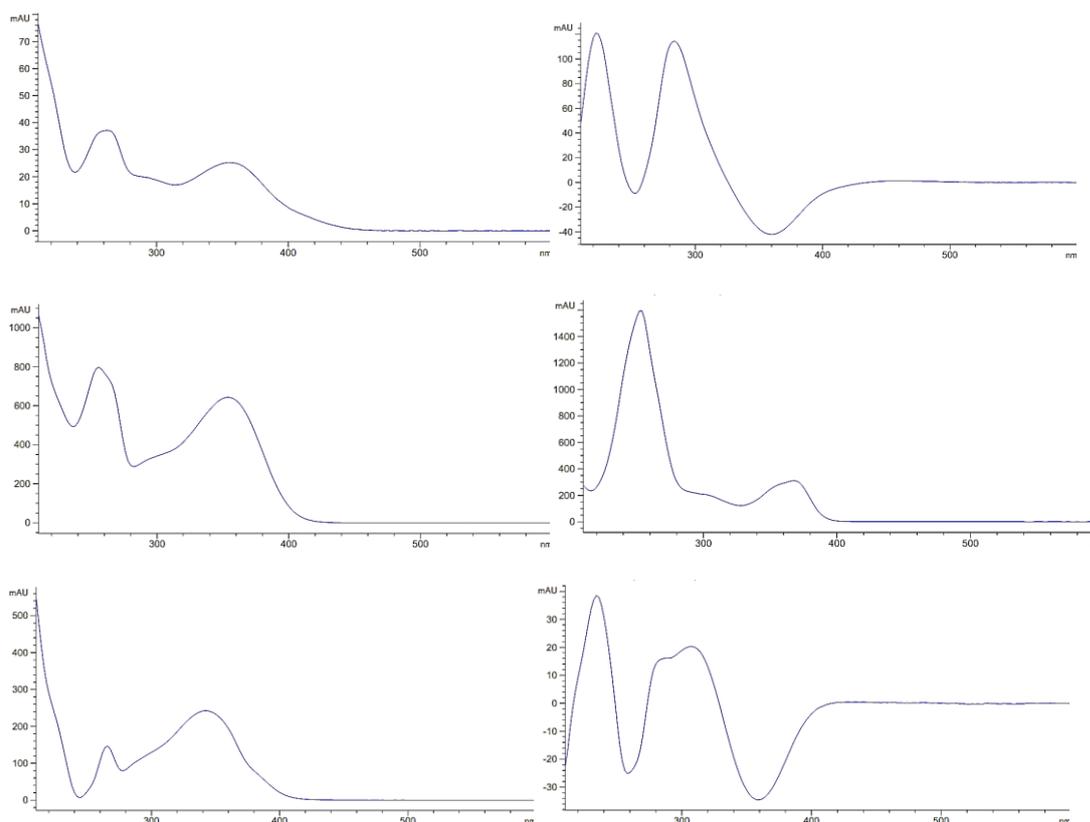


Figura 24. Espectros UV das amostras em intervalos característicos de grupos flavonóicos: 1) CBc-F ($T_r=24,447$ min), 2) FBc-F ($T_r=35,578$ min), 3) FBp1-F ($T_r=25,854$ min), 4) GBp1-F ($T_r=15,93$ min), 5) GBa2-F ($T_r=29,924$ min), 6) FBp2-F ($T_r=36,178$ min).

As amostras que apresentaram indícios da presença de rutina foram pertencentes à espécie *Bauhinia purpurea*, FBp1-F e FBp2-F, com $T_r = 24,730$ min e $24,577$ min (figura 25), respectivamente, sendo mais um indício da presença deste padrão em tal espécie de *Bauhinia*, como verificado anteriormente em placa cromatográfica. Entretanto, na amostra GBp1-F não foi observado o mesmo sinal na região deste padrão.

Em nenhuma amostra foi identificado o padrão kaempferitrina, confirmando a ausência deste como foi exposto anteriormente nas placas cromatográficas utilizando este padrão, sendo possível observar na figura 25 o resultado para todas as frações acerca da privação deste flavonoide.

Na figura 25 a seguir é exibido um perfil cromatográfico obtido a partir da análise em CLAE, onde é possível observar que para a maioria das frações são exibidos picos mais intensos no período de 30 a 40 minutos.

Esse perfil cromatográfico obtido exibe um perfil geral para as espécies de *Bauhinia* estudadas, demonstrando a possibilidade de maior presença de substâncias flavonoídicas nas frações relativas às folhas das espécies *B. coronata* (figura 25-1 e 25-2), *B. purpurea* (figura 25-3 e 25-11) e *B. acreana* relativa à Comunidade de N. Senhora de Nazaré (figura 25-10).

As espécies *Bauhinia acreana* e *Bauhinia purpurea* demonstraram grandes diferenças no perfil cromatográfico obtido por análise em CLAE a partir das amostras coletadas em regiões distintas do município de Manacapuru, Manaus e S. Gabriel da Cachoeira.

Esses resultados confirmam o perfil cromatográfico obtido a partir das placas cromatográficas realizadas anteriormente, onde as colorações e intensidades das manchas referentes aos fenólicos presentes, obtidas entre as amostras de mesma espécie, diferenciavam-se.

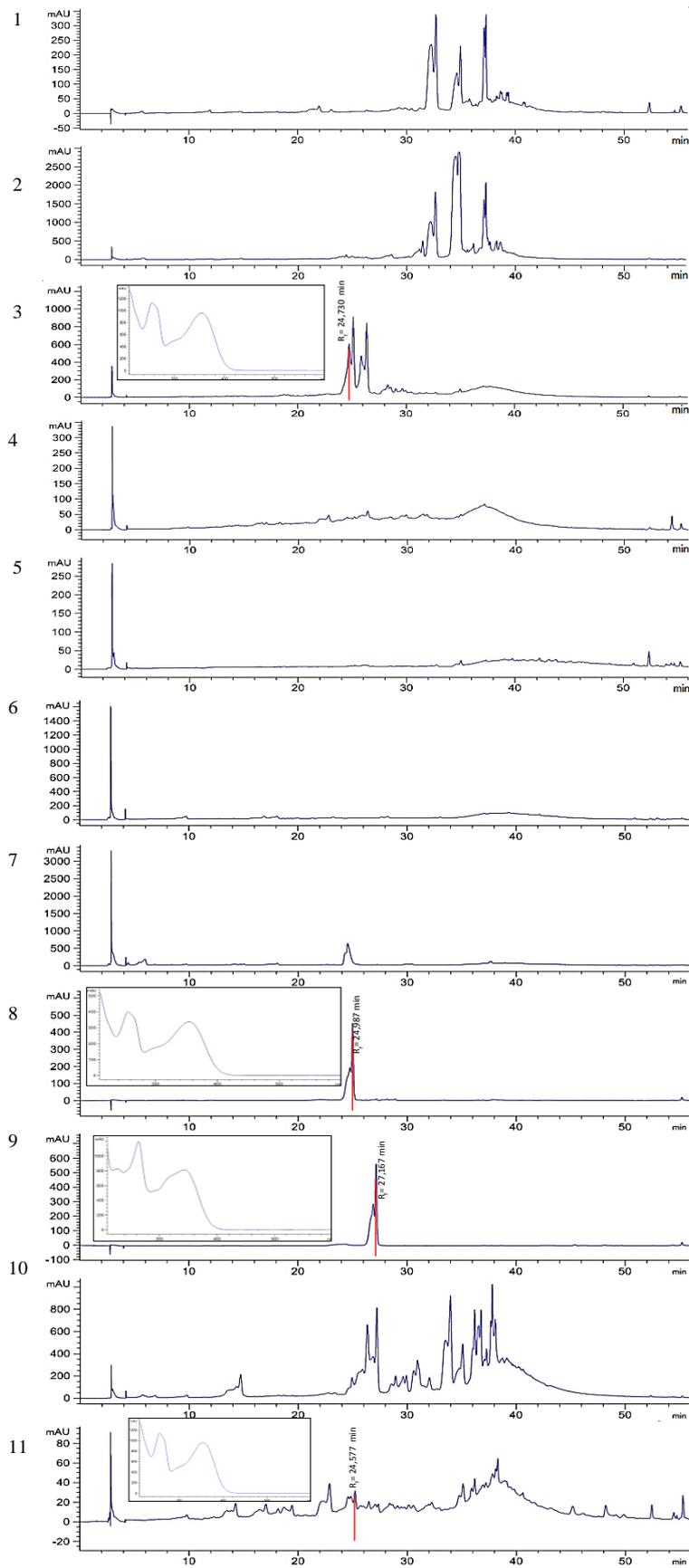


Figura 25. Cromatogramas das amostras 1)CBc-F, 2) FBc-F, 3) FBp1-F, 4) GBp1-F, 5) FBa1-F, 6) GBa1-SPE, 7) GBa2-SPE, 8) Rutina, 9) Kaempferitrina, 10) FBa2-F, 11) FBp2-F.

5.9 Identificação por espectrometria de massas (EM)

Após realizar as análises cromatográficas por CCD e CLAE, e assim verificar a presença de padrões, realizou-se as análises por espectrometria de massas com o objetivo de confirmar a presença de rutina e isoquercitrina reveladas nas amostras FBp1-F, GBp1-F e FBp2-F, detectadas anteriormente por métodos cromatográficos.

A partir dos dados de rutina, com $m/z = 409$ $[M-H]^-$, e isoquercitrina, com $m/z 463$ $[M-H]^-$, foi possível observar a presença destes dois picos na análise espectrométrica daa espécies de *Bauhinia*. Como previsto a partir do perfil elaborado e confirmando tais evidências, a espécie *Bauhinia purpurea* de ambas as localidades, apresentou os íons correspondentes aos padrões, como é possível observar na figura 26 a seguir.

É verificado também, na figura 26, uma menor intensidade do pico relativo à m/z da rutina, 409 $[M-H]^-$, para a amostra correspondente à fração do galho de *Bauhinia purpurea*. Assim, pode-se supor que a quantidade desta substância nos galhos é inferior à presente nas folhas da espécie.

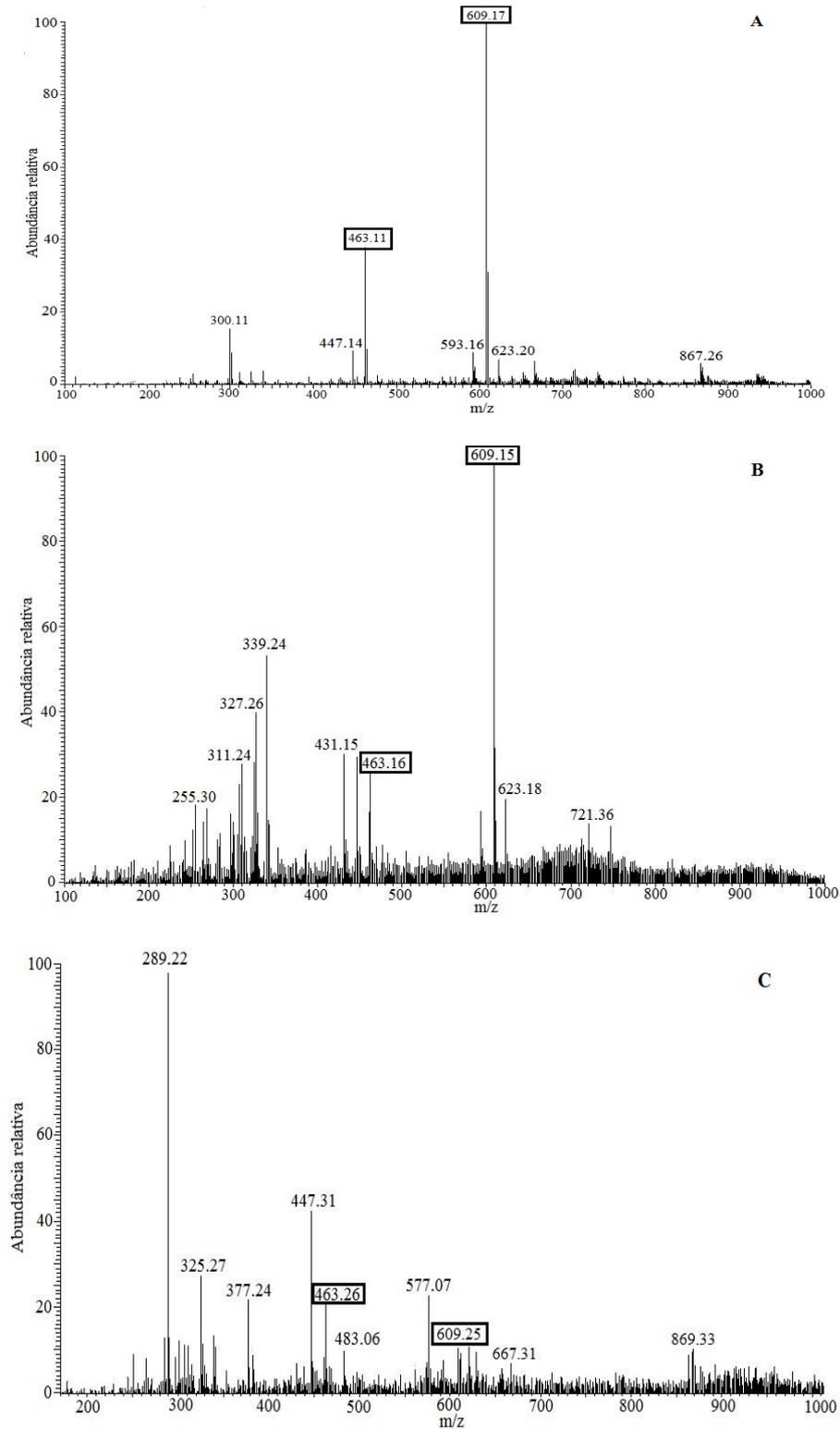


Figura 26. Espectro das amostras FBp1-F (A), FBp2-F (B) e GBp1-F (C), respectivamente, com a presença do pico m/z 609, relativo ao flavonoide rutina, e m/z 463, relativo ao flavonoide isoquercitrina, identificados por CCD e/ou CLAE.

Após identificação da presença do pico relativo ao padrão rutina em tais amostras, m/z 609, realizou-se a análise do padrão para detecção das fragmentações geradas sucessivamente (MS^n).

Na figura 27 a seguir é possível observar os espectros gerados a partir desta análise e a fragmentação da rutina nos picos m/z 301 e 179, baseado como descrito em Dubber *et al*, 2005.

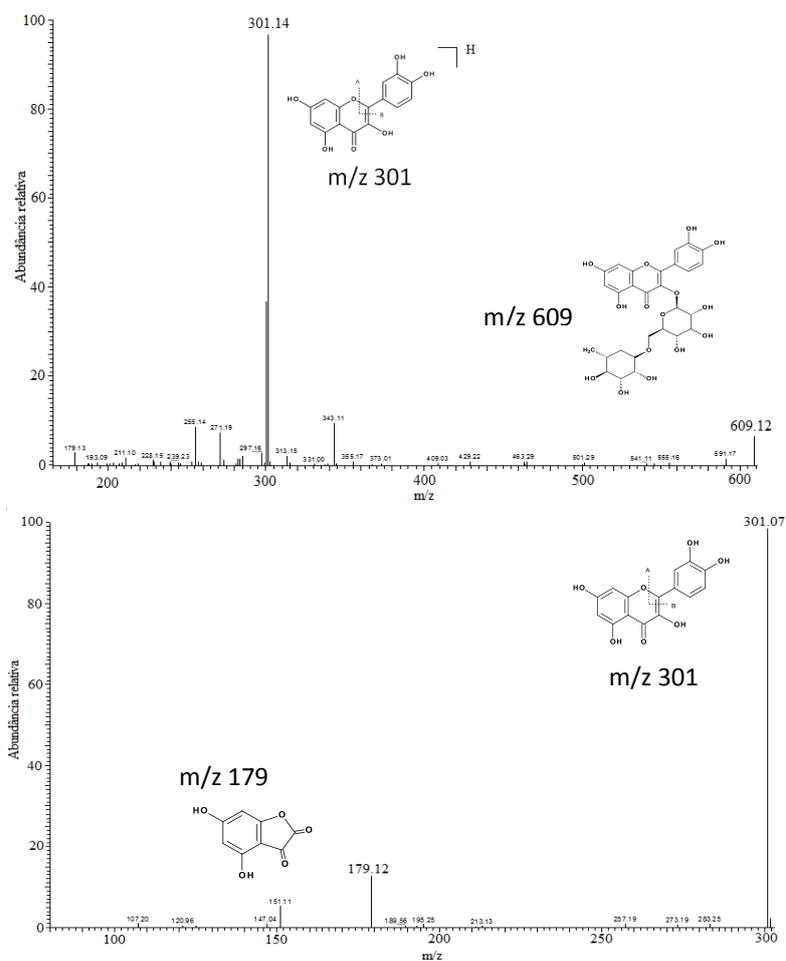


Figura 27. Fragmentação dos íons m/z 609 e m/z 301 do padrão rutina.

Para a fragmentação da rutina, é proposto, segundo Dubber *et al*, (2005), que a perda de 308 u (m/z 301) a partir da m/z 609, pode estar relacionada à saída da parte equivalente do açúcar da estrutura, e a fragmentação do pico m/z 301 (MS^3) resultando em pico m/z 179, sendo referente à retroclicização do anel aromático.

Tais propostas apresentadas concordam com os resultados obtidos, para o padrão rotina e para as fragmentações relativas à espécie *Bauhinia purpurea*, como é possível observar nos espectros da figura 28 a seguir.

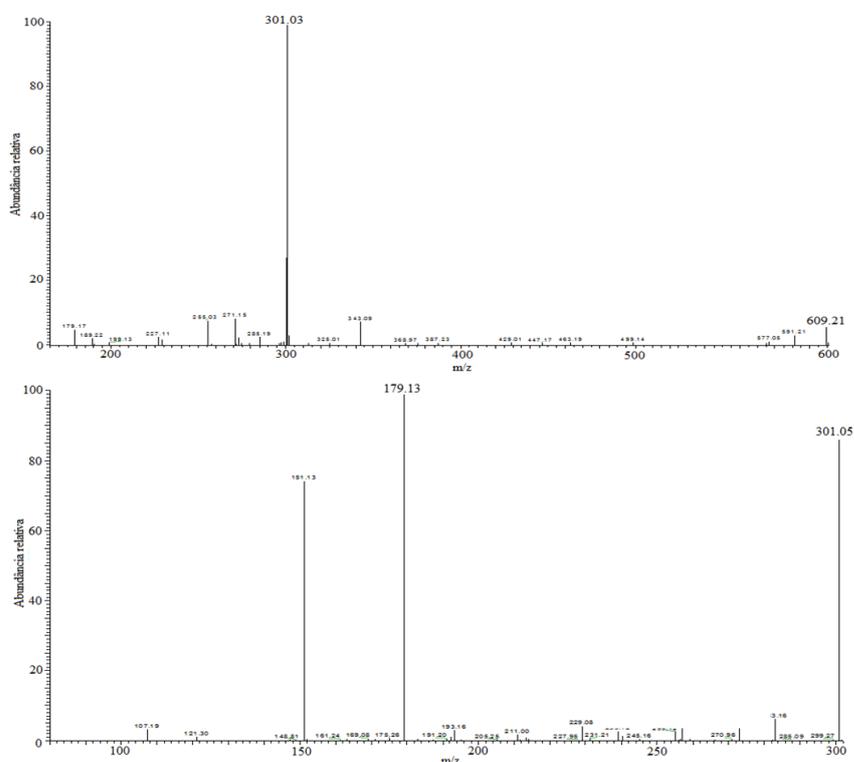


Figura 28. Respectivas fragmentações do íon m/z 609 (MS^2) e do íon m/z 301 (MS^3) das frações FBp1-F, FBp2-F e GBp1-F referentes à rotina e proposta de fragmentação de acordo com Dubber *et al*, (2005).

As fragmentações dos picos m/z 609 e m/z 301 do padrão rotina, visto anteriormente na figura 26, são equivalentes às obtidas nas amostras FBp1-F, FBp2-F e GBp1-F, como mostrado na figura 27. Apesar deste flavonoide ser comum no gênero *Bauhinia*, sendo identificado em espécies como *B. vahlii*, *B. tomentosa*, *B. splendens*, *B. retusa*, *B. tomentosa* (SULTANA *et al*, 1985; SUBRAMANIAN e NAIR, 1963; CECHINEL FILHO *et al*, 1995; TIWARI *et al*, 1978; ROW *et al*, 1974), ainda não tinha sido relatado na literatura a sua presença na espécie *Bauhinia purpurea* pertencente à região amazônica, de ambas as localidades coletadas, Manaus e S. Gabriel da Cachoeira.

Para verificação da presença de isoquercitrina na espécie *Bauhinia purpurea* também, realizou-se a fragmentação deste padrão, como é observado na figura 29 a seguir. Porém, só foi possível a realização de fragmentação sucessiva MS², e não o MS³ como na análise da rutina, devido a problemas técnicos no equipamento analisador.

É possível verificar na fragmentação da isoquercitrina um comportamento semelhante ao padrão anterior, rutina, quanto ao modo de fragmentação, propondo-se as fragmentações que se seguem na figura 29.

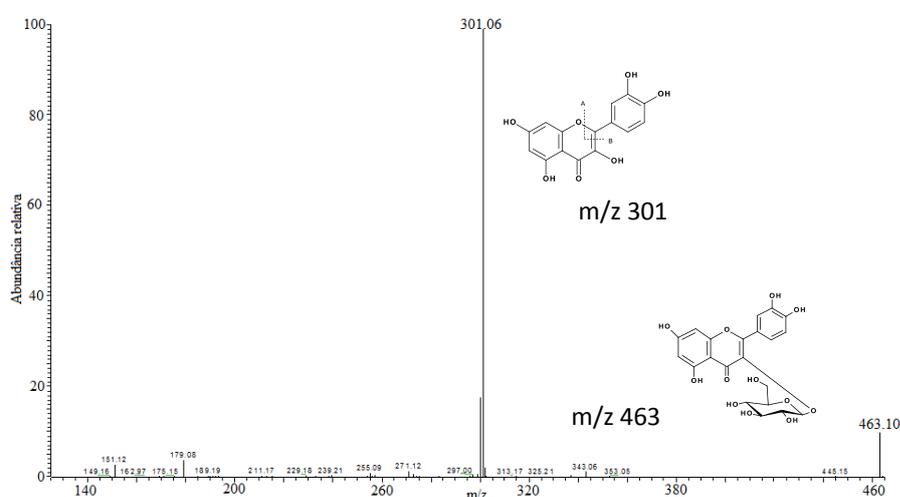


Figura 29. Análise do padrão isoquercitrina (MS) com detecção do pico m/z 463 [M-H]⁻.

Os picos obtidos na figura 29 podem estar relacionados à perda do açúcar, de m/z 463 a m/z 301 (perda de 162 u, já que é somente uma unidade de açúcar e não duas, como na rutina) e em seguida a possível ocorrência da retrociclização do anel aromático, com a perda de 122u, o que geraria um pico m/z 179, como mostrado na rutina anteriormente (DUBBER *et al.*, 2005).

Na análise do pico m/z 463 detectado nas amostras FBp1-F, FBp2-F e GBp1-F (figura 33), relativo ao flavonoide isoquercitrina, foi apresentada a mesma fragmentação quando comparada com a do padrão na figura 29.

Com tais resultados obtidos, aliado aos resultados de CCD apresentados anteriormente, propõe-se a presença deste outro flavonoide característico do gênero *Bauhinia* presente na espécie amazônica *Bauhinia purpurea*, concordando com a literatura, onde já havia sido detectada em Ramachandran e Joshi, (1967) nesta mesma espécie.

Além destes picos relativos à rutina e isoquercitrina, foi identificado na amostra GBp1-F a presença do pico relativo à catequina, m/z 289 $[M-H]^-$, conforme mostrado na figura 30 a seguir.

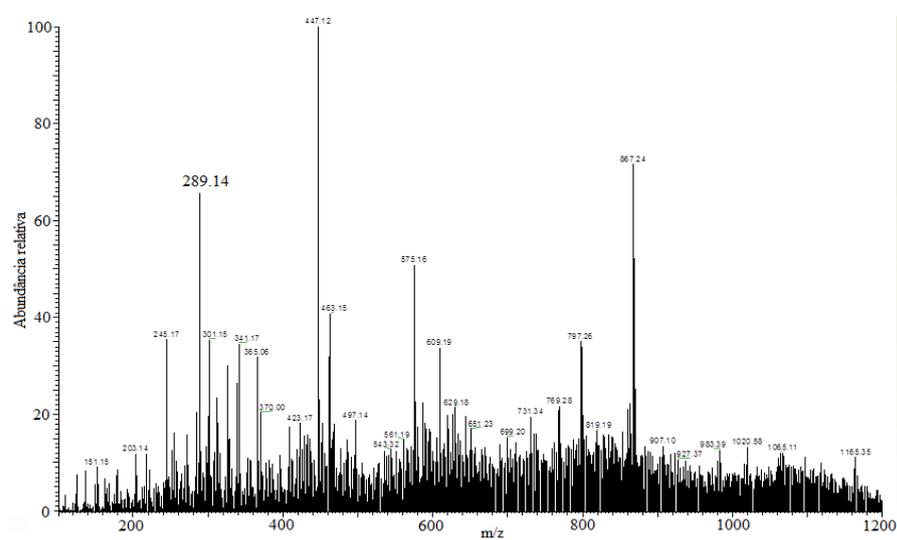


Figura 30. Espectro de massas (MS) da amostra GBp1-F com presença do pico m/z 289 $[M-H]^-$.

Novamente então realizou-se a análise do padrão, desta vez a catequina, e em seguida a fragmentação do pico, m/z 289 $[M-H]^-$, como visto na figura 31, bem como a própria proposta de fragmentação segundo JIN *et al*, (2012) e ZHAO, (2012), onde a catequina perde 44 u relativa a um grupo alceno ligado à hidroxila.

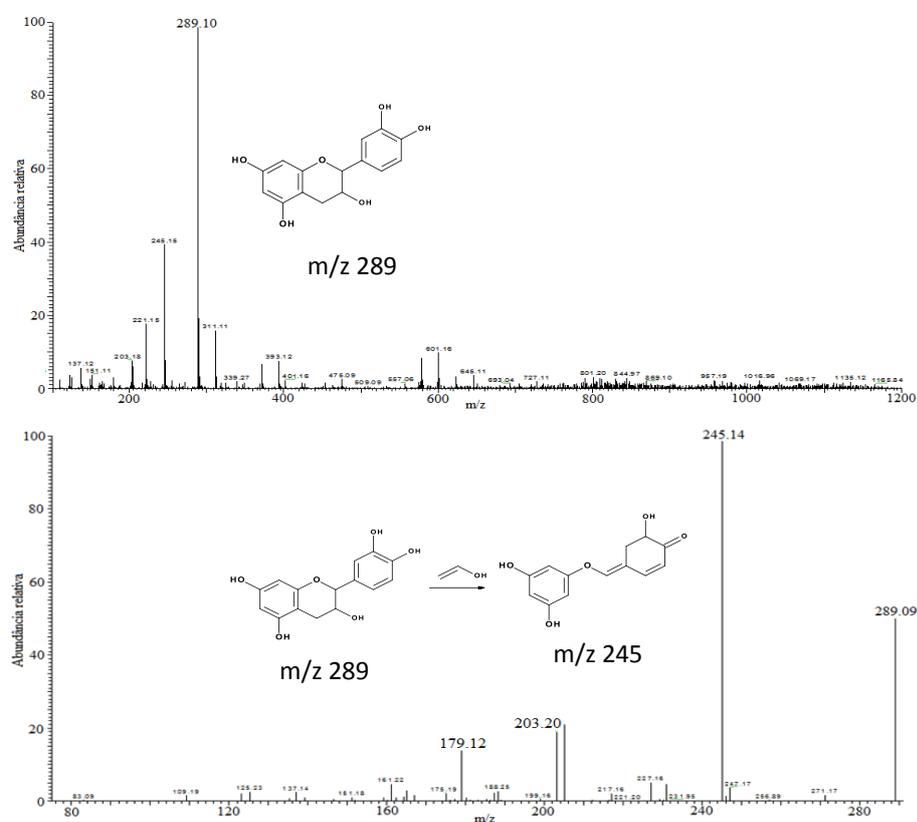


Figura 31. Fragmentação do pico m/z 289 $[M-H]^-$ do padrão catequina.

A partir da análise da fragmentação do pico m/z 289 $[M-H]^-$ da amostra GBp1-F foi possível observar semelhança quando comparado com a do padrão catequina, com a presença do mesmo íon majoritário m/z 245 $[M-H]^-$, além de outros minoritários como m/z 203 e m/z 179, mostrado na figura 32 a seguir.

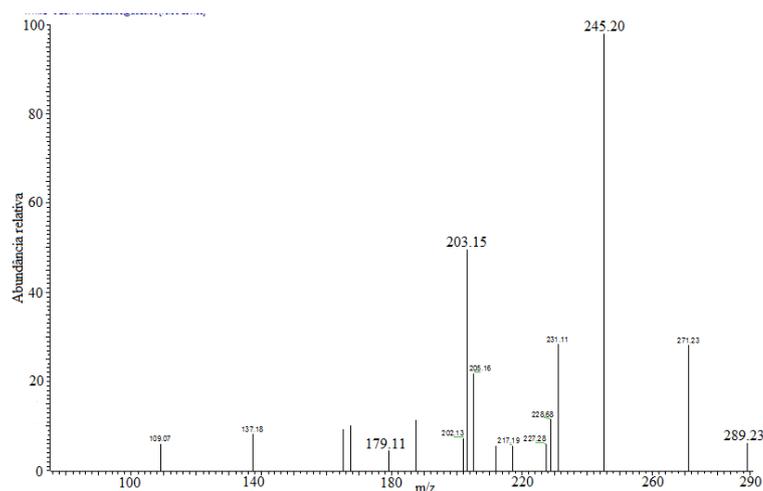


Figura 32. Fragmentação do pico m/z 289 $[M-H]^-$ da amostra GBp1-F referente à catequina.

Apesar de não ter sido identificado catequina através de cromatografia em camada delgada (CCD) anteriormente, e, no entanto serem apresentados os fragmentos relativos a este padrão na amostra GBp1-F na análise por espectrometria de massas, é proposto que tal fato seja associado à maior sensibilidade desta técnica espectrométrica do que a própria cromatografia em camada delgada, a qual pode não identificar substâncias em concentrações tão baixas (TEIXEIRA *et al*, 2008).

A confirmação da presença desta substância através de outras técnicas, seria um resultado inédito na espécie *B. purpurea*, pois somente foi encontrada nas espécies *B. racemosa*, *B. aurea* e *B. championii* (SASHIDARA *et al*, 2012; SHANG *et al*, 2007; CHEN *et al*, 1994).

6. CONCLUSÃO

O estudo com as espécies do gênero *Bauhinia* da região amazônica apresentou resultados fitoquímicos e biológicos ainda não registrados na literatura, o que colabora com o aumento no número de informações relativas a esse gênero com potencial farmacológico e colabora com a busca por classes químicas e substâncias de interesse dentro da pesquisa como flavonoides e alcaloides, grupos responsáveis por muitas ações medicinais.

Dentre os resultados biológicos obtidos a partir dos extratos brutos de *Bauhinia* destacam-se:

- Elevada atividade antioxidante, como a apresentada pela espécie *Bauhinia coronata* (CBc - $CI_{50} = 11,240 \pm 0,70 \mu\text{g/mL}$) que mostrou ação relativa ao padrão ácido gálico ($CI_{50} = 11,67 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$).
- A diferença nos resultados da atividade antioxidante entre as amostras de *Bauhinia purpurea* de diferentes localidades, com valores de DPPH[•] para FBp1 com $CI_{50} = 195,804 \pm 5,66 \mu\text{g/mL}$ e FBp2 com $CI_{50} = 17,234 \pm 2,07 \mu\text{g/mL}$, sugere que a composição dessa espécie pode ser diferente de acordo com o local em que é encontrada.
- Atividades de inibição enzimática frente à tirosinase e α -glucosidase, com o melhor índice neste último, também para a espécie *Bauhinia coronata* (FBc - $CI_{50} = 1,91 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$), a qual é pouco encontrada na literatura dentro do estudo das espécies do gênero *Bauhinia*, apresentou resultado próximo ao padrão acarbose ($CI_{50} = 0,84 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$).
- Baixa taxa de toxicidade frente o microcrustáceo *Artemia salina*, com CL_{50} superiores a $250 \mu\text{g/mL}$ para todos os extratos de *Bauhinia*, exceto para GBp1, sugerindo-se a possibilidade de estudos e pesquisas voltados à área biotecnológica.
- Os extratos não apresentaram potencial citotóxico frente a células tumorais, onde a maior atividade apresentada foi de 40,09% para o extrato de *Bauhinia acreana* (GBa2),

contrário ao que a literatura relata para as espécies *B. purpurea* e *B. variegata*, as quais já apresentaram ação antitumoral.

- Quanto à avaliação da atividade antibacteriana, os extratos das espécies de *Bauhinia acreana*, *B. purpurea* e *B. coronata* quando testados frente às espécies *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis* (*Streptococcus sanguis*), *Streptococcus pyogenes* grupo A tipo 1, *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*), *Staphylococcus aureus* não apresentaram inibição. Entretanto, na literatura algumas espécies como *B. variegata*, *B. tomentosa* e até mesmo *B. purpurea*, a qual foi analisada e assim como as demais também apresentou resultado negativo, já exibiram inibição de bactérias, o que pode estar relacionado à diferença na composição das espécies locais.

- As espécies estudadas exibiram um rico perfil flavonoídico constatado a partir da realização de CCD e CLAE, bem como descrito na literatura, como a presença de flavonoides glicosilados detectados a partir de CCDs reveladas com NP-PEG. Tal presença é característica do gênero *Bauhinia*, com destaque para as espécies *B. coronata* e *B. purpurea*.

- A ausência do marcador químico kaempferitina, verificado por análises em CCD e CLAE, e a atividade de inibição à α -glicosidase observada por *B. coronata* demonstra que outra substância pode estar associada à tal atividade fitoterápica, possibilitando a existência de outro marcador dentro do gênero.

- Por meio das análises em CCD, CLAE e EM foi verificada a ausência da classe alcaloídica nas espécies de *Bauhinia* locais, a qual somente foi relatada em duas espécies: *Bauhinia candicans*, com o isolamento da trigonelina, e em *Bauhinia unguolata*, com os alcaloides harmano e eleagnina, reforçando a ideia de que esta seja uma classe rara dentro do gênero.

- Foram identificados os flavonoides rutina e isoquercitrina através das análises em CCD, CLAE e EM, o que possibilita a explicação da atividade antioxidante da espécie *B. purpurea* (folhas e galhos). Tais flavonoides são descritos com muitos benefícios farmacológicos, o que motiva futura pesquisa relacionada a esses e outros flavonoides presentes nestas espécies regionais.

- Foi verificado indício da presença de catequina em *Bauhinia purpurea* (GBp1-F) através de EM, sendo a presença deste fenólico podendo estar associada aos relatos de ação hipoglicemiante da espécie, já que estudos apresentaram tal potencial vinculado a esta substância química. Isso também desperta a possibilidade de um novo marcador para a ação hipoglicemiante do gênero, já que não foi observada a presença do flavonoide kaempferitrina (marcador químico).

- Estudos específicos para a análise do potencial das frações obtidas a partir dos extratos brutos de espécies de *Bauhinia* não são descartados, ao contrário, uma vez que o extrato bruto não apresentou desempenho significativo frente às enzimas α -glucosidase e α -amilase o estudo de frações específicas tornam-se uma nova possibilidade de aplicação farmacológica.

- A partir da elaboração deste perfil fitoquímico das espécies de *Bauhinia* regionais, pesquisas em prol de desenvolvimento de produtos biotecnológicos a partir desta fonte são visados, já que as espécies apresentam classes químicas de grande interesse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-WAHAB, S. M.; WASSEL, G. M.; AMMAR, N. M.; HANNA, T., 1987. Flavonoid constituents in the different organs of selected *Bauhinia* species and their effect on blood glucose. *Herba Hungarica*, 26(1), 27-39.
- ABOU-ARAB, A.A.K.; KAWTHER, M.S.; TANTAWY, M.E.El.; BADEAA, R.I.; KHAYRIA N., 1999. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. *Food Chem.*, 67(1), 357-363.
- ACHENBACH, H.; STOCKER, M.;CONSTELA, M.A.F., 1988. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*. 27 (6), 1835-1841.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L.H. C.; SILVA, A.C.O., 2005. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). *Acta Bot. Bras.* 19 (1), 27-38.
- ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A., 2006. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J. Ethnopharmacol.*, 107, 449-455.
- ALMEIDA, C.F.C.B. R.; SILVA, T.C. L.; AMORIM, E.L.C.; MAIA, M.B. S.; ALBUQUERQUE, U.P., 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *J. Arid. Environ.* 62 (1), 127-142.
- ALMEIDA, E. R.; XAVIER, H.; GUEDES, M.C., 1997. III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas, Brasil.
- ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J., 2012. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, 1824 (1), 195-206.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M., 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quím. Nova*, 33(10), 2202-2210.
- AMOROZO, M. C. M.; GÉLY, A., 1988. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas. Barcarena, PA, Brasil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Sér. Bot.* v. 4, n. 1.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R., 2006. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. (Boca Raton, FL: CRC Taylor & Francis).

- ANDRADE-CETTO, A.; MARTÍNEZ-ZURITA, E.; SOTO-CONSTANTINO, A.; REVILLA-MONSALVE, M. C.; WIEDENFELD, H., 2008. Chronic hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on n5-streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 116, 358.
- ANNEGOWDA, H.V.; MORDI, M. N.; RAMANATHAN, M.; HAMDAN, M.R.; MANSOR, S.M., 2011. Effect of Extraction Techniques on Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bauhinia purpurea*: HPTLC Determination of Antioxidants. *Food Anal. Met.*, 5(2), 226-233.
- ARTS, M. J. T. J.; DALLINGA, J. S.; VOSS, H. P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A., 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.*, 88, 567-570.
- AZEVEDO, S. K.; SILVA, I. M., 2006. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, 20(1), 185-194.
- BADGER, G. M.; BEECHAM, A.F., 1951. Isolation of tetrahydroharman from *Petalostyles labicheoides*. *Nature*, 168 (4273), 517-518.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDARAM, K. SAMMAN, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 191-203.
- BALOGUN, A. M.; FETUGA, B. L., 1985. Fatty acid composition of seed oils of some members of the leguminosae Family. *Food Chem.*, 17(3), 175-182.
- BARBOSA, W. L. R., 2009. Etnofarmácia: fitoterapia popular e ciência farmacêutica. Núcleo de Meio Ambiente, Belém- Pará.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASSO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C., 1991. Leguminosae - Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: Impr. Univ. 2: 15-100.
- BIANCO, E. M.; SANTOS, C.A.M., 2003. Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae). *Rev. Bras. Farm.*, 13 (2), 93-99.
- BODAKHE, S. H.; RAM, A., 2007. Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. *Yakugaku Zasshi*, 127 (9), 1503-1507.

- BODAKHE, S. H.; RAM, A.; VERMA, S.; PANDEY, D.P., 2012. Anticataract activity of rhamnocitrin isolated from *Bauhinia variegata* stem bark. *Orient Pharm Exp Med. Short Communication*, 12(3), 227-232.
- BOONPHONG, S. S.; PUANGSOMBAT, P. P.; BARAMEE, A. A.; MAHIDOL, C. C.; RUCHIRAWAT, S. S.; KITTA KOOP, P.P., 2007. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.*, 70 (5), 795-801.
- BORRÁS, M. R. L., 2003. Plantas da Amzônia: medicinais ou mágicas? Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Editora Valer, Manaus-AM.
- BRACA, A.; DE TOMMASE, N.; BARI, L.D.; PIZZA, C.; POLITI, M.F.; MORELLI, I., 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J.Nat. Prod.*, 64(7), 892-895.
- BRANDÃO, M. G. L.; PIGNAL, M.; ROMANIUC, S.; GRAEL, C. F. F.; FAGG, C. W. 2012. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalista Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). *J. Ethnopharmacol.* 143, 488–500.
- CALIXTO, J. B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(179).
- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, M., 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 71(58), S58 – S65.
- CARVALHO, J. C. T.; SANTOS, L. S.; VIANA, E. P.; DE ALMEIDA, S. S. M. S.; MECONATO, E.; RODRIGUES, M.; FERREIRA, L. R.; VAN DE KAMP, A. 1999. Anti-inflammatory and analgesic activities of the crude extracts from stem bark of *Bauhinia Guianensis*. *Pharm. Biol.*, 37(4), 281-284.
- CARVALHO, P. E. R., 2003. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 1039.
- CECHINEL FILHO, V.; BREVIGLIERI, E.; WILLAIN FILHO, A.; SANTOS, A. R. S., 1995. Phytochemical analysis and analgesic effects of *Bauhinia splendens*. *Rev. Bras. Farm.*, 76(4), 115-117.
- CHEN, C.; HUANG, Y.; OU, J., 1994. Constituents of the stem of *Bauhinia championii*. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 46(6), 485-9.

- CHIEN-CHIN, C.; YUH-PAN, C.; HONG-YEN, H.B., 1985. Bauhinin, a New Nitrile Glucoside from *Bauhinia championii*. *J. Nat. Prod.*, 48(6), 933-937.
- CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO, SO Y.; KIM, D.H.; CHANG, S.Y., 2002. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. *Toxicology*, 181(1), 581-586.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S., 1996. Flavonoids -Chemistry,metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K.M., 1997. Natural Products in Drug Discovery and Development. *J. Nat. Prod.*, 60(1), 52-60.
- DAAYF, F.; LATTANZIO, V. Recent Advances in Polyphenol Research, vol I. Blackwell Publishing Ltd, 2008.
- DA CUNHA, A.M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M.W., 2010. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata*Link.*Phytomedicine*, 17(1), 37-41.
- DAS, A. K.; DATTA, B. K.; SHARMA, G.D., 2008. Medicinal plants used by diferente tribes of Cachar district, Assam. *Ind. J. Trad. Knowledge*, 7(3), 446-454.
- DE SOUZA, P. M., 2011. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal.
- DEWICK, P. M., 2002. Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach. Second edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I., 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43, 200-227.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A., 2004. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 32(8), 747-753.
- DUBBER, M-J.; SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G. S.; KANFER, I., 2005. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37(4), 723–731.
- ELVIN-LEWIS, M., 2001. Should we be concerned about herbal remedies. *J Ethnopharmacol*, 75(1), 141-164.

- ENGEL, I. C.; FERREIRA, R.A., 2008. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). Rev. Bras. Farm., 18 (2), 258-264.
- ESTRADA, O.; HASEGAWA, M.; GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; PERDOSO, N.; SOLORZANO, E.; MENDEZ, J.; MENDEZ, B.;ZEA, G., 2005. Evaluation of flavonoids from *Bauhinia megalandra* leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. Phytother. Res., 19 (10), 859-863.
- EWING, J. F.; JANERO, D. R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. Anal Biochem.,232(2), 243-248.
- FERNÁNDEZ-PEÑA, C.; GONZÁLEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; TILLET, S., 2008. Efecto del extracto acuoso de hojas de *Bauhinia megalandra* sobre la glucogenólisis hepática en ratas. Arch. Venez Farmacol. Ter., 27(2), 129-131.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Ver. Ass. Med. Brasil, 13(1), 61-68.
- FERREIRA, M. A., 1973. Garcia de Orta, Serie de Farmacognosia, 2, 7.
- FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B., 2012. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relationwith their biological propertie. Food Chemistry, 134, 894–904.
- FIGUEIRA, A. C. G.; BRITO, A. F.; SILVA, G. A., 2012. Avaliação da toxicidade de plantas medicinais brasileiras por meio do bioensaio com *Artemia salina*. Anal da Jornada de Pesquisa e Iniciação Científica, Faculdade CERES, 3 (3), 2012.
- FRANKISH, N.; SOUSA MENEZES, F.; MILLS, C.; SHERIDAN, H., 2010. Enhancement of insulin release from the beta-cell line INS-1 by an ethanolic extract of *Bauhinia variegata* and its major constituent roseoside. Planta Med., 76(10), 995-997.
- FUENTES, O.; ARANCIBIA-AVILA, P.; ALARCÓN, J., 2004. Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. Fitoterapia, 75(6), 527-532.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J. Agric. Food Chem., 48, 3597-3604.
- GHOSAL, S.; BANERJEE, S. K.; BHATTACHARYA, S. K.; SANYAL, A.K., 1972. Chemical and pharmacological evaluation of *Desmodium pulchellum*. Planta Med., 21(4), 398-409.

- GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S., 2008. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Quím. Nova*, 31, 2042-2046.
- GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; BECERRA, A., 1998. Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by aqueous extract of *Bauhinia megalandra* leaves. *Phytother Res*, 12(4), 291-293.
- GONZÁLEZ-MUJICA, F.; PERDOMO, E.; MENDEZ, J.; HASEGAWA, M.; MOTTA, N., 2002. Inhibition of the neoglucogenic and glucose 6-hepatic phosphatase for flavones purified from bauhinia megalandra leaves. *Rev. Fac. Med.*, 25(1), 37-40.
- GONZÁLEZ-MUJICA, F., 2011. Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health. Antihyperglycemic Activity of *Bauhinia megalandra*, 14, 334.
- GOPALAKRISHNAN, S.; VADIVEL, E., 2011. Antibacterial and antifungal activity of the bark of *Bauhinia tomentosa* Linn. *Pharma Science Monitor*, 2(1), 103-109.
- GRÜNER, J. M.; SOUZA, T. K.; BENITEZ, L. B.; SILVA, C. M., 2012. Análise do perfil fitoquímico de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pávon) Tieghem, Loranthaceae. *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, 1, 1-133.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B., 2000. Corantes têxteis. *Quím. Nova*, 23(1), 71-78.
- GUPTA, A. K.; VIDYAPATI, T.J.; CHAUHAN, J.S., 1980. Chemical Examination of the Stem of *Bauhinia variegata*. *Planta Med.*, 38, 174-176.
- GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R. S.; KUMAR, T. S., 2004. Antitumour activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. *Acta Pharmacol. Sin*, 25, 1070-1076.
- GUPTA, R.; PAARAKH, P. M.; GAVANI, U., 2009. Pharmacognostical and phytochemical screening of *Bauhinia variegata* Linn. leaves. *Journal of Pharm. Res.*, 2(7), 1196-1198.
- GUSSON, A. E.; LOPES, S. F., 2008. A Família Fabaceae nas Florestas Estacionais Semidecíduais do Triângulo Mineiro. IX Simpósio Nacional Cerrado. Brasília, DF.
- GUYTON, A. C.; HALL, J.E., 2002. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 973.

- HACKETT, A. M., 1986. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In LISS, A. L. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological, and Structural-Activity Relationships*, p. 177-194.
- HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FNKUI, S., 1994. The correlation between active oxygenscavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med*, 16, 845-850.
- HARDY, K.; BUCKLEY, S.; COLLINS, M. J.; ESTALRRICH, A.; BROTHWELL, D.; COPELAND, L.; GARCIA-TABERNERO, A.; GARCIA- VARGAS, S.; LA RASILLA, M., 2012. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, 99(8), 617-626.
- HAYER, N. J. Desenvolvimento, purificação e caracterização de IgG anti lectina de folha de *Bauhinia monandra*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2000.
- HAVSTEEN, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1141-1148.
- HAYSTEEN, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1141-1148.
- HEARING, V. J., 1987. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification properties, and reactions catalyzed. *Meth. Enzymol.*, 142, 154-65.
- HOPE, W. C.; WELTON, A. F.; FIELDER-NAGY, C.; BATULA-BERNARDO, C.; COFFEY, J. W., 1983. In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 367-371.
- HOWES, M. J. R.; HOUGHTON, P. J., 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol., Biochem. Behav.*, 75(3), 513-527.
- KIJHNAU, J. 1976. The Flavonoids - Aclass of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117-191.
- IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A.B., 1983. Components of *Bauhinia candicans*. *J. Nat. Prod.*, 46(5), 752-753.

- IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B., 1984. Sitosterol 3-O- α -D-xylopyranoside from *Bauhinia candicans*. *Phytochemistry*, 23(9), 2087-2088.
- IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A.B., 1987. Sitosterol 3-O- α -D-xyluronofuranoside from *Bauhinia candicans*. *Phytochemistry*, 26(3), 857-858.
- IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A.B., 1989. Steroidal glycosides, flavonoids, and other components of *Bauhinia uruguayensis*. *An. Asoc. Quim. Argent.*, 77, 461-466.
- JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; SIOUMIS, A.A., 1966. Alkaloids of the Australian Leguminosae - VII. Nb-Methyltetrahydroharman from *Acacia complanata*. *Aust. J. Chem.*, 19, 1539-1540.
- JOLY, A. B., 1993. *Botânica: Introdução a Taxonomia Vegetal*. Ed. Nacional: São Paulo, 1993.
- JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F.R.M.B., 2004. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ^{14}C -glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem. Biol. Interac.*, 149(2-3), 89-96.
- JOSHI, V. D.; VERMA, T.; SHETTY, P. R., 2009. Antioxidant potential of *Bauhinia purpurea* Linn. Leaves. *Int. J. Pharm. Res.*, 1, 51-55.
- JULIANI, C. 1929. Ação hipoglicemiante da unha-de-vaca. *Rev. Med. Pharm., Chim. e Phys.*, 2, 165-169.
- JULIANI, C. 1931. Ação hipoglicemiante de *Bauhinia forficata* link. *Novos estudos experimentais. Rev. Sudam. Endocrinol. Immunol. e Quimioter.*, 14, 326-334.
- KARIOTI, A.; PROTOPAPPA, A.; MEGOULAS, N.; SKALTSA, H., 2007. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorg. Med. Chem.*, 15(7), 2708-2714.
- KUMAR, T.; CHANDRASHEKAR, K.S., 2011. *Bauhinia purpurea* Linn: a review of its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Res. J. Med. Plant*, 5, 420-431.
- KUMAR, V.; YADAV, S. K., 2012. Synthesis of different-sized silver nanoparticles by simply varying reaction conditions with leaf extracts of *Bauhinia variegata* L. *J. Pharm. Res.*, 5(2), 792-797.
- LALUEZA-FOX, C.; HUGUET, R.; BASTIR, M.; SANTAMARIA, D.; MADELLA, M.; WILSON, J.; CORTES, A. F.; ROSAS, A., 2012. Neanderthal medics? Evidence for food,

cooking, and medicinal plants extrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, 99(8), 617-626.

LANINI, J.; DUARTE-ALMEIDA, J. M., 2009. “O que vêm da terra não faz mal” - relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. *Rev. Bras. Farmacog.*, 19(1A), 121-129.

LAUX, D. O.; STEFANI, G. M.; GOTTLIEB, O. R. 1985. Bausplendin, a dimethylenedioxyflavone from *Bauhinia splendens*. *Phytochemistry*, 24(5), 1081–1084.

LEANDRO, L. M., 2011. Estudo Fitoquímico e Atividades Biológicas de *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora*. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LEE Y. P.; CHUNG, G. H.; RHEE, J. S., 1993. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK WI lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1169, 156–164.

LEWIS, G. P., 1987. Legumes of Bahia. Kew, Royal Botanic Gardens.

LIMA, P. G. C.; COELHO-FERREIRA, M.; OLIVEIRA, R., 2011. Plantas medicinais em feiras e mercados públicos do Distrito Florestal Sustentável da BR-163, estado do Pará, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, 25(2), 422-434.

LINO, C. S.; DIOGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; ANDRADE NETO, M.; ALVES, R. S.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; FLORENCO DE SOUSA, F. C.; VIANA, G. S. B., 2004. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 125-127.

LIU, J.; WANG, B.; PENG, L.; ZHANG, G., 2004. Structure-activity relationship of flavonoid antioxidants. *Chongqing Daxue Xuebao*, 27(2), 120-124.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, p. 544.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R., 2004. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 14, supl. 01, p. 45-47.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C. VEIGA-JUNIOR, V. V., 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova*, 25(3), 429-438.

- MAIA NETO, M.; ANDRADE NETO, M.; BRAZ FILHO, R., 2008. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochem. System. Ecol.*, 36, 227-229.
- MANSUR, M. C. P. P. R., 2011. Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachyavar.massambabensis* Vaz numa formulação antissolar. Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J.E., 1998. Plantas Mediciniais, Editora UFV, Viçosa.
- MELO, J. G.; NASCIMENTO, V.T., 2004. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Rev. Bras. Farmacognosia*, 14(2), 111-120.
- MENDES, C.; MARINHO, C.M.F.; MOREIRA-JUNIOR, V.F.; QUEIROZ, F.M.; DANTAS, G.L.S.; MACEDO, M.F.S.; OLIVEIRA, C.N.; SCHWARS, A., 2010. Evaluation of *Bauhinia monandra* aqueous and ethanol extracts in pregnant rats. *Pharm. Biol.*, 48(7), 780-785.
- MENEZES, F. S.; MINTO, A.B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N., 2007. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. *Rev. Bras. Farmacognosia*, 17(1), 8-13.
- MING, L. C., 2006. Plantas medicinais na reserva extrativista Chico Mendes – uma visão etnobotânica. Editora UNESP.
- MIYAKE, E.T.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K., 1986. Pharmacognostic characterization of Pata-de-Vaca (*Bauhinia forficata*). *Rev. Bras. Farmacognosia*, 1(1), 58-68.
- MOLYNEUX, P., 2004. The use the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; ROCHA, E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L., 2006. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16(Supl.), 611-617.
- MORO, G. A.; GRAZIANO, M. N.; COUSSIO, J.D., 1975. Alkaloids of Argentine medicinal plants. IV. Alkaloids of *Prosopis nigra*. *Phytochemistry*, 14, 827-834.

- MOSSMAN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* (65) 55-63.
- NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUVADI, M. R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, Biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmac.*, 33, 2-16.
- NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; DE SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q., 2011. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata*. *L. Rev. Bras. Farm.*, 92(4), 327-332.
- NEGI, B. S.; DAVE, B. P.; GARWAL, Y. K., 2012. Evaluation of antimicrobial activity of *B. purpurea* leaves under *in vitro* conditions. *Indian J. Microbiol.*, 52(3), 360-365.
- NIJVELDT, R. J.; van NOOD, E.; van HOORN, D. E. C.; BOELENS, P. G.; van NORREN, K.; van LEEUWEN, P. A. M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74(4), 418-425.
- NGOC, T. M.; MINH, P. T. H.; HUNG, T. M.; THUONG, P. T.; LEE, I.; MIN, B.; BAE, K., 2008. Lipoxygenase inhibitory constituents from rhubarb. *Arch. Pharmacol Res.*, 31(5), 598-605.
- NOOR, R.; MITTAL, S.; IQBAL, J., 2002. Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit.*, 8(9), 210-215.
- OKWUTE, S. K.; NDUKWE, G. I.; WATANABE, K.; OHNO, N., 1986. Isolation of griffonilide from the stem bark of *Bauhinia thonningii*. *J. Nat. Prod.*, 49(4), 716-717.
- ORTIZ, H. F.; SÁNCHEZ, W. F.; MÉNDEZ, A. J.; MURILLO P. M., 2009. Potencial Antioxidante de Hojas y Corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms: Contribución de sus Flavonoides en esta Actividad. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 33(127), 183-191.
- ÖZTÜRK, M.; AYDOGMUS-ÖZTÜRK, F.; DURU, M. E.; TOPÇU, G., 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chem.*, 103, 623-630.
- PANDEY, S.; AGRAWAL, R. C., 2010. Chemopreventive potential of *Bauhinia variegata* flower extract against DMBA-induced skin papillomagenesis in mice. *Pharmacologyonline*, (1), 39-46.

- PAREKH, J.; KARATHIA, N.; CHANDA, S., 2006. Screening of some traditionally used medicinal plants for potential antibacterial activity. *Indian J. Pharm. Sci.*, 68, 832-834.
- PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I. L., 2002. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 81(2), 191-197.
- PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L., 2004. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, 4, 1-7.
- PEPATO, M. T.; CONCEIÇÃO, C. Q.; GUTIERRES, V. O.; VENDRAMINI, R. C.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; BRUNETTI, I. L., 2010. Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of *Bauhinia forficata* for the treatment of experimental diabetes in rats. *African J. Biotechnol.*, 9(42), 7165-7173.
- PEREIRA, C. A.; CORRÊA, A. D.; PEREIRA, L. L. S.; CHAGAS, P. M. B.; SANTOS, C. D.; DE SOUZA, S. P., 2011. Inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. *R. Bras. Bioci.*, 9(3), 265-269.
- PETTIT, G. R.; NUMATA, A.; IWAMOTO, C.; USAMI, Y.; YAMADA, T.; OHISHI, H.; CRAGG, G. M., 2006. Antineoplastic Agents. 551. Isolation and Structures of Bauhiniastatins 1-4 from *Bauhinia purpurea*. *J. Nat. Prod.*, v. 69(3), p. 323-327.
- PIERONI, L. G.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L., sem ano. Perfil cromatográfico e potencial antioxidante de espécies nativas do cerrado de Bauru, SP. UNESP Bauru, 6327-6330.
- PIMPÃO, R. C. S., 2009. Compostos fenólicos e sua actividade antioxidante em espécies de *Juniperus*: análise da produção sazonal e sob condições de stresse. Lisboa.
- PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M., 2010. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. *Quím. Nova*, 33(4), 909-913.
- PITCHAI, D.; GOPALAKRISHNAN, V.; PERIYASAMY, V.; MANIKKAM, R., 2012. In-silico modeling and docking studies of AA2BR with catechin to explore the anti diabetic activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 328-333.

- PITCHAI, D.; MANIKKAM, R., 2012. Hypoglycemic and insulin mimetic impact of catechin isolated from *Cassia fistula*: a substantiate in silico approach through docking analysis. *Med. Chem. Res.*, 21(9), 2238-2250.
- PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E., 2003. Flavonóides glicosilados das folhas e flores da *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Quím. Nova*, 26(4), 466-469.
- POKHREL, N., ADHIKARI, R.P., 2002. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity *Bauhinia variegata*, locally known as Koiralo. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18(1), 69-71.
- POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H., 1981. *Advances in Legume Systematics. Part 1*, Royal Botanic Gardens: England.
- PRABHAKAR, P.; GANDHIDASAN, R.; RAMAN, P. V.; KRISHNASAMY, N. R.; NANDURI, S., 1994. De-O-methylracemosol: A tetracyclic 2,2-dimethylchroman from the roots of *Bauhinia racemosa*. *Phytochemistry*, 36(3), 817-818.
- RAHMAN, W.; BEGUM, S. J., 1966. Flower pigments: flavonoids from the white flowers of *Bauhinia variegata*. *Naturwissenschaften*, 53(15), 385.
- RAJANI, G. P.; ASHOK, P., 2009. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. *Indian J. Pharmacol.*, 41(5):227–232.
- RAJKAPOOR, B.; JAYAKAR, B.; MURUGESH, N., 2003. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. *J. Etnopharmacol.*, 89, 107-109.
- RAMACHANDRAN, R., JOSHI, B.C., 1967. Chemical examination of *Bauhinia Purpurea* flowers. *Curr. Sci.*, 36, 574-575.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay. *Free Radic Biol Med.*, 26 (9-10), 1231-1237.
- REDDY, M.V.B., REDDY, M.K., GUNASEKAR, D., CAUX, C., BODO, B., 2003. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry* 64(4), 879-882.
- REPKE, D.B.; MANDELL, D.M.; THOMAS, J.H., 1973. Alkaloids of *Acacia baileyana*. *Lloydia*, 36, 211-213.
- RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L., 2003. *Flavonoids in health and disease*. Second edition. Marcel Dekker, Inc. New York.

- RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. In BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 2006. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos. Brasília, Ministério da Saúde.
- ROSADO, V., ROSADO, A., 1960. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Oswaldo Lamartine de Faria online, 2nd edition.
- ROSS J.;KASUM, C., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. Annual Review of Nutrition, 22, 19-34.
- ROW, L., RAMACHANDRA, L., VISWANADHAM, N., 1954. Colouring matter of the flower petals of *Bauhinia tomentosa* Linn. Proc. Indian. Acad. Sci.,39(5), 240-242.
- SAINT-HILAIRE, A. de 1824b. Histoire des plantes les plus remarquables du Brésil et du Paraguay. Chez A. Belin, Imprimeur Libraire, Paris, p. 279.
- SAINT-HILAIRE, A. de; JUSSIEU, A. de, CAMBESSEDES, J., 1825–1833. Flora Brasílica Meridionalis, vol. 3. Belin Bibliopolium, Paris.
- SARTORELLI, P.; CORREA, D.S., 2007. Constituents of Essential Oil from *Bauhinia forficata* Link. J. Essent. Oil Res., 19, 468-469.
- SASHIDHARA, K. V.; SINGH, S. P.; MISRA, S.; GUPTA, J.; MISRA-BHATTACHARY, S., 2012. Galactolipids from *Bauhinia racemosa* as a new class of antifilarial agents against human lymphatic filarial parasite, *Brugia malayi*. Eur. J. Med. Chem., 50, 230-235.
- SEMWAL, S.; SHARMA, R.K., 2011. A new lignan rhamnoside from *Bauhinia retusaseed* pods (Caesalpinaceae).Chin. Chem. Lett. ,22, 1081-1083.
- SHABIR, G. A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. J. Chromat. A, 987(1–2), 57–66.
- SHANG, X.; LI, S.; WANG, Y.; WANG, S.; YANG, Y.; SHI, J., 2007. Dihydroflavonol glycosides and flavan-3-ols from *Bauhinia aurea*. Zhongguo Zhongyao Zazhi, 32(9), 815-818.
- SHARON, S.; LIS, H., 1972. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. Science, 177(4053), 949-959.

- SHILPA, P.; RUPA, M.; BHATTACHARYA, S., 2011. Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity of diferente parts of *Bauhinia purpurea* LINN., in *online Inventi Rapid: Ethnopharmacology*.
- SHIMIZU, K.; YASUTAKE, S.; KONDO, R., 2003. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excelsa*. *Chem. Pharm. Bull.*, 51(3), 318-319.
- SILVA, K.L., BIAVATTI, M.W., LEITE, S.N., YUNES, R.A., DELLE MONACHE, F., CECHINEL FILHO, V.Z., 2000. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Zeitschrift für Naturforschung* 55c, 478-480.
- SILVA, K.L., CECHINEL-FILHO, V., 2002. Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição Química e Potencial Farmacológico. *Quim. Nova*, 25(3), 449-454.
- SILVA, M. F.; SOUZA, L. A. G., 2002. Levantamento das Leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, baixo rio Negro, Amazonas. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi*, 18(1): 3-35.
- SILVA, E. G.; BEHR, G. A.; ZANOTTO-FILHO, A.; LORENZI, R.; PASQUALI, M. A. B.; RAVAZOLO, L. G.; BORDIGNON, Jr., C. L.; SILVA, F. A.; ABOY, A. L.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F., 2007. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) Macbr. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(8), 1488-1496.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLHO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., 1999. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFCS.
- SOLER-RIVAS, R.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J., 2000. An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs. *Phytochem. Anal.*, 11, 330-338.
- SOUSA, E., SZPOGANICS, B.; PIZZOLATTI, M.G., 1998. VI Encontro de Química da Região Sul da Sociedade Brasileira de Química, Maringá, Brasil.
- SOUSA E., ZANATTA L., SEIFRIZ I., CRECZYNSKI-PASA, T.B., PIZZOLATTI M.G., SZPOGANICZ B., SILVA F.R.M.B., 2004. Hypoglycemic effect and antioxidante potential of kaempferol-3,7-*O*-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J. Nat. Prod.*, 67, 829-832.

SOUZA, C.R.F., 2003. A comparative study of the production of dried extract of *Bauhinia forficata* Link by the spray-dryer and the spouted bed processes. Universidade de São Paulo.

SOUZA, J.D., SILVA, M.B.R., ARGOLO, A.C.C., NAPOLEÃO, T.H., SÁ, R.A., CORREIA, M.T.S., PAIVA, P.M.G., SILVA, M.D.C., COELHO, L.C.B.B., 2011. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. Int. Biodeterior. Biodegradation, 65(5), 696-702.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim Nova, 30(2), 351-355.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L., 2010. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacogn., 20(3), 435-440.

STASI, L.C.D., HIRUMA-LIMA, C.A., 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Editora Unesp, 2nd edition.

SHARON, S., LIS, H., 1972. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. Science, 177(4053), 949-959.

SILVA, K.L., CECHINEL FILHO, V., 2002. Plantas do Gênero Bauhinia: Composição Química e Potencial Farmacológico. Quím. Nova, 25(3), 449-454.

SU, E. G., 1999. Formulando com branqueadores de pele. Cosmetics & Toiletries, 11(2), 57-63.

SUBRAMANIAN, S.S., NAIR, A.G.R., 1963. Isolation of isoquercitrin from the flowers of *Bauhinia tomentosa*. Indian J. Chem., 1, 450.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A., 2008. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. Acta Biochim. Pol., 55, 391-398.

SULTANA, S.; ILYAS, M.; MOHAMMED, K.; SHAIDA, W.A., 1985. Chemical investigation of *Bauhinia vahlii* Linn. (Leguminosae). J. Indian Chem. Soc., 62, 337-338.

- QIAO, X.; HOU, T.; ZHANG, W.; GUO, S.; XU, X., 2002. A 3D Structure Database of Components from Chinese Traditional Medicinal Herbs. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 42 (3), 481–489.
- TAKATORI, M., 1997. Skin cosmetic/Cosmetic containing extract of *Bauhinia variegata* for improving skin conditions. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*.
- TAKEBAYASHI, J.; TAI, A.; GOHDA, E.; YAMAMOTO, I., 2006. Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-o-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: a kinetic and stoichiometric study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 766-771.
- TEIXEIRA, A. S.; FREITAS-SILVA, O.; GODÓY, R. L. O.; VARGAS, E. A.; MARTINS, A., 2008. Métodos de extração e quantificação de aflatoxinas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de castanha-do-brasil. *Rev. Ciên. Vida. Seropédica, RJ, EDUR*, v. 28, suplemento, 144-146.
- TEIXEIRA, C. C.; RAVA, C. A.; SILVA, P.M., MELCHIOR, R.; ARGENTA, R.; ANSEMI, F.; ALMEIDA, C.R. C.; FUCHS, F.D., 2000. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. *J. Ethnopharmacology*, 71, 343-347.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M., 1995. *Compêndio de Fitoterapia*; Herbarium Lab. Botânico, Curitiba: Paraná.
- THIRUVENKATASUBRAMANIAM, R.; JAYAKAR, B., 2010. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidaemic activities of *Bauhinia variegata* L on streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacia Letter*, 2(5), 330-334.
- TIWARI, K. P.; MASOOD, M.; RATHORE, Y. K. S., 1978. Flavonoid constituents of bark of *Bauhinia retusa*. *Proc. Est. Acad. Sci. India, Section A: Physical Sciences*, 48(3), 183-4.
- VARGAS, F. S., 2008. Tese: Estudo comparativo entre técnicas para avaliação de atividades antioxidantes de espécies de plantas da Amazônia. Manaus: UFAM.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, 30 (5), 1323-1338.
- VAZ, A. M. S. F., 1993. Diversidade e Conservação de Lianas do gênero *Bauhinia* na Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica*, 23(4), p. 383-395.

- VEITCH, N. C.; GRAYER, R.J., 2011. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1626-1695
- VIANA, E. P.; ALMEIDA, S. S. M. S.; SANTA-ROSA, R. S.; SANTOS, L. S. Naftaquininas do caule de *Bauhinia guianensis*. In: 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, v. 23, p. 21, 2000.
- VIJAYAKUMARI, K.; SIDDHURAJU, P.; JANARDHANAN, K.L., 1997. Chemical composition, amino acid content and protein quality of the little-known legume *Bauhinia purpurea*. *L.J. Sci. Food Agric.*, 73, 279-286.
- WAGNER, H.; BLADT, S., 1996. *Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer. Second Edition.
- WAHAB, A. E.; WASSEL, S.M.; AMMAR, G. M.; HANNA, N.M, 1987. Flavonoids constituents in diferente organs of selected *Bauhinia* species & their effect on blood glucose. *Herba Hungarica*, 26 (1), 27-29.
- WASSEL, M.; ABDEL-WAHAB, S. M.; AMMAR, N.M., 1986. Constituents of the essential oils from *Bauhinia variegata* L. and *Bauhinia purpurea* L. flowers. *Sci. Pharm.*, 54, 357-361.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M.J., 1992. *As Famílias de plantas floridas: descrições, ilustrações, Identificação e Recuperação de Informação*. Versão: 14 de dezembro de 2000. Disponível em: <http://biodiversity.uno.edu/delta/> , acessado em: 23/08/2011.
- WILLAIN FILHO, A.; BREVIGLIERI, E.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, A.R.S., 1997. Antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia splendens* stems in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49(8), 823-827.
- WOLFE, K. L.; HAI LIU, R., 2008. Structure Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8404–8411.
- WU, Z. B.; ZHAO, Y. Y.; YANG, X. W.; LIANG, H., 2009. Flavonoids from *Bauhinia glauca* subsp. *pernervosa*. *ChemInform*, 57(6), 628-631.
- YADAVA, R.N.; REDDY, V.M., 2003. Anti-inflammatory activity of a novel flavonol glycoside from the *Bauhinia variegata* Linn. *Nat. Prod. Res.*, 17, 165-169.
- YADAVA, R. N.; TRIPATHI, P., 2000. A novel flavone glycoside from the stem of *Bauhinia purpurea*. *Fitoterapia*, 71(1), 88-90.

ZUCCOLOTTO, T.; APEL, M.; RATES, S.M.K., 1999. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre- RS. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 58(2), 25-31.