



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JARBAS LIMA DE CARVALHO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Bauhinia pulchella* Benth.

**FORTALEZA
2014**

JARBAS LIMA DE CARVALHO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Bauhinia pulchella* Benth.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago

FORTALEZA
2014

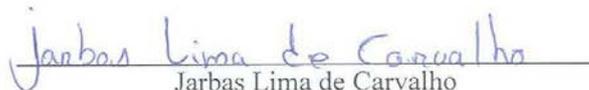
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C234e Carvalho, Jarbas Lima de.
Estudo químico e biológico de *Bauhinia pulchella* Benth / Jarbas Lima de Carvalho. – 2014.
145 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.
1. Fabaceae. 2. Flavonóides. 3. Esteróides. 4. Triterpenos. I. Título.

JARBAS LIMA DE CARVALHO

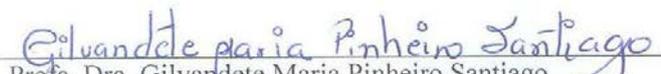
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Bauhinia pulchella* Benth.

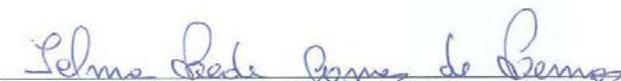
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

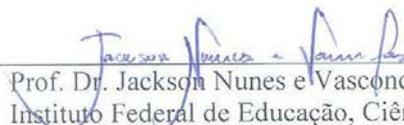

Jarbas Lima de Carvalho

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 08/12/2014.

EXAMINADORES:


Prof. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Jackson Nunes e Vasconcelos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concedido todos os meios para o propósito da vida;

À professora Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, por ter sido alguém tão além que uma orientadora costuma ser: mãe, amiga, confidente, conselheira e um exemplo de profissional a ser seguido, enfim, o reflexo do que quero ser um dia como professor;

A todos os professores que conheci no meu novo lar, ou seja, no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, em especial aos professores Chico Monte, Mary Anne, Ângela, Telma, Antônia, Edilberto e Audísio Filho, que foram os mais presentes nessa turma de Mestrado, pelos ensinamentos transmitidos;

Ao professor Raimundo Braz-Filho, a quem tive o enorme prazer em conhecer, pela ajuda no início, meio e fim das elucidações estruturais;

Aos amigos que adquiri na Química durante o curso de Mestrado, pela solicitude nos momentos mais difíceis;

Aos amigos de laboratório Roberto Wagner, Leôncio, Valdeline, Erivaldo, Sarah, Gabrielli pelo convívio agradável e especialmente, ao Horlando, por estar sempre disponível a auxiliar no desenvolvimento da parte experimental desse trabalho;

À minha família, por todo o apoio concedido nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais, que mesmo com quase nenhum estudo, souberam educar todos os seus filhos, mostrando o caminho certo da vida;

À minha namorada (noiva), que foi uma das principais pessoas responsáveis pela conclusão dessa dissertação, pelo apoio e ajuda em tudo que eu quis fazer na vida, visando sempre um futuro melhor para nós.

RESUMO

O presente trabalho relata o estudo químico e biológico do caule e das folhas de *Bauhinia pulchella*. Nesse estudo, o extrato etanólico do caule, obtido por maceração, foi submetido a fracionamento cromatográfico levando ao isolamento de três flavonoides (+)-3'-4'-diidroxifenil-cromano-7-ol (**BP-2**), (-)-fisetinidol (**BP-3**) e (+)-epicatequina (**BP-4**); da mistura de triterpenos taraxerona e β -amirenona (**BP-1**); da mistura de esteroides sitosterol e estigmasterol (**BP-5**) e de um bibenzil denominado 2-hidróxi-3'-5'-dimetoxibenzila (**BP-6**). Cabe ressaltar que as substâncias **BP-1** e **BP-4** são inéditas no gênero, enquanto **BP-2** é inédita na literatura. As estruturas dos metabólitos secundários isolados foram elucidadas por RMN ^1H e ^{13}C ; IV e EM, juntamente com a comparação com os dados descritos na literatura. A composição química do óleo essencial das folhas de *B. pulchella*, obtido por hidrodestilação, foi determinada e quantificada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e detector de ionização por chama (CG-DIC), sendo, portanto, identificados 95,68% dos seus constituintes: α -pineno (23,89%), óxido de cariofileno (22,43%) e β -pineno (12,19%) foram os constituintes majoritários. O óleo essencial teve sua atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* avaliada, sendo obtido um valor de CL_{50} igual a $105,93 \pm 1,48 \mu\text{g/mL}$. O poder citotóxico do óleo essencial foi avaliado sobre as linhagens tumorais humanas HL-60, MCF-7, NCI-H292 e HEP-2, sendo obtidos valores de CI_{50} e intervalos de confiança iguais a 9,941 (8,238 a 12,00); 53,05 (41,39 a 67,99); 48,98 (44,22 a 54,25) e 50,42 (42,47 a 59,87) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo a linhagem celular HL-60 a mais sensível dentre as células testadas. Este é o primeiro relato do estudo químico de *Bauhinia pulchella*, bem como da investigação da atividade larvicida e citotóxica do óleo essencial de suas folhas.

Palavras-chave: Fabaceae. *Bauhinia pulchella*. Óleo essencial. Atividade larvicida. Atividade citotóxica. Triterpenos. Flavonoides. Bibenzil. Esteroides.

ABSTRACT

This present work reports the chemical and biological analysis of the stem and leaves from *Bauhinia pulchella*. In this study, the ethanol extract from stems was obtained by maceration, subjected to chromatographic fractionation, leading to isolation of three flavonoids: (+)-3',4'-dihydroxyphenyl-chroman-7-ol (**BP-2**), (-)-fisetinidol (**BP-3**) and (+)-epicatechin (**BP-4**); a mixture of triterpenes taraxerone and β -amyrenone (**BP-1**); a mixture of steroids sitosterol and stigmasterol (**BP-5**); and a bibenzyl named 2-hydroxy-3',5'-dimethoxybibenzyl (**BP-6**). It is noteworthy to mention that **BP-1** and **BP-4** substances are unprecedented in the genus, while **BP-2** is unpublished. Chemical structures of secondary metabolites obtained were elucidated by ^1H and ^{13}C NMR; IR and MS associated with comparison of data described in the literature. Chemical composition of the essential oil from leaves of *B. pulchella*, obtained by hydrodistillation, was determined and quantified by gas chromatography-mass spectroscopy (GC/MS) and gas chromatography-flame ionization detector (GC/FID), which identified 95,68% of all constituents. α -pinene (23.89%); caryophyllene oxide (22.43%) and β -pinene (12.19%) were the major components. The essential oil was tested against *Aedes aegypti* larvae and showed LC_{50} value of $105.93 \pm 1.48 \mu\text{g/mL}$. The cytotoxic activity of essential oil was evaluated on human tumor cell lines (HL-60; MCF-7; NCI-H292 and HEP-2) was evaluated, showing IC_{50} values with confidence intervals of 9.941 (8.238 to 12.00), 53.05 (41.39 to 67.99), 48.98 (44.22 to 54.25) and 50.42 (42.47 to 59.87) $\mu\text{g/mL}$, respectively and the cell line HL-60 the most sensitive among the cells tested. This is the first report of the chemical study of *Bauhinia pulchella*, as well the investigation of larvicidal activity and cytotoxicity of the essential oil from its leaves.

Keywords: Fabaceae. *Bauhinia pulchella*. Essential oil. Larvicidal activity. Cytotoxic activity. Triterpenes. Flavonoids. Bibenzyl. Steroids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Foto de um espécime de <i>Bauhinia pulchella</i> em São Benedito – CE	26
Figura 2 – Foto de um espécime de <i>Bauhinia pulchella</i> em São Benedito – CE	26
Figura 3 – Cromatograma de OEBP obtido por CG/EM.....	48
Figura 4 – Cromatograma de OEBP obtido por CG/DIC.....	48
Figura 5 – Espectro de massas do triciclono	51
Figura 6 – Espectro de massas do α -pineno.....	51
Figura 7 – Espectro de massas do canfeno.	51
Figura 8 – Espectro de massas do sabineno.....	51
Figura 9 – Espectro de massas do β -pineno.....	52
Figura 10 – Espectro de massas do ρ -cimeno	52
Figura 11 – Espectro de massas do limoneno	52
Figura 12 – Espectro de massas do 1,8-cineol.....	52
Figura 13 – Espectro de massas do óxido de α -pineno	53
Figura 14 – Espectro de massas do linalol.....	53
Figura 15 – Espectro de massas do <i>trans</i> -pinocarveol.....	53
Figura 16 – Espectro de massas da pinocarvona.....	53
Figura 17 – Espectro de massas do terpinen-4-ol	54
Figura 18 – Espectro de massas do α -terpineol.....	54
Figura 19 – Espectro de massas do α -copaeno	54
Figura 20 – Espectro de massas do β -bourboneno	54
Figura 21 – Espectro de massas do β -elemeno	55
Figura 22 – Espectro de massas do cipereno	55
Figura 23 – Espectro de massas do (<i>E</i>)-cariofileno.....	55
Figura 24 – Espectro de massas do β -copaeno	55
Figura 25 – Espectro de massas do α - <i>trans</i> -bergamoteno.....	56
Figura 26 – Espectro de massas do allo-aromadendreno.....	56
Figura 27 – Espectro de massas do β -selineno	56
Figura 28 – Espectro de massas do α -muuroleno.....	56
Figura 29 – Espectro de massas do γ -cadineno.....	57
Figura 30 – Espectro de massas do espatulenol.....	57
Figura 31 – Espectro de massas do óxido de cariofileno.....	57
Figura 32 – Espectro de massas do epóxido de humuleno II.....	57

Figura 33 – Espectro de massas do α -cadinol.....	58
Figura 34 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-1	66
Figura 35 – Espectro de RMN ^1H de BP-1 (300 MHz, CDCl_3).....	66
Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-1 (75 MHz, CDCl_3)	67
Figura 37 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-1 (75 MHz, CDCl_3).....	67
Figura 38 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC de BP-1 (300 x 75 MHz, CDCl_3).....	68
Figura 39 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H – COSY de BP-1 (300 MHz, CDCl_3)	68
Figura 40 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HMBC de BP-1 (300 x 75 MHz, CDCl_3).....	69
Figura 41 – Unidade estrutural de BP-1	63
Figura 42 – Espectro de massas (i.e 70 eV) de BP-1a e BP-1b	69
Figura 43 – Estruturas de BP-1a (taraxerona) e de BP-1b (β -amirenona).....	62
Figura 44 – Fragmentos propostos para os principais picos observados no espectro de massas de taraxerona (BP-1a) e β -amirenona (BP-1b).....	63
Figura 45 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-2	75
Figura 46 – Espectro de RMN ^1H de BP-2 (300 MHz, CD_3OD).....	75
Figura 47 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-2 (75 MHz, CD_3OD).....	76
Figura 48 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-2 (75 MHz, CD_3OD).....	76
Figura 49 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC de BP-2 (300 x 75 MHz, CD_3OD).....	77
Figura 50 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H – COSY de BP-2 (300 MHz, CD_3OD)	77
Figura 51 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HMBC de BP-2 (300 x 75 MHz, CD_3OD).....	78
Figura 52 – Unidade estrutural (A) de BP-2.....	72
Figura 53 – Unidade estrutural (B) de BP-2.....	72
Figura 54 – Estrutura de BP-2.....	73
Figura 55 – Estrutura do (+)-3',4'-diidroxifenil-cromano-7-ol	73
Figura 56 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-3	85
Figura 57 – Espectro de RMN ^1H de BP-3 (300 MHz, CD_3OD).....	85
Figura 58 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-3 (75 MHz, CD_3OD).....	86
Figura 59 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-3 (75 MHz, CD_3OD).....	86

Figura 60 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-3 (300 x 75 MHz, CD_3OD).....	87
Figura 61 – Unidade estrutural (A) de BP-3.....	80
Figura 62 – Unidade estrutural (B) de BP-3.....	81
Figura 63 – Unidade estrutural (C) de BP-3.....	81
Figura 64 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-3 (300 MHz, CD_3OD).....	87
Figura 65 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-3 (300 x 75 MHz, CD_3OD).....	88
Figura 66 – Estrutura de BP-3.....	82
Figura 67 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY de BP-3 (300 MHz, CD_3OD).....	89
Figura 68 – Estrutura de BP-3 e as correlações do NOESY.....	83
Figura 69 – Estrutura do (-)-fisetinidol.....	83
Figura 70 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-4.....	95
Figura 71 – Espectro de RMN ^1H de BP-4 (500 MHz, CD_3OD).....	95
Figura 72 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-4 (125 MHz, CD_3OD).....	96
Figura 73 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-4 (125 MHz, CD_3OD).....	96
Figura 74 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-4 (500 MHz, CD_3OD).....	97
Figura 75 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-4 (500 MHz x 125 MHz, CD_3OD).....	97
Figura 76 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-4 (500 x 125 MHz, CD_3OD).....	98
Figura 77 – Unidade estrutural (A) de BP-4.....	91
Figura 78 – Unidade estrutural (B) de BP-4.....	92
Figura 79 – Unidade estrutural (C) de BP-4.....	92
Figura 80 – Estrutura de BP-4.....	93
Figura 81 – Representação conformacional do anel C.....	93
Figura 82 – Estrutura da (+)-epicatequina.....	94
Figura 83 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – NOESY de BP-4 (500 MHz, CD_3OD).....	99
Figura 84 – Estrutura de BP-4 e as correlações do NOESY.....	94
Figura 85 – Espectro de RMN ^1H de BP-5 (500 MHz, CDCl_3).....	102

Figura 86 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-5 (125 MHz, CDCl_3).....	102
Figura 87 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-5 (125 MHz, CDCl_3)	103
Figura 88 – Estruturas dos componentes da mistura (sitosterol + estigmasterol).....	101
Figura 89 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-6	108
Figura 90 – Espectro de RMN ^1H de BP-6 (300 MHz, CDCl_3).....	108
Figura 91 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-6 (75 MHz, CDCl_3)	109
Figura 92 – Espectros RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-6 (75 MHz, CDCl_3)	109
Figura 93 – Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-6 (300 MHz, CDCl_3)	110
Figura 94 – Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-6 (300 x 75 MHz, CDCl_3).....	110
Figura 95 – Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-6 (300 x 75 MHz, CDCl_3).....	111
Figura 96 – Unidade estrutural (A) de BP-6.....	105
Figura 97 – Unidade estrutural (B) de BP-6.....	106
Figura 98 – Unidade estrutural (C) de BP-6.....	106
Figura 99 – Estrutura de BP-6.....	107
Figura 100 – Estrutura química do Temephos [®]	112
Figura 101 – Conversão do sal MTT em Azul de Formazan.....	113
Figura 102 – Estrutura química da Doxorubicina	113
Figura 103 – Foto com as coordenadas geográficas.....	116
Figura 104 – À esquerda, sistema de hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger. À direita, separação do óleo essencial e do hidrolato no doseador.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos derivados de plantas para o tratamento do câncer	22
Tabela 2 – Estruturas dos metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Bauhinia</i>	32
Tabela 3 – Espécies de <i>Bauhinia</i> com seus respectivos metabólitos secundários isolados.....	46
Tabela 4 – Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Bauhinia pulchella</i>	50
Tabela 5 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-1 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°	60
Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-1a comparados com dados da literatura descritos na literatura (HERNANDES-CHAVEZ <i>et al.</i> , 2012; BATES <i>et al.</i> ,1998) para taraxerona (CDCl ₃)	64
Tabela 7 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-1b comparados com dados da literatura descritos na literatura (DE CARVALHO <i>et al.</i> , 1998; MARNER; FREYER; LEX,1991) para β -amirenona (CDCl ₃).....	65
Tabela 8 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-2 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°	71
Tabela 9 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-2 (3',4'-diidroxifenil-cromano-7-ol) (CD ₃ OD).....	74
Tabela 10 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-3 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°	80
Tabela 11 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-3 comparados com dados da literatura descritos na literatura (IMAI <i>et al.</i> , 2008) para (-)-fisetinidol (CD ₃ OD)	84
Tabela 12 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-4 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°	91
Tabela 13 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-4 comparados com dados da literatura descritos na literatura (BALDÉ <i>et al.</i> , 1991; MARTIN <i>et al.</i> , 2000) para (+)-epicatequina	94
Tabela 14 – Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C de BP-5 comparados com os dados descritos na literatura (FACUNDO <i>et al.</i> ,2008) para sitosterol e estigmasterol (CDCl ₃).	101
Tabela 15 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-6 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°	105

Tabela 16 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-6 comparados com dados descritos na literatura (TAKASUGI <i>et al.</i> , 1987; GOIS, 2014) para 2-hidróxi-3',5'-dimetoxibenzila (CDCl ₃)	107
Tabela 17 – Valores de CI ₅₀ e intervalos de confiança 95% do óleo essencial das folhas de <i>B. pulchella</i> (OEBP).....	114
Tabela 18 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do EECBP.....	123
Tabela 19 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico do EECBP.....	124
Tabela 20 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (5-20).....	124
Tabela 21 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (5-20).....	125
Tabela 22 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (5-6).....	125
Tabela 23 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (5-6).....	126
Tabela 24 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (24-31).....	126
Tabela 25 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (24-31).....	127
Tabela 26 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (21-28).....	127
Tabela 27 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (21-28).....	128
Tabela 28 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (119-130).....	128
Tabela 29 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (119-130).....	128
Tabela 30 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (41-70).....	129
Tabela 31 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (41-70).....	129
Tabela 32 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (10).....	130
Tabela 33 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (10).....	130
Tabela 34 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (16-69).....	130
Tabela 35 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (16-69).....	131
Tabela 36 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (30-60).....	131
Tabela 37 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (30-60).....	131
Tabela 38 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (11-18).....	132
Tabela 39 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (11-18).....	132
Tabela 40 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (20-35).....	132
Tabela 41 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (20-35).....	133
Tabela 42 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (29-47).....	133
Tabela 43 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (29-47).....	133
Tabela 44 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (23-36).....	134

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Principais vias de produção dos metabólitos secundários.....	31
Fluxograma 2 – Etapas envolvidas na obtenção do OEBP.....	121
Fluxograma 3 – Etapas envolvendo desde a coleta do material vegetal até o isolamento de BP-1; BP-2; BP-3; BP-4; BP-5 e BP-6.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de Adenosina
BB	<i>Broad Band</i>
bcl-2	Gene bcl-2
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CL ₅₀	Concentração Letal de 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo Dupleto
DIC	Detector de Ionização por Chama
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DP	Desvio-Padrão
EECBP	Extrato Etanólico do Caule de <i>Bauhinia pulchella</i>
EM	Espectrometria de Massas
eV	Elétron-Volt
p53	Gene p53
GPS	<i>Global Positioning System</i>
HEP-2	Células de Adenoarcinoma de Cervical
HL60	Células de Leucemia Pró-mielocítica
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IK	Índice de Kovatz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MCF-7	Células de Adenocarcinoma de Mama
MHz	Mega hertz

MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCI-H292	Células de Carcinoma de Pulmão
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OEBP	Óleo Essencial de <i>Bauhinia pulchella</i>
PA	Para Análise
ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Tripleto
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFOB	Universidade Federal do Oeste da Bahia
UFS	Universidade Federal de Sergipe
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento Químico
ϕ	Diâmetro
L	Comprimento
$[\alpha]_D^T$	Rotação Óptica Específica
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	O câncer e a atividade citotóxica	21
1.2	A dengue e os insetos multirresistentes	22
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	23
2.1	A família Fabaceae	23
2.2	A subfamília Caesalpinioideae	24
2.3	O gênero <i>Bauhinia</i>	24
2.4	Considerações botânicas sobre a espécie <i>Bauhinia pulchella</i> Benth.	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	30
4.1	Metabolismo vegetal e a produção dos seus metabólitos	30
4.2	Levantamento dos constituintes químicos isolados do gênero <i>Bauhinia</i>	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Bauhinia pulchella</i>	48
5.2	Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de <i>Bauhinia pulchella</i>	59
5.2.1	Determinação estrutural de BP-1	59
5.2.2	Determinação estrutural de BP-2	70
5.2.3	Determinação estrutural de BP-3	79
5.2.4	Determinação estrutural de BP-4	90
5.2.5	Determinação estrutural de BP-5	100
5.2.6	Determinação estrutural de BP-6	104
5.3	Atividades biológicas	112
5.3.1	Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial das folhas de <i>Bauhinia pulchella</i> (OEBP) sobre <i>Aedes aegypti</i>	112
5.3.2	Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de <i>Bauhinia pulchella</i> (OEBP)	112
6	PARTE EXPERIMENTAL	116
6.1	Coleta do material vegetal	116

6.2	Métodos analíticos	117
6.2.1	Métodos cromatográficos	117
6.3	Análises espectroscópicas	117
6.3.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	117
6.3.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	118
6.3.3	Espectrometria de massa (EM)	118
6.3.4	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) e cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG/DIC)	118
6.4	Rotação óptica específica	118
6.5	Obtenção do óleo essencial das folhas de <i>Bauhinia pulchella</i>	120
6.6	Atividades biológicas	121
6.6.1	Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial das folhas de <i>Bauhinia pulchella</i> (OEBP) sobre <i>Aedes aegypti</i>	121
6.6.2	Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de <i>Bauhinia pulchella</i> (OEBP) sobre linhagens celulares tumorais	121
6.7	Estudo dos constituintes fixos de <i>Bauhinia pulchella</i>	123
6.7.1	Obtenção do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pulchella</i> Benth (EECBP)	123
6.7.2.1	Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pulchella</i> Benth (EECBP)	123
6.7.2.2	Fracionamento cromatográfico de EECBP (5-20)	124
6.7.2.3	Fracionamento cromatográfico de EECBP (5-6) e isolamento de BP-1	125
6.7.2.4	Fracionamento cromatográfico de EECBP (24-31)	126
6.7.2.5	Fracionamento cromatográfico de EECBP (21-28) e isolamento de BP-2	127
6.7.2.6	Fracionamento cromatográfico de EECBP (119-130)	128
6.7.2.7	Fracionamento cromatográfico de EECBP (41-70) e isolamento de BP-3 e BP-4	129
6.7.2.8	Fracionamento cromatográfico de EECBP (10)	130
6.7.2.9	Fracionamento cromatográfico de EECBP (16-69)	130
6.7.2.10	Fracionamento cromatográfico de EECBP (30-60) e isolamento de BP-5	131
6.7.2.11	Fracionamento cromatográfico de EECBP (11-18)	132
6.7.2.12	Fracionamento cromatográfico de EECBP (20-35)	132
6.7.2.13	Fracionamento cromatográfico de EECBP (29-47)	133

6.7.2.14	Fracionamento cromatográfico de EECBP (23-36) e isolamento de BP-6	134
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
	REFERÊNCIAS	138

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A história da sociedade é rodeada de lendas e mitos a respeito do uso de espécies vegetais na cura de determinadas doenças crônicas que assolavam a humanidade. A evolução tecnológica, juntamente com esse conhecimento popular, comumente chamado de etnofarmacologia, possibilitou o avanço nas pesquisas sobre plantas medicinais, como fonte de novas substâncias biologicamente ativas. Um grande passo dado pela humanidade, nessa perspectiva, é proveniente das civilizações chinesa e indiana, as quais podem ser consideradas uma das pioneiras no estudo dos efeitos do uso de determinadas plantas no combate de enfermidades (BRASIL, 2012).

O processo de globalização possibilitou uma proximidade maior entre diversas culturas, ocasionando pesquisas híbridas, referentes às análises dos constituintes químicos presentes nas “ervas” de cada região. Essa miscelânea de conhecimentos acarretou conhecimento sobre as atividades farmacológicas, possibilitando, dessa forma, uma expansão mercadológica da indústria farmacêutica, a qual possui em sua biblioteca, principalmente, estudos originados a partir de plantas medicinais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

O Brasil é um país com grande potencial para o desenvolvimento de produtos naturais devido à sua grande biodiversidade. Cerca de 20% do patrimônio genético do planeta está concentrada no nosso país, que contém um terço da flora mundial e este fato implica no aumento das pesquisas nesse ramo, observando-se que a química voltada para essa área apresenta uma quantidade acentuada de pesquisadores (JACOBSON *et al.*, 2005; THOMPSON; PASCALICCHIO, 2012).

Os fitoterápicos que, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº48 de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são definidos como medicamentos obtidos unicamente de matérias-primas vegetais, tendo eficácia comprovada e que não apresentam substâncias ativas isoladas em suas composições (BRASIL, 2004); ocupam um espaço bastante vasto no mercado global, o qual vem se ampliando com o tempo, chegando a um valor aproximado de 26 bilhões de dólares. É válido salientar que o Brasil apresenta uma pequena representação nesse montante, chegando a 1,1 bilhão de dólares, uma relação inversa ao potencial que o país dispõe em recursos na área (ALVES, 2013).

O mercado desse ramo vem se desenvolvendo ainda mais com a queda do crescimento envolvido na produção de fármacos de origem sintética. Um dos grandes problemas nessa forma de produção de medicamentos está relacionado com o alto investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação. O custo total de produção de um

novo medicamento de origem sintética é de aproximadamente um bilhão de dólares e com o passar do tempo esses valores vem aumentando, devido ao menor número de moléculas aprovadas (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008). Os custos para o desenvolvimento dos medicamentos derivados de plantas são bem menores e cada vez mais, são descobertas novas aplicações para esses produtos, sendo, portanto, de grande interesse para o mercado (ALVES, 2013).

Flavonoides, terpenos e alcaloides, são estudados com ênfase, uma vez que são observadas diversas atividades biológicas e/ou farmacológicas para estas classes de substâncias. Dentre as atividades relevantes relatadas para representantes dessas classes de metabólitos secundários, pode-se destacar a atividade analgésica da morfina isolada de *Papaver somniferum*, e a atividade antitumoral do taxol e da vincristina, isolados de *Taxus brevifolia* (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) e de *Catharanthus roseus* (CORRÊA, 1995), respectivamente.

As plantas do gênero *Bauhinia*, que pertencem à família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae, são popularmente conhecidas como “pata-de-vaca” ou “mororó”. Suas utilizações na medicina popular abrangem diversas enfermidades tais como diabetes, infecções, dor e inflamação. São também relatadas na literatura atividades antitumoral, antipirética, antioxidante e antimalárica para espécies deste gênero (CECHINEL FILHO, 2009). As espécies deste gênero apresentam terpenos, esteroides, alcaloides e principalmente flavonoides em suas composições químicas (MALI; MAHAJAN; MEHTA, 2007).

1.1 O câncer e a atividade citotóxica

A alteração dos mecanismos de controle que mantêm a proliferação e diferenciação celular é caracterizada como a doença chamada câncer. O crescimento e a multiplicação das células em demasia formam tumores locais que podem migrar para outros locais que estão normais, sendo esse processo chamado de metástase, que pode vir acompanhado de disfunções metabólicas podendo causar a morte. As causas do câncer estão envolvidas com diversos fatores, tais como sexo, raça, idade, predisposição genética e exposição a agentes carcinogênicos, como tabaco, exposição às irradiações ionizantes e benzeno, dentre outros (DANAEI *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo o desenvolvimento de novos fármacos contra o câncer partem, normalmente, do planejamento racional e pela triagem empírica. Segundo Newman e Cragg (2012), no período de 1981 a 2010, do total de novos fármacos anticâncer utilizados na

terapêutica (n = 175), 80% (n = 131) tinham como origem os produtos naturais ou compostos sintéticos ou semissintéticos, baseados em produtos naturais. Assim, apenas 20% destas moléculas podem ser consideradas sintéticas, ou seja, que não possuem nenhum tipo de inspiração em produto natural. Desta forma, a busca por novas terapias para esta enfermidade torna-se algo indispensável ao modo de vida atual, sendo as plantas certamente ricas fontes de novos fármacos para o tratamento e prevenção do câncer (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Uma classe de metabólitos secundários que são bastante utilizadas para o tratamento do câncer são os alcaloides, dos quais pode-se citar como exemplo, vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus* e que inibem a polimerização da tubulina, impedindo a divisão celular, ocasionando a morte celular. Outras substâncias semissintéticas como vinorelbina, etopósido, tenipósido são derivadas de produtos naturais com propriedades farmacológicas distintas (TABELA 1) (KATZUNG, 2010).

Tabela 1 – Fármacos derivados de plantas para o tratamento do câncer

Fármaco	Local de ação	Indicações	Fonte vegetal
Vimblastina Vincristina Vindesina Vinorelbina	Tubulina/Microtúbulos	Leucemia linfoblástica Doença de Hodgkin	<i>Cantharanthus roseus</i>
Paclitaxel Docetaxel	Tubulina/Microtúbulos	Câncer de mama	<i>Taxus brevifolia</i>
Podofilotoxina Etopósido Tenipósido	Topoisomerase II	Câncer de ovário	<i>Podophyllum peltatum</i>
Camptotecinas Topotecana Irinotecana	Topoisomerase I	Câncer de pulmão	<i>Camptotheca acuminata</i>

Fonte: Katzung (2010)

1.2 A dengue e os insetos multirresistentes

Mosquitos são importantes vetores de alguns arbovírus, protozoários e helmintos. Eles podem transmitir muitas doenças tais como dengue, febre amarela e malária, que causam sérios problemas de saúde ao homem e introduzem obstáculos socioeconômicos aos países em desenvolvimento, particularmente nas regiões tropicais (SENTHILKUMAR; KANATHASAN; VENKATESALU, 2008).

Aedes aegypti L. (Culicidae) é o principal responsável na transmissão da dengue e também pode ser transmissora da febre amarela urbana (POLSON *et al.*, 2011). A dengue é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema prioritário de saúde pública no Brasil. É causada por quatro variedades de flavivírus. A transmissão deste mal entre os seres humanos ocorre através da picada de um mosquito infectado, mais frequentemente uma fêmea de *Aedes aegypti* (BIANCO *et al.*, 2013).

Com a resistência do *Aedes aegypti* aos agentes de combate utilizados e os riscos presentes na contaminação pela dengue, uma vez que não existe vacina e uma das maneiras de solucionar a disseminação dessa doença seria na erradicação do mosquito transmissor, a pesquisa relacionada com espécies vegetais se torna uma alternativa para a descoberta de novas moléculas com atividades inseticida, repelente, larvicida e que alterem o seu crescimento. Dados relatados na literatura mostram que alguns produtos naturais de origem vegetal tem ação específica sobre o vetor e não causam desordem no meio ambiente (SUNDARAM, 1996; GUPTA, 2004). Também é relatado o uso de extratos vegetais (GUISSONI *et al.*, 2013) e óleos essenciais (NEVES *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2014) no combate às larvas de *Aedes aegypti*.

A partir de pesquisas bibliográficas realizadas no *SciFinder*[®], observou-se a ausência de estudos químicos e/ou biológicos sobre *Bauhinia pulchella* Benth. (Fig. 1, p. 26; Fig. 2, p. 26) e esta observação serviu como estímulo para realizar o estudo químico da espécie.

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 A família Fabaceae

Espécies da família Fabaceae (Leguminosae) estão presentes em diversas partes do globo terrestre, sendo localizadas com mais frequência nas regiões tropicais e subtropicais e a partir do afastamento da linha do equador, a quantidade e diversidade de representantes dessa família tende a diminuir (DA COSTA, 2012).

Sua catalogação no mundo apresenta 727 gêneros e 19.325 espécies, constando no Brasil na faixa de 188 gêneros e 2500 espécies (LEWIS *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2010). É considerada uma das maiores famílias de Angiospermas e é dividida em três subfamílias: Faboideae (Papilionoideae), Mimosoideae e Caesalpinioideae, sendo comumente encontrada na caatinga (QUEIROZ, 2009).

2.2 A subfamília Caesalpinioideae

É considerada a segunda maior subfamília da família Fabaceae, apresentando 172 gêneros e em torno de 2.250 espécies difundidas pelo globo (LEWIS *et al.*, 2005). Sua principal característica morfológica consiste na presença quase exclusiva de folhas pinadas ou bipinadas.

Suas flores tetrâmeras ou pentâmeras com pétalas livres, sendo que as laterais adjacentes sobrepõem à adaxial, quando essa constitui o vegetal, zigomorfa e hermafrodita. O legume representa o fruto da maioria das suas espécies com as sementes e não constituem ranhura hilar, contendo radícula reta. Sua estrutura é definida como uma trepadeira e raízes nodulares (POLHILL; RAVEN, 1981).

2.3 O gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* está presente na região tropical de todos os continentes, por isso é considerado como pantropical e apresenta em torno de 300 espécies (VAZ; TOZZI, 2003). As espécies desse gênero apresentam estrutura ereta, como ramificações que auxiliam no suporte do vegetal e têm as folhas que apresentam uma característica peculiar acerca do seu formato que é bilobulada, devido ao desenvolvimento parcial de dois folíolos, por isso, as espécies desse gênero são popularmente conhecidas como “pata-de-vaca”, “unha-de-vaca”, “unha-de-boi”, “casco-de-vaca”, “pata-de-boi”, “unha-de-boi-de-espinho” e “pata-de-toro” (COSTA, 1942; CORREA, 1984).

2.4 Considerações botânicas sobre a espécie *Bauhinia pulchella* Benth

A espécie *Bauhinia pulchella* Benth, segundo Vaz e Tozzi (2003, p. 118-119), apresenta-se como:

Arvoreta ou arbusto. Entrenó distal 0,5-1,5 cm comprimento. Folhas bilobadas, lâmina 1-5,1 x 1,2-6 cm [...] Base emarginada (subcordada) até cordada, 7-nérvea, nervura marginal aplanada, lobos acrescidos em mais de 3/4, raramente 1/2 do comprimento total [...] Estípulas rudimentares, submilimétricas; nectários extraflorais subuliformes, 0,5-1,0 mm compr., ou rudimentares e geralmente encobertos pelas estípulas [...] Inflorescência até 15 cm compr., curto-pedunculada; pedúnculo 0,5-1,5 cm compr.; eixo racemiforme, delgado, tenuemente rufo-tomentelo; inflorescências parciais 2-floras; folhas subopositifolias, lâmina 0,7-2 x 0,6-1,6 cm [...] Botões 10-12 x 0,2-0,3 cm na antese, lineares, ápice 5-reentrante-agudo, 5-subcostados a lisos, enérveos, canos-tomentelos, com tricomas glandulares numerosos e apessos [...] Flores com pedicelo 0,9-1 cm compr., bractéolas escamiformes, submilimétricas, hipanto cilíndrico, 1,1-1,3 x 0,4-0,7 cm, internamente irregular seríceo-tomentoso na região distal; cálice fendido na antese em 3-5, lobos reflexos, ondulados a retorcidos, 3,5-5,7 cm compr.; pétalas lineares, ápice agudo, 2 x 0,05-0,1 cm, externamente glabras; estaminódios 0, estames 10, anteras iguais, lineares, não loceladas, filetes 5-6 cm compr., filetes alternipétalos, internamente tomentosos, coluna estaminal presente, 8 mm altura máxima [...] Gineceu 8 cm compr., estigma claviforme, ovário tomentelo, com tricomas glandulares, estipe 4 cm compr., glabro [...] Legume deiscente, valvas 9-10-17 x 0,7-0,9 cm, pubérulo a glabro, estipe 2-4,5 cm compr.; lobos funiculares curto-emarginados. Sementes 5-8 x 3,5-5 mm (VAZ; TOZZI, 2003, p. 118-119).

Sua importância para a biodiversidade do Brasil é considerável, tendo em vista ser encontrada apenas nesse país, sendo, portanto, encontrada nos estados do Ceará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Bahia e Piauí da região Nordeste. Na região Centro-Oeste pode ser encontrada nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, chegando até o estado de Rondônia na região Norte (VAZ; TOZZI, 2003).

Figura 1 – Foto de um espécime de *Bauhinia pulchella* em São Benedito – CE



Fonte: Jarbas Lima de Carvalho (2013)

Figura 2 – Foto de um espécime de *Bauhinia pulchella* em São Benedito – CE



Fonte: Jarbas Lima de Carvalho (2013)

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Contribuir para o conhecimento químico e biológico de *Bauhinia pulchella*.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas de *B. pulchella*;
- Identificar e quantificar os constituintes químicos do óleo essencial;
- Preparar o extrato etanólico do caule de *B. pulchella*;
- Isolar e purificar, através de técnicas cromatográficas, os constituintes químicos do caule de *B. pulchella*;
- Determinar a estrutura dos compostos isolados através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas tais como IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C ;
- Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial sobre *Aedes aegypti*;
- Avaliar a atividade citotóxica do óleo essencial sobre as linhagens tumorais humanas HL-60 (leucemia pró-mielocítica), HEP-2 (adenocarcinoma cervical), NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), utilizando-se o teste do MTT.

**LEVANTAMENTO
BIBLIOGRÁFICO**

4 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

4.1 Metabolismo vegetal e a produção dos seus metabolitos

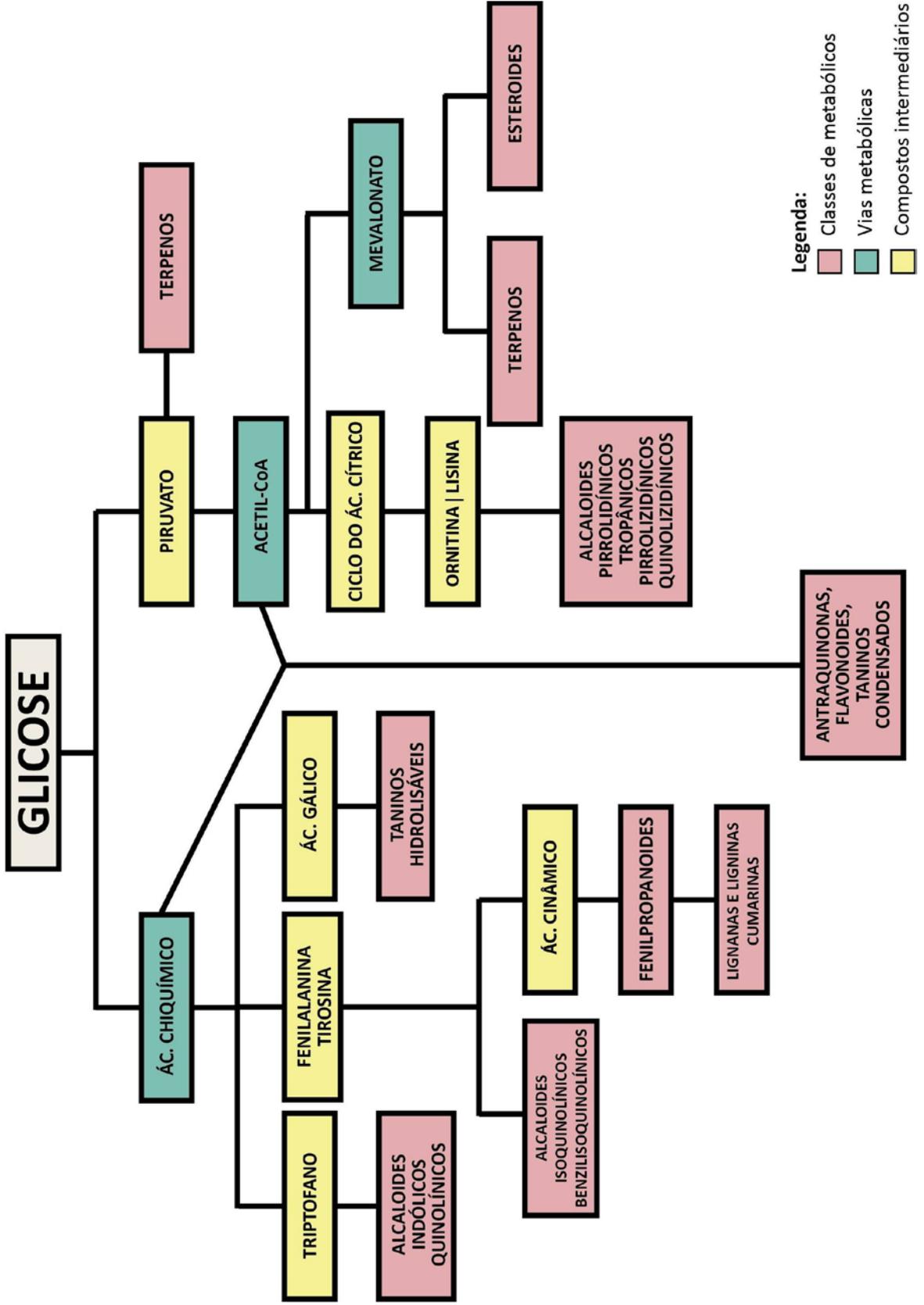
O desenvolvimento de qualquer ser vivo necessita de substâncias que forneçam energia para o seu crescimento, reprodução e que garantam a função adaptativa desse organismo. Dessa forma, ocorre, com este objetivo, a transformação de compostos orgânicos. No caso das plantas, essas substâncias são produzidas através do metabolismo vegetal, que é dividido em primário e secundário.

As macromoléculas produzidas no metabolismo primário, como os carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos são encontrados em grande escala e servem para as funções de desenvolvimento e crescimento vegetal, fornecendo energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina) que está envolvido diretamente na biossíntese das substâncias do metabolismo secundário. As micromoléculas oriundas do metabolismo secundário são responsáveis pela defesa do vegetal, favorecendo sua adaptação e pelas suas atividades biológicas. Algumas substâncias de diferentes classes podem nunca aparecer em um determinado vegetal, isto é, por não ter distribuição universal nos vegetais (DEWICK, 2009).

Os principais grupos de metabólitos secundários compreendem alcaloides, terpenos e compostos fenólicos. Os alcaloides são derivados dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, que são provenientes da via do ácido chiquímico e da ornitina e lisina. Por outro lado, os terpenos podem ser originados do piruvato, do 3-fosfoglicerato ou da via do ácido mevalônico e, por fim, os compostos fenólicos originam-se da via do ácido mevalônico ou da via do ácido chiquímico (DEWICK, 2009).

As principais vias metabólicas de produção desses metabólitos secundários estão representadas no Fluxograma 1, p. 31.

Fluxograma 1 - Principais vias de produção dos metabólitos secundários

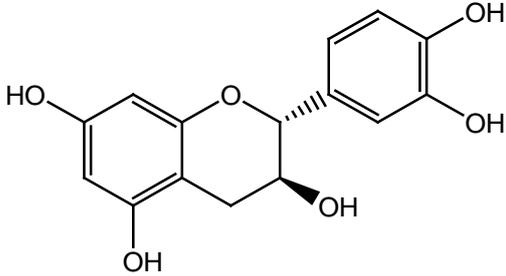
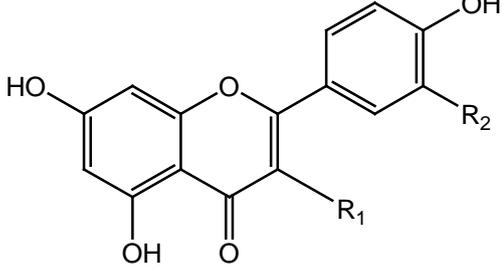
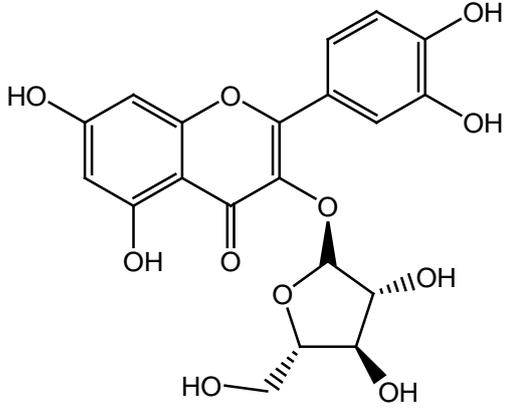
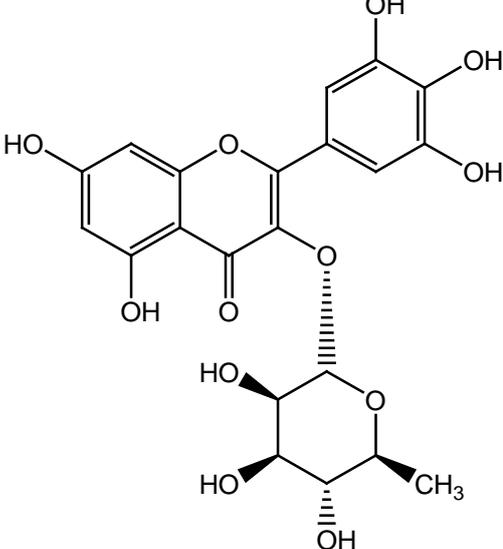


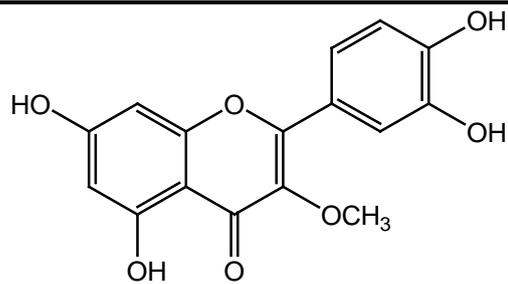
4.2 Levantamento bibliográfico sobre os constituintes químicos isolados do gênero *Bauhinia*

Visando adquirir um banco de dados atualizado que possa ser utilizado em futuras determinações estruturais de compostos isolados do gênero *Bauhinia*, realizou-se uma pesquisa bibliográfica no *Sci Finder*[®] abrangendo o período de 2009 até 2014. Essa pesquisa revelou que nos estudos químicos acerca das espécies desse gênero foram encontrados constituintes químicos das classes dos esteroides, triterpenos, ácidos graxos, derivados do ácido cinâmico, sendo os flavonóides os principais metabólitos secundários isolados.

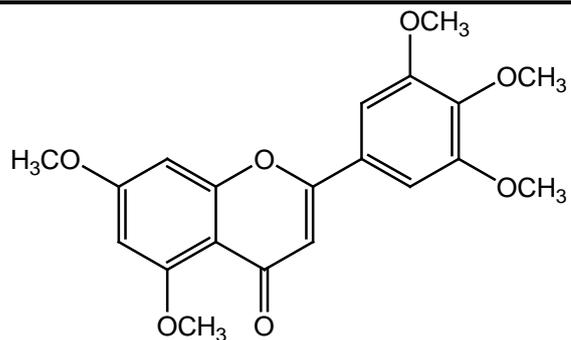
A Tabela 2 mostra as estruturas dos metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Bauhinia*, enquanto a Tabela 3 (p. 46) mostra as espécies de *Bauhinia*, os metabólitos secundários isolados e as referências bibliográficas.

Tabela 2 – Estruturas dos metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Bauhinia*

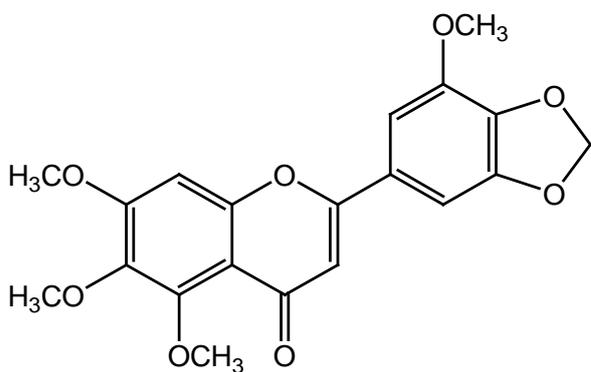
 <p style="text-align: center;">1</p>	 <p> 2 R₁ = OH; R₂ = OCH₃ 3 R₁ = OH; R₂ = OH 4 R₁ = H; R₂ = OH 5 R₁ = OH; R₂ = H 6 R₁ = H; R₂ = OCH₃ </p>
 <p style="text-align: center;">7</p>	 <p style="text-align: center;">8</p>



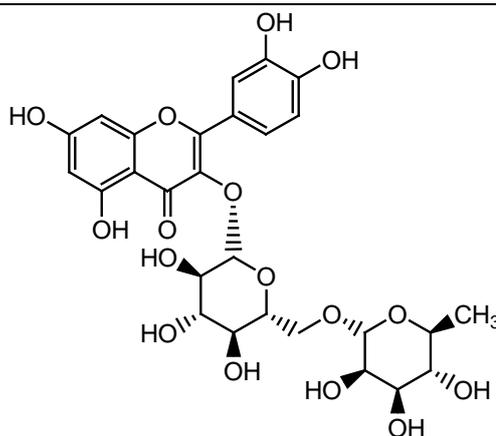
9



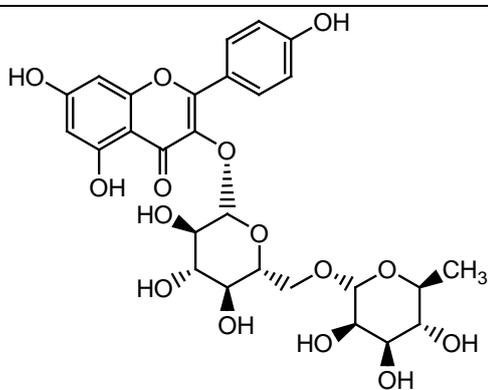
10



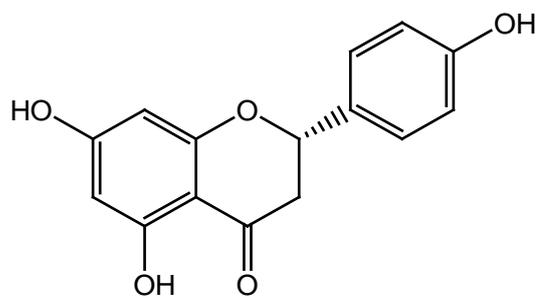
11



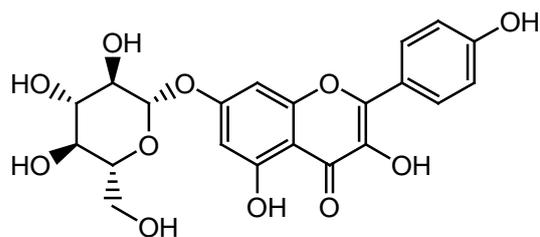
12



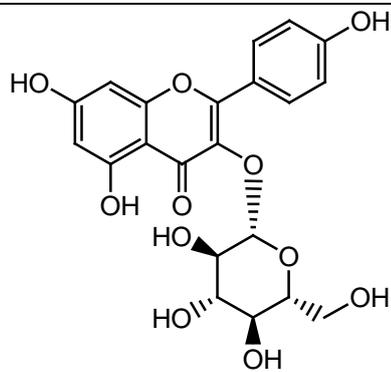
13



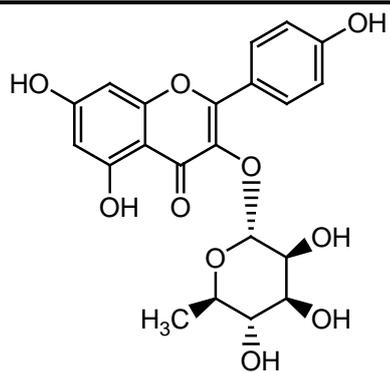
14



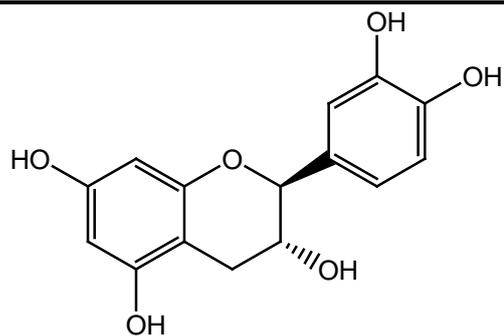
15



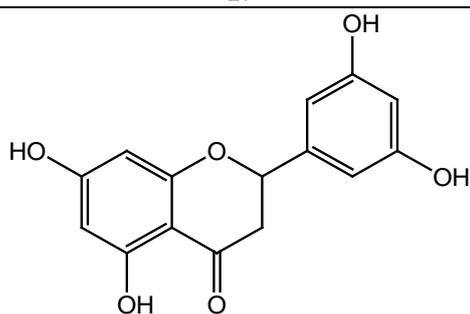
16



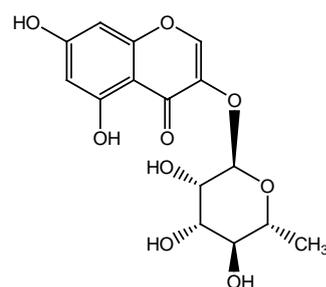
17



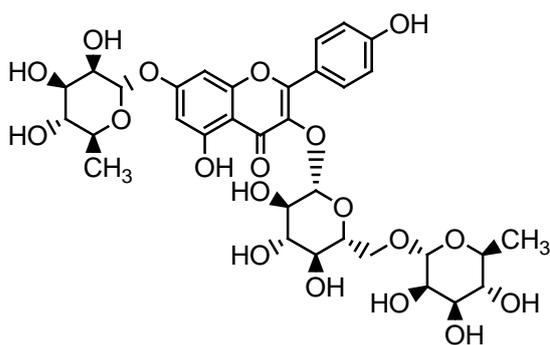
18



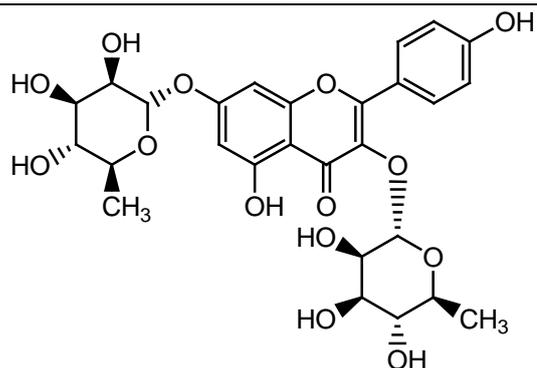
19



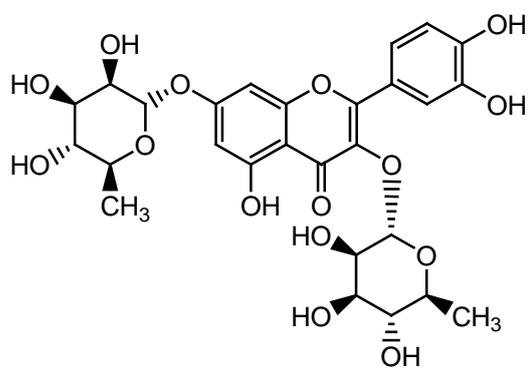
20



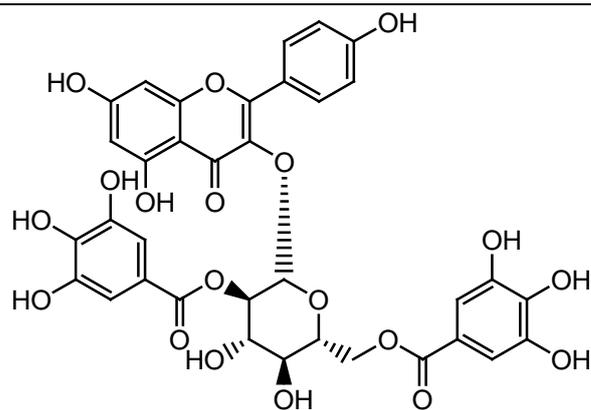
21



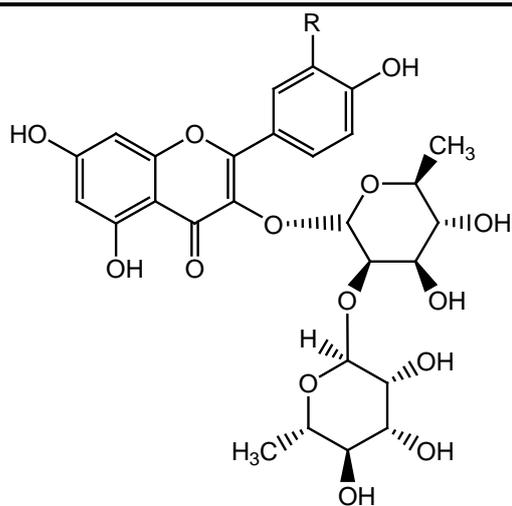
22



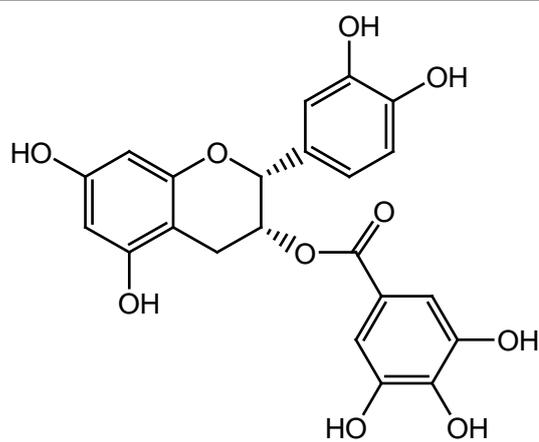
23



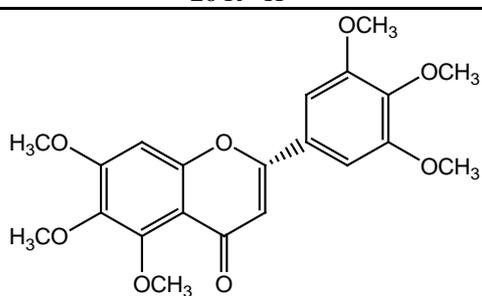
24



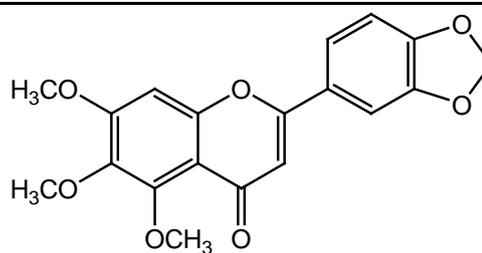
25 R= OH
26 R= H



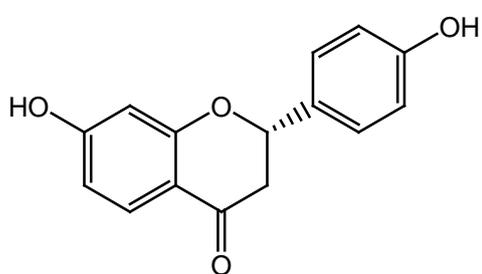
27



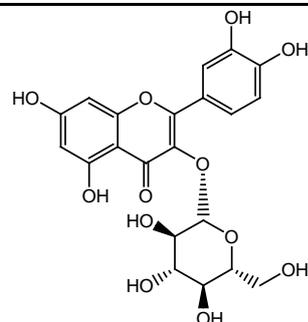
28



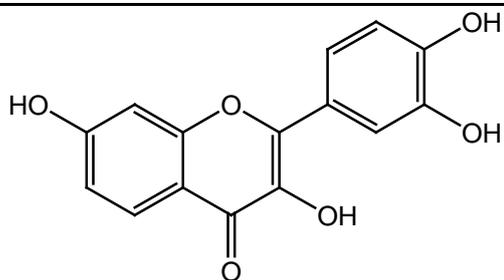
29



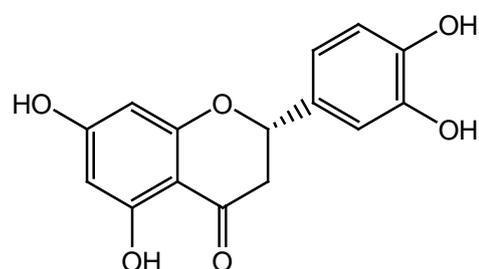
30



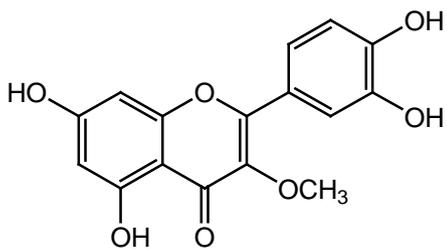
31



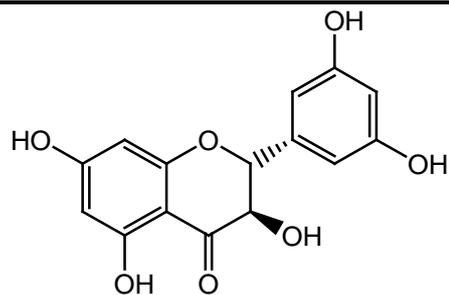
32



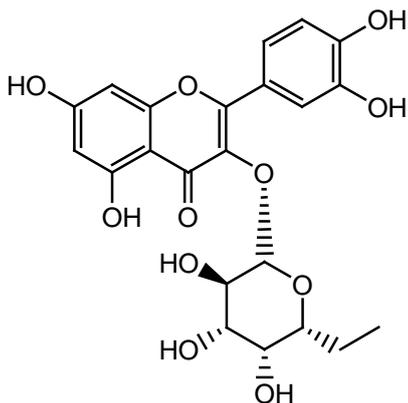
33



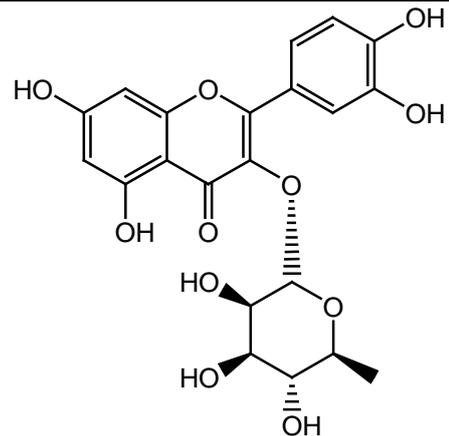
34



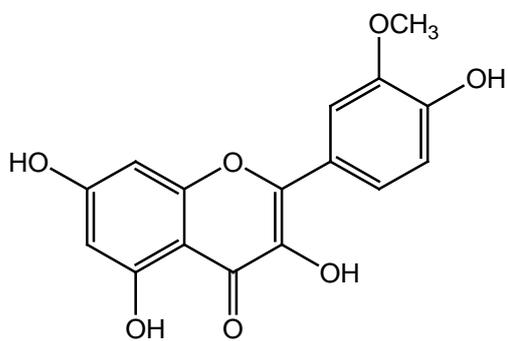
35



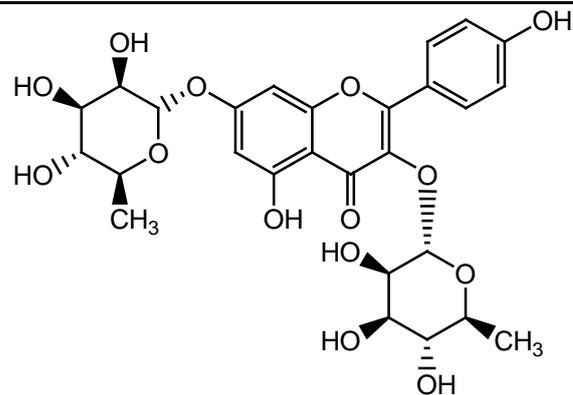
36



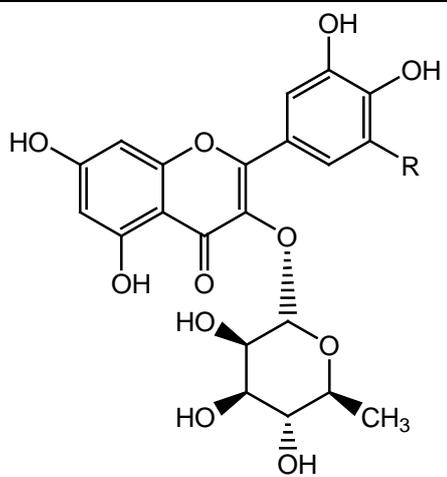
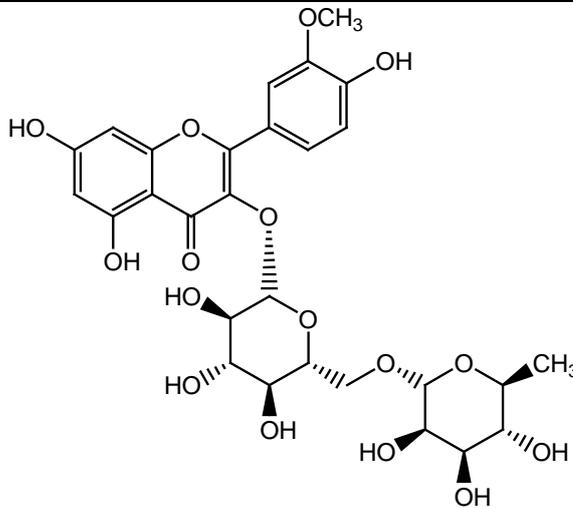
37



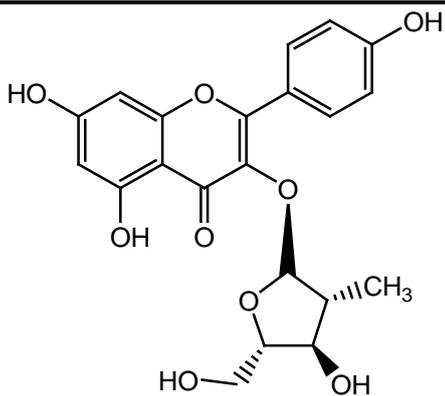
38



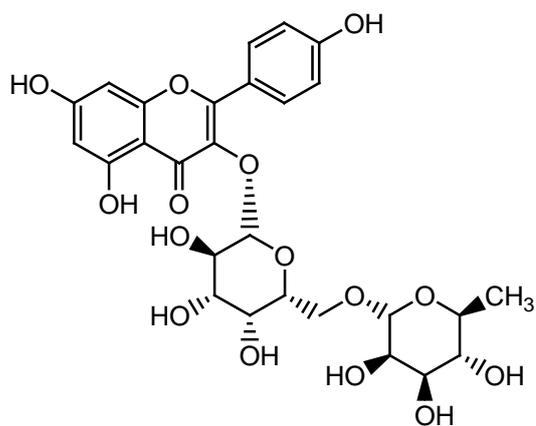
39

40 R= H
41 R= OH

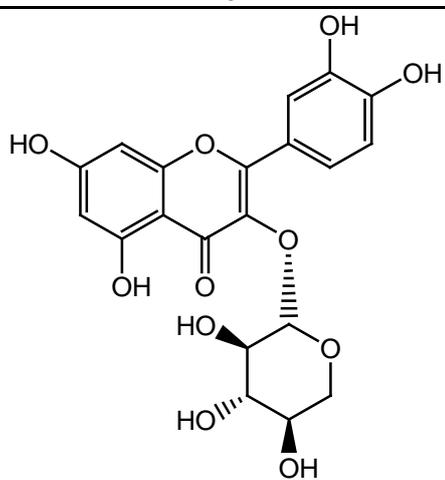
42



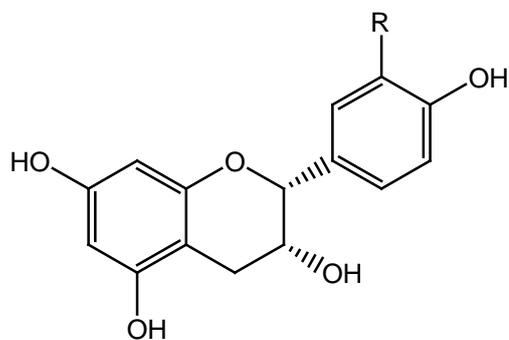
43



44

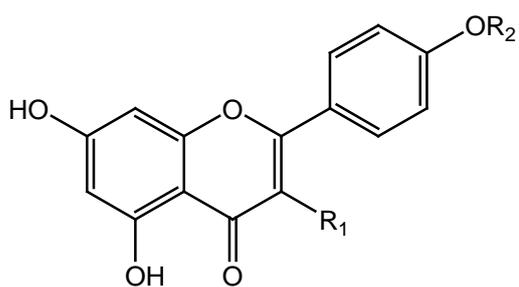
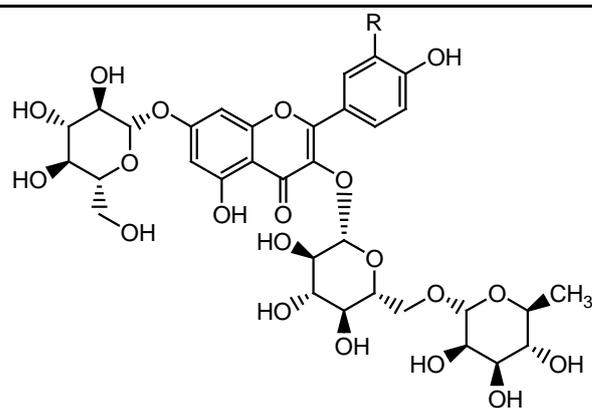


45



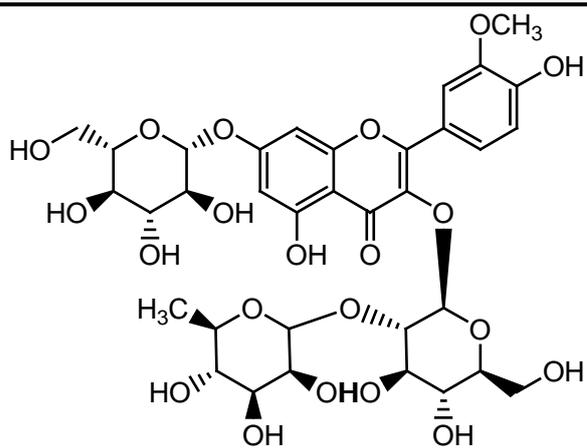
46 R = OH

47 R = H

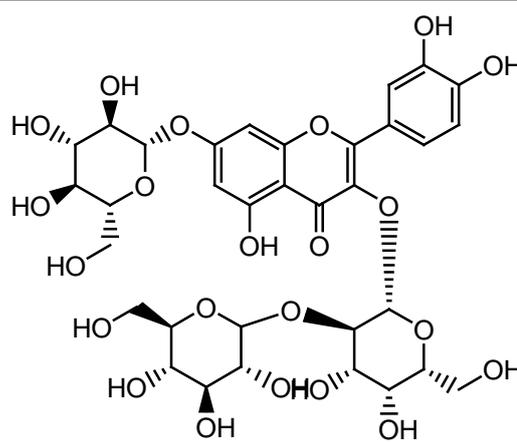
48 R₁ = OH; R₂ = CH₃49 R₁ = H; R₂ = H

50 R = OH

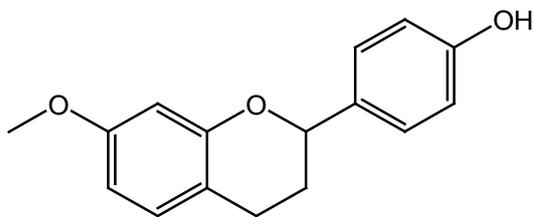
51 R = H



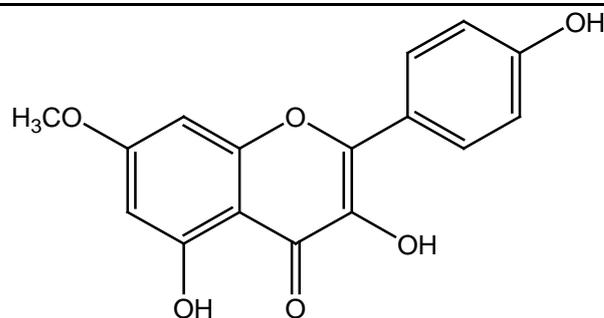
52



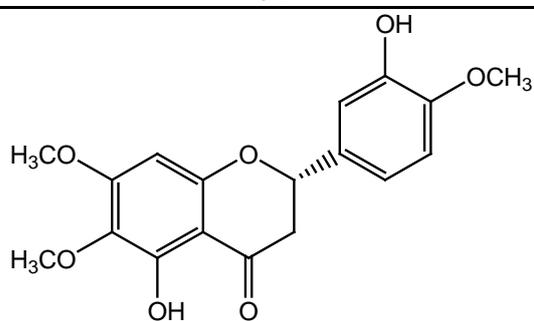
53



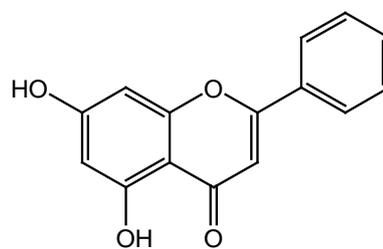
54



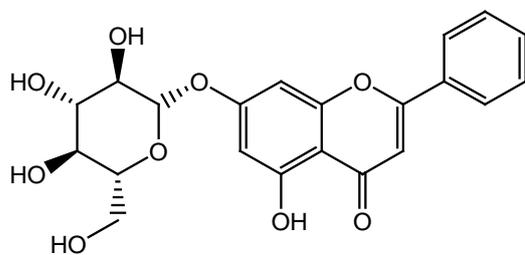
55



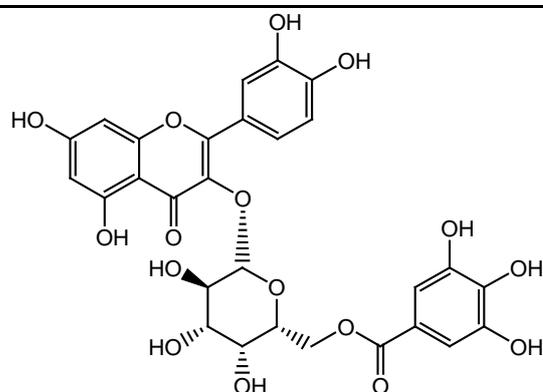
56



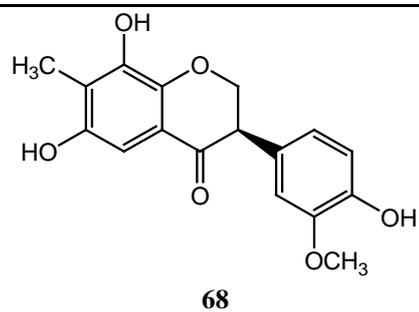
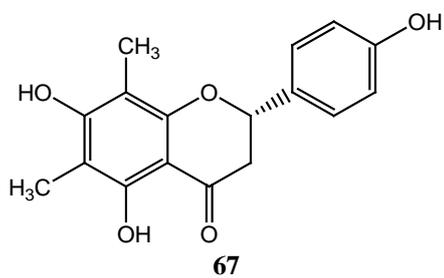
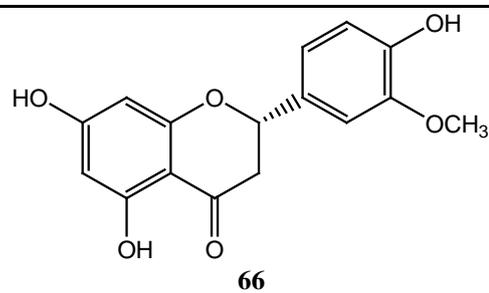
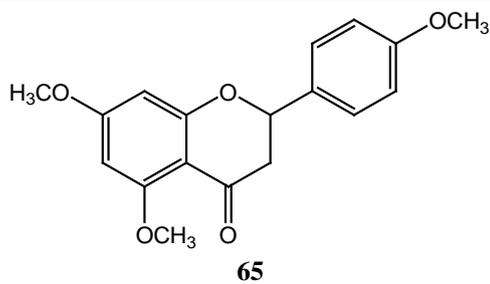
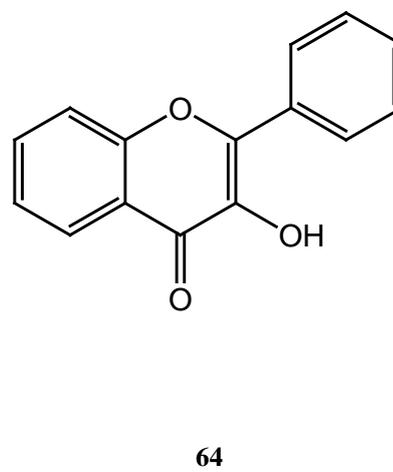
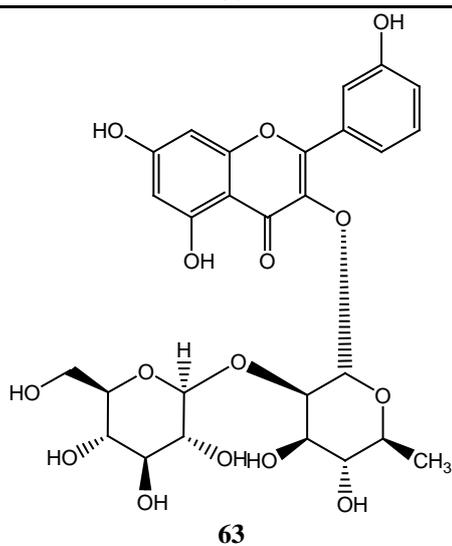
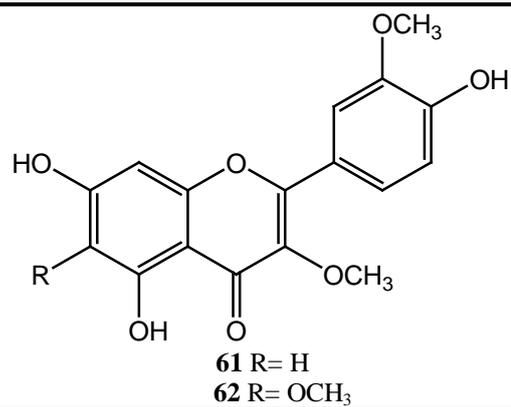
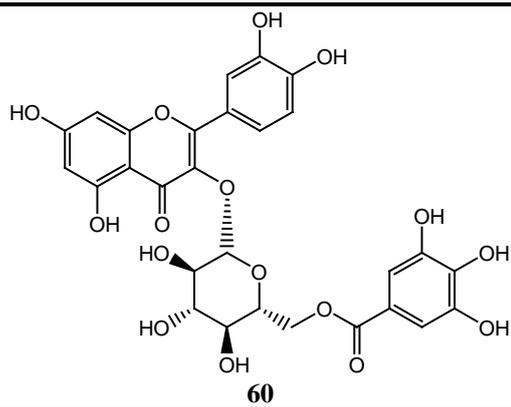
57

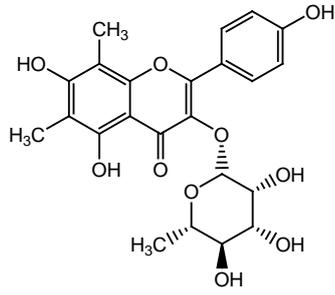


58

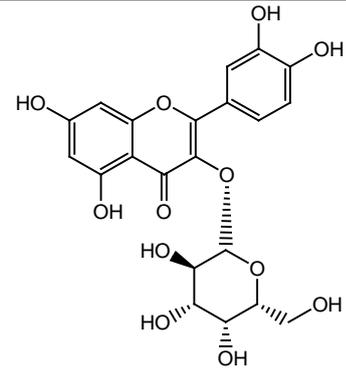


59

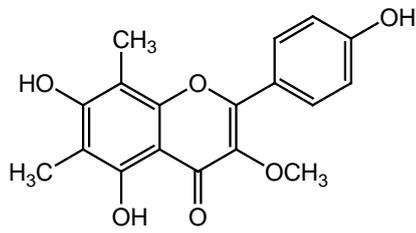




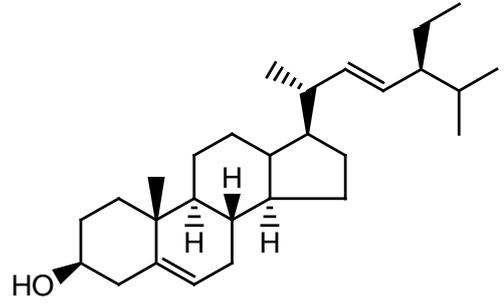
69



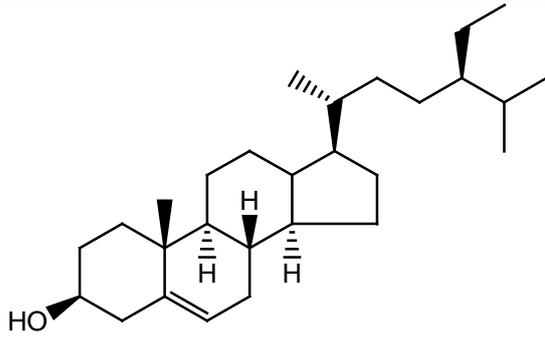
70



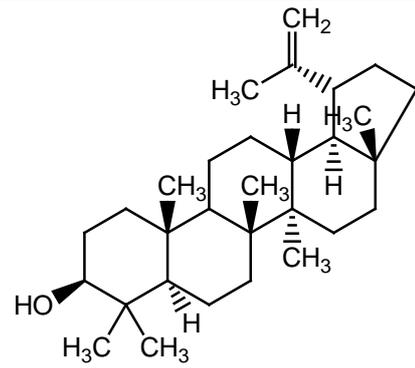
71



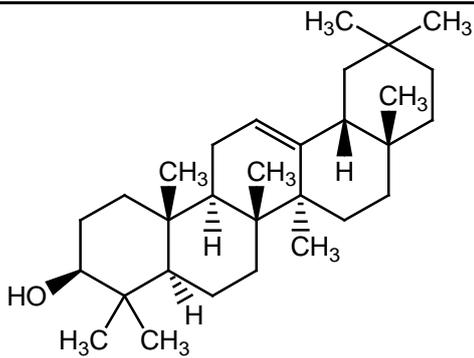
72



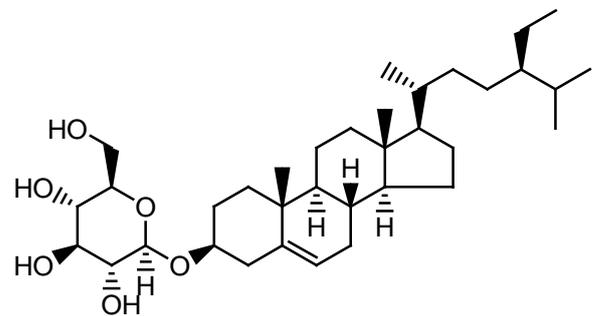
73



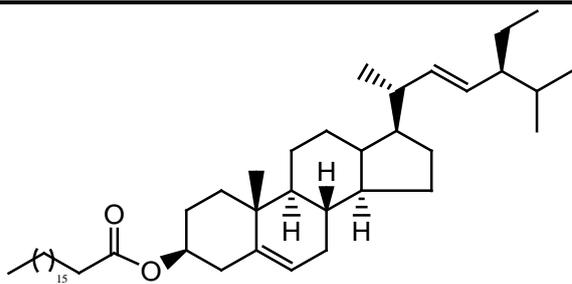
74



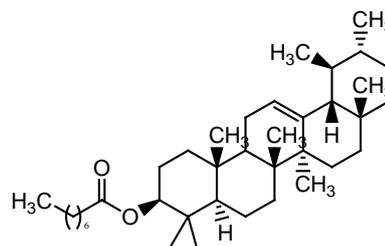
75



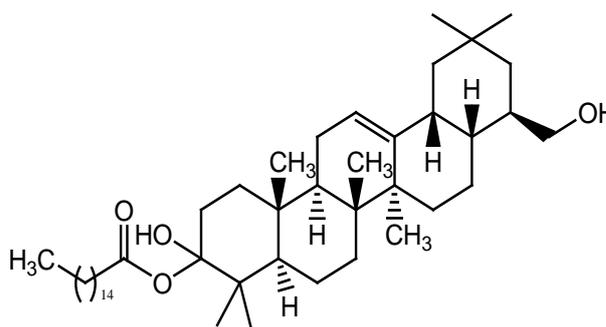
76



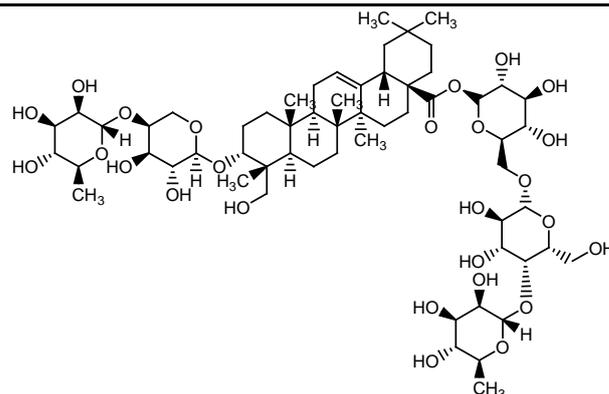
77



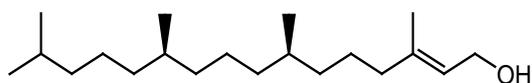
78



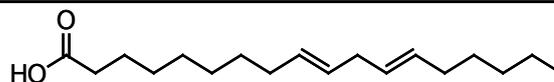
79



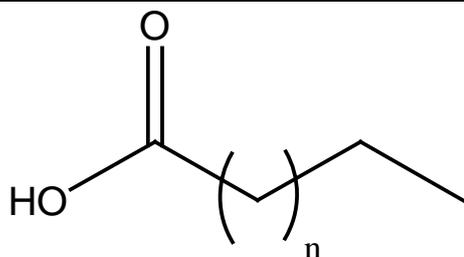
80



81



82

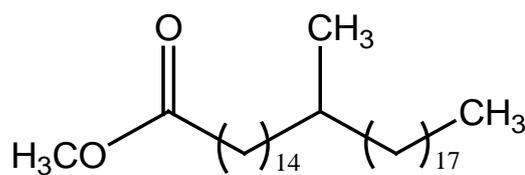


83 n = 13

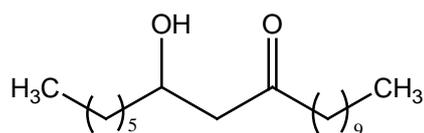
84 n = 15

85 n = 11

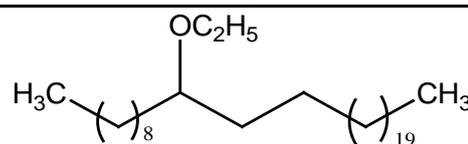
86 n = 17



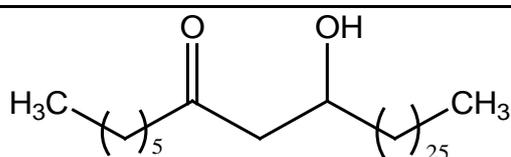
87



88



89

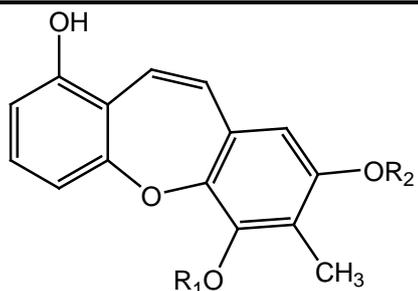


90

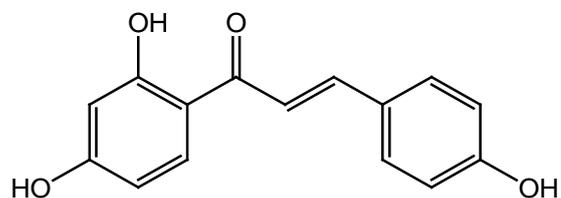


91 n = 21

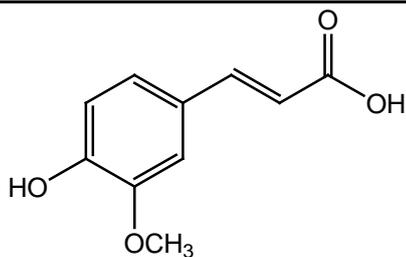
92 n = 27



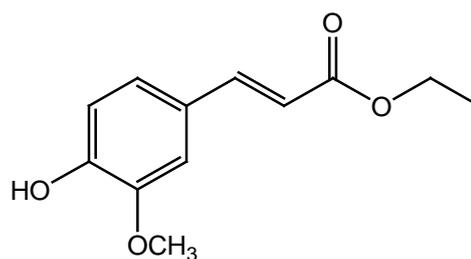
93 $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$
94 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



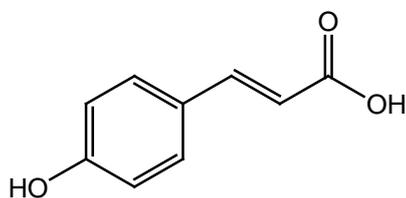
95



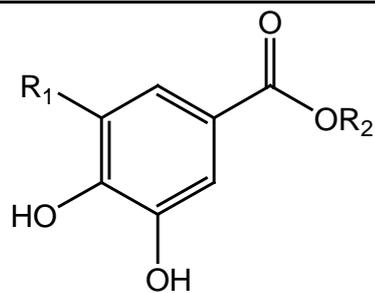
96



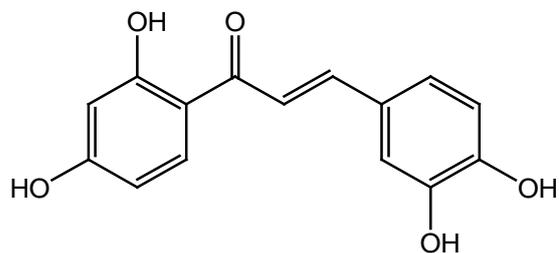
97



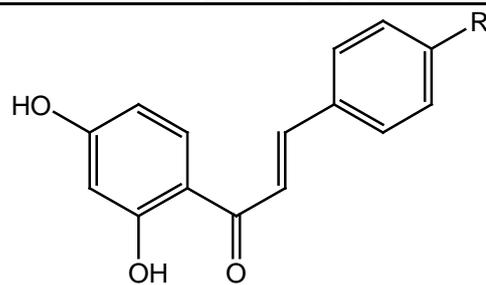
98



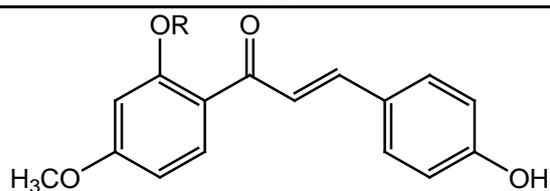
99 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$
100 $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{CH}_3$
101 $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$



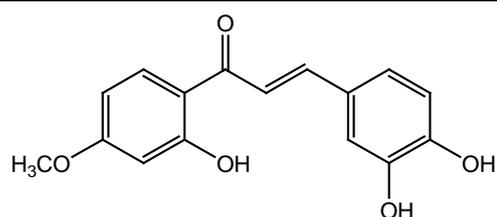
102



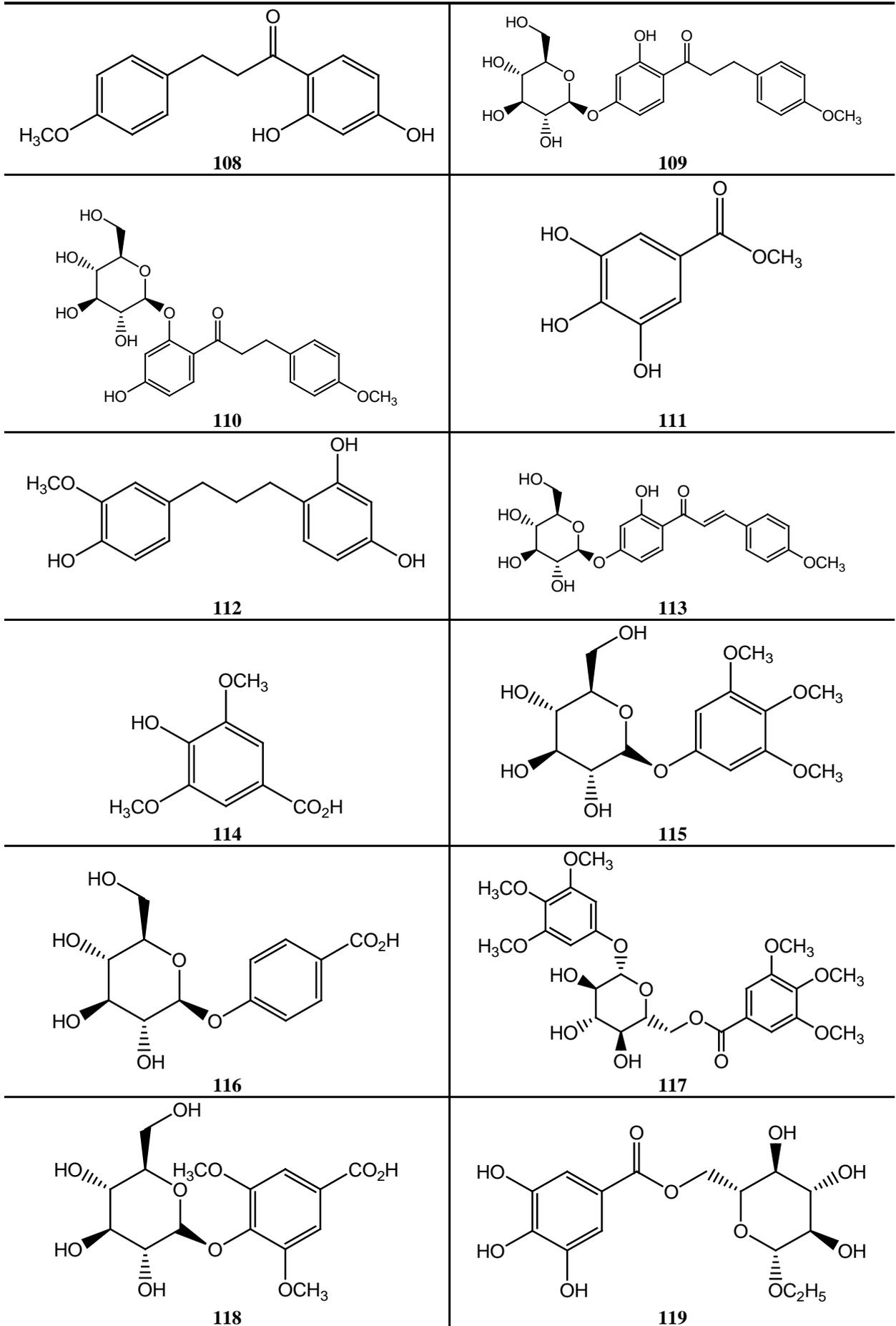
103 $R = \text{H}$
104 $R = \text{OCH}_3$

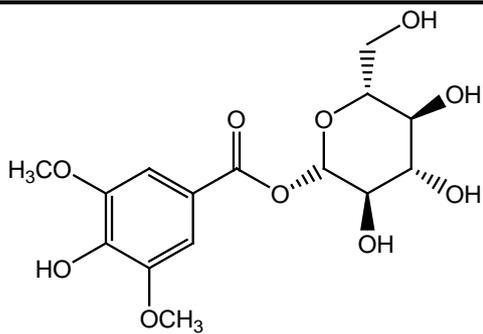


105 $R = \text{H}$
106 $R = \text{CH}_3$

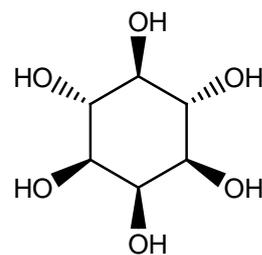


107

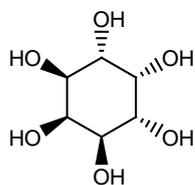




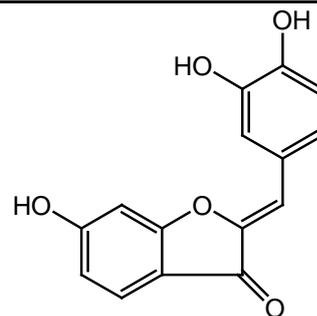
120



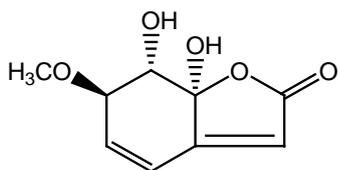
121



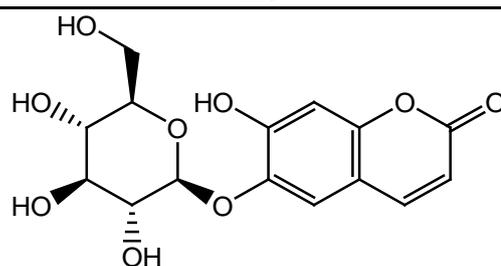
122



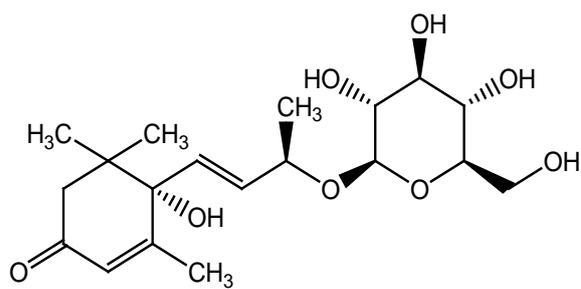
123



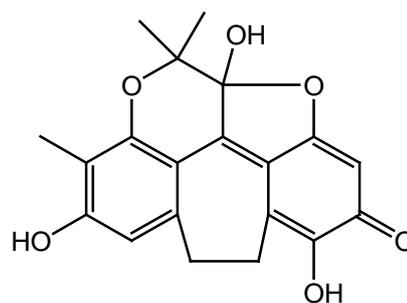
124



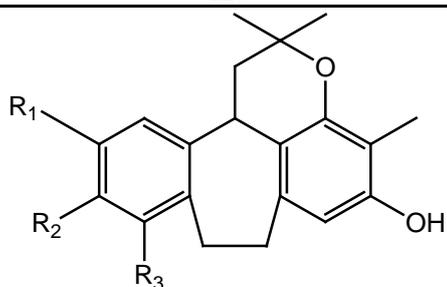
125



126



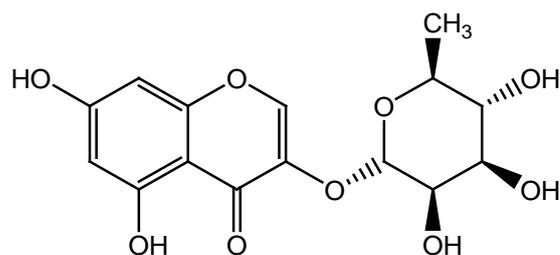
127



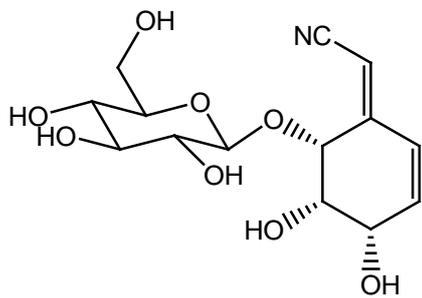
128 $R_1 = H$; $R_2 = OH$; $R_3 = OH$

129 $R_1 = OH$; $R_2 = OH$; $R_3 = H$

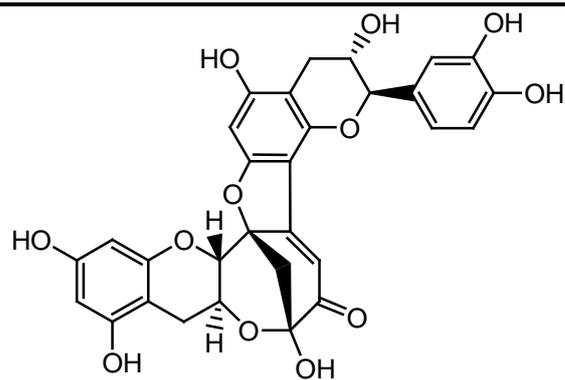
130 $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$



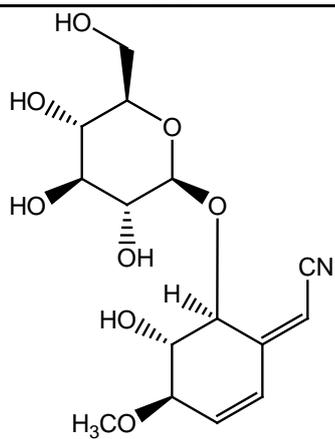
131



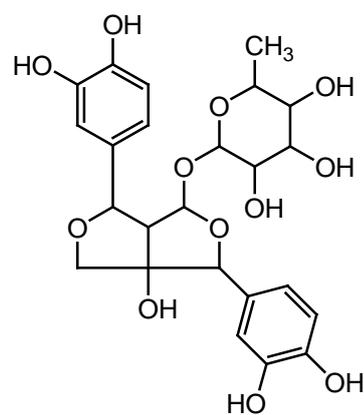
132



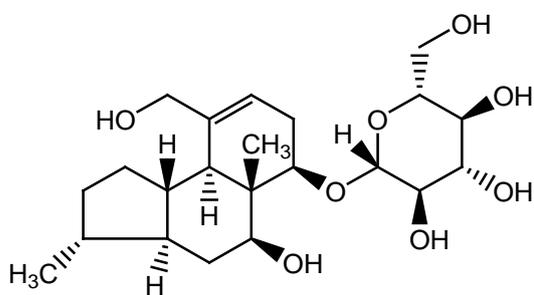
133



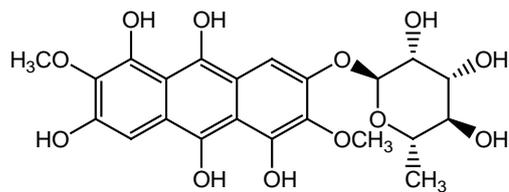
134



135



136



137

Tabela 3 – Espécies de *Bauhinia* com seus respectivos metabólitos secundários isolados

ESPÉCIES	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	REFERÊNCIAS
<i>B. aculeata</i>	93; 94	TANJUNG <i>et al.</i> , 2014
<i>B. glauca</i>	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10	TANG <i>et al.</i> , 2014
	30; 95; 112; 113; 123	BAIMING <i>et al.</i> , 2012a
	4; 32; 33; 34; 35	BAIMING <i>et al.</i> , 2012b
	99; 100; 101; 111; 113; 114; 115; 118; 117; 119; 120	ZHAO <i>et al.</i> , 2011
	95; 102; 103; 104; 105; 106; 107	WU <i>et al.</i> , 2009a
	66; 67; 68; 97; 108; 109; 110	WU <i>et al.</i> , 2009b
<i>B. championii</i>	10; 11	ZHAO <i>et al.</i> , 2014
	3; 5; 8; 73; 92	XU <i>et al.</i> , 2012
	3; 28; 46; 64	XU <i>et al.</i> , 2009
<i>B. forficata</i>	12; 13	FARIAS; MENDEZ, 2014
	21; 22; 23	SAYAGO <i>et al.</i> , 2013
	12; 13; 25; 26	SALGUEIRO <i>et al.</i> , 2013
	3; 7; 12; 13; 17; 23; 31; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45	FERRERES <i>et al.</i> , 2012
<i>B. variegata</i>	3	GUPTA <i>et al.</i> , 2013
	5; 14; 15; 16; 17; 18; 95	LIAO; LI, 2013
	21; 22; 23	SAYAGO <i>et al.</i> , 2013
	3; 122; 125	KUMARI; KUMAR; YADAV, 2012
	5; 12	MODH <i>et al.</i> , 2011
	73; 74; 87; 88; 89; 90	SINGH <i>et al.</i> , 2011
	74; 78; 79	SAHA <i>et al.</i> , 2011
	55; 56; 116; 137	BODAKHE; BODAKHE; PANDEY, 2010
	126	FRANKISH <i>et al.</i> , 2010
3; 31; 61; 62; 63; 80	MOHAMED; MAMMOUD; HAYEN, 2009	
<i>B. purpurea</i>	65	RAJKAPOOR; MURUGESH; KRISHNA, 2009
	72; 73; 74; 75; 82; 84; 85	JOSHI; DESAI; BHOBE, 2013
	13	VERMA; HANDRASHEKAR; JOSHI, 2009
<i>B. platypetala</i>	72; 81; 83; 84; 121	DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2013
<i>B. strychnifolia</i>	19; 20; 72; 73	YUENYONGSAWAD <i>et al.</i> , 2013
<i>B. pentandra</i>	132	SILVA <i>et al.</i> , 2013
<i>B. microstachya</i>	17; 24	MANSUR <i>et al.</i> , 2012
<i>B. brachycarpa</i>	10; 11; 27; 28; 29; 73; 74; 76; 111	ZHANG <i>et al.</i> , 2012
<i>B. monandra</i>	3; 12; 31	ALADE <i>et al.</i> , 2012
<i>B. tomentosa</i>	3; 12; 48; 49	JAIN <i>et al.</i> , 2011
<i>B. racemosa</i>	72; 73; 74; 77; 86; 91; 97; 127; 128; 129; 130;	JAIN <i>et al.</i> , 2013
	18; 46; 47; 99	SASHIDHARA <i>et al.</i> , 2012
<i>B. aurea</i>	124; 133; 134	SHANG <i>et al.</i> , 2012
	4; 23; 31; 39; 49; 57; 58; 59; 60; 131	SHANG <i>et al.</i> , 2009
<i>B. rufescens</i>	3; 5; 12; 36; 37; 96; 98	COMPAORE <i>et al.</i> , 2012
<i>B. retusa</i>	135	SEMWAL; SHARMA, 2011a
	23; 39; 50; 51; 52; 53	YADAV; VERMA, 2010
	54; 72; 73; 136	SEMWAL; SHARMA, 2011b
<i>B. malabarica</i>	3; 69; 70; 71; 73	PARK <i>et al.</i> , 2014

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella*

O estudo da composição química do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella* (OEBP) foi realizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) na análise qualitativa e por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (CG/DIC) na análise quantitativa. Os cromatogramas obtidos por ambas as técnicas são mostrados nas Figuras 03 e 04, respectivamente.

Figura 3 – Cromatograma de OEBP obtido por CG/EM

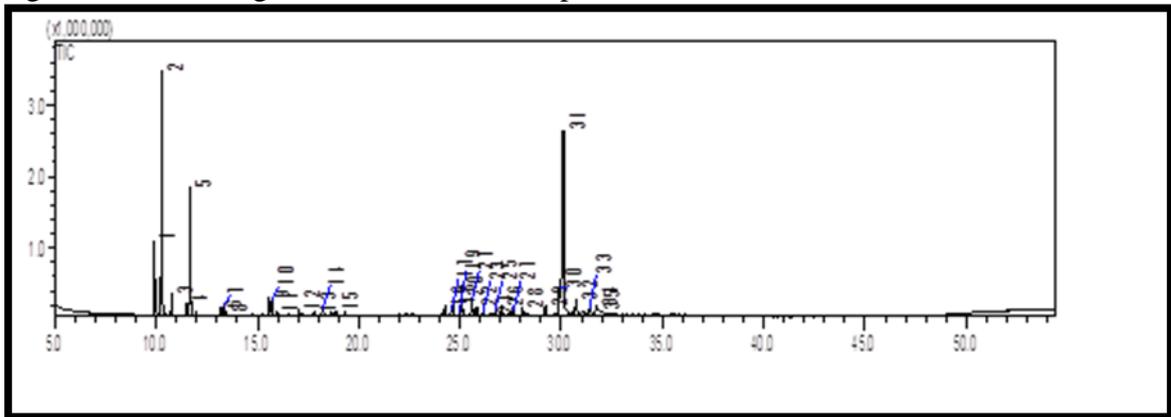
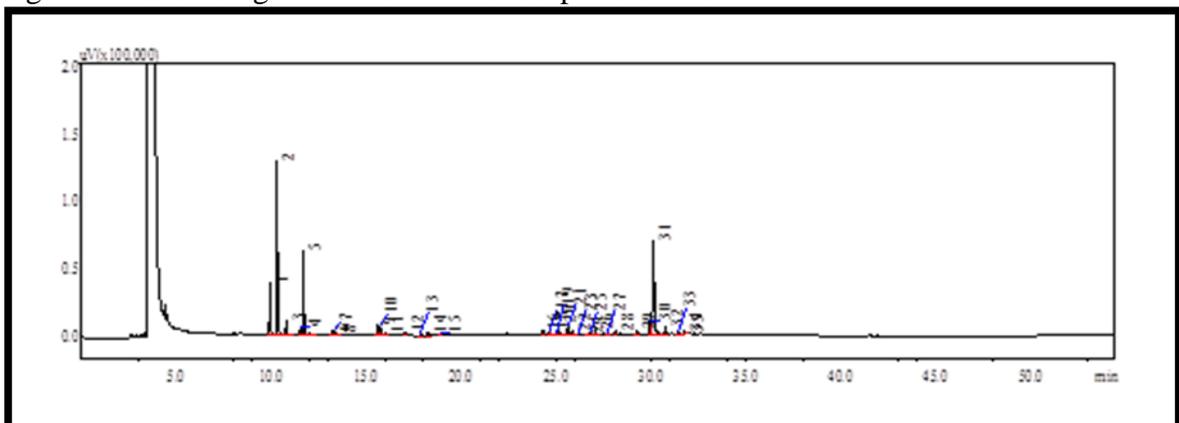


Figura 4 – Cromatograma de OEBP obtido por CG/DIC



Os constituintes do óleo essencial (OEBP) foram identificados através da comparação de seus respectivos espectros de massas com espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007), com espectros do banco de dados (NIST 21, NIST 107 e Willey 8) do

equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma série homologa de *n*-alcanos (C₈-C₁₈) injetados nas mesmas condições cromatográficas da amostra, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). Desta forma foi possível, a identificação de 95,68% dos constituintes deste óleo essencial, sendo, portanto, identificados catorze monoterpenos, dos quais sete são oxigenados; quinze sesquiterpenos, quatro destes oxigenados. α -pineno (23,89%), óxido de cariofileno (22,43%) e β -pineno (12,19%) são os constituintes majoritários do OEBP (TABELA 4).

Tabela 4 – Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella*

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	% (CG/DIC)	IK (experimental)
1	6,706	triciclono	7,29	919
2	7,036	α -pineno	23,89	930
3	7,535	canfeno	2,20	946
4	8,287	sabineno	1,16	970
5	8,422	β -pineno	12,19	974
6	10,067	ρ -cimeno	0,95	1023
7	10,213	limoneno	1,04	1027
8	10,315	1,8-cineol	0,54	1030
9	12,718	óxido de α -pineno	1,91	1097
10	12,828	linalol	1,92	1100
11	14,278	<i>trans</i> -pinocarveol	0,93	1140
12	15,082	pinocarvona	0,53	1162
13	15,765	terpinen-4-ol	0,84	1180
14	16,339	α -terpineol	0,58	1196
15	22,572	α -copaeno	1,33	1373
16	22,832	β -bourboneno	0,46	1380
17	23,046	β -elemeno	1,14	1387
18	23,482	cipereno	2,17	1399
19	24,028	(<i>E</i>)-cariofileno	2,21	1416
20	24,384	β -copaeno	1,28	1427
21	24,500	α - <i>trans</i> -bergamoteno	0,20	1431
22	25,373	allo-aromadendreno	0,37	1457
23	26,313	β -selineno	1,34	1486
24	26,641	α -muuroleno	0,70	1496
25	27,095	γ -cadineno	0,88	1511
26	29,117	espatulenol	2,86	1576
27	29,265	óxido de cariofileno	22,43	1581
28	30,098	epóxido de humuleno II	1,68	1609
29	31,474	α -cadinol	0,66	1655
TOTAL			95,68	

As Figuras 5 a 33 apresentam os espectros de massas dos constituintes presentes no OEBP, obtidos por impacto eletrônico de 70 eV.

Figura 5 – Espectro de massas do triciclono

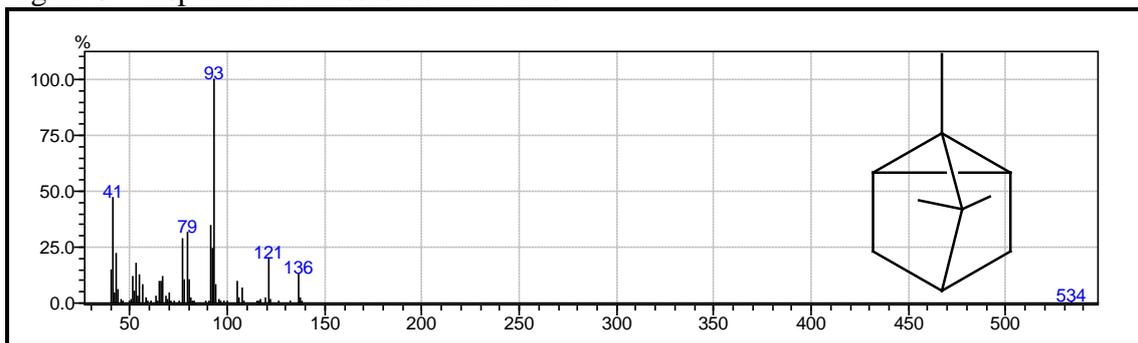
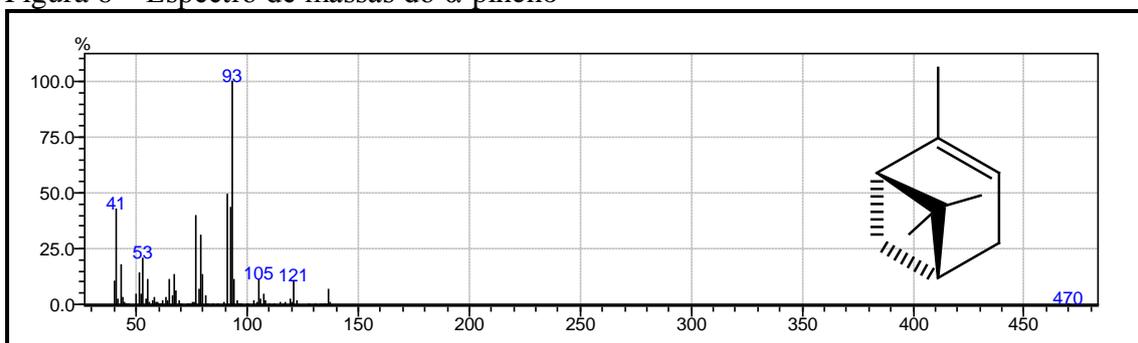
Figura 6 – Espectro de massas do α -pineno

Figura 7 – Espectro de massas do canfeno

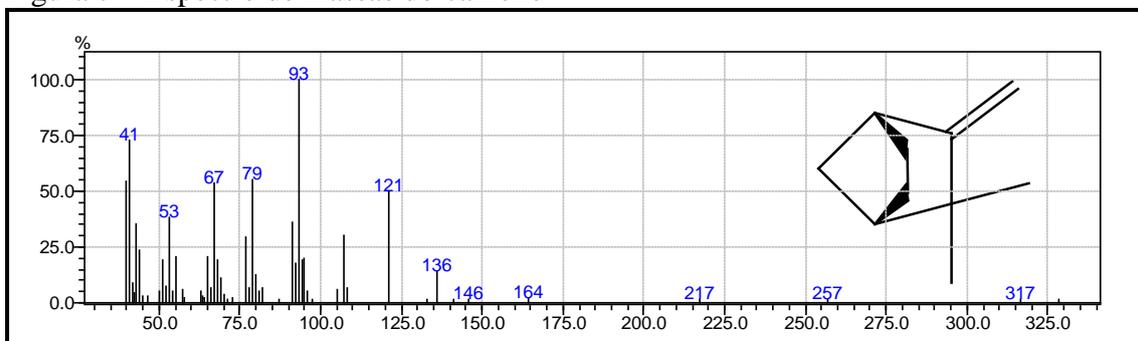


Figura 8 – Espectro de massas do sabineno

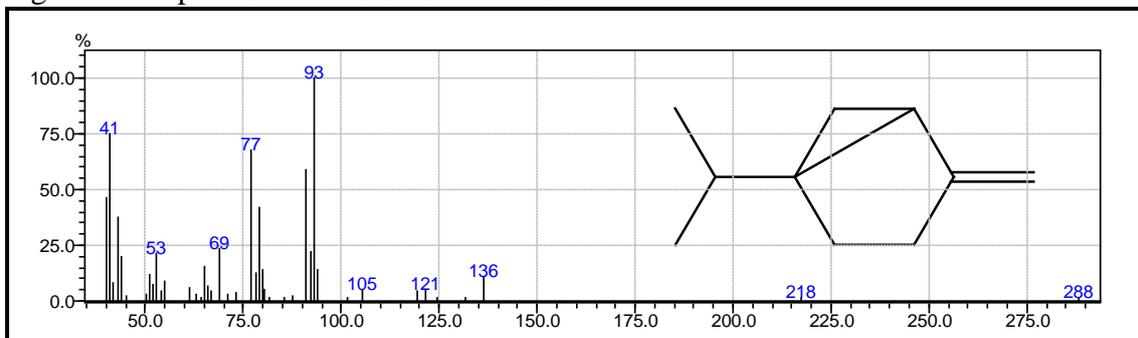


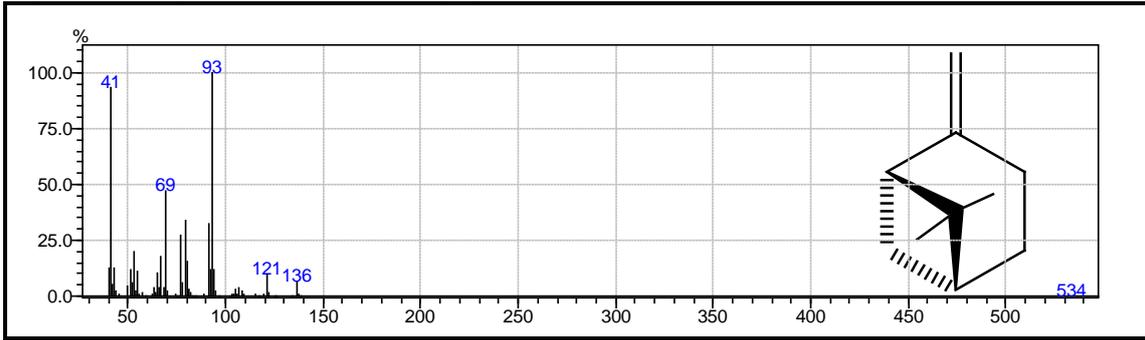
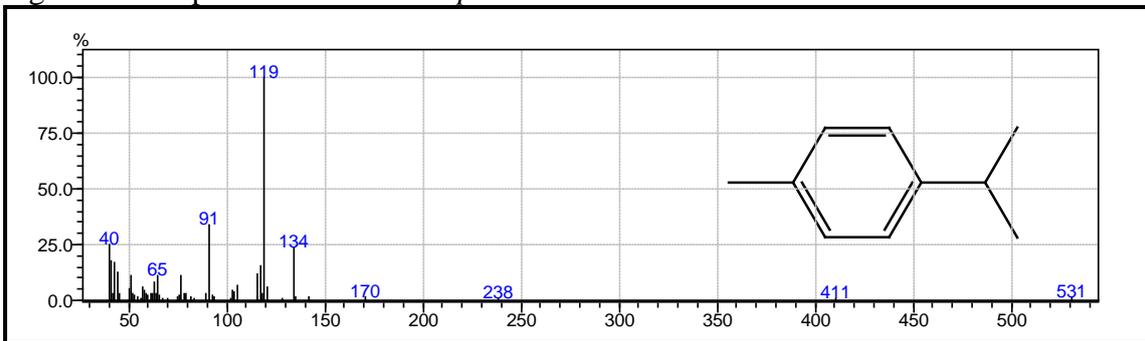
Figura 9 – Espectro de massas do β -pinenoFigura 10 – Espectro de massas do *p*-cimeno

Figura 11 – Espectro de massas do limoneno

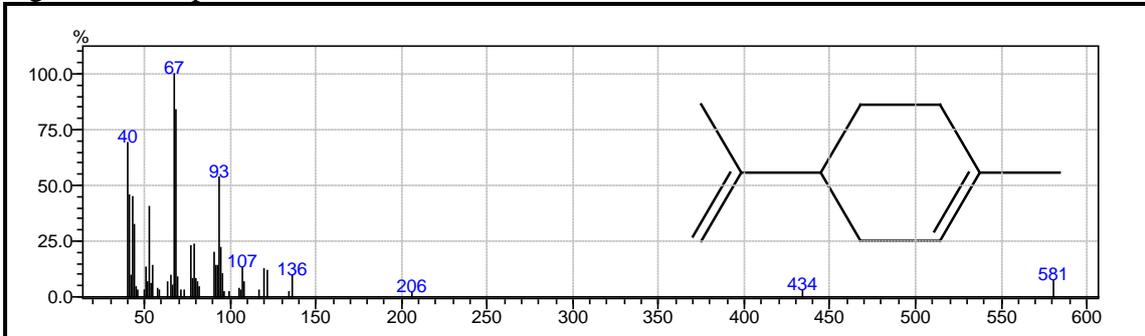


Figura 12 – Espectro de massas do 1,8-cineol

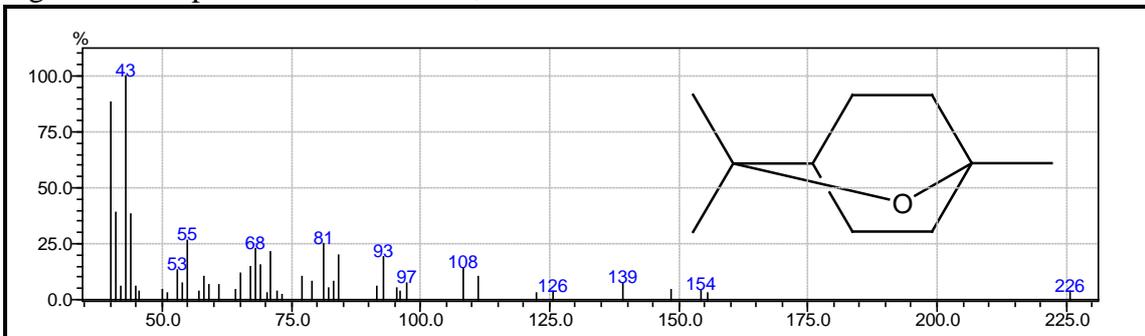


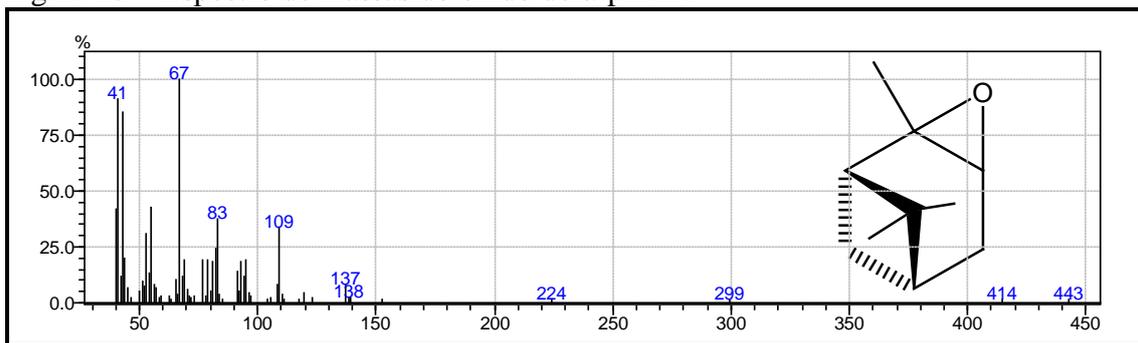
Figura 13 – Espectro de massas do óxido de α -pineno

Figura 14 – Espectro de massas do linalol

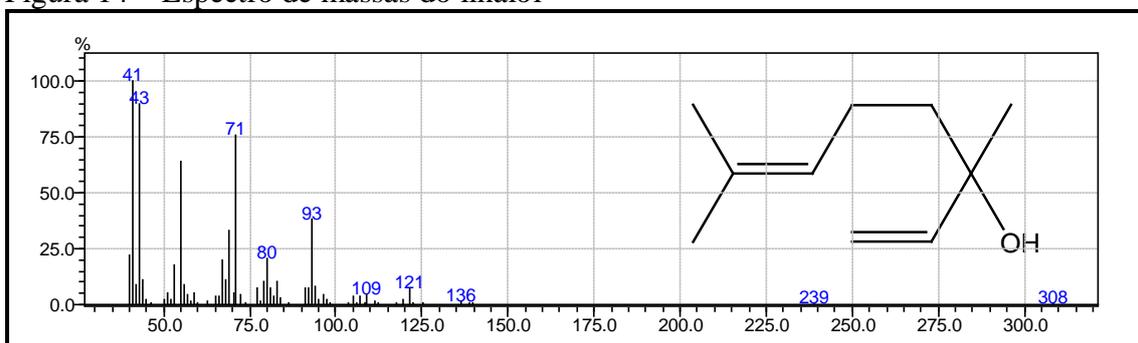
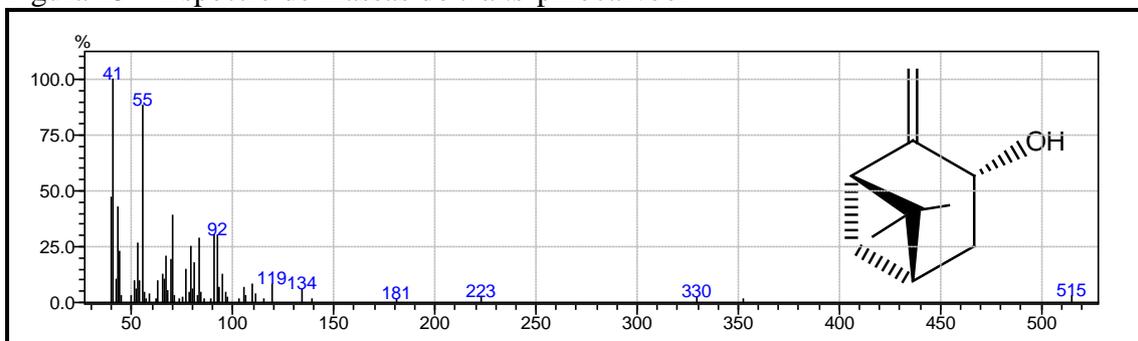
Figura 15 – Espectro de massas do *trans*-pinocarveol

Figura 16 – Espectro de massas da pinocarvona

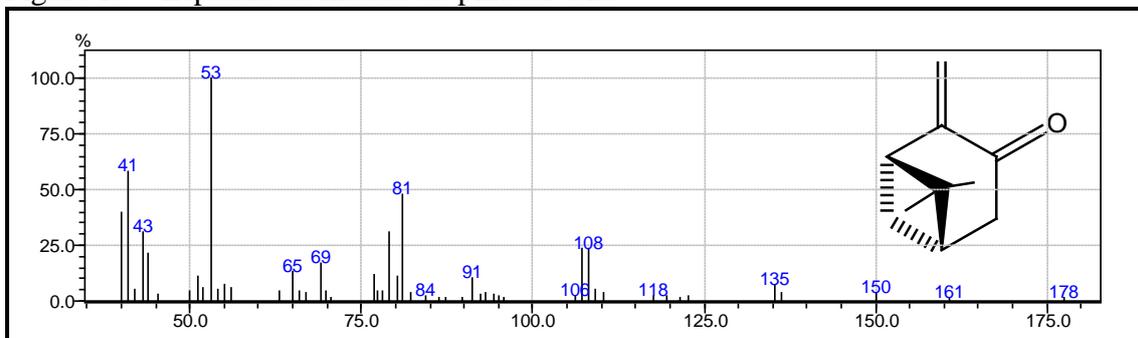


Figura 17 – Espectro de massas do terpinen-4-ol

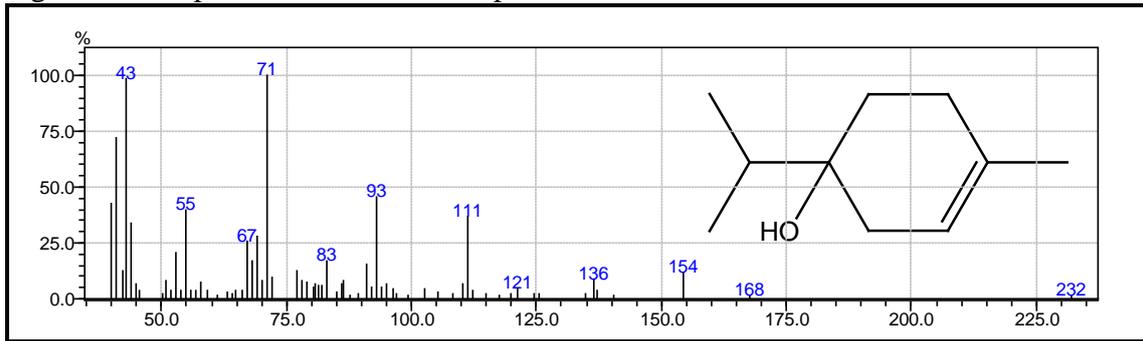
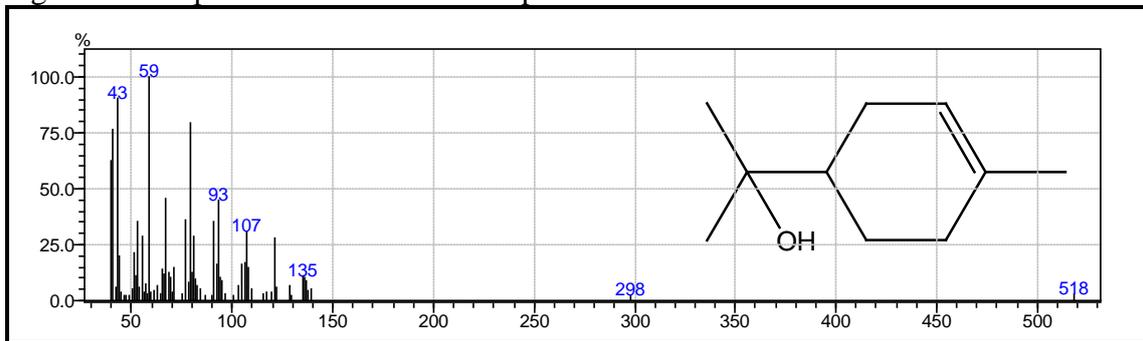
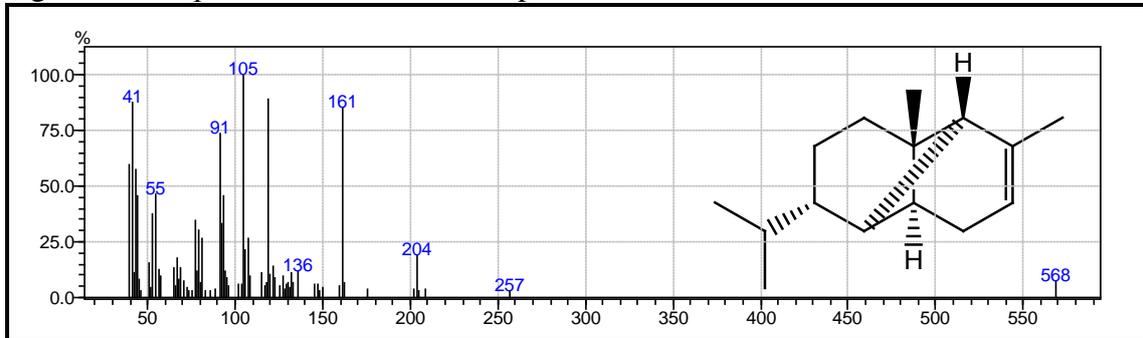
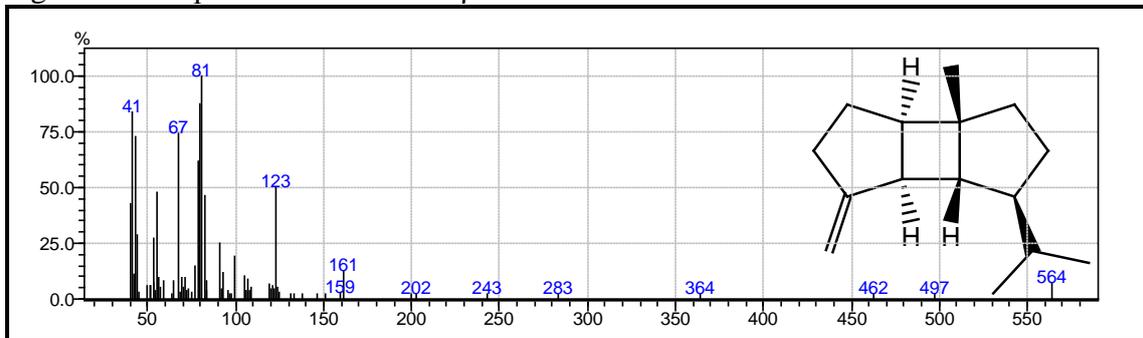
Figura 18 – Espectro de massas do α -terpineolFigura 19 – Espectro de massas do α -copaenoFigura 20 – Espectro de massas do β -bourboneno

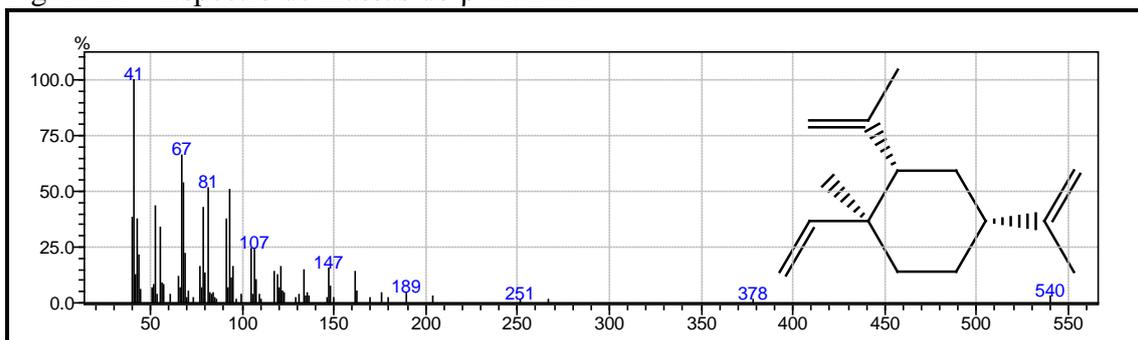
Figura 21 – Espectro de massas do β -elemeno

Figura 22 – Espectro de massas do cipereno

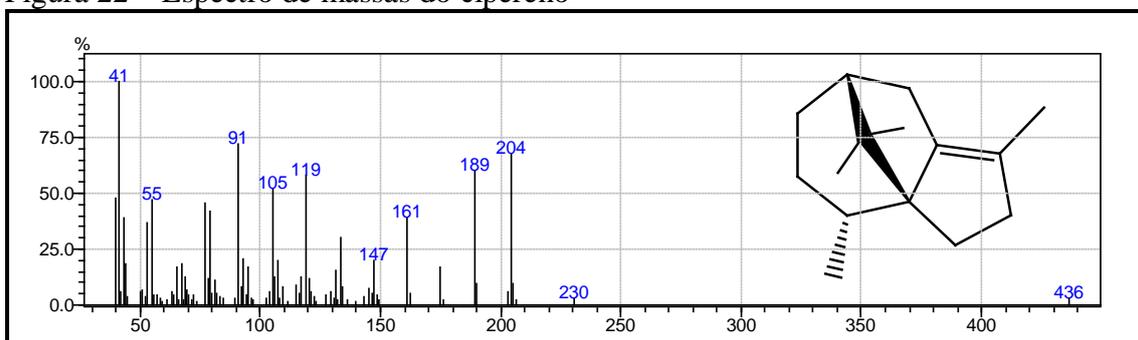
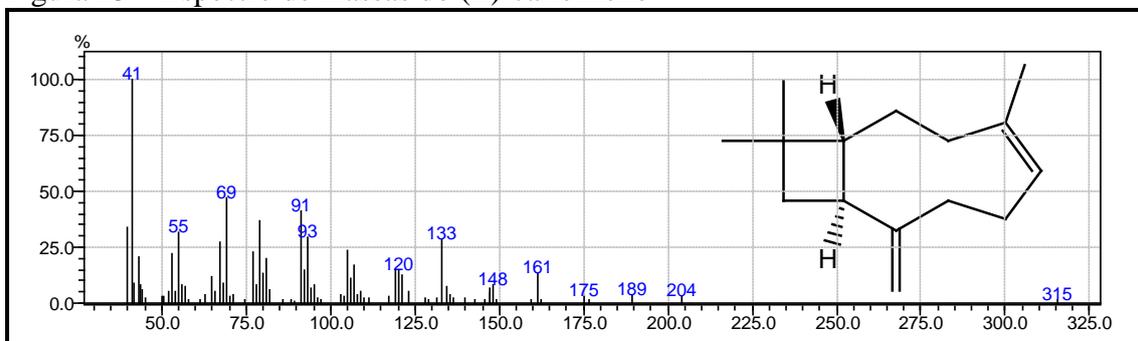
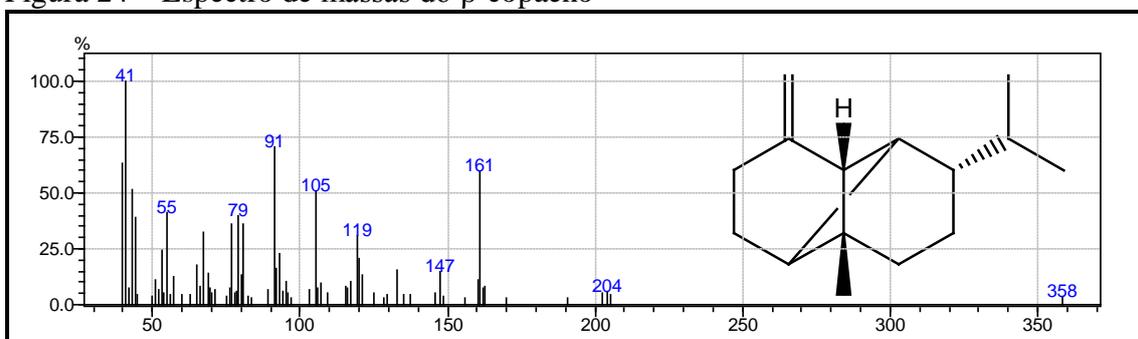
Figura 23 – Espectro de massas do (*E*)-cariofilenoFigura 24 – Espectro de massas do β -copaeno

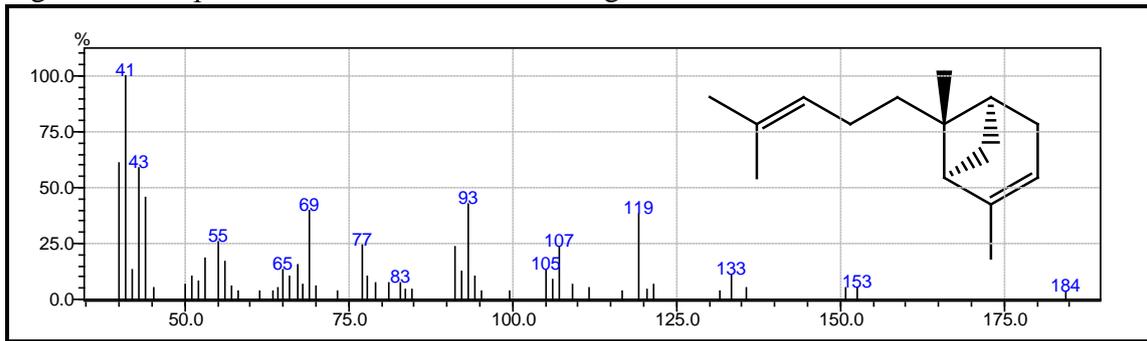
Figura 25 – Espectro de massas do α -trans-bergamoteno

Figura 26 – Espectro de massas do allo-aromadendreno

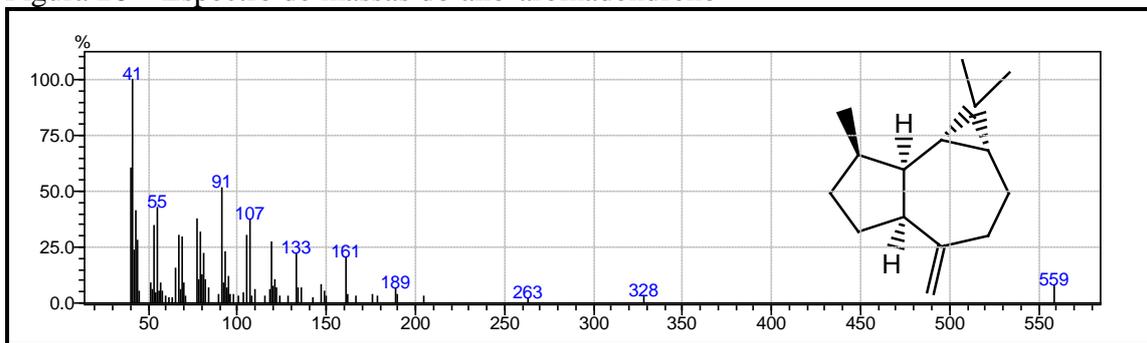
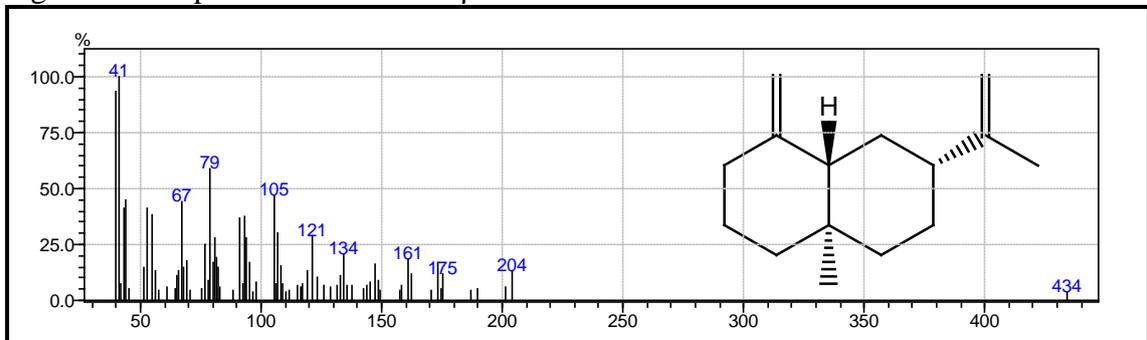
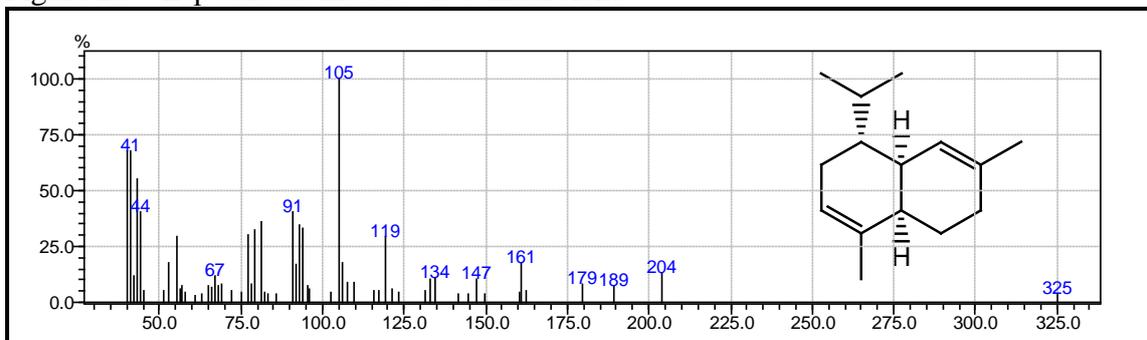
Figura 27 – Espectro de massas do β -selinenoFigura 28 – Espectro de massas do α -muuroleno

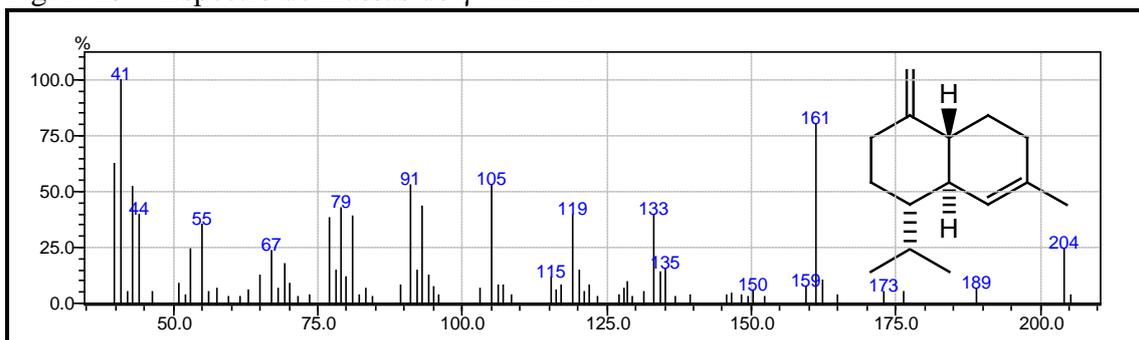
Figura 29 – Espectro de massas do γ -cadineno

Figura 30 – Espectro de massas do espatulenol

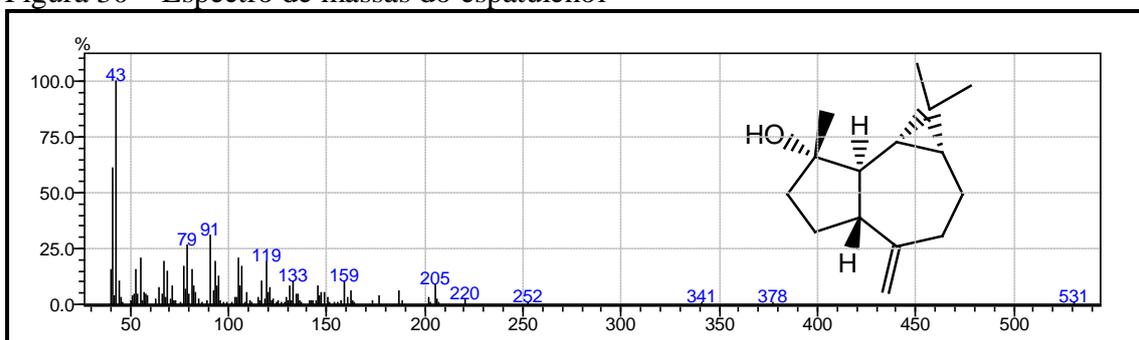


Figura 31 – Espectro de massas do óxido de cariofileno

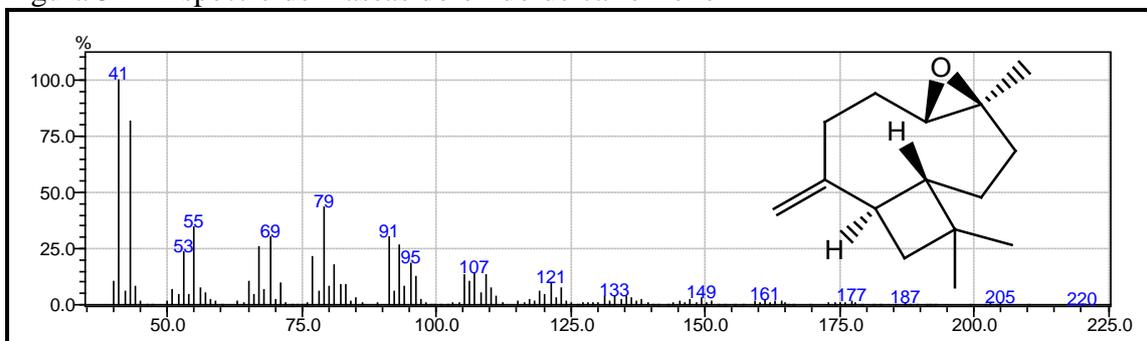


Figura 32 – Espectro de massas do epóxido de humuleno II

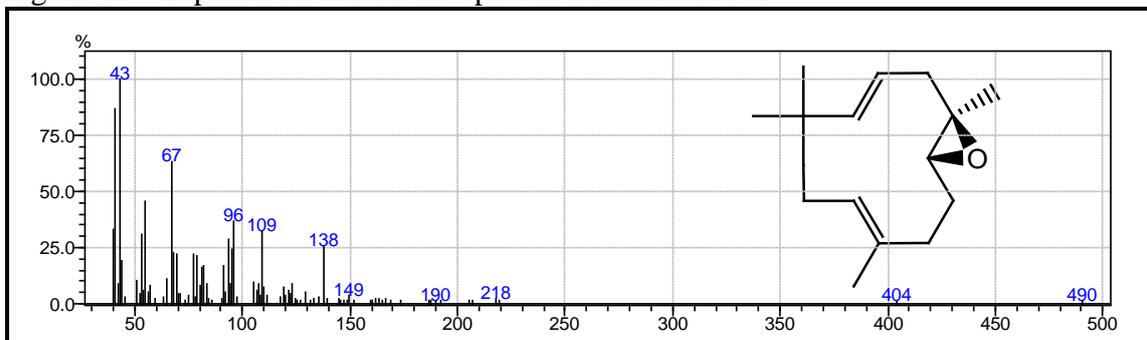
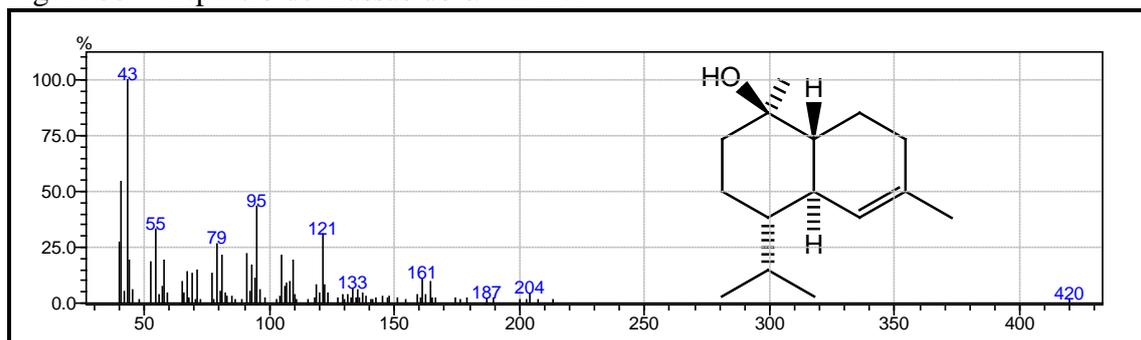


Figura 33 – Espectro de massas do α -cadinol

5.2 Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de *Bauhinia pulchella*

5.2.1 Determinação estrutural de BP-1

O tratamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (EECBP) em gel de sílica, conforme descrito no item 6.7.2.3 (p. 125), resultou no isolamento de 35,7 mg de um sólido cristalino, solúvel em diclorometano, que foi denominado BP-1.

O espectro na região do infravermelho (IV) de BP-1 (Figura 34, p. 66) apresentou duas bandas de absorção em 2921 e 2852 cm^{-1} , indicativas de deformação axial de C-H sp^3 ; uma absorção de deformação intensa em 1707 cm^{-1} relacionada à deformação axial de C=O, sugerindo a presença de cetona alifática não conjugada. Foram ainda observadas bandas de absorção em 1462 e 1377 cm^{-1} , relativas à deformação angular de grupos metilênicos (CH_2) e grupos metila (CH_3), respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de BP-1, mostrado na Figura 35, p. 66, apresentou diversos sinais na região entre δ 0,83 - 2,52, característicos de hidrogênios ligados a carbonos metílicos, metilênicos e metínicos de compostos esteroidicos ou triterpênicos. Os sinais em δ 5,21 (1H; *t*; 3,6 Hz; H-12b) e em δ 5,56 (1H; *dd*; 8,2 e 3,2 Hz; H-15a), sugeriram a presença de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos acoplados com hidrogênios alílicos, uma vez que esse tipo de interação gera uma constante de acoplamento à longa distância (4J) entre 0-3 Hz (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) de BP-1 (Figura 36, p. 67) apresentou 57 sinais, sugerindo, portanto, a presença de uma mistura binária. Os sinais em δ 217,7 e 217,9 foram atribuídos a carbonos carbonílicos de cetonas não conjugadas, conforme já sugerido pela análise do espectro na região do infravermelho. Foram observados ainda quatro sinais em δ 157,8; 145,4; 121,7 e 117,4 referentes a carbonos sp^2 .

A comparação dos dados de RMN ^{13}C – BB com os obtidos no espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 37, p. 67) de BP-1 permitiu definir o padrão de hidrogenação relativo a cada átomo de carbono e distinguir aqueles não hidrogenados dos demais por subtração espectral. Dessa forma, foi constatada a presença de q sinais referentes catorze átomos de carbonos não hidrogenados (C); oito sinais atribuídos a carbonos metínicos (CH); dezenove sinais de carbonos metilênicos (CH_2) e onze sinais para carbonos metílicos (CH_3). Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono de BP-1 juntamente com seus respectivos padrões de hidrogenação são mostrados na Tabela 05.

Tabela 5 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-1 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^{\circ}$

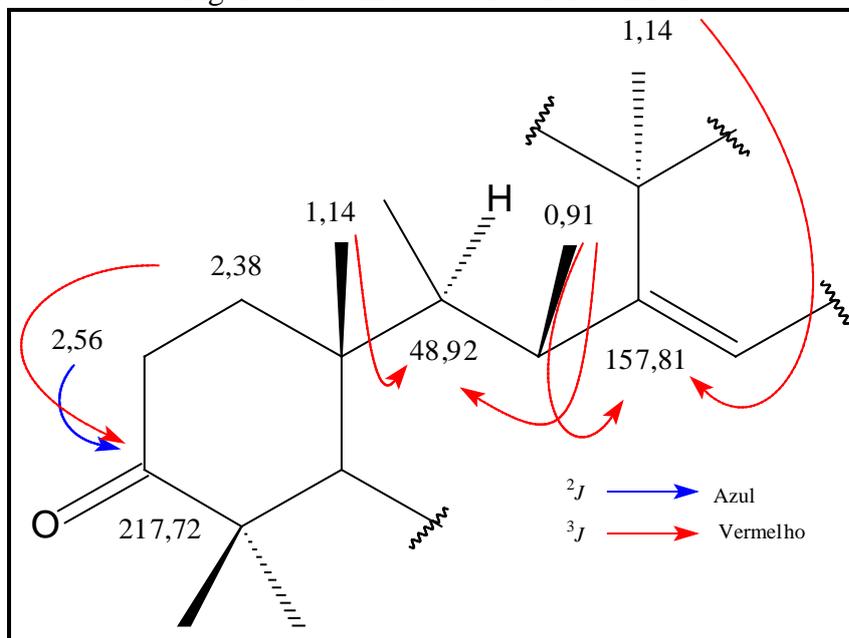
C	CH	CH ₂	CH ₃
217,72 (C=O)	121,73	47,00	30,13
217,98 (C=O)	117,41	40,85	30,07
157,81	55,99	39,52	28,63
145,48	55,53	38,56	26,69
47,78	49,01	37,91	26,32
47,67	48,92	37,32	21,69
42,08	47,96	36,89	21,56
39,09	47,08	35,98	21,00
37,96		35,32	16,95
37,91		34,93	15,43
37,75		34,43	15,02
32,73		33,79	
31,30		33,29	
29,63		32,40	
		27,16	
		26,35	
		20,17	
		19,88	
		17,66	

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC de BP-1 (Figura 38, p. 68) permitiu associar de forma inequívoca todos os sinais dos hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos, como pode ser visualizado nas Tabelas 6 (p. 64) e 7 (p. 65). Os sinais de hidrogênio em δ 5,56 (1H; *dd*; $J = 8,2$ e $3,2$ Hz; H-15a) e 5,21 (1H; *t*; $J = 3,6$ Hz; H-12b) foram correlacionados com os sinais de carbono em δ 117,41 e 121,73, respectivamente. Neste espectro, os sinais de hidrogênios metílicos em δ 0,91 (3H; *s*; H-26a); 0,92 (3H; *s*; H-26b) (3H; *s*; H-27a) estavam correlacionados com os sinais de carbono em δ 28,63; 16,95 e 26,69, respectivamente.

O espectro ^1H x ^1H – COSY (Figura 39, p. 68) mostrou as correlações entre os hidrogênios H-1a e H-1b com os hidrogênios H-2a e H-2b, respectivamente. É válido salientar que os hidrogênios H-2a e H-2b apresentam sinais na região entre δ 2,00 - 2,50, indicando que eles estão ligados a um carbono na posição *alfa* (α) em relação ao carbono carbonílico, por isso, absorvem em região mais desprotegida devido ao efeito anisotrópico da carbonila.

O espectro de correlação bidimensional heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC, ilustrado na Figura 40, p. 69, apresentou correlações a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios em δ 0,91 (3H; s; H-26a) e 1,14 (3H; s; H-27a) com o carbono (C-14) em δ 157,81. Outras correlações a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) foram observadas entre os hidrogênios em δ 0,91 (3H; s; H-26a) e 1,14 (3H; s; H-25a) com o carbono (C-9) em δ 48,92. Analisando a região com o maior deslocamento químico, foram observadas as correlações (2J) entre os hidrogênios (H-2) em δ 2,56 e entre os hidrogênios (H-1) em δ 2,38 (3J) com o carbono carbonílico (C-3) em δ 217,72. Os dados espectrais discutidos permitiram sugerir o seguinte fragmento estrutural para BP-1 (FIGURA 41).

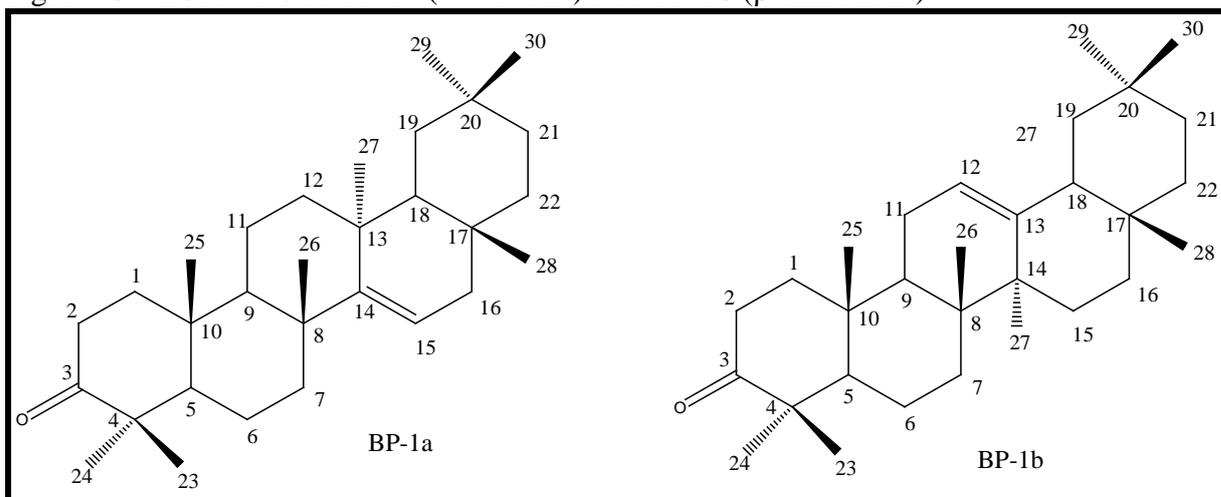
Figura 41 – Unidade estrutural de BP-1



O espectro de massas (Figura 42, p. 69) apresentou o pico do íon molecular em m/z igual a 424 daltons, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$.

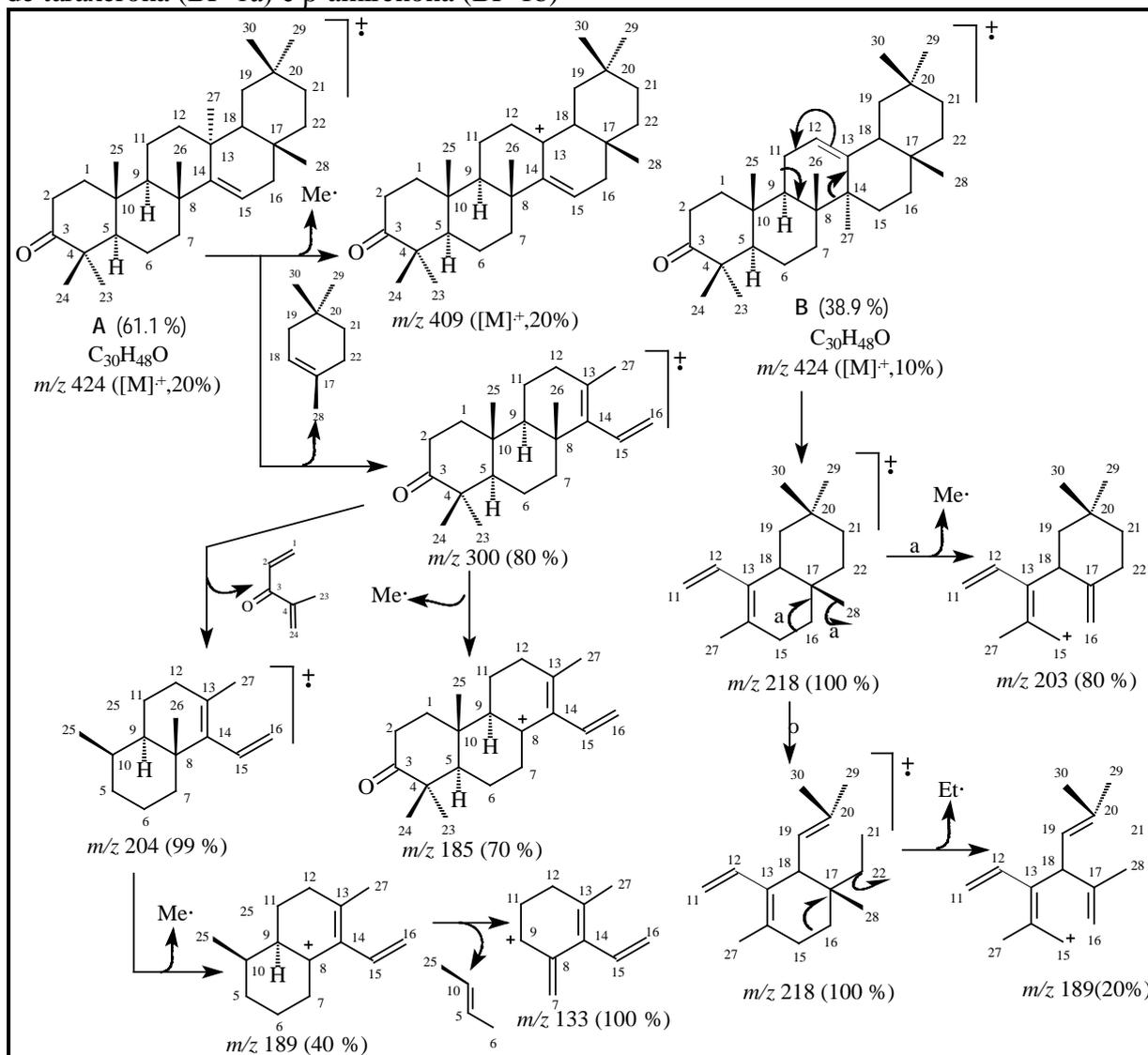
Através da análise dos dados espectroscópicos obtidos e da comparação com dados descritos na literatura (HERNANDES-CHAVEZ *et al.*, 2012; BATES *et al.*, 1998; DE CARVALHO *et al.*, 1998; MARNER; FREYER; LEX, 1991), foi possível identificar BP-1, como sendo uma mistura de triterpenos, constituída por friedo-olean-14-en-3-ona (BP-1a), vulgarmente conhecido como taraxerona e por olean-12-en-3-ona (BP-1b), vulgarmente conhecido como β -amirenona, cujas estruturas estão ilustradas na Figura 43. É válido salientar que ambas as substâncias são inéditas no gênero *Bauhinia*.

Figura 43 – Estruturas de BP-1a (taraxerona) e de BP-1b (β -amirenona)



As estruturas dos constituintes da mistura ainda puderam ser confirmadas através da análise dos seus respectivos espectros de massas; observando-se, portanto, que cada constituinte apresentou fragmentações específicas. Os picos em m/z 300, 204, 189 e 133 são resultantes da fragmentação da taraxerona, enquanto, os picos em m/z em 218, 203 e 189 são característicos da fragmentação da β -amirenona (FIGURA 44).

Figura 44 – Fragmentos propostos para os principais picos observados no espectro de massas de taraxerona (BP-1a) e β -amirenona (BP-1b)



As percentagens de cada constituinte na mistura foram calculadas utilizando a integração dos hidrogênios ligados aos carbonos olefínicos. Atribuindo o valor da integração de 1,00 para um hidrogênio (1H) no sinal referente ao hidrogênio em δ 5,21 (t) de BP-1b, pode-se obter o valor de integração igual a 1,57 para um hidrogênio (1H) em δ 5,56 (dd) de BP-1a. Dessa forma, a soma das duas integrações dos hidrogênios ligados a carbonos olefínicos (2,57) é igual a 100%; portanto, o percentual de BP-1a é 61,1% e de BP-1b é igual a 38,9%.

Os dados de RMN 1H e de RMN ^{13}C de BP-1, assim como os descritos na literatura para taraxerona (HERNANDES-CHAVEZ *et al.*, 2012; BATES *et al.*, 1998) e para β -amirenona (DE CARVALHO *et al.*, 1998; MARNER; FREYER; LEX, 1991) estão mostrados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-1a comparados com dados da literatura descritos na literatura (HERNANDES-CHAVEZ *et al.*, 2012; BATES *et al.*, 1998) para taraxerona (CDCl₃)

	HSQC		HMBC		Literatura (CDCl ₃)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J(Hz))
C						
3	217,72	-	H-2	H-1	217,7	-
4	47,78	-			47,6	-
8	37,96	-			38,9	
10	37,96	-			37,5	-
13	37,75	-			37,7	-
14	157,81	-		H-26; H-27	157,6	-
17	37,91	-			37,7	-
20	28,63				28,8	
CH						
5	55,99				55,8	
9	48,92			H-26; H-25	48,7	
12	-	-			-	-
15	117,41	5,56; dd; 8,2; 3,2			117,2	5,56; dd; 8,2; 3,2
18	49,01				48,7	
CH₂						
1	38,56				38,3	
2	35,32				34,1	
6	20,17				19,9	
7	35,98				35,1	
11	17,66				17,4	
12	37,32				35,8	
15	-	-	-	-	-	-
16	36,89				36,7	
19	40,85				40,6	
21	33,79				33,5	
22	33,29				33,1	
CH₃						
23	26,32				26,1	1,08
24	21,56				21,5	1,07
25	15,02				14,8	1,14
26	28,63	0,91(s)			29,8	1,09
27	26,69	1,14 (s)			25,6	0,92
28	26,32				29,9	0,83
29	30,07				33,3	0,95
30	21,69				21,3	0,91

Tabela 7 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-1b comparados com dados da literatura descritos na literatura (DE CARVALHO *et al.*, 1998; MARNER; FREYER; LEX,1991) para β -amirenona (CDCl₃)

	HSQC		HMBC		Literatura (CDCl ₃)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)
C						
3	217,98	-			217,9	-
4	47,67	-			47,4	-
8	39,09	-			39,6	-
10	37,75	-			37,0	-
13	145,48	-			145,2	-
14	42,08	-			41,5	-
17	32,73	-			32,4	-
20	31,30	-			31,0	-
CH						
5	55,53				55,2	
9	47,08				46,8	
12	121,73	5,21; t; 3,6			121,4	5,2; t; 3,6
15	-	-			-	-
18	47,96				47,2	
CH₂						
1	39,52				39,2	
2	34,93				33,8	
6	19,88				18,3	
7	32,40				32,5	
11	17,66				17,0	
12	-	-			-	-
15	27,16				26,8	
16	26,35				26,8	
19	47,00				46,7	
21	34,43				34,8	
22	37,91				37,5	
CH₃						
23	26,69				28,4	1,08
24	15,02				16,0	1,07
25	15,43				15,7	1,14
26	16,95	0,92(s)			16,1	1,09
27	-				26,3	0,92
28	26,69				28,7	0,83
29	30,13				33,5	0,95
30	21,00				23,6	0,91

Figura 34 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-1

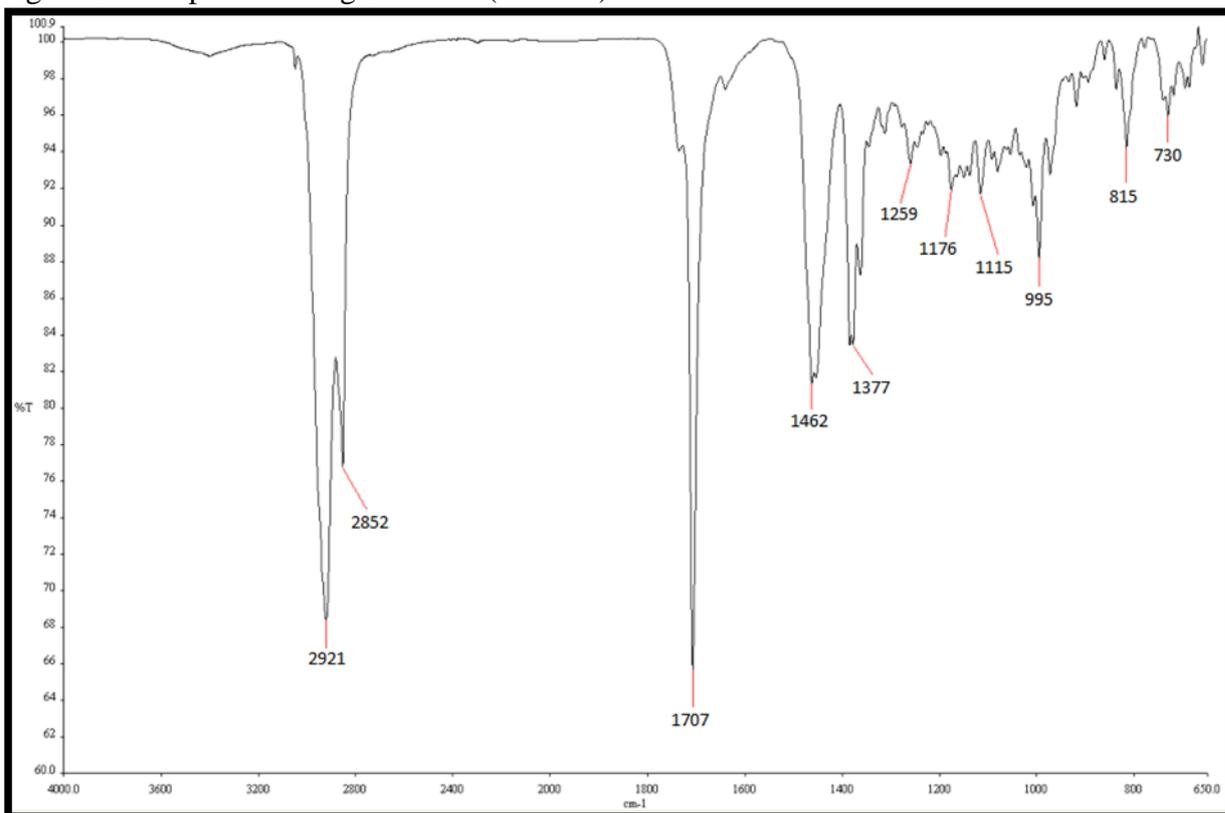
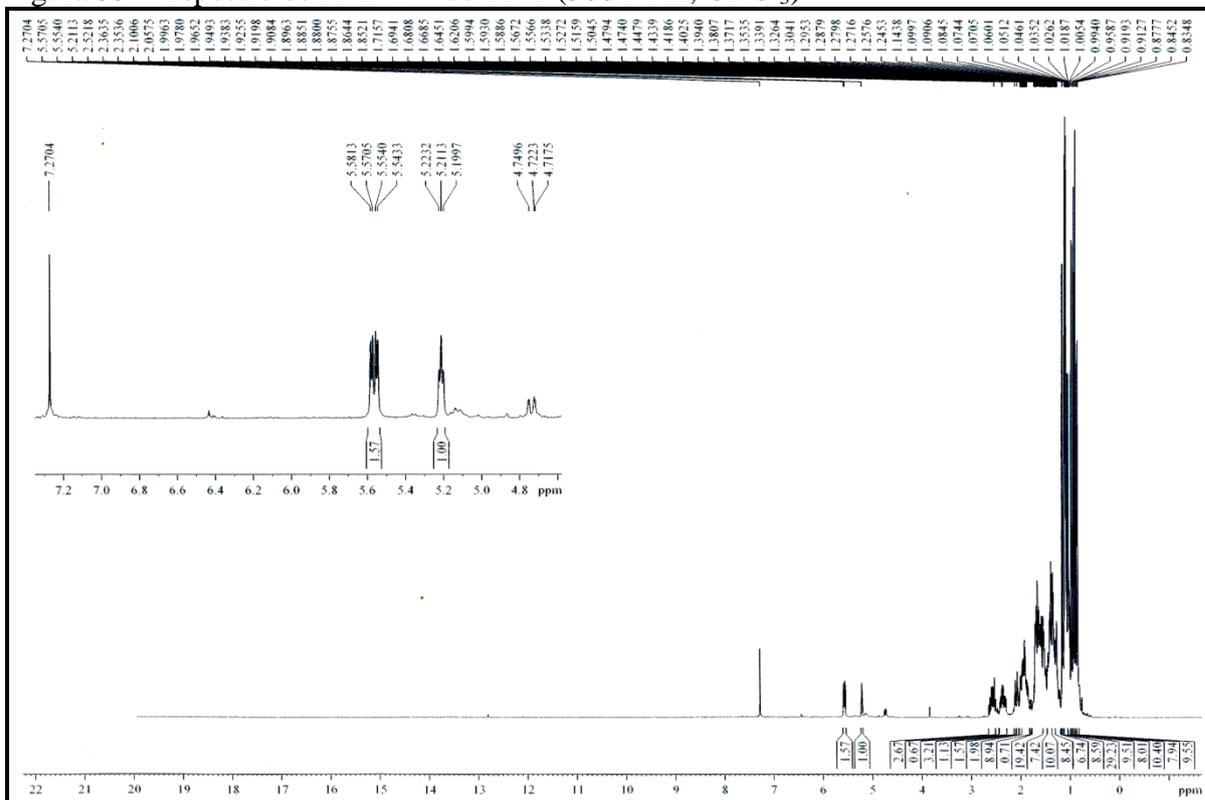
Figura 35 – Espectro de RMN ¹H de BP-1 (300 MHz, CDCl₃)

Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-1 (75 MHz, CDCl_3)

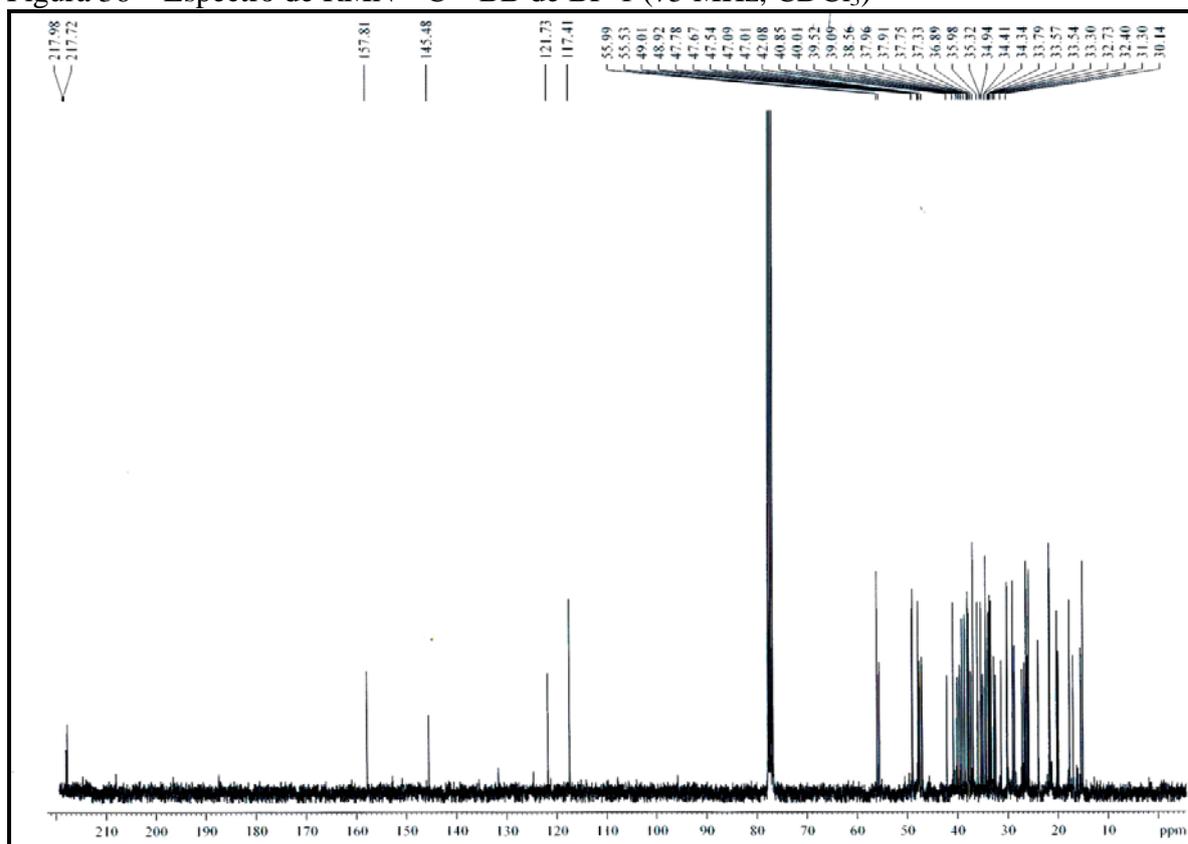


Figura 37 — Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-1 (75 MHz, CDCl_3)

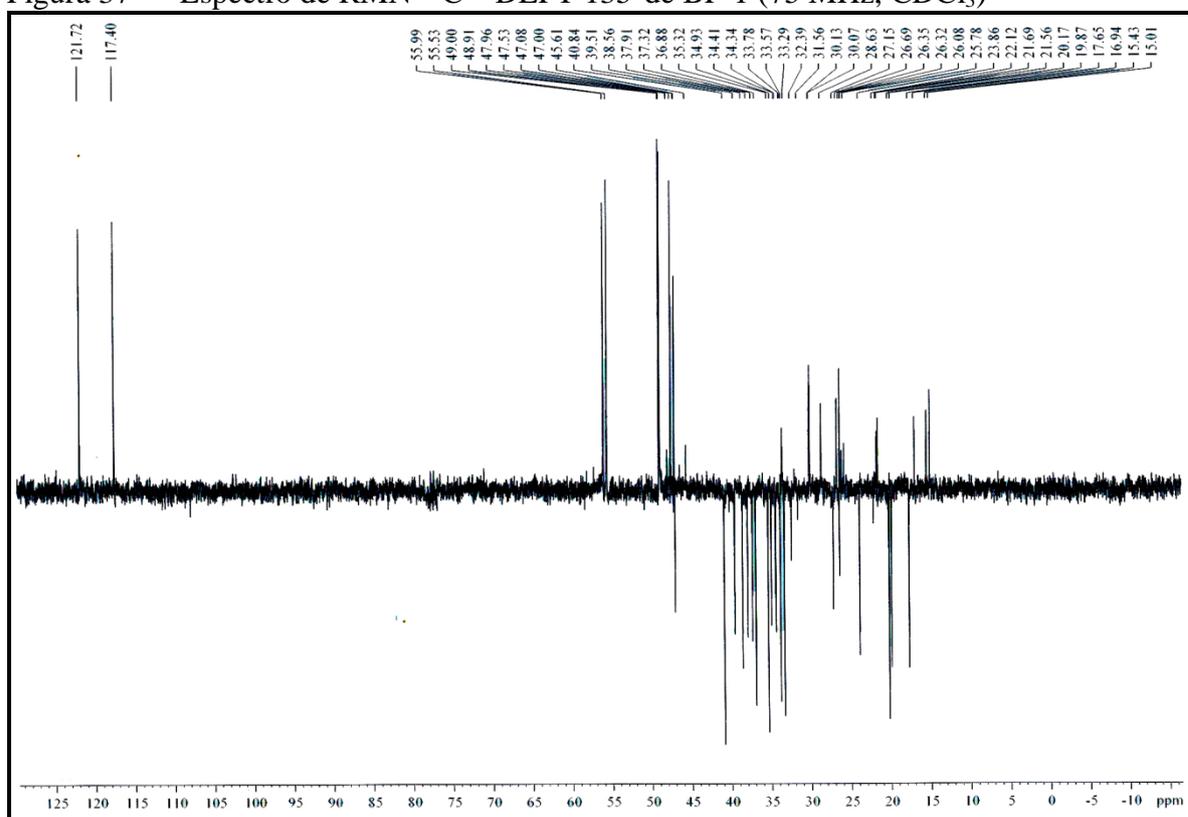


Figura 38 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-1 (300 MHz x 75 MHz, CDCl_3)

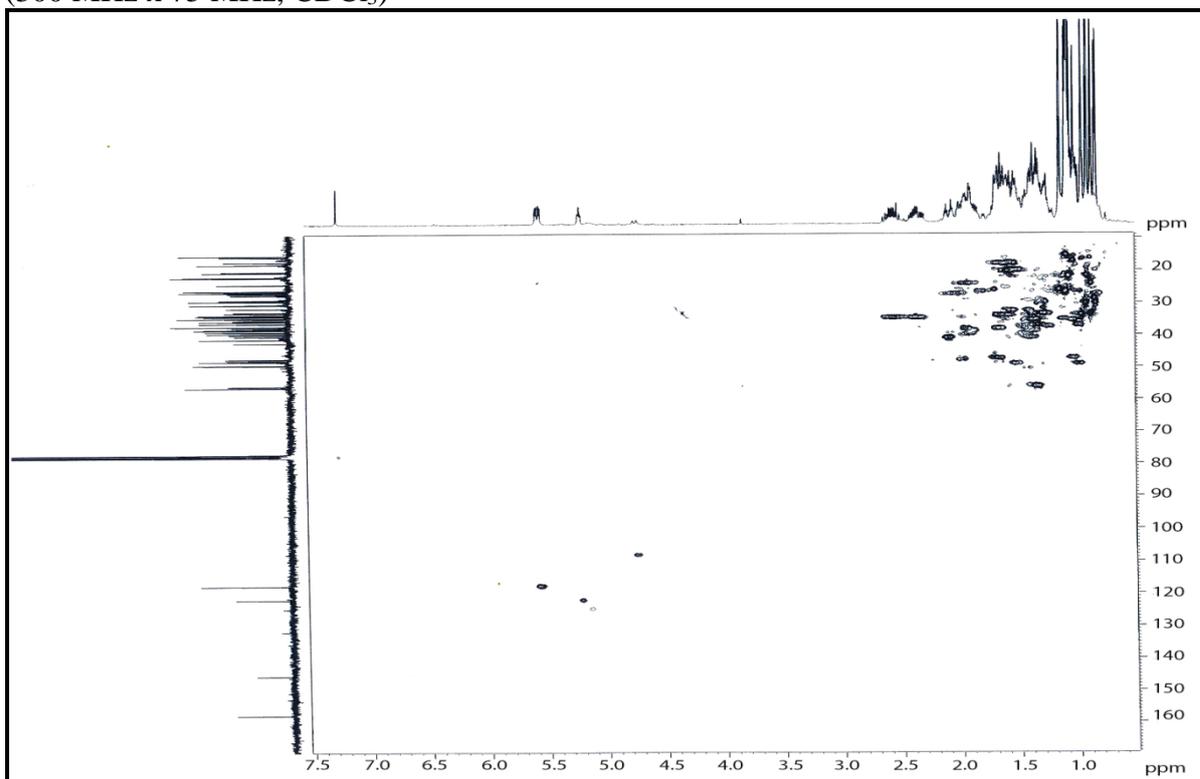


Figura 39 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-1 (300 MHz, CDCl_3)

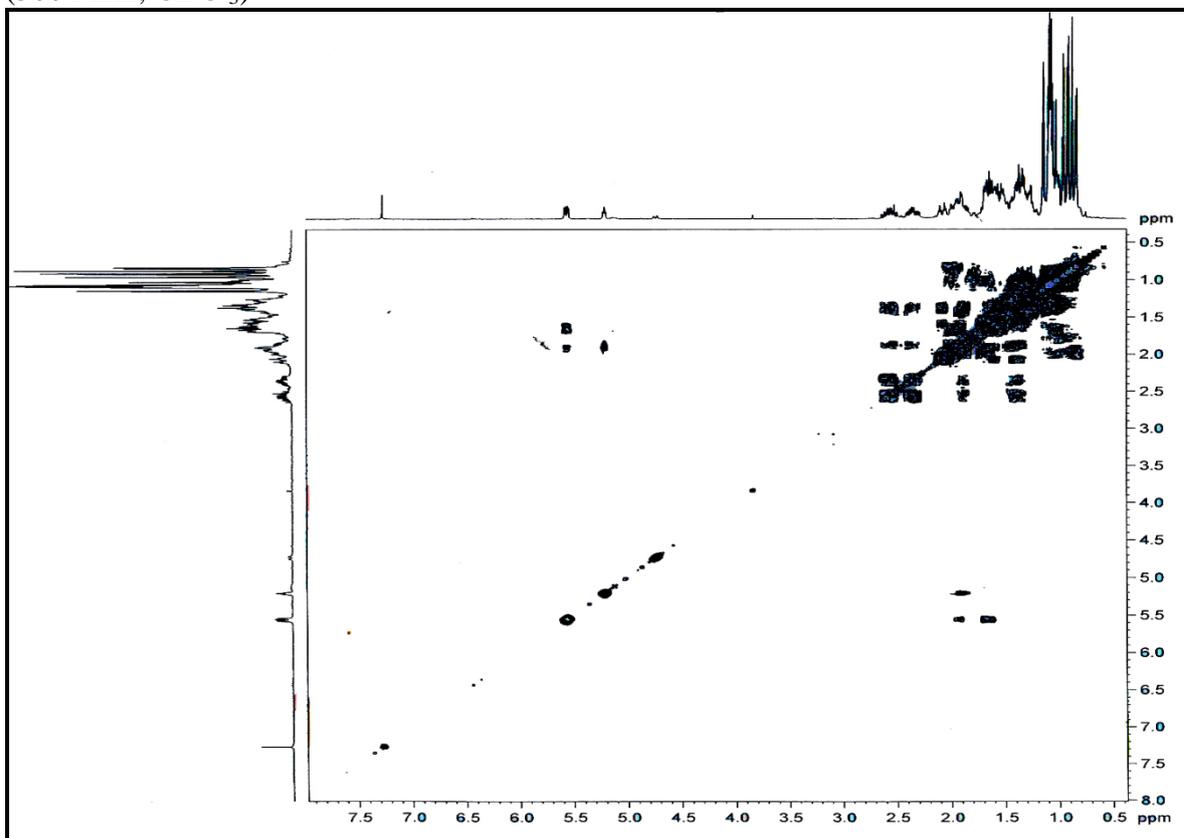


Figura 40 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-1 (300 MHz x 75 MHz, CDCl_3)

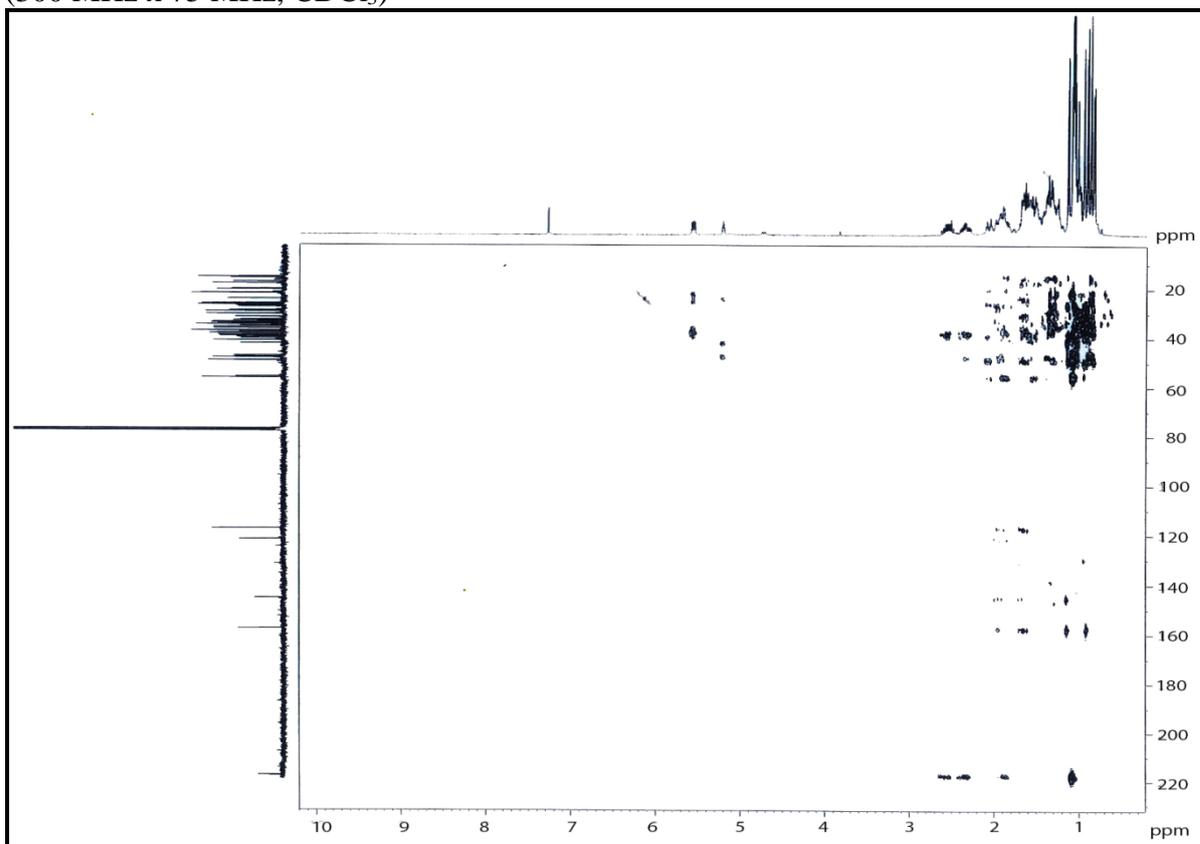
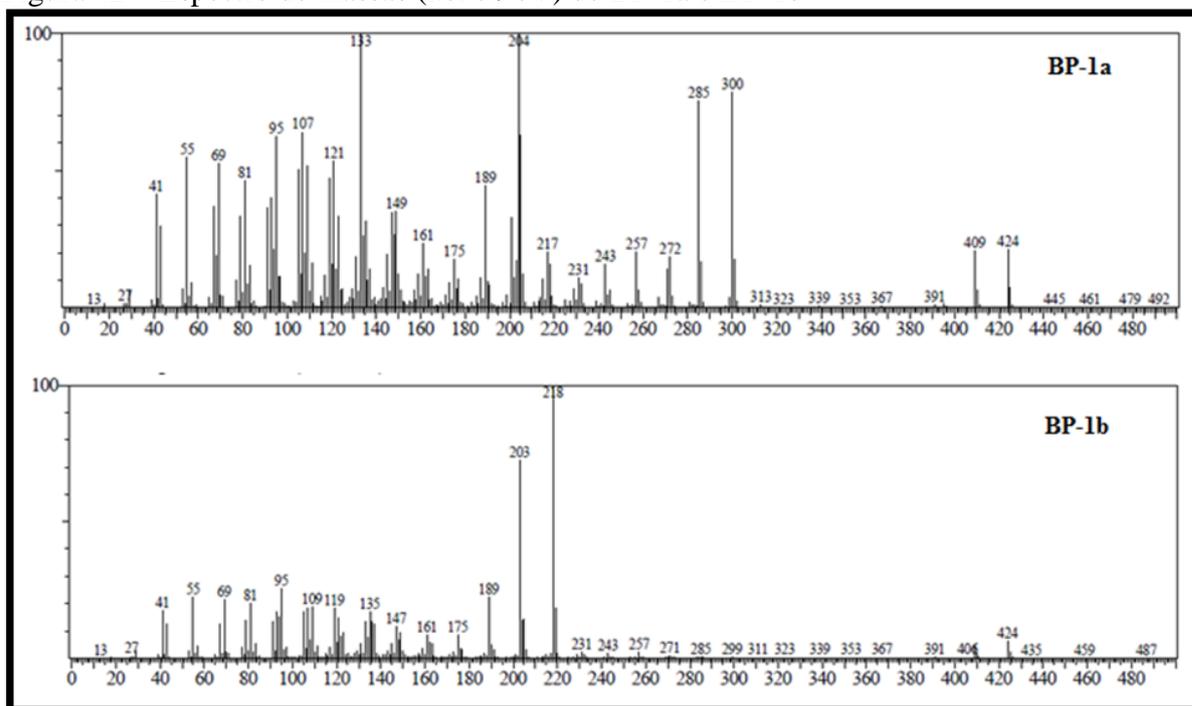


Figura 42 – Espectro de massas (i.e. 70 eV) de BP-1a e BP-1b



5.2.2 Determinação estrutural de BP-2

Sucessivos tratamentos cromatográficos em gel de sílica da fração EECBP (21-28) do extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (EECBP) conforme descrito no item 6.7.2.5 (p. 127), resultou no isolamento de 10,8 mg de um material viscoso avermelhado, com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{25} + 212,57^\circ$ (c 0,000292; CH₃OH), que foi denominado BP-2.

O espectro na região do infravermelho (IV) de BP-2 (Figura 45, p. 75) apresentou uma banda de absorção intensa em 3415 cm⁻¹ característica de deformação axial de O-H, também foram observadas duas bandas de absorção em 1619 cm⁻¹ e em 1507 cm⁻¹ sugestivas de deformação axial de ligação C=C. Neste espectro, a banda de absorção em 1457 cm⁻¹ foi relacionada à deformação angular de CH₂; enquanto as bandas de absorção em 1151 e 1112 cm⁻¹ foram atribuídas à deformação axial de C-O (PAVIA *et al.*, 2010).

No espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) ilustrado na Figura 46, p. 75, observou-se a presença de seis sinais na faixa entre δ 6,25 e 6,85, os quais foram associados a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos. Destes sinais, dois dubletos, um em δ 6,85 (1H; *d*; $J = 8,2$ Hz; H-5) e outro em δ 6,25 (1H; *d*; $J = 2,4$ Hz; H-8) e um duplo dubleto em δ 6,31 (1H; *dd*; $J = 8,2$ e $2,4$ Hz; H-6), sugeriram a presença de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. Por outro lado, o dubleto em δ 6,75 (1H; *d*; $J = 8,0$ Hz; H-5'), o dubleto de dubleto em δ 6,71 (1H; *dd*; $J = 8,1$ e $1,8$ Hz; H-6') e o singlete largo em δ 6,84 (1H; *sl*; H-2') sugeriram a presença de outro anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Neste espectro ainda foram observados quatro multipletos em δ 2,84 (1H; *m*; H-4), em δ 2,65 (1H; *m*; H-4), em δ 2,10 (1H; *m*; H-3) e em δ 1,96 (1H; *m*; H-3), característicos de sinais de hidrogênios ligados a carbonos alifáticos.

O espectro de RMN ¹³C – BB (75 MHz, CD₃OD) de BP-2 (Figura 47, p. 76) apresentou quinze sinais espectrais e através da comparação deste com o espectro de RMN ¹³C – DEPT 135° (Figura 48, p. 76) foi possível a identificação de dois carbonos metilênicos (CH₂), de sete carbonos metínicos (CH) e de seis carbonos não hidrogenados (C) (Tabela 8, p. 71). De acordo com a teoria do deslocamento químico pode-se inferir que os sinais em δ 157,71; 157,30; 146,41 e 146,10 são atribuídos a carbonos aromáticos oxigenados, enquanto o sinal em δ 79,18 refere-se a carbono alifático oxigenado, confirmando a presença da hidroxila sugerida no espectro na região do infravermelho (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE; 2007).

Tabela 8 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-2 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^\circ$

C	CH	CH ₂
157,71 (C-O)	131,06	31,49
157,30 (C-O)	118,81	25,54
146,41 (C-O)	116,29	
146,10 (C-O)	114,53	
135,17	109,20	
114,49	104,21	
	79,18 (CH-O)	
6 C	7 CH	2 CH ₂

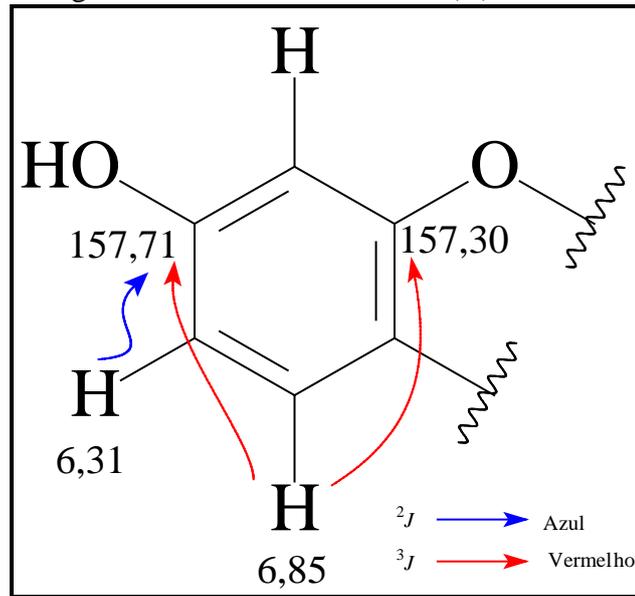
A partir dos dados espectroscópicos de BP-2, foi possível sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a nove.

A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Figura 49, p. 77) permitiu associar inequivocamente todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos (Tabela 9, p. 74).

A análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Figura 50, p. 77) permitiu verificar a correlação entre os hidrogênios em δ 2,10 e 1,96, com os hidrogênios em δ 4,98, 2,84 e 2,65. Por outro lado, o hidrogênio em δ 6,85 está correlacionado com o hidrogênio em δ 6,31.

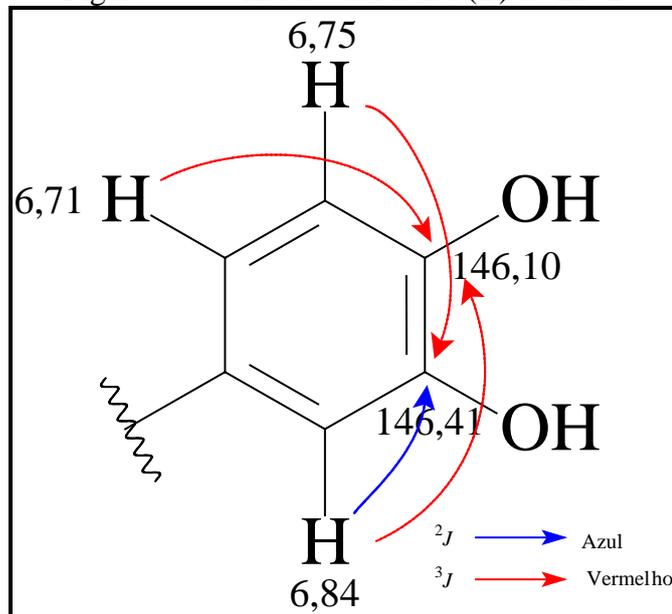
A análise do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 51, p. 78) mostrou a correlação ($^3J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ 6,85 com os carbonos em δ 157,30 e 157,71, como também a correlação ($^2J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ 6,31 com o carbono 157,71 (FIGURA 52).

Figura 52 – Unidade estrutural (A) de BP-2



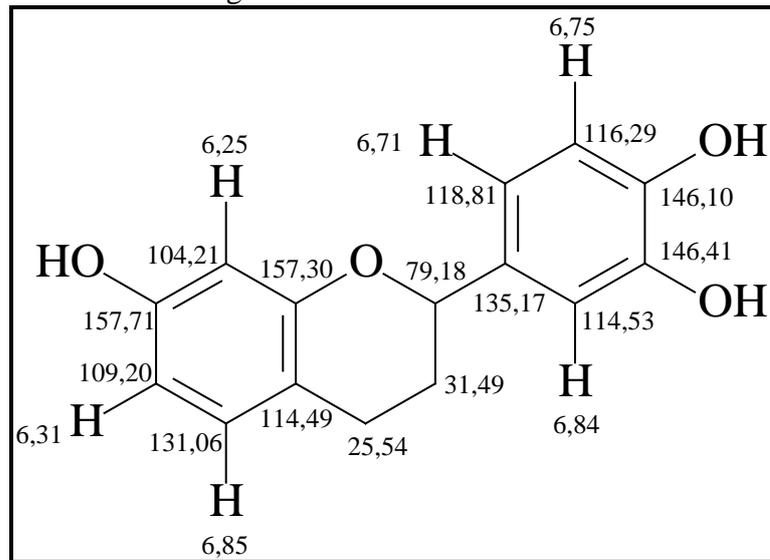
No espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC ainda foram observadas, as correlações ($^2J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ 6,84 e ($^3J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ 6,75 com o carbono δ 146,41; ($^3J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios δ 6,84 e 6,71 com o carbono em δ 146,10 (FIGURA 53).

Figura 53 – Unidade estrutural (B) de BP-2



Após a análise de todos os dados espectroscópicos obtidos, concluiu-se que BP-2, trata-se de (+)-3',4'-diidroxifenil-cromano-7-ol, cuja estrutura está mostrada na Figura 54, p. 73.

Figura 54 – Estrutura de BP-2



Após a pesquisa na literatura, não foram encontrados dados espectroscópicos de RMN ^1H e de ^{13}C para essa estrutura. É válido salientar que devido à presença de um carbono estereogênico na estrutura de (+)-3',4'- diidroxifenil-cromano-7-ol é possível a ocorrência de dois estereoisômeros. É relatada na literatura (ROUX, 1963) a ocorrência de um estereoisômero com sinal negativo de rotação óptica específica e através da comparação deste com o sinal observado em BP-2, pode-se inferir que BP-2 trata-se do enantiômero do metabólito secundário descrito na literatura, sendo, portanto, uma substância inédita na literatura (Figura 55). Os dados de RMN ^1H e de ^{13}C de BP-2 estão mostrados na Tabela 9, p. 74.

Figura 55 – Estrutura do (+)-3',4'- diidroxifenil-cromano-7-ol

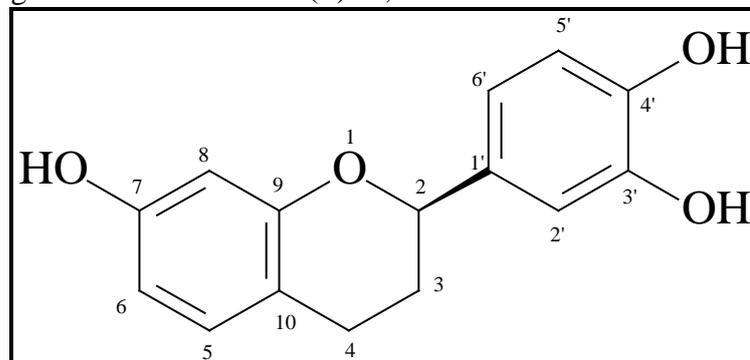


Tabela 9 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-2 (3',4'-diidroxifenil-cromano-7-ol) (CD₃OD)

	HSQC		HMBC	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
C				
7	157,71	-	-	H-5
9	157,30	-	H-8	H-5
3'	146,41	-	H-2'	H-5'
4'	146,10	-	-	H-2'; H-6'
1'	135,17	-	-	H-5'
10	114,49	-	-	-
CH				
2	79,18	4,98	-	H-2'; H-6'
5	131,06	6,85; <i>d</i> ; 8,2	-	-
6	109,20	6,31; <i>dd</i> ; 8,2; 2,4	-	H-8
8	104,21	6,25; <i>d</i> ; 2,4	-	H-6
2'	114,53	6,84; <i>sl</i>	-	-
5'	116,29	6,75; <i>s</i>	-	-
6'	118,81	6,71; <i>dd</i> ; 8,1; 1,8	H-4	H-2
CH₂				
3	31,49	2,10; <i>m</i> ; 1,96; <i>m</i>	-	-
4	25,54	2,84; <i>m</i> ; 2,65; <i>m</i>	-	-

Figura 45 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-2

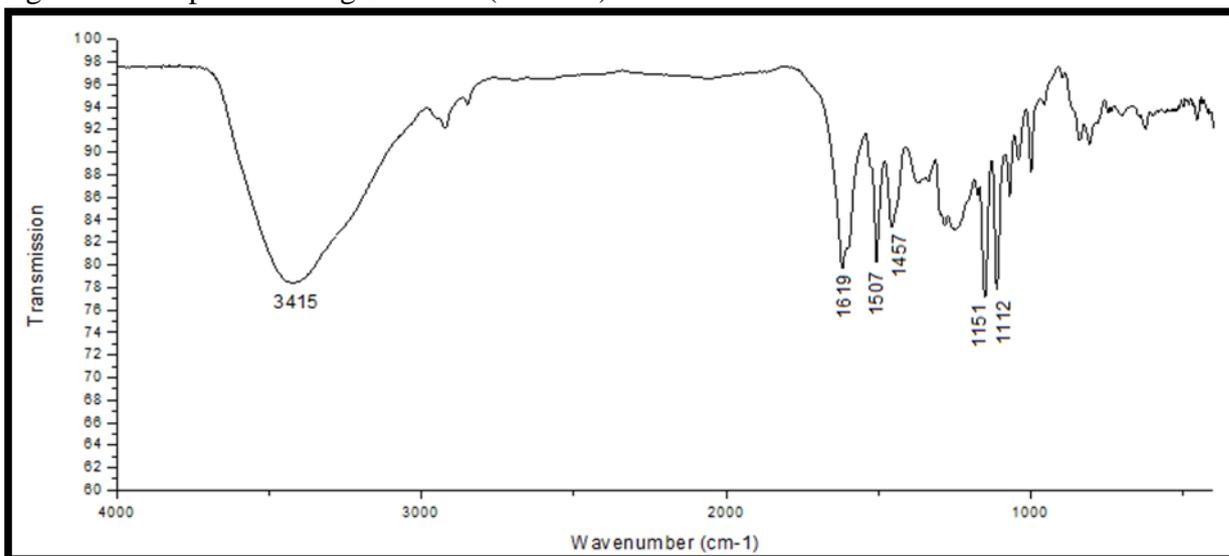
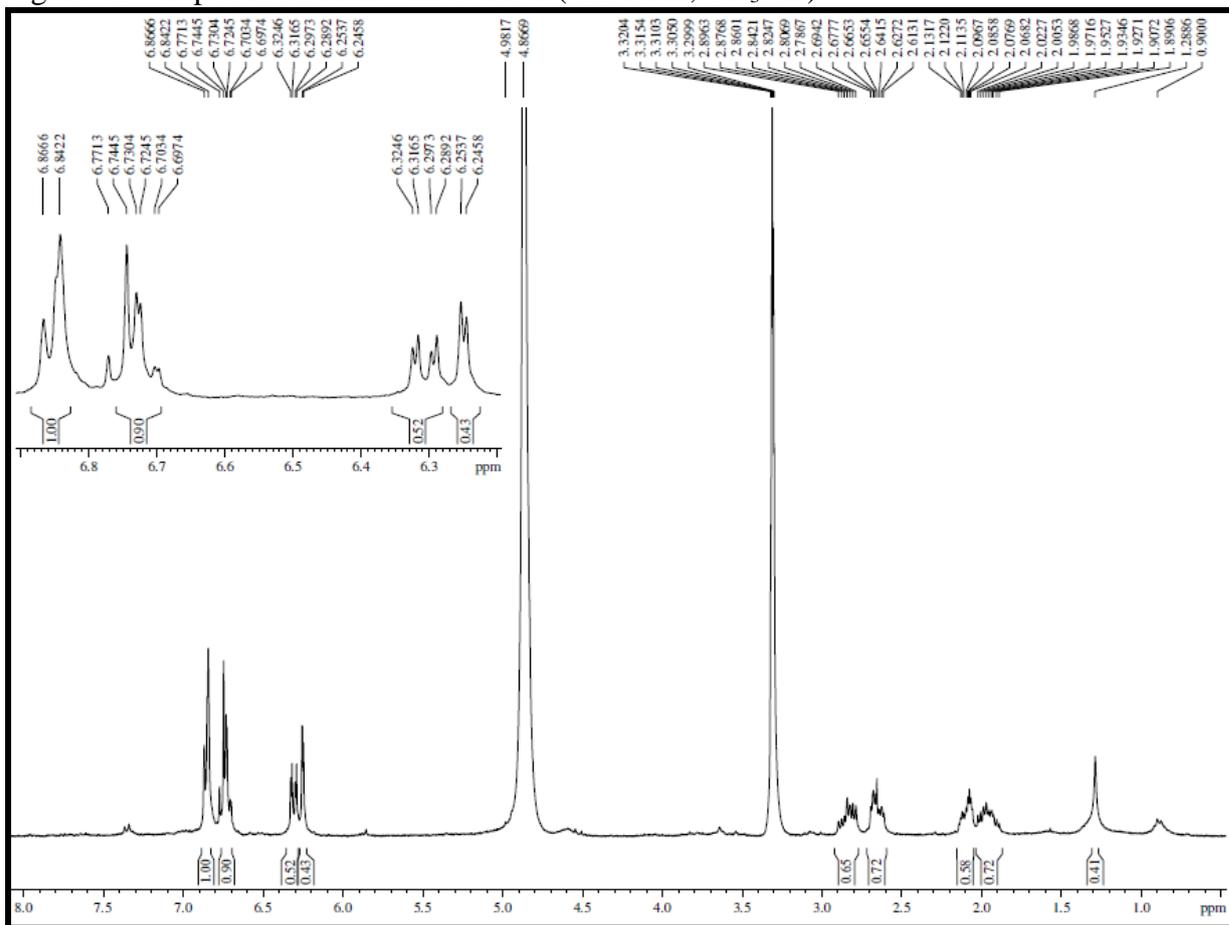
Figura 46 – Espectro de RMN ¹H de BP-2 (300 MHz, CD₃OD)

Figura 47 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-2 (75 MHz, CD_3OD)

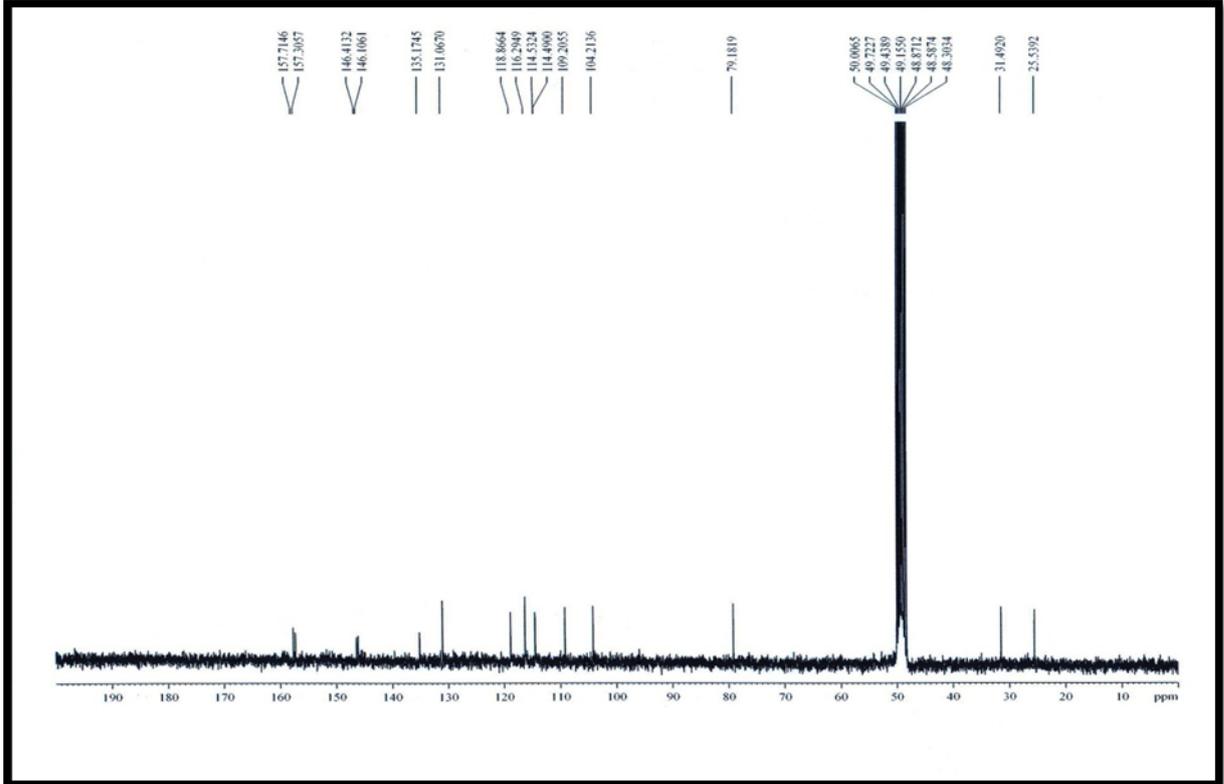


Figura 48 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-2 (75 MHz, CD_3OD)

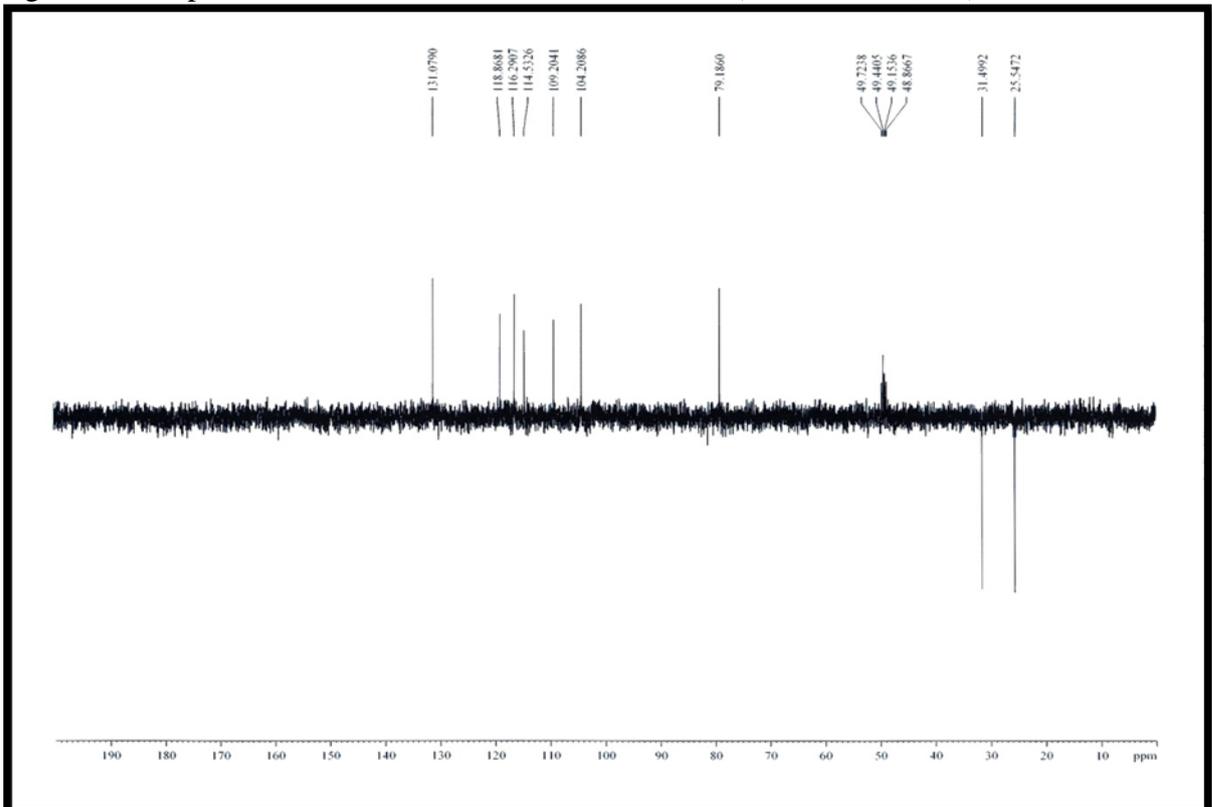


Figura 49 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-2 (300 x 75 MHz, CD_3OD)

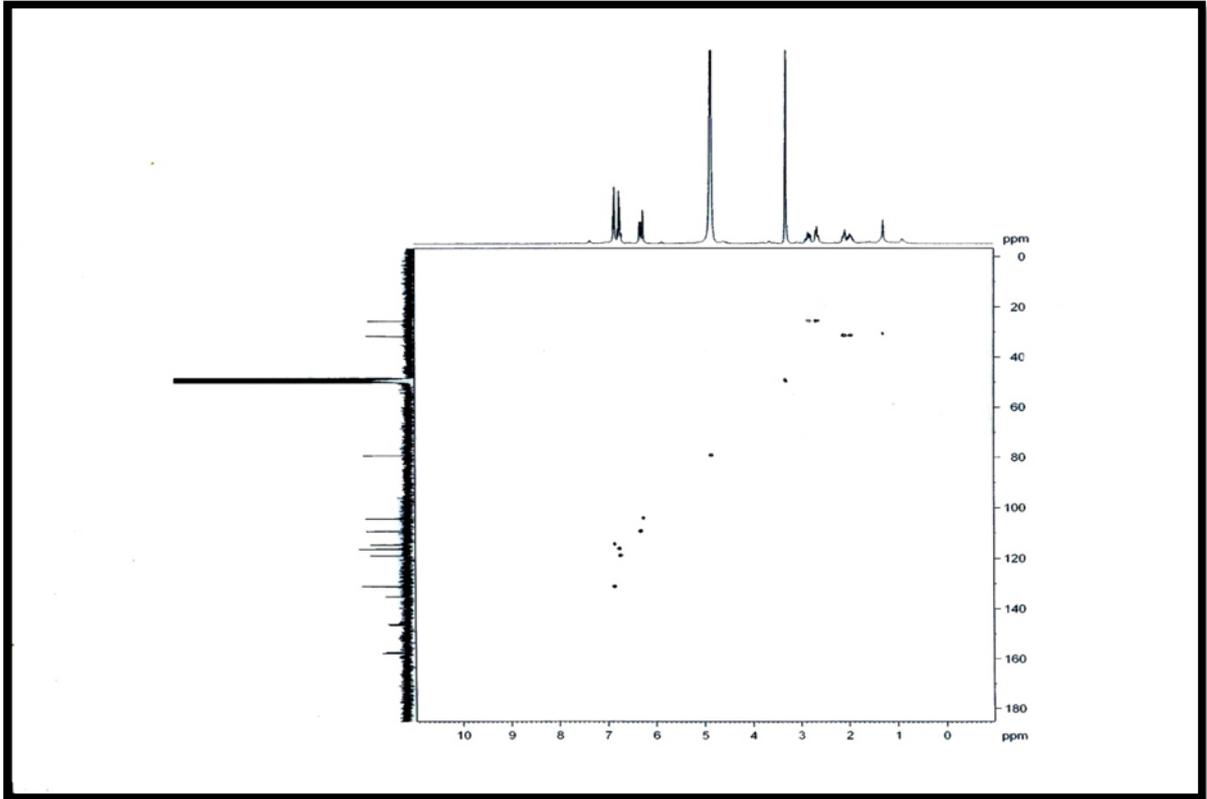


Figura 50 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-2 (300 MHz, CD_3OD)

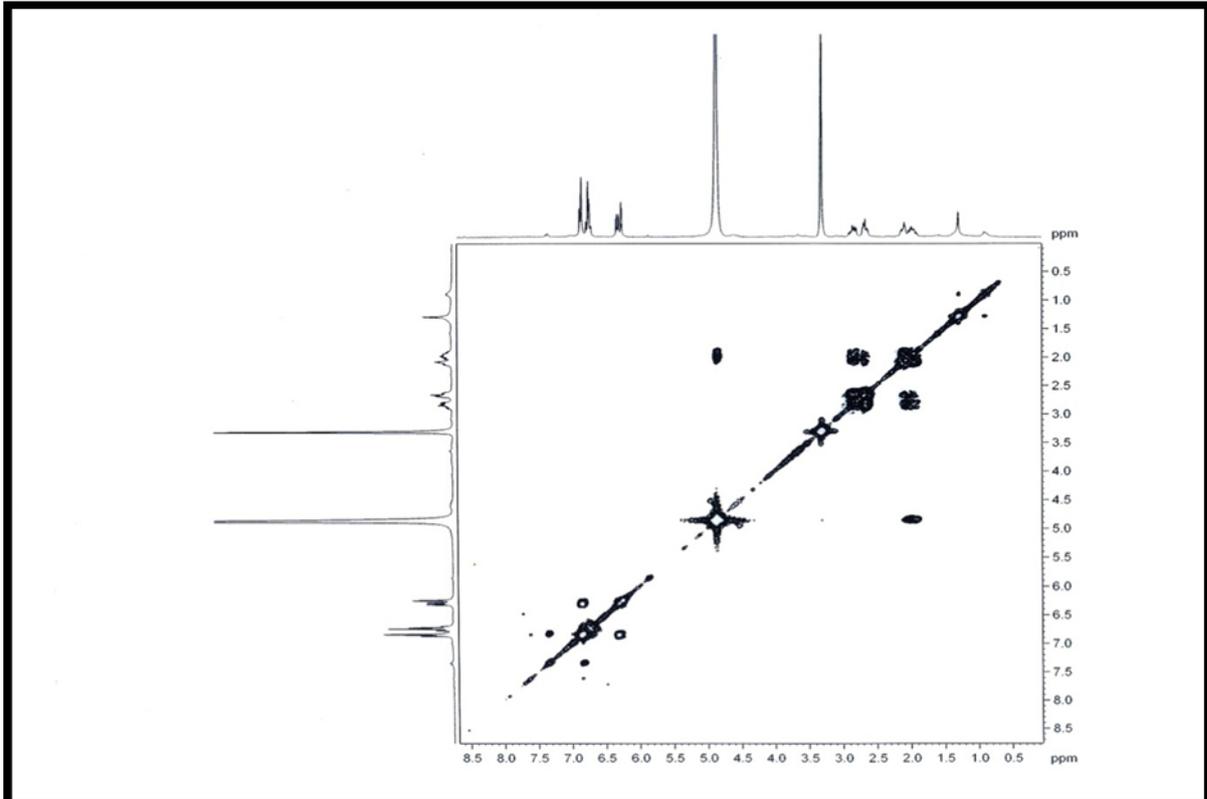
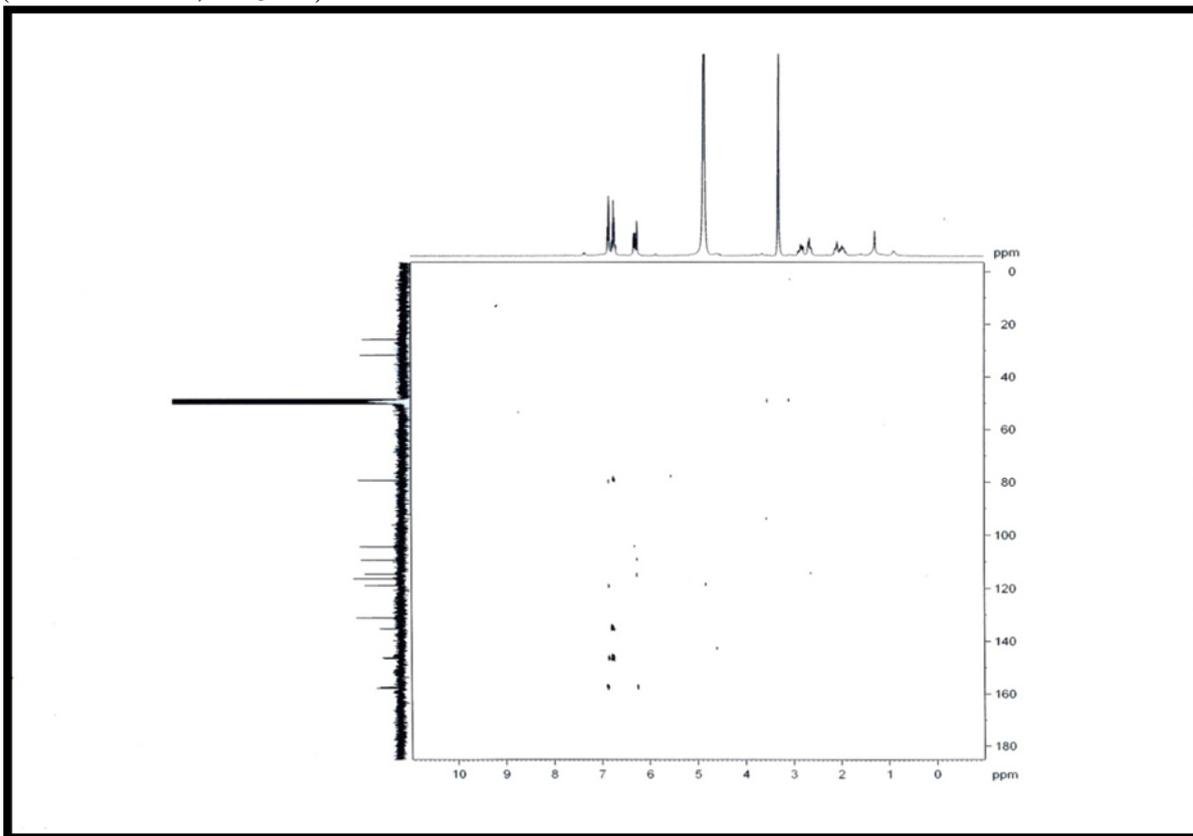


Figura 51 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-2 (300 x 75 MHz, CD_3OD)



5.2.3 Determinação estrutural de BP-3

Sucessivos tratamentos cromatográficos em gel de sílica da fração EECBP (41-70) do extrato etanólico do caule de *Bauhinia pulchella* (EECBP), descrito no item 6.7.2.7 (p. 129), resultou no isolamento de 14,6 mg de um sólido vermelho, com ponto de fusão entre 201,2 e 201,9 °C e rotação óptica específica $[\alpha]_D^{25} - 161,58^\circ$ (c 0,000216; CH₃OH), (lit. $[\alpha]_D^{25} - 24,0^\circ$; c 1,11; CH₃OH) (IMAI *et al.*, 2008), que foi denominado BP-3.

O espectro na região do infravermelho (IV) de BP-3 (Figura 56, p. 85) mostrou banda de absorção em 3348 cm⁻¹ correspondente à deformação axial ligação de O—H e bandas de absorção em 1621 cm⁻¹ e em 1509 cm⁻¹ referentes à deformação axial de ligação C=C. Este espectro mostrou ainda bandas de absorção em 1154, 1114 e 1016 cm⁻¹ características de deformação axial de ligação C-O (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) (Figura 57, p. 85) apresentou seis sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, sendo quatro dubletos em δ 6,86 (1H; d ; $J = 8,2$ Hz; H-5), em δ 6,83 (1H; d ; $J = 1,8$ Hz; H-2'), em δ 6,76 (1H; d ; $J = 8,1$ Hz; H-5') e em δ 6,29 (1H; d ; $J = 2,4$ Hz; H-8) e dois dubletos de dubletos em δ 6,71 (1H; dd ; $J = 8,1$ e 1,8 Hz; H-6') e em δ 6,34 (1H; dd ; $J = 8,2$ e 2,4 Hz; H-6). Levando-se em consideração a magnitude das constantes de acoplamento, pode-se sugerir a presença de hidrogênios posicionados em *orto* e em *meta*. Neste espectro ainda foram observados um dubleto em δ 4,65 (1H; d ; $J = 7,2$ Hz; H-2) como também um multipletto em δ 4,01 (1H; m ; H-3). Finalmente, foram observados dois duplos dubletos em δ 2,68 (1H; dd ; $J = 15,7$ e 8,0 Hz; H-2) e em 2,87 (1H; dd ; $J = 15,7$ e 5,1; H-2) atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos saturados.

O espectro de RMN ¹³C – BB de BP-3 (75 MHz, CD₃OD) de BP-3 (Figura 58, p. 86) mostrou catorze linhas espectrais e através da comparação deste com o espectro de RMN ¹³C – DEPT 135° (Figura 59, p. 86) foi possível identificar um carbono metilênico (CH₂), oito carbonos metínicos (CH) e seis carbonos não hidrogenados (C), conforme mostrado na Tabela 10. Observou-se ainda no espectro de RMN ¹³C – BB que o sinal em δ 146,39 apresentava-se mais intenso que os demais sinais referentes aos carbonos não hidrogenados, dessa forma, concluiu-se que esse sinal pode ser atribuído a dois átomos de carbono.

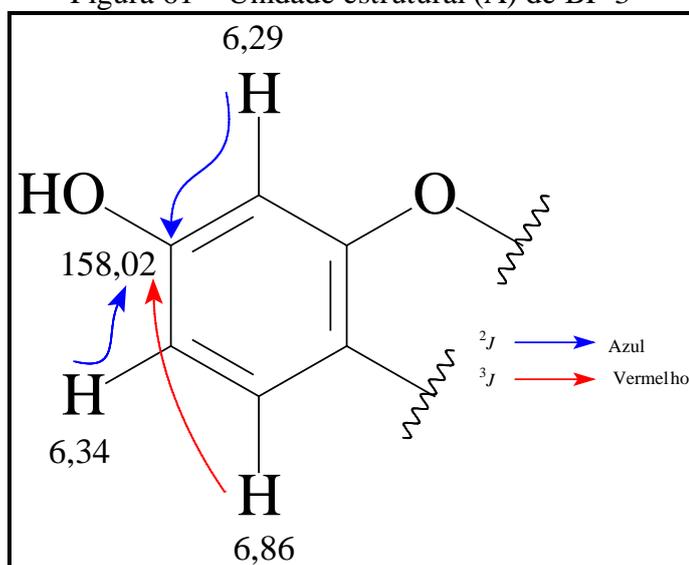
Tabela 10 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-3 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135 $^\circ$

C	CH	CH ₂
158,02 (C-O)	131,43	33,27
156,30 (C-O)	120,02	
146,39 (C-O)	116,29	
146,39 (C-O)	115,29	
132,42	109,63	
112,73	103,79	
	83,14 (CH-O)	
	68,98 (CH-O)	
6 C	8 CH	1 CH ₂

Os dados espectroscópicos de BP-3 permitiram sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a nove, sugerindo, portanto, que esta substância tratava-se de um flavonoide da classe das flavana-3-ol, devido à ausência de sinal de absorção de carbono carbonílico e pela presença de dois sinais em δ 68,98 e em δ 83,14 atribuídos aos carbonos oximetínicos e do sinal em δ 33,27 atribuído ao carbono metilênico.

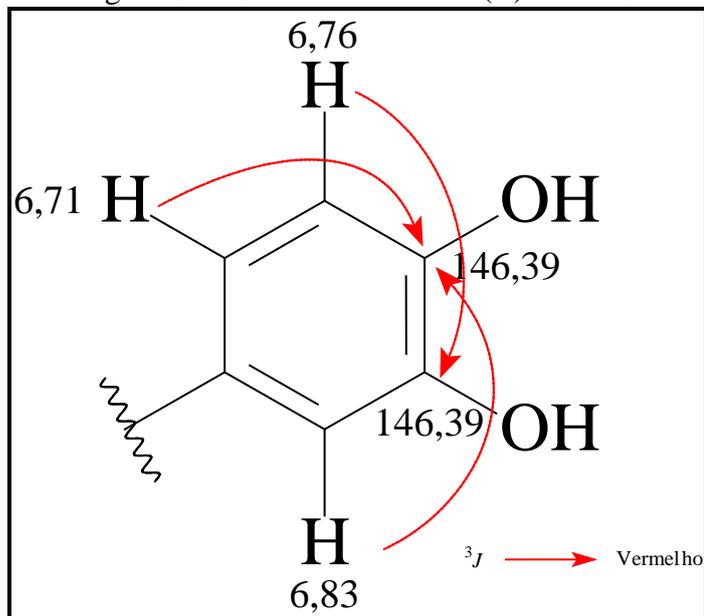
Através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 60, p. 87) foi possível indicar as posições das hidroxilas ligadas aos anéis A e B do flavonoide. Este espectro mostrou as correlações, tanto ($^2J_{\text{CH}}$) como ($^3J_{\text{CH}}$), dos hidrogênios em δ 6,29; 6,86 e 6,34, com o carbono em δ 158,02, definindo, a posição da hidroxila no anel A (FIGURA 61).

Figura 61 – Unidade estrutural (A) de BP-3



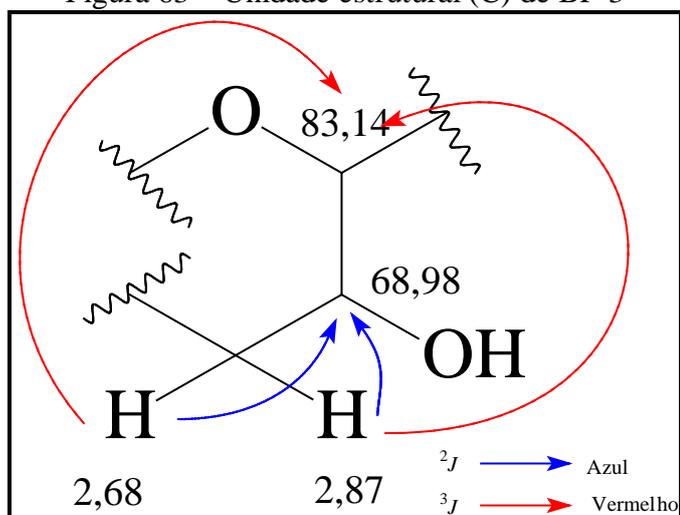
A localização das hidroxilas no anel B foi determinada através da observação das correlações (${}^2J_{\text{CH}}$ e ${}^3J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios em δ 6,76; 6,83 e 6,71 com os carbonos em δ 146,39 (FIGURA 62).

Figura 62 – Unidade estrutural (B) de BP-3



A continuação da análise deste espectro mostrou ainda as correlações (${}^2J_{\text{CH}}$) e (${}^3J_{\text{CH}}$) entre os sinais dos hidrogênios em δ 2,68 e 2,87 com os sinais de carbonos em δ 68,98 e 83,14 (FIGURA 63).

Figura 63 – Unidade estrutural (C) de BP-3

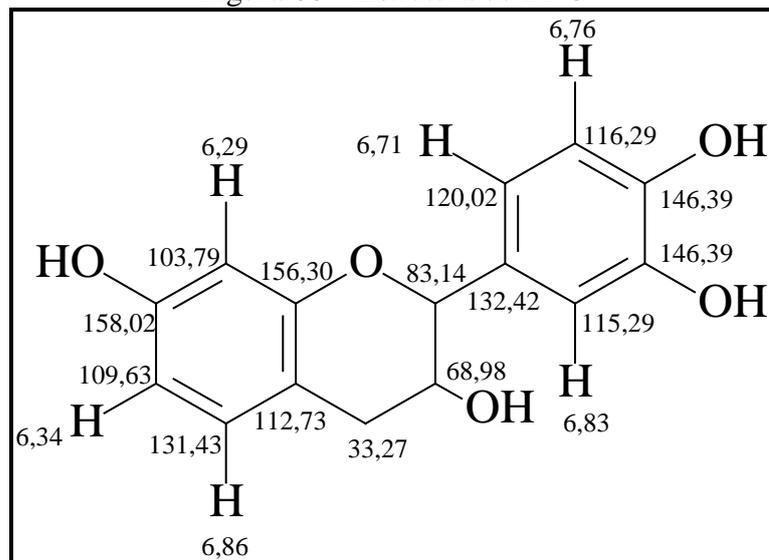


O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Figura 64, p. 87) mostrou a correlação entre o hidrogênio em δ 4,01 com os hidrogênios em δ 2,68 e 2,87. Neste espectro ainda observou-se a correlação entre os hidrogênios em δ 6,86 e 6,34.

A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Figura 65, p. 88) permitiu associar inequivocamente todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos (Tabela 11, p. 84).

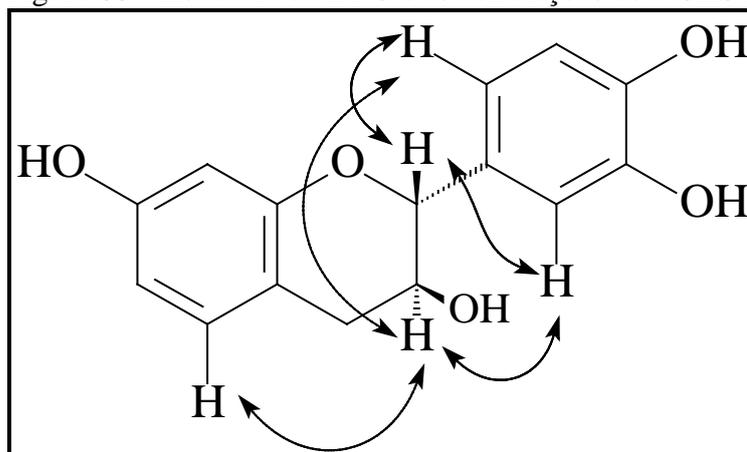
A análise dos dados espectroscópicos obtidos e a posterior comparação com dados registrados na literatura (IMAI *et al.*, 2008) (Tabela 11, p. 84), permitiram identificar BP-3 como o flavonoide da classe das flavana-3-ol denominado 2-(3',4'-diidroxifenil)-cromano-3,7-diol, já isolado da *Bauhinia acuruana* (GÓIS, 2014) e cuja estrutura está mostrada na Figura 66.

Figura 66 – Estrutura de BP-3



Através da análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY de BP-3 (Figura 67, p. 89) pode-se determinar a configuração relativa dos carbonos C-2 e C-3, observando-se neste espectro as correlações entre H-2 e H-2'; H-2 e H-6'; H-3 e H-5; H-3 e H-6' e, por fim, entre H-4 e H-1'. Dessa forma, as configurações de C-2 e C-3 foram determinadas conforme mostrada na Figura 68. A posição *trans-diaxial* dos hidrogênios ligados aos carbonos C-2 e C-3 ainda pode ser confirmada pelo valor da constante de acoplamento (J) igual a 7,2 Hz (PAVIA *et al.*, 2010).

Figura 68 – Estrutura de BP-3 e as correlações do NOESY



Sabendo-se que, a rotação óptica específica de BP-3 forneceu um sinal negativo e através da análise dos dados com dados descritos na literatura (IMAI *et al.*, 2008) (Tabela 11, p. 84), foi possível identificar BP-3 como (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-diidroxifenil)-cromano-3,7-diol, conhecido vulgarmente como (-)-fisetinidol (FIGURA 69).

Figura 69 – Estrutura do (-)-fisetinidol

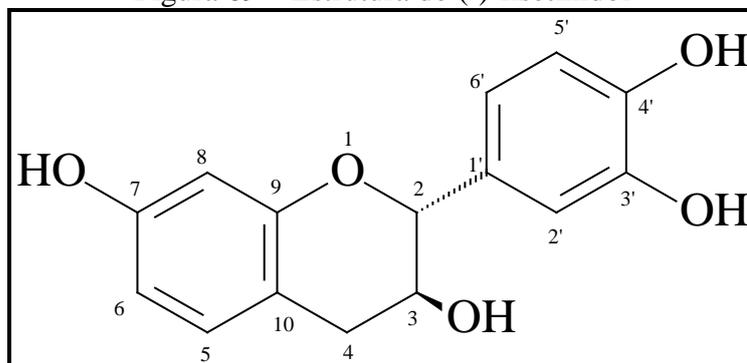


Tabela 11 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-3 comparados com dados descritos na literatura (IMAI *et al.*, 2008) para (-)-fisetinidol (CD₃OD)

	HSQC		HMBC		Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., JHz)
C						
7	158,02	-	H-6	H-5; H-8	155,6	-
9	156,30	-	H-8	H-2; 2H-4	154,9	-
10	112,73	-	2H-4	H-6; H-8	111,2	-
1'	132,42	-	H-2	H-5'	131,0	-
3'	146,39	-		H-5'	145,0	-
4'	146,39	-		H-2'; H-6'	145,0	-
CH						
2	83,14	4,65; <i>d</i> ; 7,2		H-2'; H-4; H-6'	81,7	4,64; <i>d</i> ; 7,1
3	68,98	4,01; <i>m</i>	H-2; 2H-4		67,5	4,02; <i>m</i>
5	131,43	6,86; <i>d</i> ; 8,2		2H-4	130,0	6,88; <i>d</i> ; 7,9
6	109,63	6,34; <i>dd</i> ; 8,2; 2,4			108,2	6,36; <i>dd</i> ; 8,1; 2,4
8	103,79	6,29; <i>d</i> ; 2,4			102,3	6,31; <i>d</i> ; 2,4
2'	115,29	6,83; <i>d</i> ; 1,8		H-2; H-6'	113,8	6,85; <i>d</i> ; 1,5
5'	116,29	6,76; <i>d</i> ; 8,1			114,8	6,78; <i>d</i> ; 9,3
6'	120,02	6,71; <i>dd</i> ; 8,1; 1,8		H-2; H-2'	118,3	6,73; <i>dd</i> ; 9,4; 1,7
CH₂						
4	33,27	2,87; <i>dd</i> ; 15,7; 5,1 2,68; <i>dd</i> ; 15,7; 8,0		H-2; H-5	31,9	2,89; <i>dd</i> ; 4,8; 16,0 2,70; <i>dd</i> ; 4,8; 16,0

Figura 56 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-3

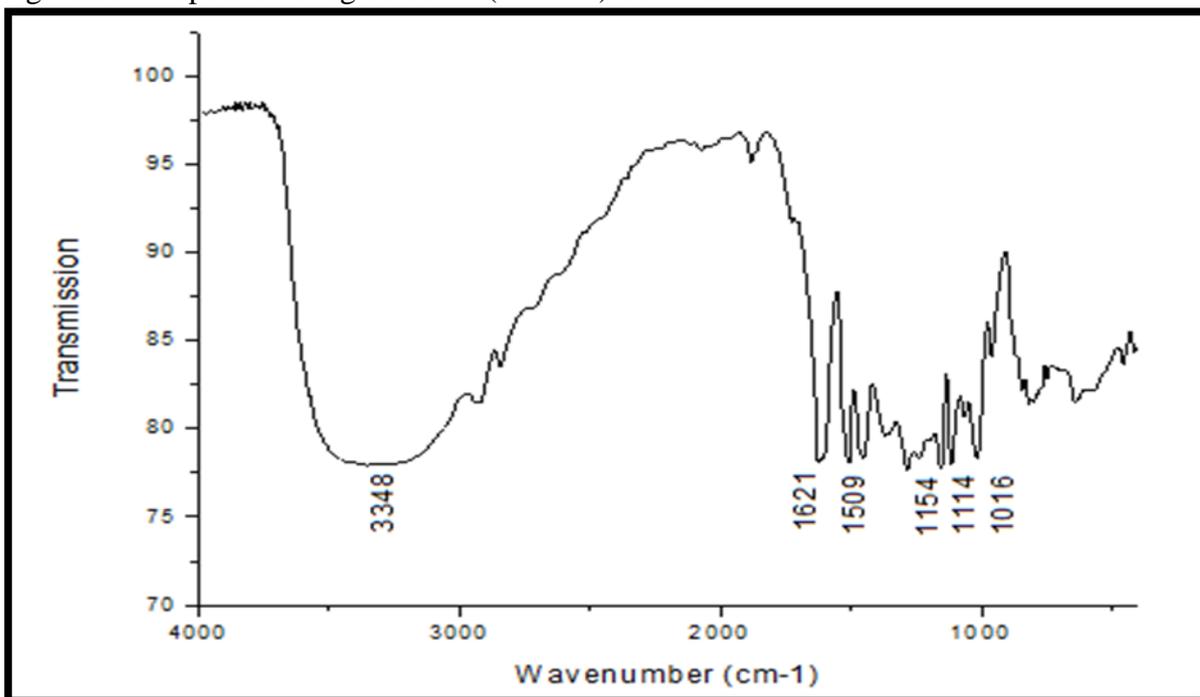
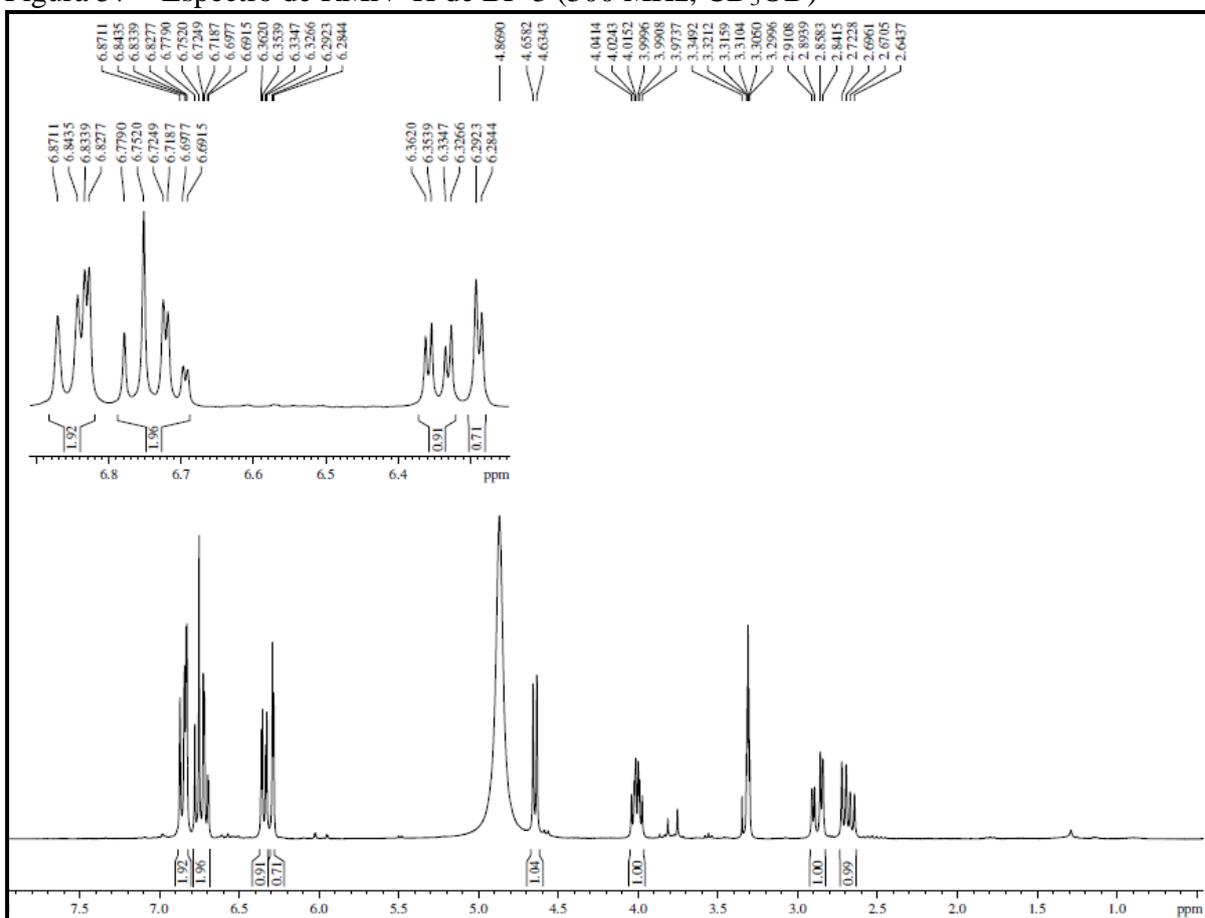
Figura 57 – Espectro de RMN ^1H de BP-3 (300 MHz, CD_3OD)

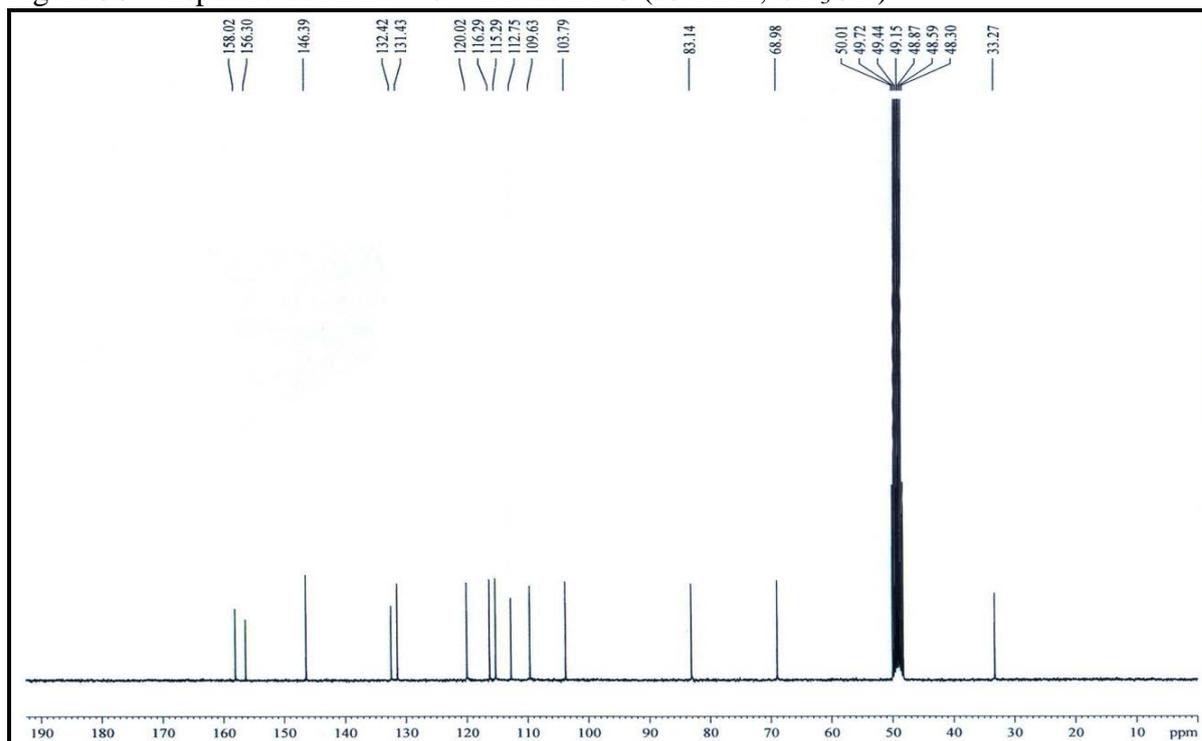
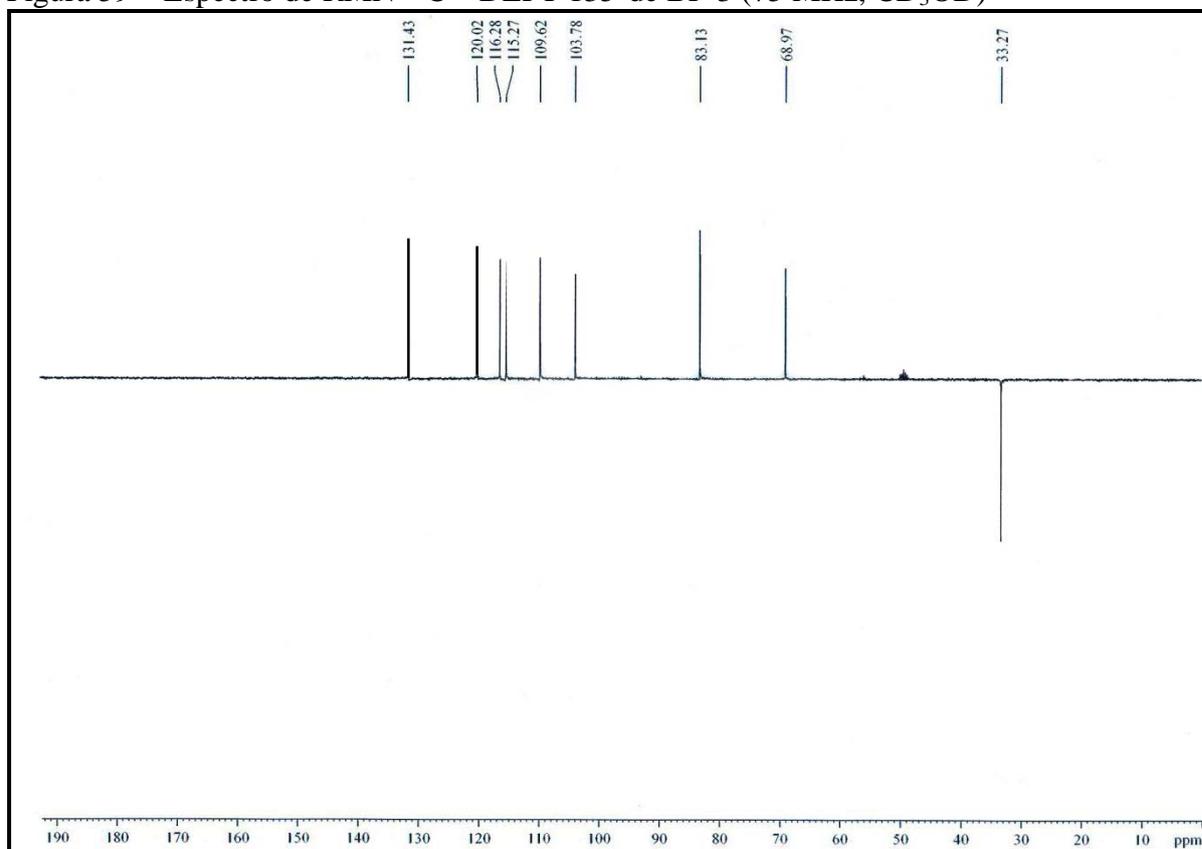
Figura 58 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-3 (75 MHz, CD_3OD)Figura 59 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-3 (75 MHz, CD_3OD)

Figura 60 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-3 (300 x 75 MHz, CD_3OD)

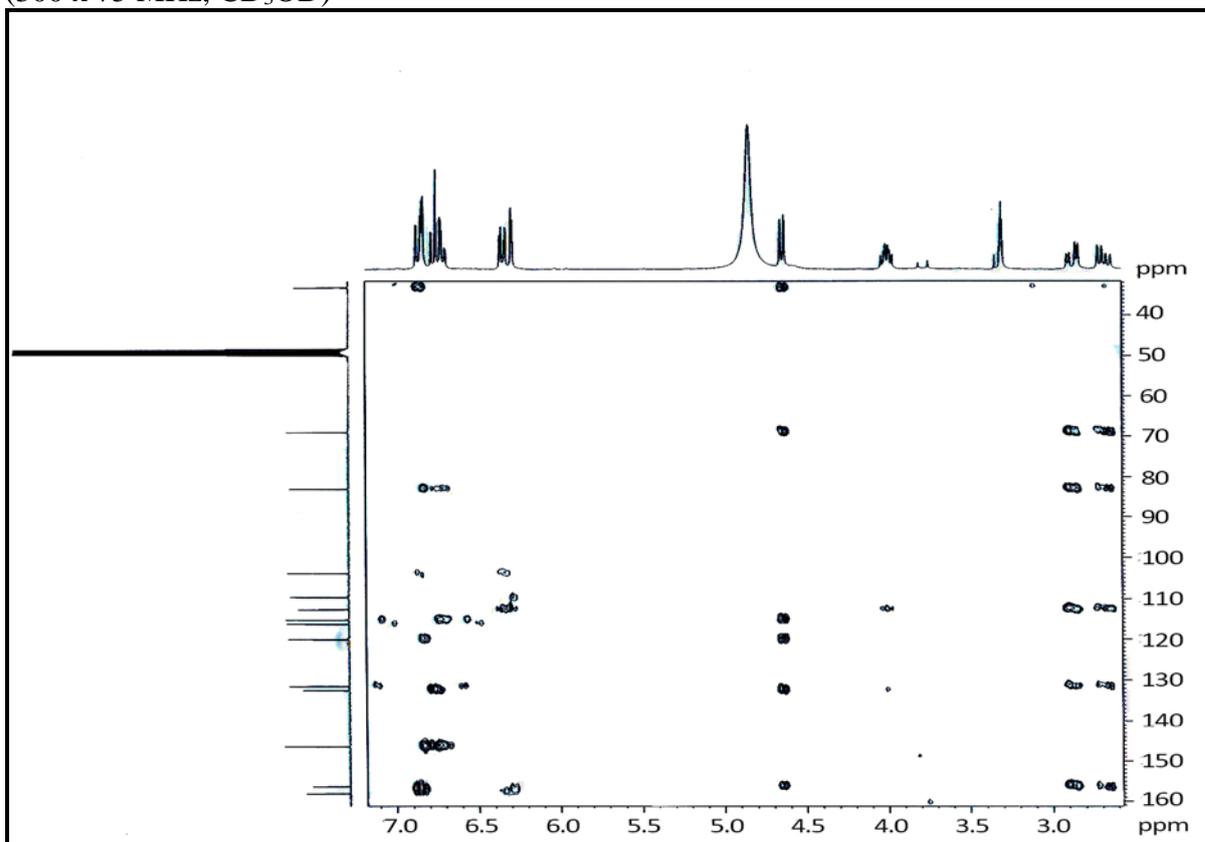


Figura 64 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-3 (300 MHz, CD_3OD)

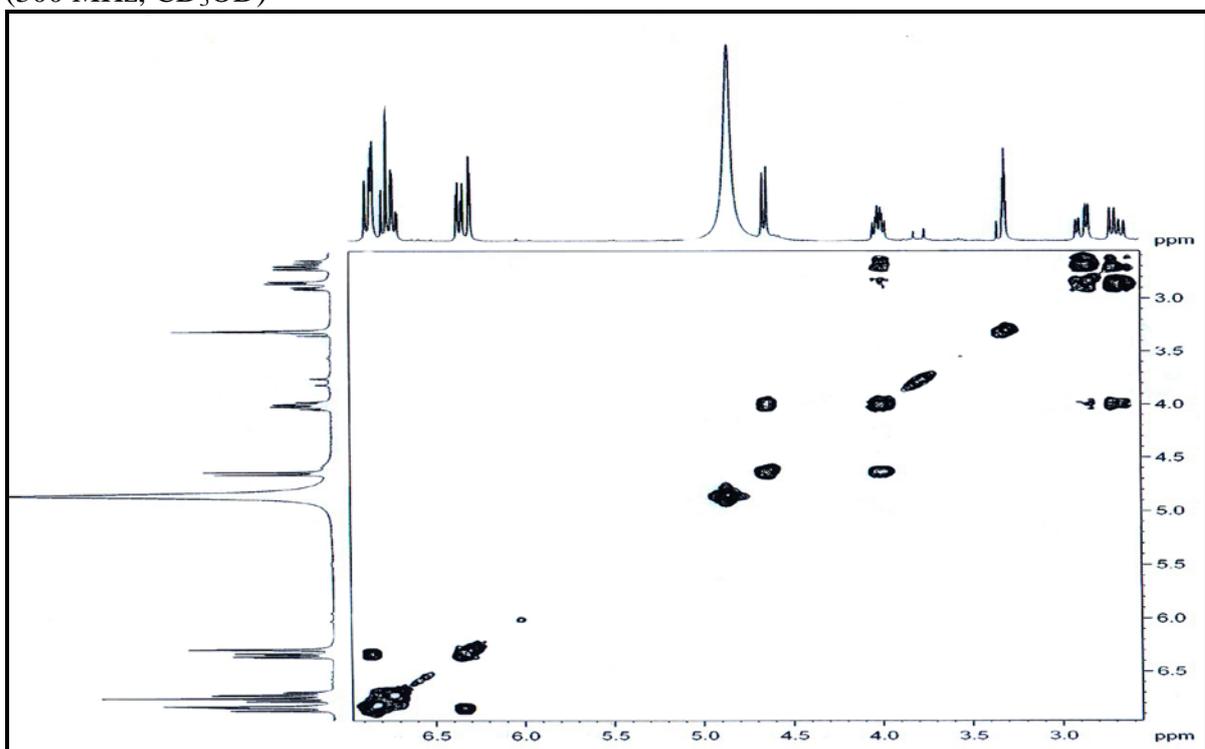


Figura 65 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-3 (300 x 75 MHz, CD_3OD)

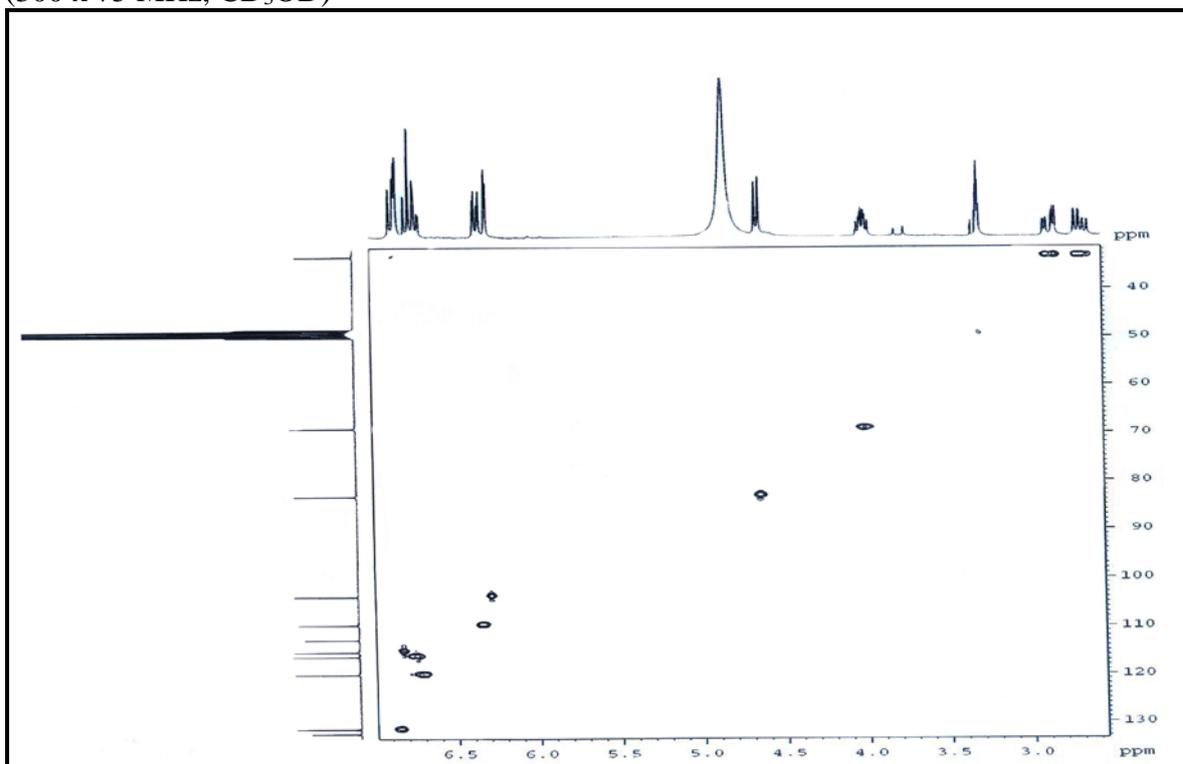
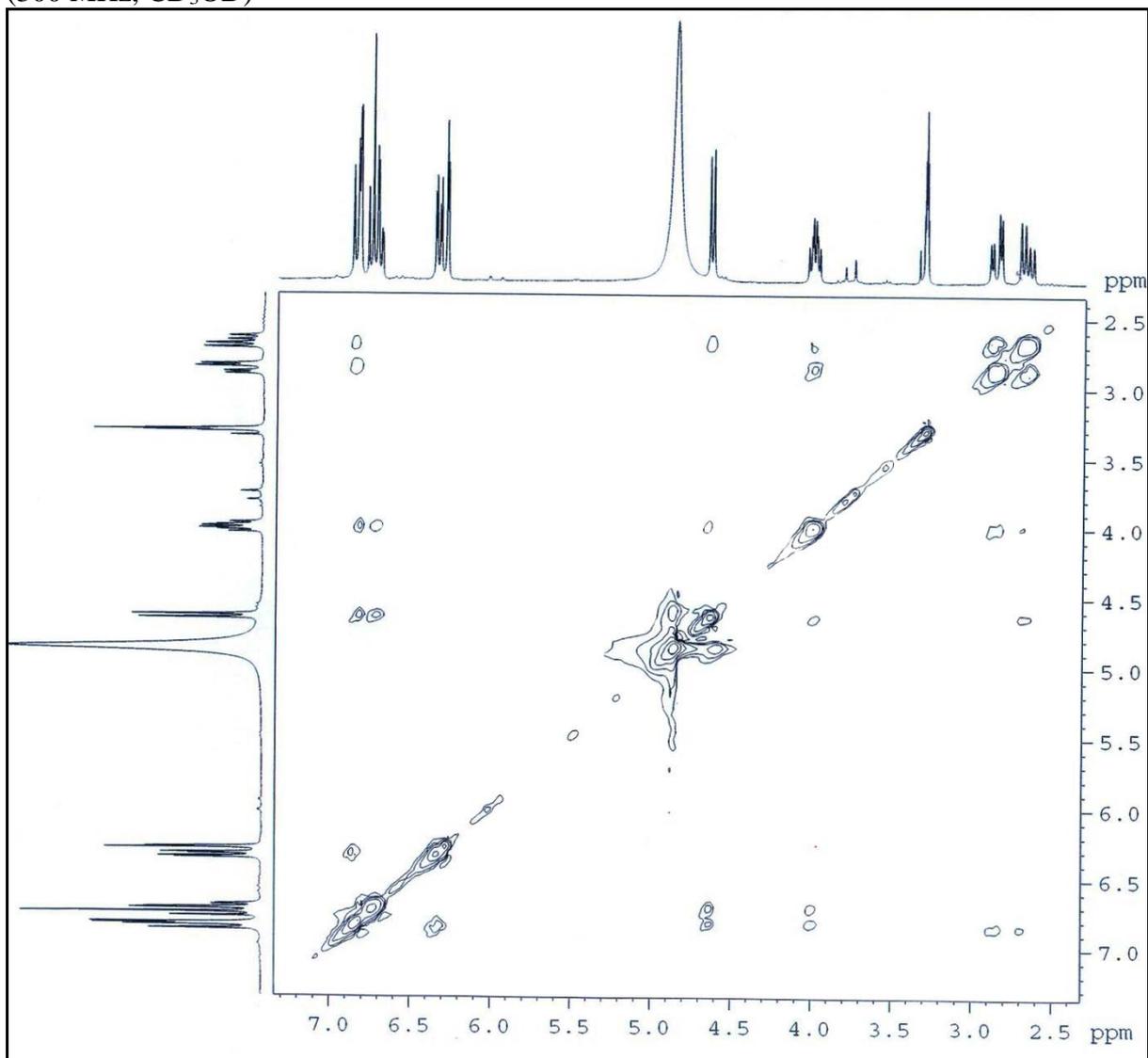


Figura 67 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY de BP-3 (300 MHz, CD_3OD)



5.2.4 Determinação estrutural de BP-4

Após sucessivos tratamentos cromatográficos em gel de sílica da fração EECBP (41-70) do extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (EECBP), descrita no item 6.7.2.7 (p. 129), foram obtidos 10,4 mg de um sólido vermelho, com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{25} + 300,0^\circ$ (c 0,0002; CH₃OH), (lit. $[\alpha]_D^{20} + 57,8^\circ$; c 0,5; MeOH) (MARTIN *et al.*, 2000), que foi denominada BP-4.

O espectro na região do infravermelho de BP-4 (Figura 70, p. 95) revelou uma banda de absorção larga em 3356 cm⁻¹, característica de deformação axial de ligação O-H; bandas de absorção em 1613 e 1519 cm⁻¹ referentes à deformação axial de ligação C=C; banda em 1465 cm⁻¹ atribuída à deformação angular de CH₂ e bandas de absorção em 1145, 1112 e 1014 cm⁻¹ características de deformações axial de ligação C-O (PAVIA *et al.*, 2010).

Através da análise do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) de BP-4 (Figura 71, p. 95), foram observados dubletos em δ 6,96 (1H; d ; $J = 1,6$ Hz; H-2 \prime); δ 6,76 (1H; d ; $J = 8,0$ Hz; H-5 \prime); δ 5,94 (1H; d ; $J = 2,0$ Hz; H-6) e δ 5,92 (1H; d ; $J = 2,6$ Hz; H-8) e um dubleto de dubleto em δ 6,80 (1H; dd ; $J = 8,1$; 1,8 Hz; H-6 \prime). Observando-se os valores das constantes de acoplamento (J) pode-se concluir que os hidrogênios em δ 6,80 (dd ; $J = 8,1$; 1,8 Hz; H-6 \prime) e em δ 6,76 (d ; $J = 8,0$ Hz; H-5 \prime) estão em posição *orto*. Por outro lado, os hidrogênios em δ 5,94 (d ; $J = 2,0$ Hz; H-6) e δ 5,92 (d ; $J = 2,6$ Hz; H-8) estão *meta* posicionados (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ¹³C – BB (125 MHz, CD₃OD) de BP-4, mostrado na Figura 72, p. 96, mostrou quinze sinais espectrais e através da comparação deste espectro com o espectro de RMN ¹³C – DEPT 135° (Figura 73, p. 96), pode-se verificar que BP-4 apresenta sete carbonos não hidrogenados (C), um carbono metilênico (CH₂) e sete carbonos metínicos (CH) (TABELA 12).

Tabela 12 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-4 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°

C	CH	CH ₂
158,15 (C-O)	119,55	29,41
157,82 (C-O)	116,04	
157,52 (C-O)	115,47	
146,09 (C-O)	96,54	
145,93 (C-O)	96,04	
132,44	80,03 (CH-O)	
100,22	67,64 (CH-O)	
7C	7 CH	1CH ₂

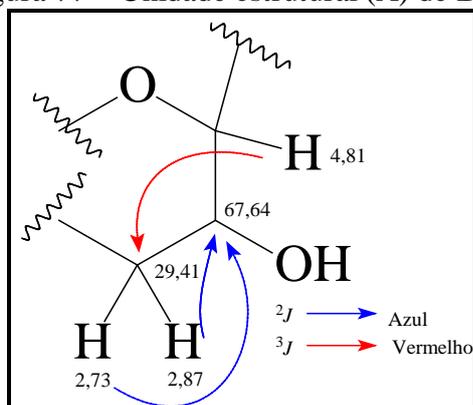
Os dados espectroscópicos de BP-4 permitiram sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a nove, sugerindo, portanto, que esta substância, assim como BP-3, tratava-se de uma flavana-3-ol.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Figura 74, p. 97) mostrou a correlação entre o hidrogênio em δ 4,18 com os hidrogênios em δ 2,73 e 2,87.

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-4 (Figura 75, p. 97) permitiu associar de forma inequívoca todos os sinais dos hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbono, conforme mostrado na Tabela 13, p. 94.

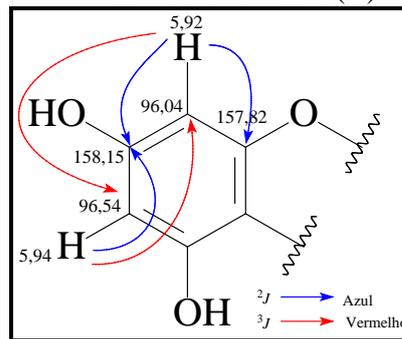
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figura 76, p. 98) mostrou a correlação ($^3J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ 4,81 com o carbono em δ 29,41; assim como a correlação ($^2J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios em δ 2,73 e δ 2,87 com o carbono δ 67,64 (Figura 77), confirmando, dessa forma, a posição da hidroxila no anel C do flavonoide.

Figura 77 – Unidade estrutural (A) de BP-4



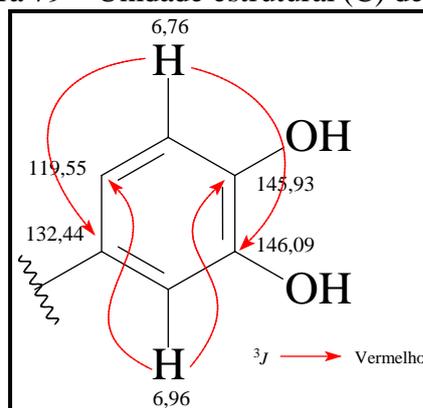
As posições das hidroxilas nos anéis A e B de BP-4 também foram definidas através da análise do espectro HMBC. Neste espectro foram observadas as correlações ($^3J_{CH}$) entre os hidrogênios em δ 5,92 e 5,94 com os carbonos em δ 96,54 e 96,04, respectivamente. Foram ainda observadas, as correlações ($^2J_{CH}$) entre os hidrogênios em δ 5,92 com os carbonos em δ 158,15 e 157,82, e do hidrogênio em δ 5,94 com o carbono em δ 158,15, definindo, dessa forma, a posição das hidroxilas no anel A (FIGURA 78).

Figura 78 – Unidade estrutural (B) de BP-4



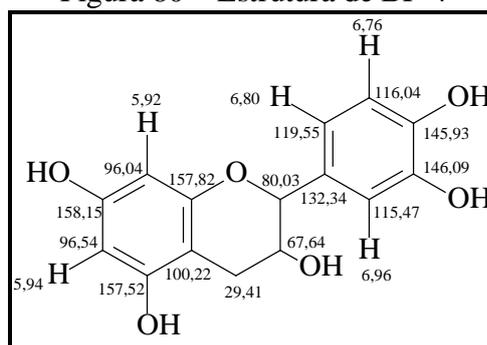
As correlações ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio em δ 6,76 e 6,96 com os carbonos em δ 146,09 e em 145,93, respectivamente, permitiram localizar as hidroxilas do anel B do flavonoide. Neste espectro ainda foram observadas as correlações ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio em δ 6,76 com os carbonos em δ 132,44; correlações semelhantes ($^3J_{CH}$) também foram observadas entre o hidrogênio em δ 6,96 com o carbono em δ 119,55 (FIGURA 79).

Figura 79 – Unidade estrutural (C) de BP-4



A análise dos dados espectroscópicos obtidos e a posterior comparação com dados registrados na literatura (BALDÉ *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 2000) (Tabela 13, p. 94), permitiram identificar BP-4 como a flavan-3-ol, denominada 2-(3',4'-diidroxifenil)-cromano-3,5,7-triol, cuja estrutura está mostrada na Figura 80.

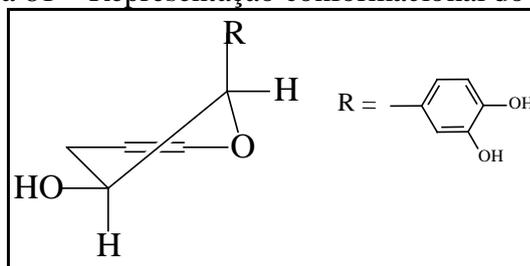
Figura 80 – Estrutura de BP-4



A estrutura de BP-4 apresenta dois centros estereogênicos (C-2 e C-3) ocorrendo, portanto, a possibilidade para a existência de quatro estereoisômeros. Vale salientar que apenas dois desses isômeros apresentam sinal de valor positivo de rotação óptica específica, dessa forma, a molécula isolada, que apresentou valor positivo, poderia se tratar de 2*R*,3*S*-(+)-catequina ou de 2*S*,3*S*-(+)-epicatequina (TASDEMIR *et al.*, 2006).

A posição *trans-diaxial* dos hidrogênios ligados aos carbonos C-2 e C-3 da (+)-catequina geraria um dubleto com uma alta constante de acoplamento (*J*), o que não foi observado no espectro de RMN ¹H (Figura 71, p. 95). Neste espectro, foi, portanto, observado um singlete intenso, que pode ser explicado pela formação de um ângulo diedro de 90° entre esses hidrogênios que, de acordo com a relação de Karplus, torna nula a constante de acoplamento que está representado na Figura 81 (PAVIA *et al.*, 2010). Dessa forma, foi possível definir as configurações de C-2 e C-3, e a estrutura de BP-4 foi definida como (2*S*,3*S*)-2-(3',4'-diidroxifenil)-cromano-3,5,7-triol, representada na Figura 82, conhecida como (+)-epicatequina, substância inédita no gênero *Bauhinia*.

Figura 81 – Representação conformacional do anel C



Após a análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H – NOESY de BP-4 (Figura 83, p. 99) pode-se confirmar a configuração relativa dos carbonos C-2 e C-3, observando-se neste espectro as correlações entre H-2 e H-3; H-2 e H-2' e, por fim, H-2 e H-6', que estão demonstradas na Figura 84.

Figura 84 – Estrutura de BP-4 e as correlações do NOESY

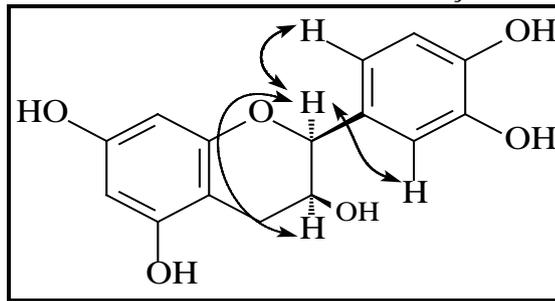
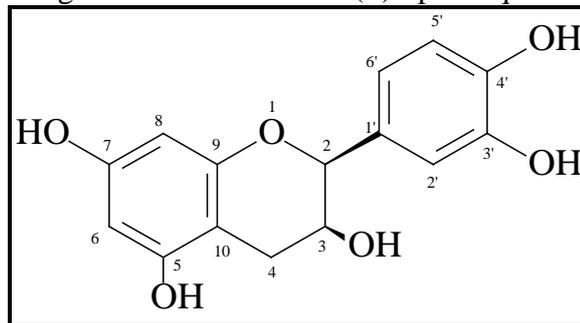


Figura 82 – Estrutura da (+)-epicatequina

Tabela 13 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-4 comparados com dados descritos na literatura (BALDÉ *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 2000) para (+)-epicatequina

	HSQC		HMBC		Literatura	
					(CD ₃ OD) BALDÉ <i>et al.</i> , 1991	(CD ₃ COCD ₃) MARTIN <i>et al.</i> , 2000
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)
C						
7	158,15	-	H-8; H-6	-	158,1	-
9	157,82	-	H-8	-	157,6	-
5	157,52	-	H-6	H-4	157,9	-
3'	146,09	-	-	H-5'	145,7	-
4'	145,93	-	-	H-2'	145,7	-
1'	132,44	-	H-2	H-5'	132,6	-
10	100,22	-	H-4	H-6; H-8	100,8	-
CH						
5'	116,04	6,76 <i>d</i> ; 8,0	-	-	115,8	6,78; <i>d</i> ; 8,0
6'	119,55	6,80; <i>dd</i> ; 8,1; 1,8	-	H-2; H-2'	120,3	6,83; <i>dd</i> ; 8,0; 1,9
2'	115,47	6,96; <i>d</i> ; 1,6	-	H-2	115,3	7,05; <i>d</i> ; 1,9
6	96,54	5,94; <i>d</i> ; 2,0	-	H-8	96,9	6,02; <i>d</i> ; 2,2
8	96,04	5,92; <i>d</i> ; 2,6	-	H-6	96,5	5,92; <i>d</i> ; 2,2
2	80,03	4,82; <i>s</i>	-	H-6'; H-2'; H-4	79,8	4,88; <i>t</i> ; 0,7
3	67,64	4,18; <i>m</i>	H-4	-	67,4	4,19; <i>m</i>
CH₂						
4	29,41	2,87; <i>dd</i> ; 16,7; 4,6 2,73; <i>dd</i> ; 16,9; 3,0	-	H-2	29,2	2,87; <i>dd</i> ; 16,6; 4,6 2,74; <i>dd</i> ; 16,6; 2,9

Figura 70 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-4

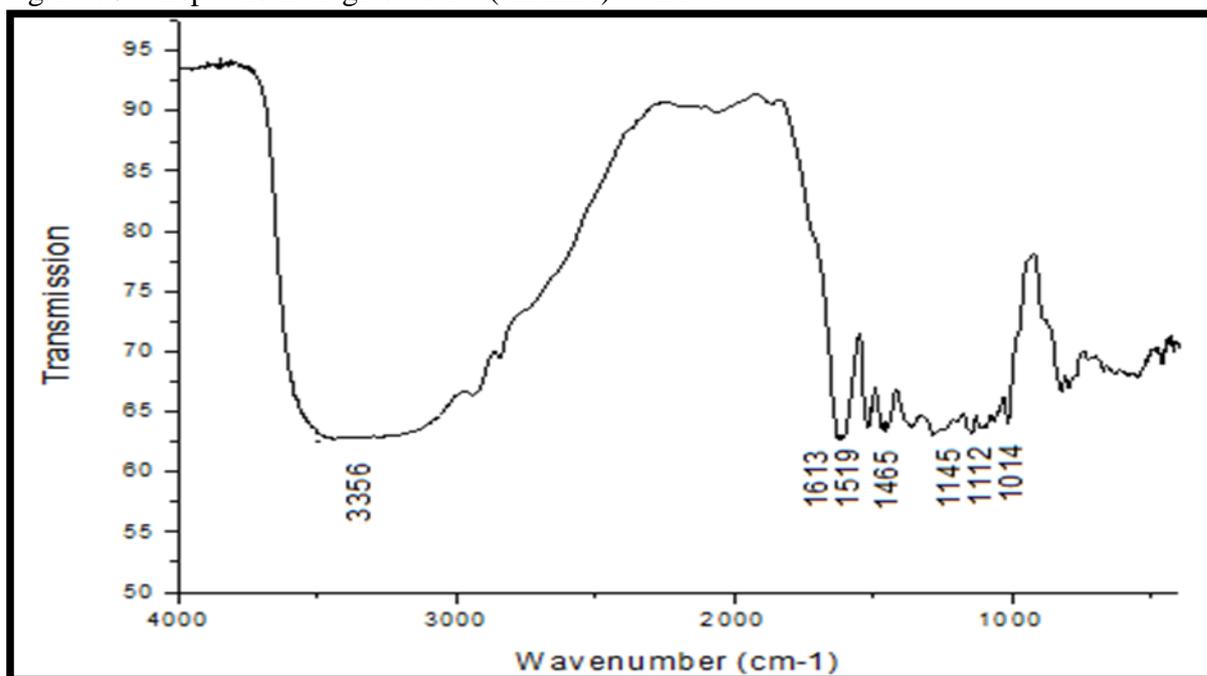
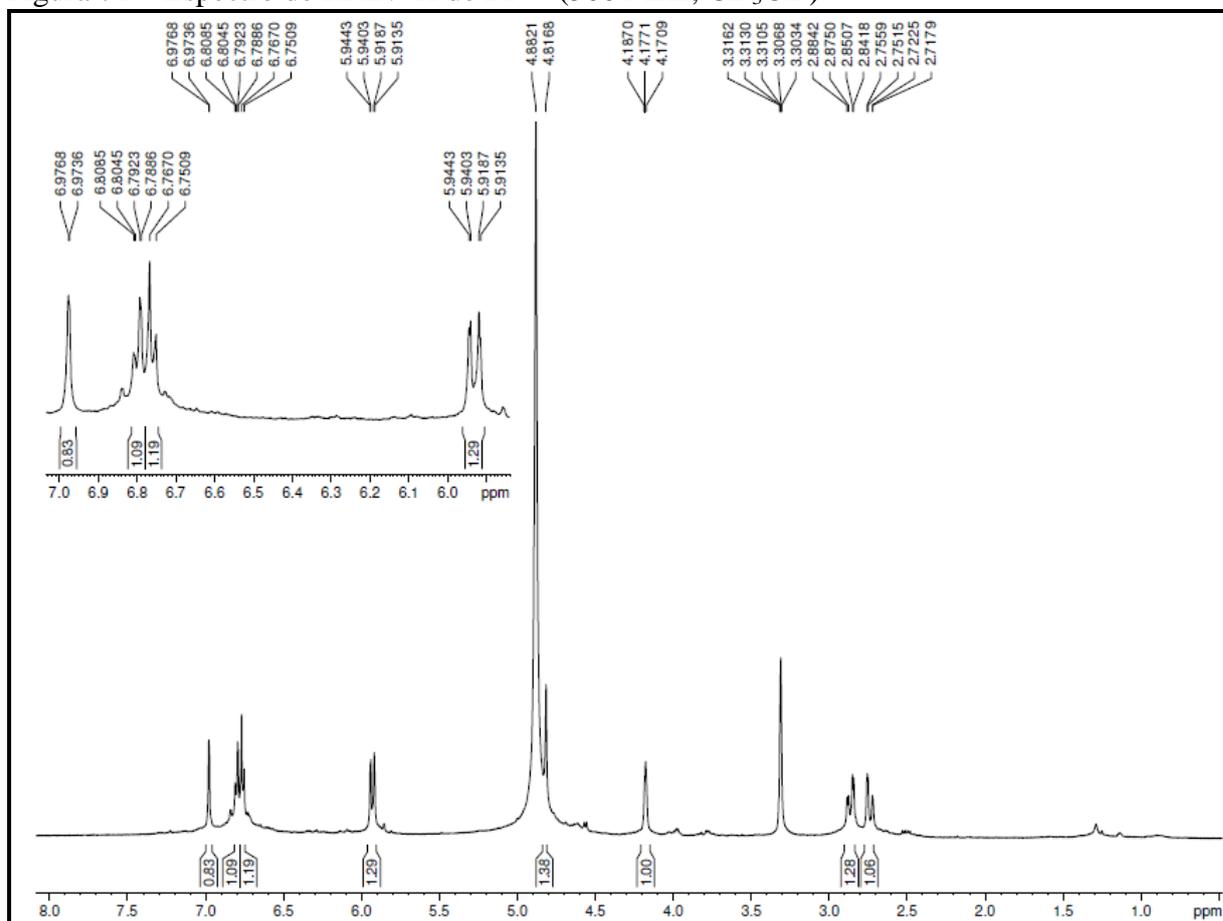
Figura 71 – Espectro de RMN ^1H de BP-4 (500 MHz, CD_3OD)

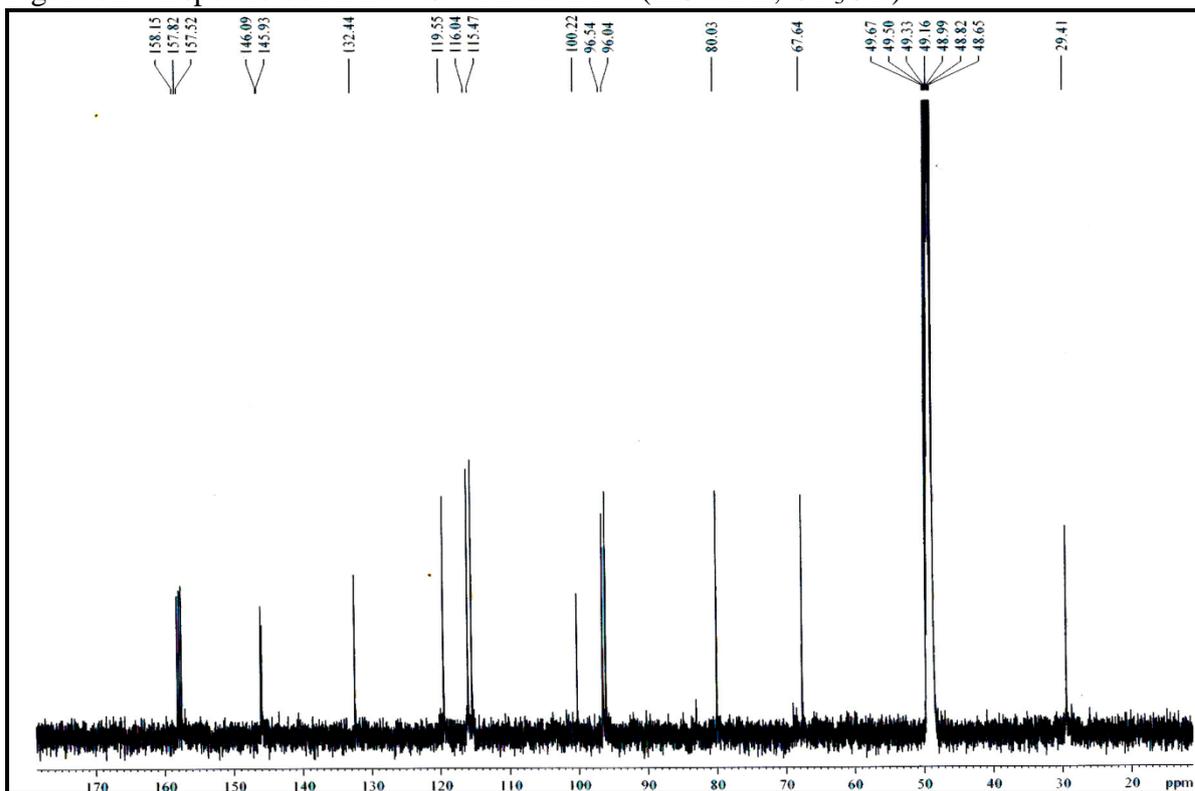
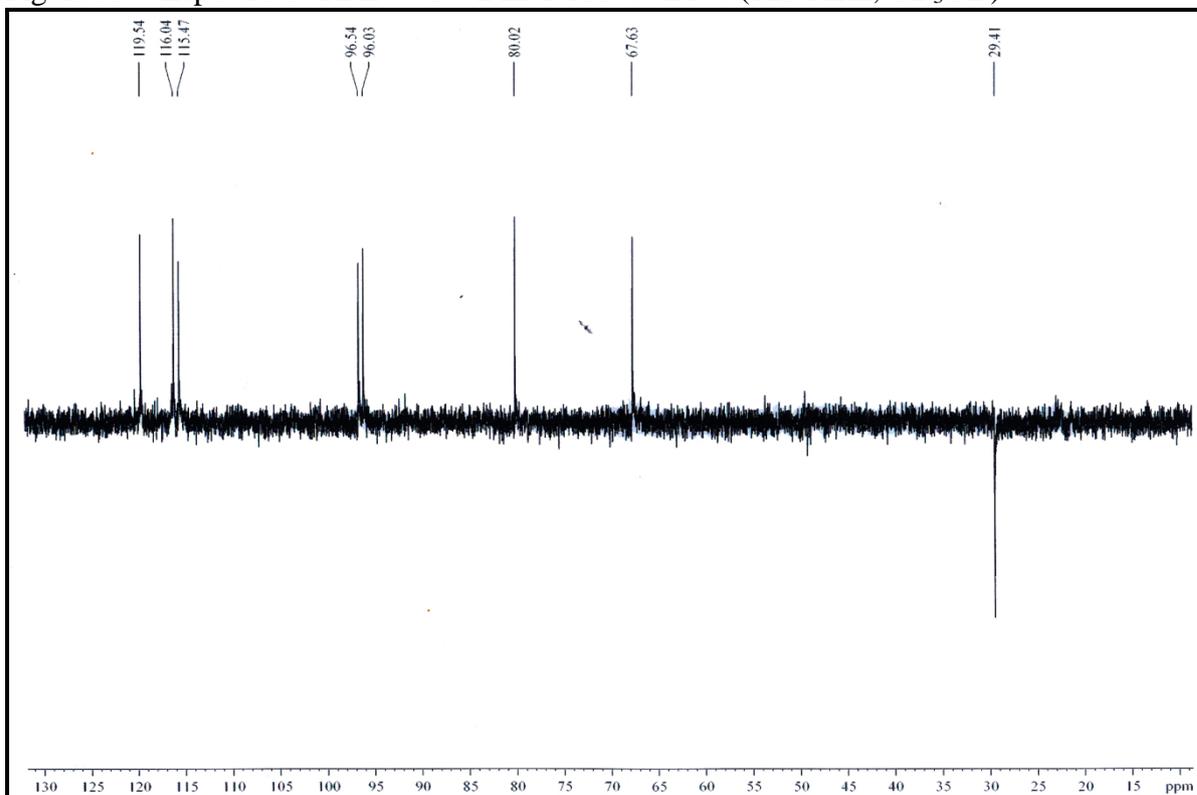
Figura 72 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-4 (125 MHz, CD_3OD)Figura 73 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-4 (125 MHz, CD_3OD)

Figura 74 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-4 (500 MHz, CD_3OD)

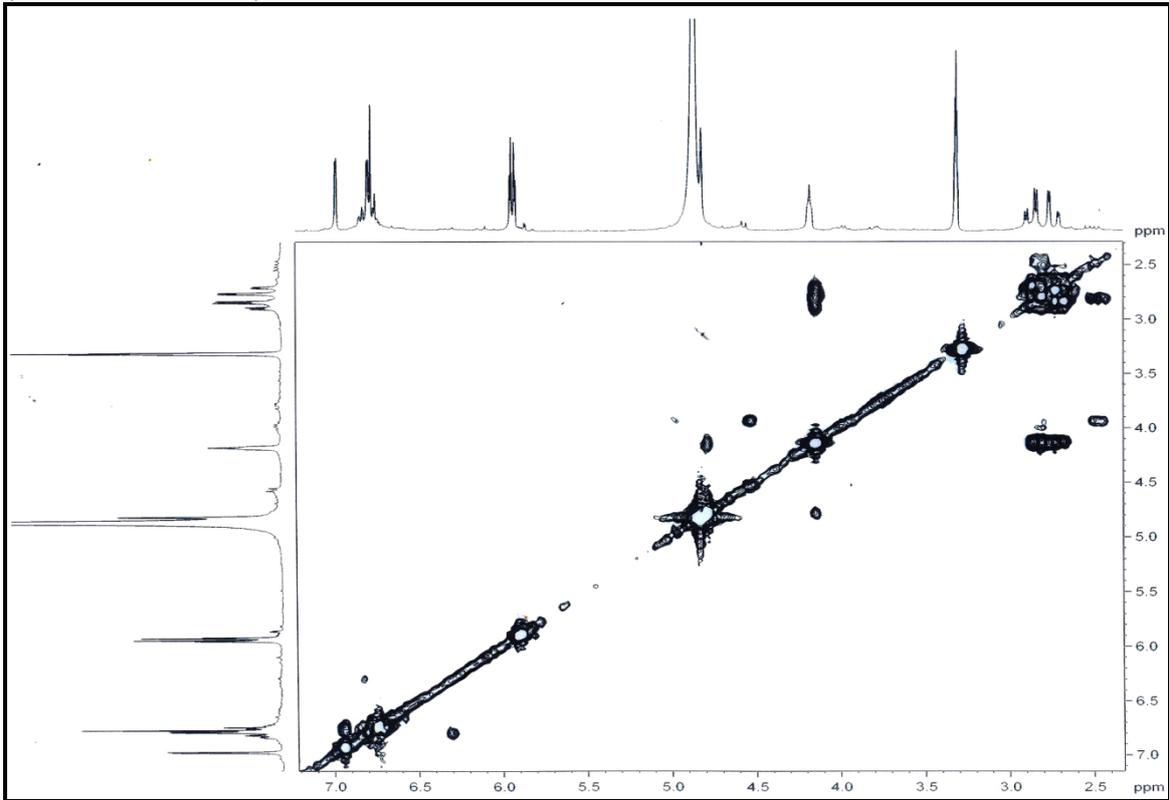


Figura 75 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-4 (500 x 125 MHz, CD_3OD)

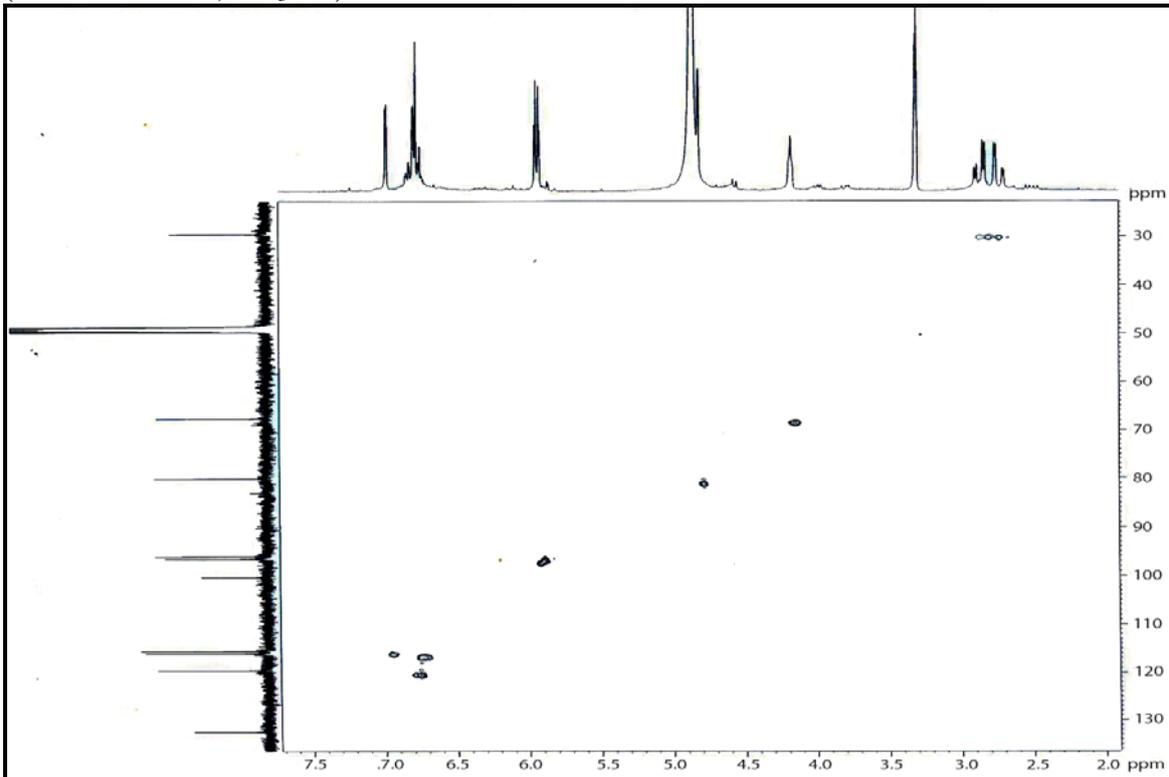


Figura 76 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-4 (500 x 125 MHz, CD_3OD)

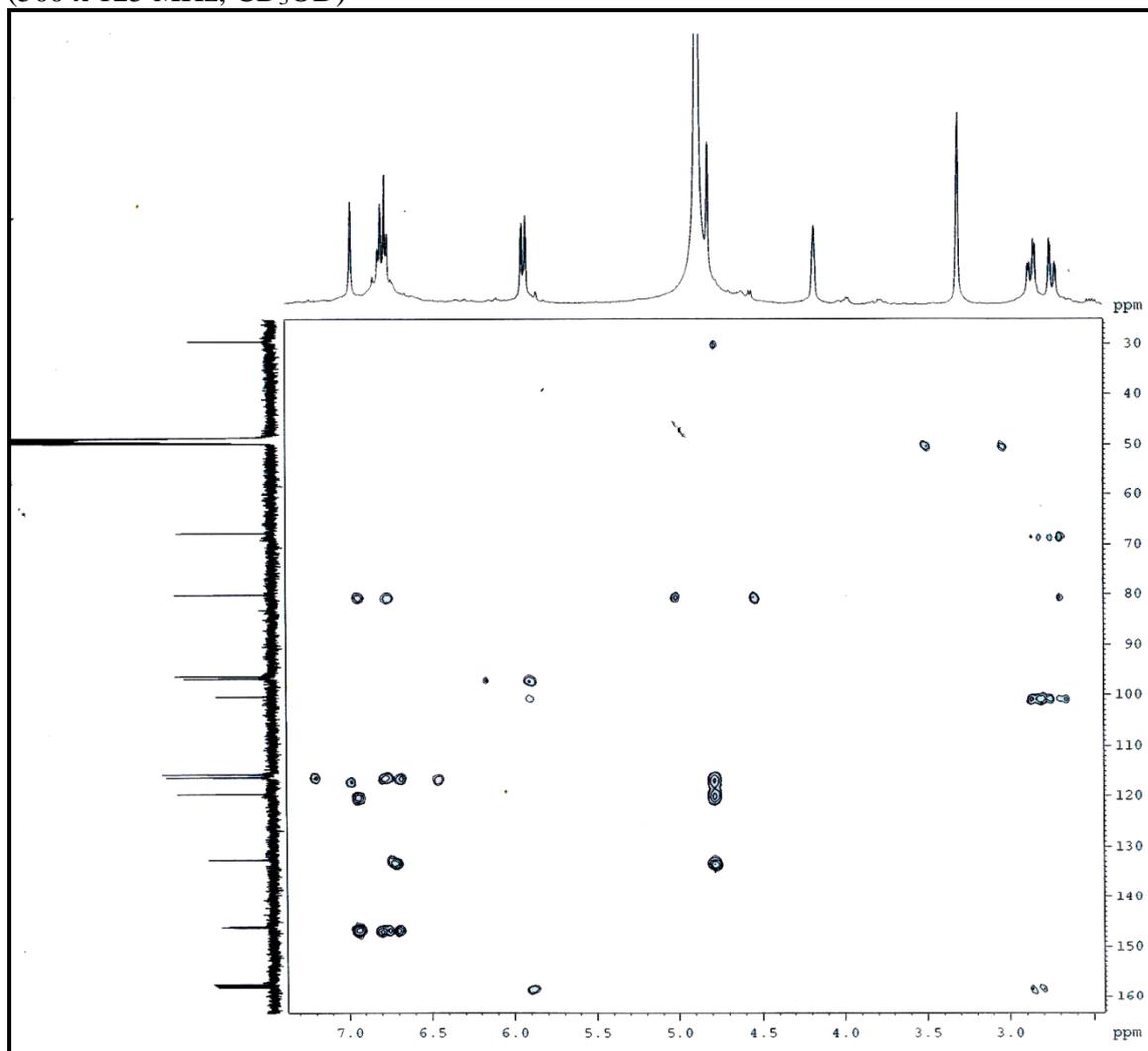
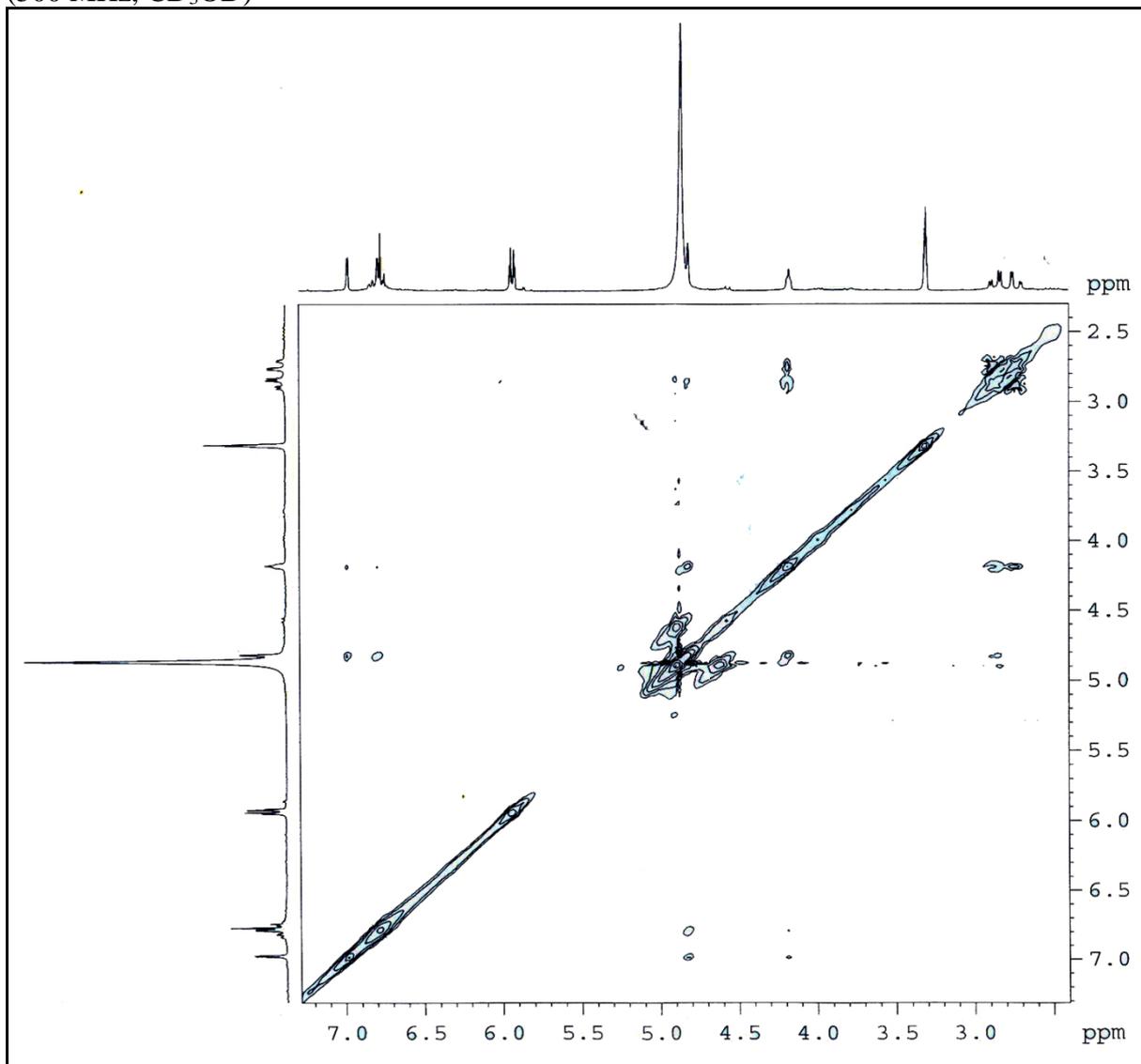


Figura 83 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – NOESY de BP-4 (500 MHz, CD_3OD)



5.2.5 Determinação estrutural de BP-5

O tratamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (EECBP) em gel de sílica, conforme descrito no item 6.7.2.10 (p. 131), resultou no isolamento de 10,7 mg de um sólido branco cristalino, solúvel em diclorometano, que foi denominado BP-5.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de BP-5, mostrado na Figura 85, p. 102, apresentou um multipletto (*m*) em δ 3,53, característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Foram observados ainda neste espectro, dois sinais em δ 5,02 (1H; *dd*; $J = 15,0$; 8,6 Hz) e δ 5,16 (1H; *dd*; $J = 14,9$; 8,6 Hz) referentes aos hidrogênios vinílicos do estigmasterol, ou seja, referentes aos hidrogênios H-23 e H-22, respectivamente. Por outro lado, um singletto largo (*sl*) em δ 5,36 foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico C-6 do sitosterol e estigmasterol. Diversos sinais entre δ 0,69-2,35 são característicos de hidrogênios ligados a carbonos metínicos, metilênicos e metílicos do núcleo esteroidal (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^{13}C – BB (CDCl_3 , 125 MHz) de BP-5 (Figura 86, p. 102) apresentou sinais em δ 140,97 e 121,95 atribuídos aos carbonos C-5 e C-6 dos dois esteroides. Os sinais em δ 138,54 e 129,49 foram atribuídos aos carbonos C-22 e C-23 do estigmasterol, enquanto o sinal em δ 72,04 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C – BB com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 87, p. 103) permitiu identificar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono das estruturas dos esteroides (Tabela 14, p. 101).

A análise dos dados espectroscópicos e a comparação com dados descritos na literatura (FACUNDO *et al.*, 2008) (Tabela 14, p. 101), permitiram identificar BP-5 como a mistura de esteroides 24 α -etil-colestan-5-en-3 β -ol (sitosterol) e 24 α -etil-colestan-5,22-dien-3 β -ol (estigmasterol), cujas as estruturas estão apresentadas na Figura 88.

A análise das integrações observadas no espectro de RMN ^1H permitiu a determinação da porcentagem de cada constituinte da mistura. Assim, o valor da integração de H-23, exclusiva do estigmasterol, é 0,23. Por outro lado, o sinal de H-6, que está presente nas duas substâncias, foi de 1,04, portanto, fazendo a diferença dos valores consegue-se obter a integração de cada hidrogênio. Dessa forma, o valor da integração do hidrogênio ligado ao carbono olefínico no sitosterol é 0,81. As diferenças nos valores das integrações dos hidrogênios de cada substância refletem na porcentagem deles na mistura, obtendo-se assim 22,12% de estigmasterol e 77,88% de sitosterol. A mistura de sitosterol e estigmasterol já foi

isolada de outras espécies de *Bauhinia*, como por exemplo, de *B. strychnifolia* (YUENYONGSAWAD *et al.*, 2013) e de *B. purpurea* (JOSHI; DESAI; BHOBE, 2013).

Figura 88 – Estruturas dos componentes da mistura BP-5 (sitosterol + estigmasterol)

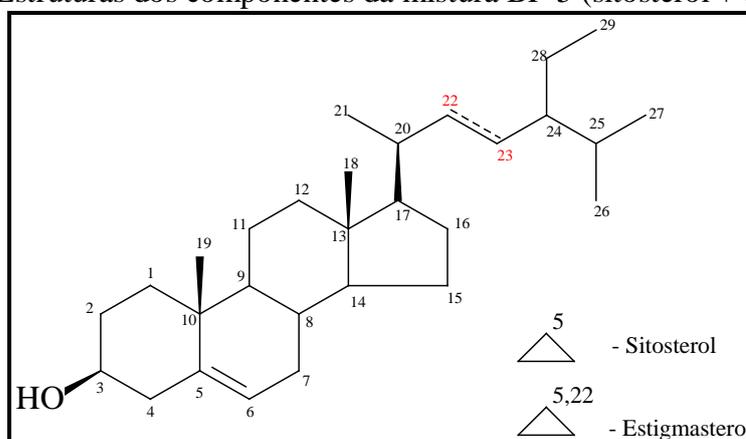


Tabela 14 – Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C de BP-5 comparados com os dados descritos na literatura (FACUNDO *et al.*, 2008) para sitosterol e estigmasterol (CDCl_3)

C	DEPT	Sitosterol		Estigmasterol	
		BP-5	Lit.	BP-5	Lit.
1	CH ₂	37,47	37,2	37,47	37,2
2	CH ₂	32,13	29,7	32,13	29,7
3	CH	72,04	71,8	72,04	71,8
4	CH	42,50	39,8	42,50	39,6
5	C	140,97	140,7	140,97	140,7
6	CH	121,95	121,7	121,95	121,7
7	CH ₂	32,13	31,6	32,13	31,6
8	CH	32,13	31,9	32,13	31,9
9	CH	50,34	50,1	50,40	50,1
10	C	36,36	36,8	36,36	33,9
11	CH ₂	20,04	21,1	20,04	21,1
12	CH ₂	39,89	39,8	39,90	39,8
13	C	42,50	42,3	42,50	42,3
14	CH	57,08	56,8	57,08	56,7
15	CH ₂	24,58	24,4	24,58	24,3
16	CH ₂	28,47	28,9	29,14	28,2
17	CH	56,26	56,1	56,26	56,9
18	CH ₃	12,08	11,9	12,19	12,1
19	CH ₃	19,62	18,9	19,62	12,2
20	CH	36,36	36,1	40,72	40,5
21	CH ₃	19,21	18,8	20,04	21,2
22	CH ₃ /CH	34,19	33,7	138,54	138,3
23	CH ₂ /CH	26,27	26,1	129,49	129,3
24	CH	46,04	45,8	50,34	50,1
25	CH	29,35	29,1	32,13	31,9
26	CH ₃	19,62	19,4	20,04	21,2
27	CH ₃	19,24	19,0	19,24	19,8
28	CH ₂	22,91	23,1	25,63	25,4
29	CH ₃	12,26	11,8	12,26	11,9

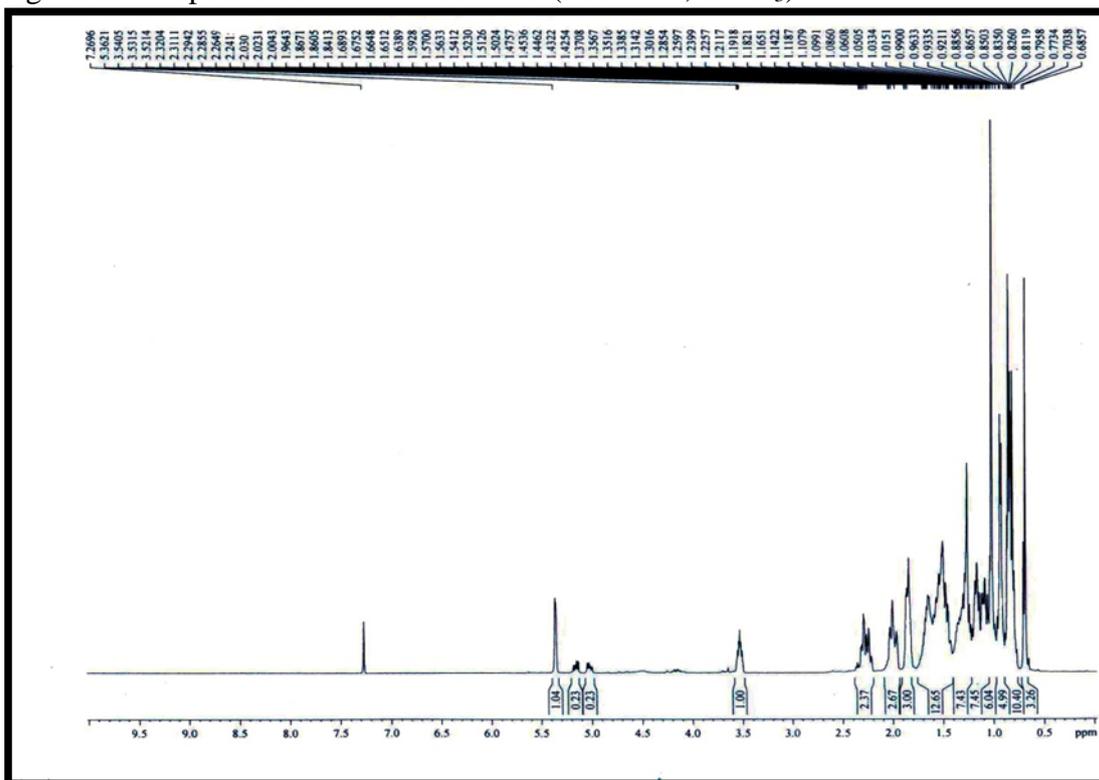
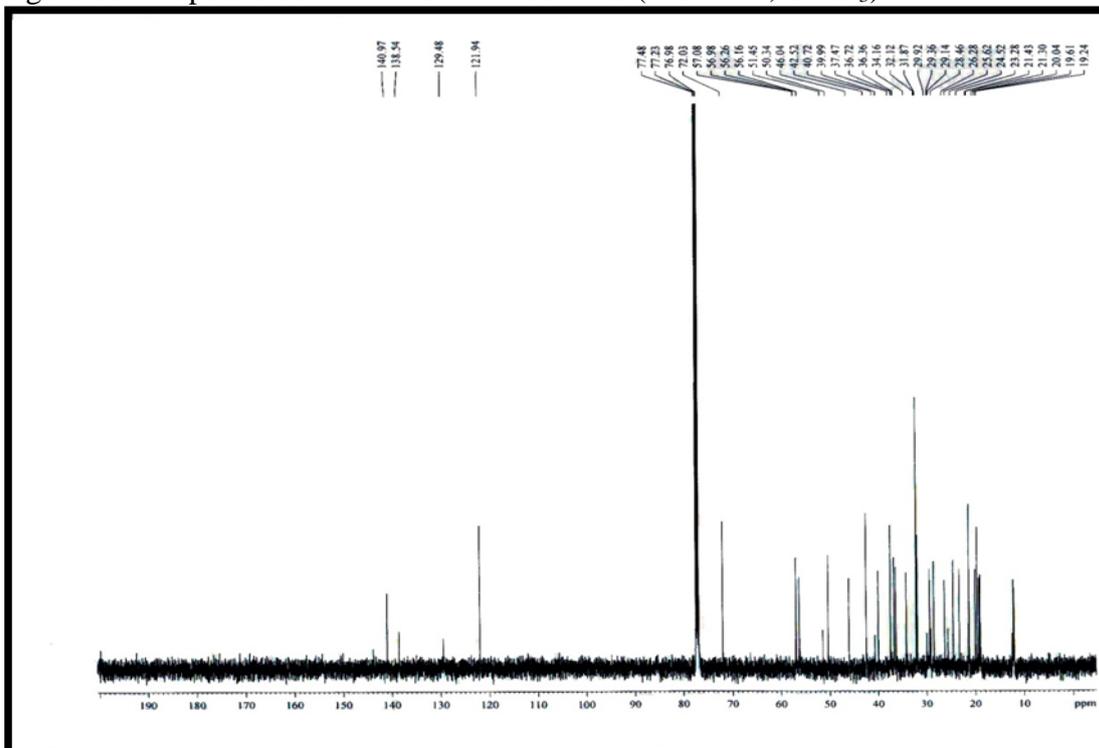
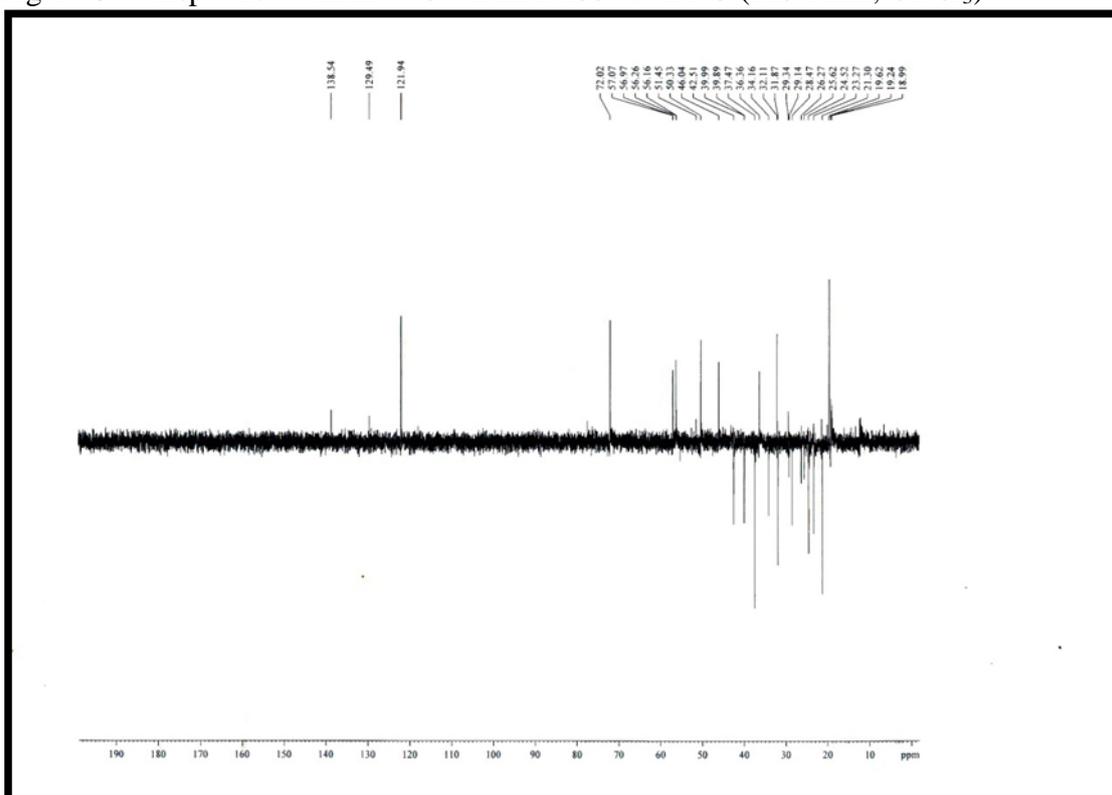
Figura 85 – Espectro de RMN ^1H de BP-5 (500 MHz, CDCl_3)Figura 86 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-5 (125 MHz, CDCl_3)

Figura 87 – Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-5 (125 MHz, CDCl_3)

5.2.6 Determinação estrutural de BP-6

Após diversos tratamentos cromatográficos em gel de sílica da fração EECBP (23-36), conforme descrito no item 6.7.2.14 (p. 134), resultou no isolamento de 9,2 mg de um líquido marrom, solúvel em diclorometano, que foi denominado BP-6.

Através da análise do espectro na região do infravermelho (Figura 89, p. 108) observou-se uma banda de absorção larga em 3415 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação O-H. Este espectro também mostrou bandas de absorção em 2936 cm^{-1} e em 1151 cm^{-1} características de deformação axial de ligação C-H de carbonos sp^3 e de deformação axial de ligação C-O, respectivamente (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de BP-6 (Figura 90, p. 108) apresentou sinais na região entre δ 6,34-7,12, característicos de hidrogênios ligados a carbonos de anéis aromáticos. Os sinais em δ 6,34 (1H; *d*; $J = 2,1\text{ Hz}$; H-4') e em δ 6,37 (1H; *d*; $2,1\text{ Hz}$; H-2') foram atribuídos a hidrogênios em posição *meta*; enquanto os sinais em δ 6,76 (1H; *d*; $J = 7,8\text{ Hz}$; H-3), δ 7,10 (2H; *m*; H-4 e H-6) e em δ 6,88 (1H; *t*; $6,8\text{ Hz}$; H-5) sugeriram a presença de um anel aromático 1,2-dissubstituído. Na região de menor deslocamento químico, foram observados sinais em δ 3,77 (6H; *s*) e em δ 2,89 (4H; *m*, H-7 e H-8) referentes a hidrogênios de grupos metoxila e a hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos em posição α ao anel aromático, respectivamente.

A comparação do espectro de RMN ^{13}C – BB (75 MHz, CDCl_3) (Figura 91, p. 109) com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (Figura 92, p. 109) permitiu a determinação do padrão de hidrogenação dos átomos de carbono de BP-6. Dessa forma, foi possível a identificação de cinco carbonos não hidrogenados (**C**), sendo destes três oxigenados; sete carbonos metínicos (**CH**), dois metilênicos (**CH₂**) e dois metílicos (**CH₃**) (Tabela 15, p. 105). Observou-se ainda no espectro de RMN ^{13}C – BB que os sinais δ 161,04; 106,79 e 55,49 apresentavam-se mais intensos que os demais sinais referentes aos outros carbonos com o mesmo padrão de hidrogenação, concluindo-se, portanto, que esses sinais podem ser atribuídos a dois átomos de carbono.

Tabela 15 – Dados de deslocamentos químicos (δ) de carbono-13 para BP-6 obtidos por comparação entre os espectros de RMN ^{13}C – BB e de RMN ^{13}C – DEPT 135°

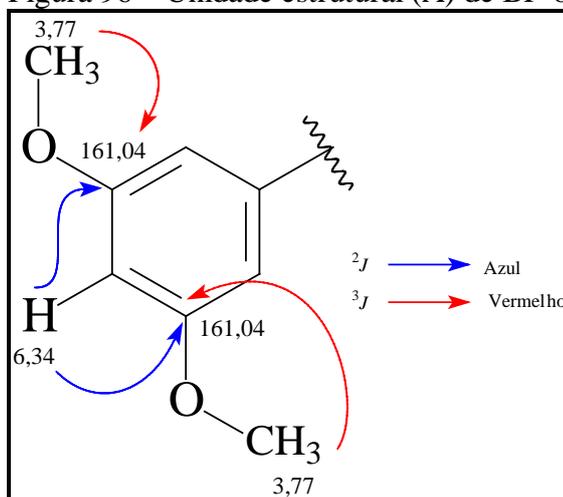
C	CH	CH ₂	CH ₃
128,04	98,39	36,74	55,49 (OCH ₃)
144,60	106,79	32,32	55,49 (OCH ₃)
153,79 (C-O)	106,79		
161,04 (C-O)	115,63		
161,04 (C-O)	121,12		
	127,57		
	130,58		
5 C	7 CH	2 CH ₂	2 CH ₃

Através da análise do espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (Figura 93, p. 110) observou-se a correlação entre o hidrogênio em δ 6,76 (H-3) com o hidrogênio em δ 7,10 (H-4).

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-6 (Figura 94, p. 110) permitiu associar de forma inequívoca todos os sinais dos hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos, como pode ser visualizado na Tabela 16 (p. 107).

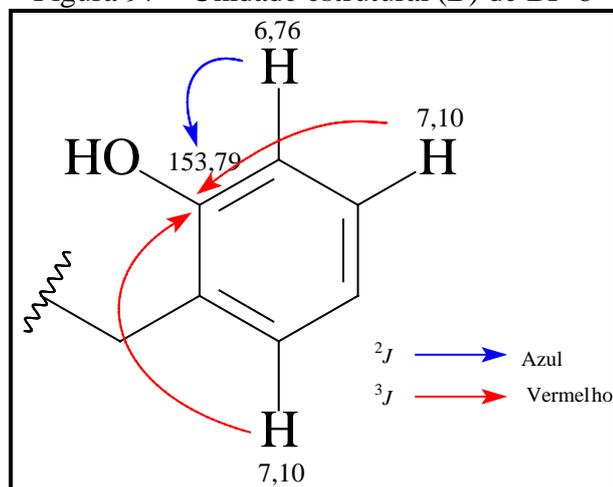
Através da análise do espectro de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ – HMBC (Figura 95, p. 111) foram definidas as posições de cada substituinte na molécula. A correlação ($^3J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios com sinal em δ 3,77 com o sinal de carbono em δ 161,04, juntamente com a correlação ($^2J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ 6,34 com o sinal de carbono em δ 161,04 definiram as posições dos grupos metoxila em BP-6 (FIGURA 96).

Figura 96 – Unidade estrutural (A) de BP-6



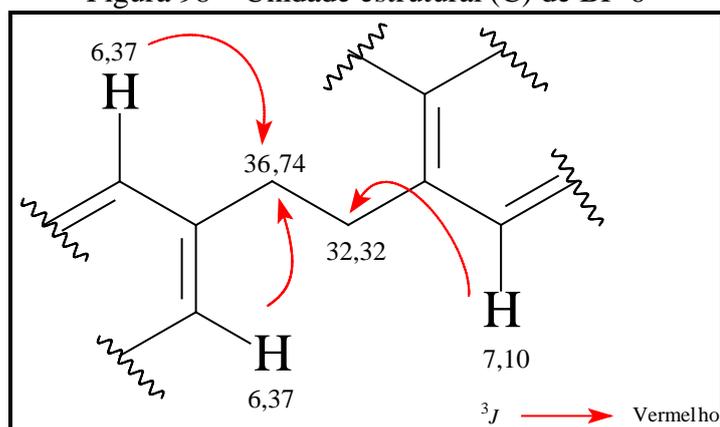
No espectro HMBC também foram visualizadas as correlações entre os hidrogênios δ 7,10 e 6,76 com o carbono em δ 153,79, definindo a posição da hidroxila na molécula (FIGURA 97).

Figura 97 – Unidade estrutural (B) de BP-6



No espectro HMBC ainda foram visualizadas correlações entre os hidrogênios em δ 6,37 com o carbono metilênico em δ 36,64 ($^3J_{CH}$), como também do hidrogênio em δ 7,10 com o outro carbono em δ 32,32 ($^3J_{CH}$), conforme mostrado na Figura 98.

Figura 98 – Unidade estrutural (C) de BP-6



Através da análise dos dados espectroscópicos obtidos e da comparação com dados descritos na literatura (TAKAGUSI *et al.*, 1987; GÓIS, 2014) (Tabela 16, p. 107), BP-6 foi identificada como 2-hidróxi-3',5'-dimetoxibenzila, substância da classe dos bibenzis, cuja estrutura está mostrada na Figura 99.

BP-6 é classificada como um bibenzil do grupo A por apresentar apenas grupos oxigenados ligados diretamente aos anéis aromáticos (XIAO *et al.*, 2008) e já foi isolada de *Bauhinia purpurea* (BOONPHONG *et al.*, 2007) e de *Bauhinia unguolata* (GÓIS, 2014).

Figura 99 – Estrutura de BP-6

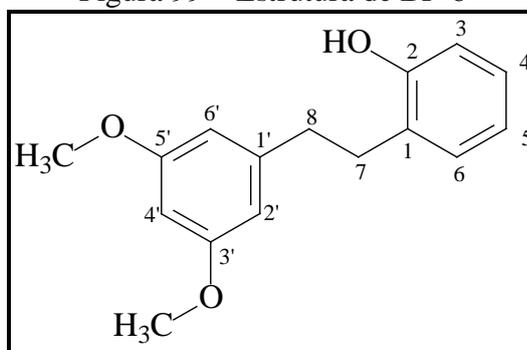


Tabela 16 – Dados espectroscópicos de RMN de BP-6 comparados com dados descritos na literatura (TAKASUGI *et al.*, 1987; GOIS, 2014) para 2-hidróxi-3',5'-dimetoxibibenzila (CDCl₃)

	HSQC		HMBC		Literatura (CDCl ₃)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., J Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	GÓIS, 2014	TAKASUGI <i>et al.</i> , 1987
					δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., Hz)
C						
1	128,04	-	-	H-8; H-3; H-5	128,08	-
2	153,79	-	H-3	H-4; H-6	153,79	-
1'	144,60	-	-	H-7	144,57	-
3'	161,04	-	H-4'	-	161,02	-
5'	161,04	-	H-4'	-	161,02	-
CH						
3	115,63	6,76; d, 7,8	-	H-5	115,60	6,81; m
4	127,57	7,10; m	-	-	127,55	7,10; m
5	121,12	6,88; t; 6,8	-	H-3	121,08	6,81; m
6	130,58	7,10; m	-	-	130,56	7,10; m
2'	106,79	6,37; d; 2,1	-	H-4'	106,74	6,34; s
4'	98,39	6,34; d; 2,1	-	-	98,34	6,34; s
6'	106,79	6,37; d; 2,1	-	H-4'	106,74	6,34; s
CH₂						
8	36,74	2,89; m	-	H-6'; H-2'	36,74	2,88; m
7	32,32	2,89; m	-	H-6	32,33	2,88; m
OCH₃						
3'	55,49	3,77; s	-	-	55,47	3,75; s
5'	55,49	3,77; s	-	-	55,47	3,75; s

Figura 89 – Espectro na região do IV (em KBr) de BP-6

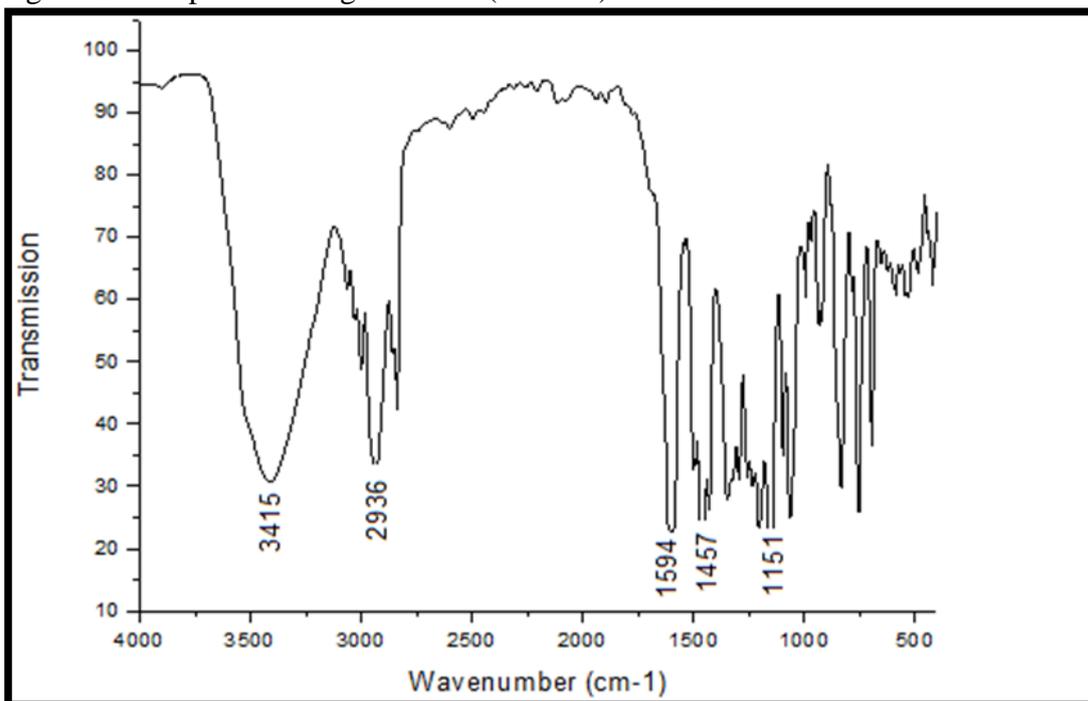
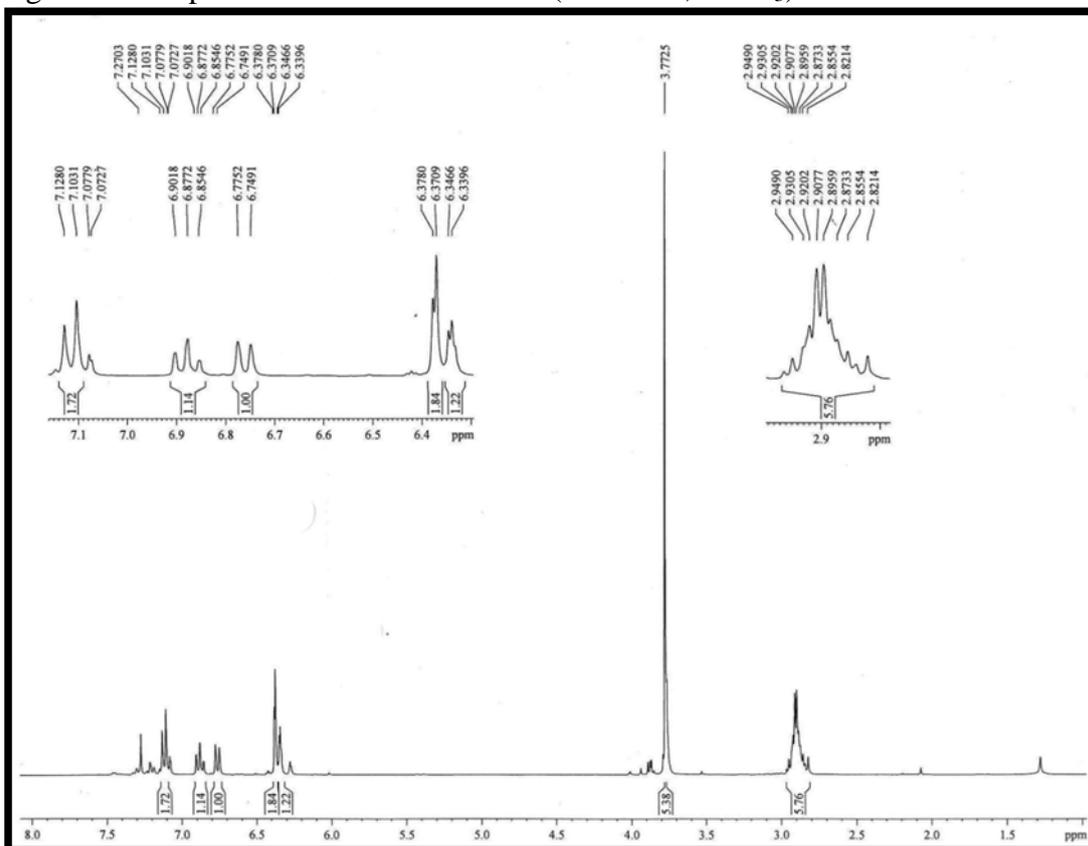
Figura 90 – Espectro de RMN ^1H de BP-6 (300 MHz, CDCl_3)

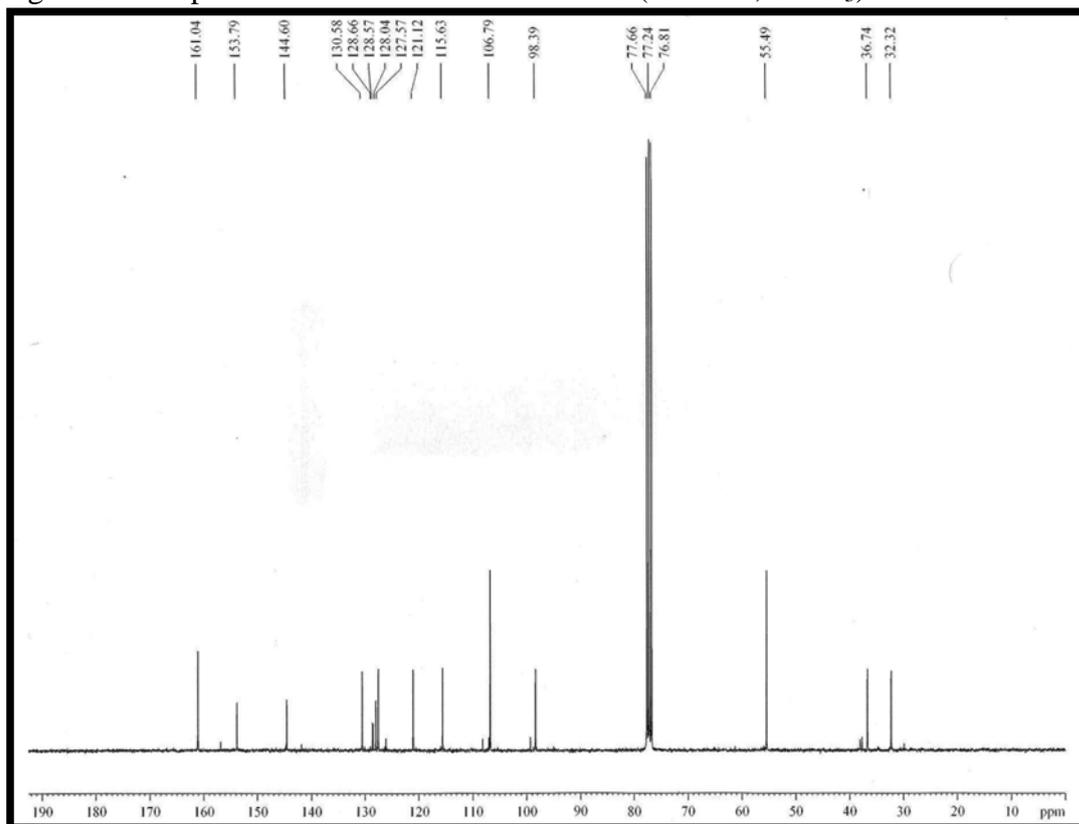
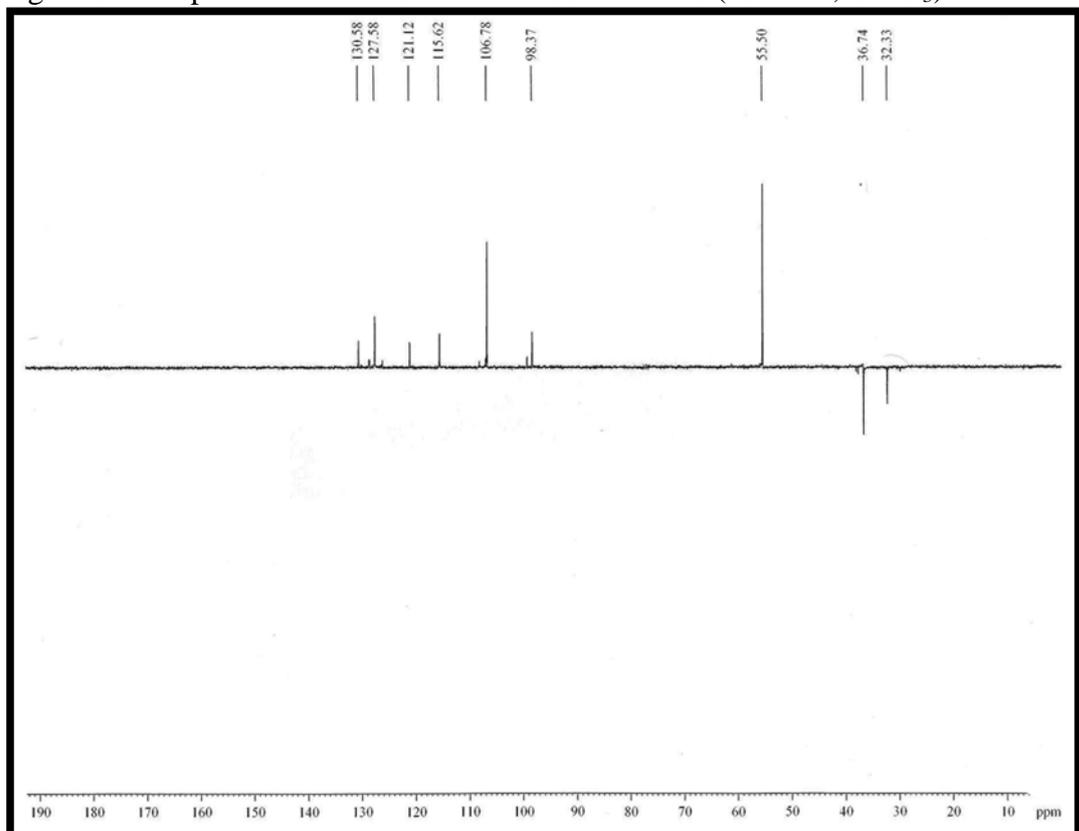
Figura 91 – Espectro de RMN ^{13}C – BB de BP-6 (75 MHz, CDCl_3)Figura 92 – Espectros RMN ^{13}C – DEPT 135° de BP-6 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 93 – Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY de BP-6 (300 MHz, CDCl_3)

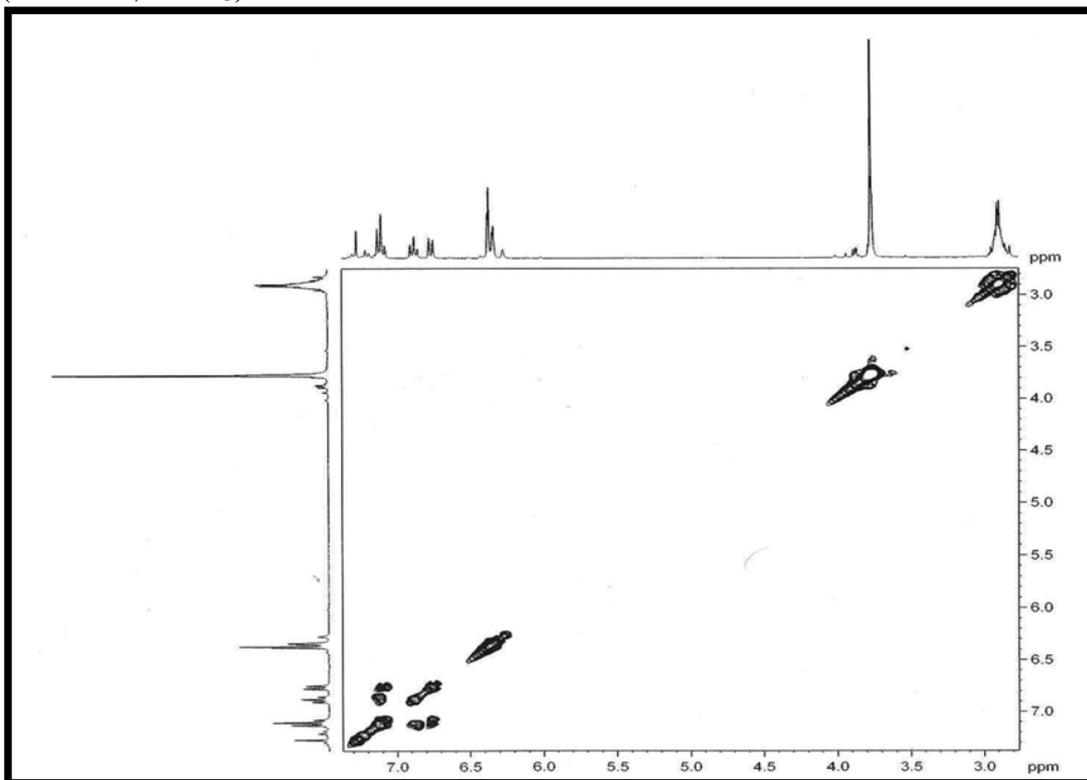


Figura 94 – Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC de BP-6 (300 x 75 MHz, CDCl_3)

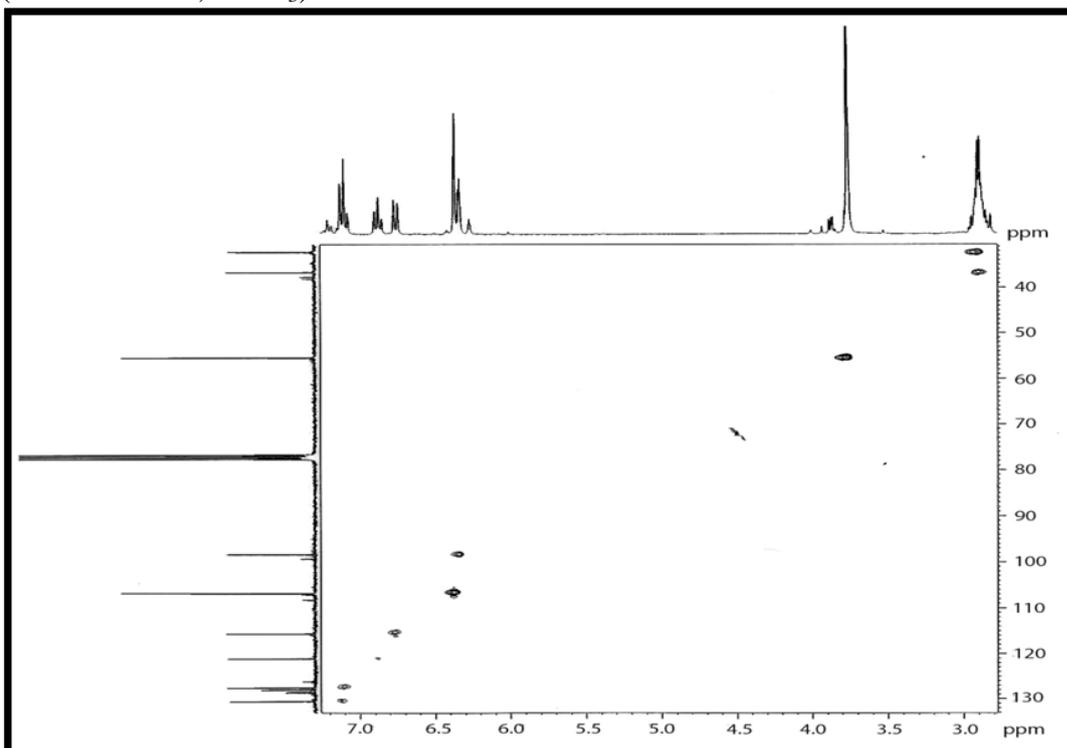
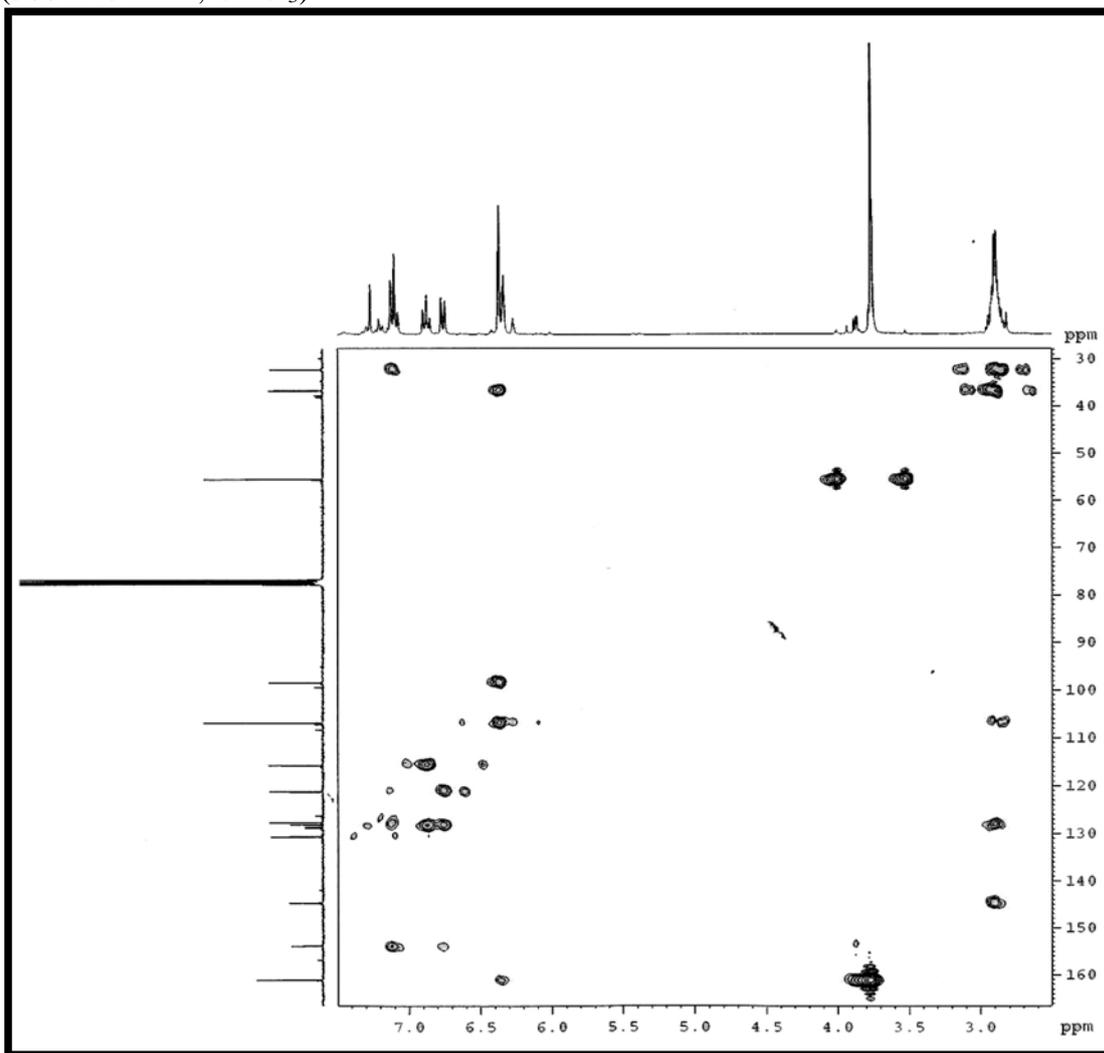


Figura 95 – Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC de BP-6
(300 x 75 MHz, CDCl_3)



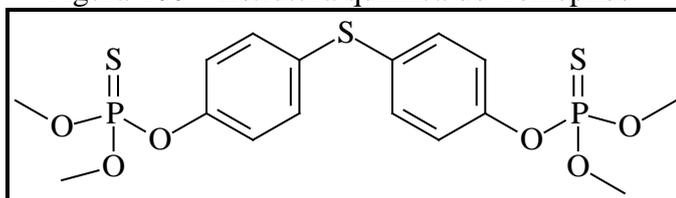
5.3 Atividades biológicas

5.3.1 Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella* (OEBP) sobre *Aedes aegypti*

O resultado dos bioensaios mostrou que o óleo essencial das folhas de *B. pulchella* (OEBP) apresentou valor de CL_{50} igual a $105,93 \pm 1,48 \mu\text{g/mL}$. Este resultado é considerado satisfatório, tendo em vista que na literatura é relatado que amostras com valores de CL_{50} menores que $100 \mu\text{g/mL}$ são consideradas bons agentes larvicidas (CHENG *et al.*, 2003). Por outro lado, a literatura relata que óxido de cariofileno, o segundo maior constituinte do óleo essencial, apresenta atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* (SILVA *et al.*, 2008; ALI *et al.*, 2014), podendo, portanto, este composto ser o responsável pela atividade larvicida do óleo essencial.

Estes bioensaios tiveram Temephos[®], um inseticida organofosforado, como controle positivo, e este composto apresentou valor de CL_{50} igual a $1,4 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ (FIGURA 100).

Figura 100 – Estrutura química do Temephos[®]

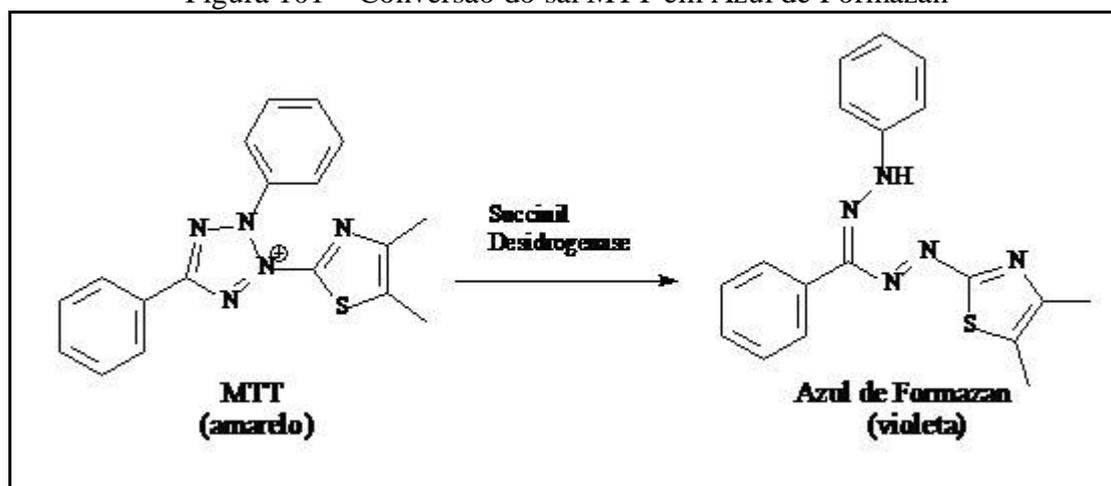


5.3.2 Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella* (OEBP)

Inicialmente, foi realizado o estudo de citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial (OEBP) em concentração única sobre as linhagens celulares humanas HL-60 (leucemia pró-mielocítica), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e NCI-H292 (carcinoma de pulmão), como um *screening* inicial do potencial citotóxico da amostra. Dessa forma, observou-se 100% de inibição sobre o crescimento das linhagens celulares avaliadas. Nestes ensaios foi utilizado o método do MTT [(3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio)] (MOSSMAN, 1983), que tem como princípio a análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT que tem coloração amarelada em azul de formazan que é roxo, a partir de enzimas

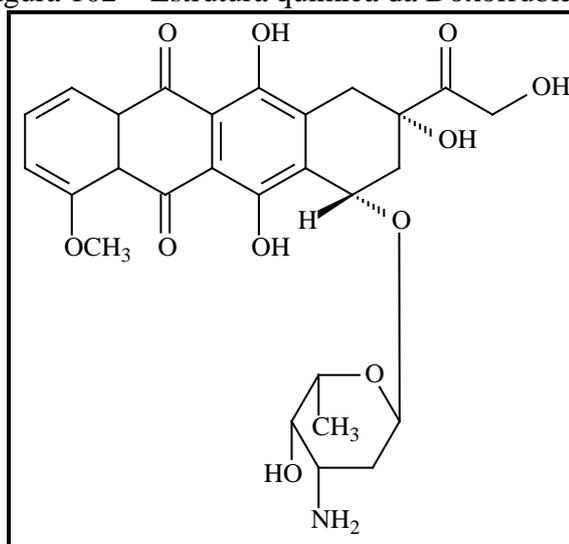
mitocondriais que estão presentes apenas nas células metabolicamente ativas. Esse procedimento garante a definição da citotoxicidade, não demonstrando, portanto, os meios que desenvolvem o mecanismo de ação, sendo tal reação representada na Figura 101 (BERRIDGE *et al.*, 1996).

Figura 101 – Conversão do sal MTT em Azul de Formazan



Tendo como objetivo a determinação da CI_{50} do óleo essencial utilizou-se novamente o método do MTT, sendo também avaliada a atividade citotóxica sobre a linhagem celular humana HEP-2 (adenocarcinoma cervical), que não havia sido utilizada no *screening* inicial. Os resultados obtidos (Tabela 17) mostram que o óleo essencial foi seletivo para células de leucemia pro-mielocítica (CI_{50} 9,94 $\mu\text{g/mL}$), uma vez que mostrou uma atividade fraca sobre as demais células de diferentes origens histológicas avaliadas. Esse bioensaio teve a Doxorrubicina, um agente antineoplásico, como controle positivo (FIGURA 102).

Figura 102 – Estrutura química da Doxorrubicina

Tabela 17 – Valores de CI₅₀ e intervalos de confiança 95% do óleo essencial das folhas de *B. pulchella* (OEBP)

Amostra	CI ₅₀ , Intervalo de confiança 95% (µg/mL)			
	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HEP-2
OEBP	9,94 (8,24-12,00)	53,05 (41,39-67,99)	48,98 (44,22-54,25)	50,42 (42,47-59,87)
Doxorubicina	0,02 (0,01-0,02)	0,30 (0,20-0,50)	0,20 (0,10-0,50)	0,70 (0,30-1,40)

HL-60 – Linhagem celular humana de leucemia pró-mielocítica; MCF-7 – Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama; NCI-H292 – Linhagem celular humana de carcinoma de pulmão; HEP-2 – Linhagem celular humana de adenocarcinoma cervical.

PARTE EXPERIMENTAL

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Coleta do material vegetal

Folhas e caule de *Bauhinia pulchella* foram coletados em 25 de maio de 2013, no município de São Benedito-CE, mais especificamente na rodovia CE-321, Km 59, por uma equipe técnica coordenada pelo Dr. Francisco José Teixeira Gonçalves. O local de coleta teve as seguintes coordenadas geográficas: 4°4'54" S, 40°50'21" O; tal registro foi obtido com o sistema de processamento global (GPS) presente no celular do modelo iPhone 4 (FIGURA 103).

A identificação botânica foi realizada pelo Professor Edson Pereira Nunes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Uma exsicata de *B. pulchella* encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número 54266.

Figura 103 – Foto com as coordenadas geográficas



Fonte: Jarbas Lima de Carvalho (2013)

6.2 Métodos analíticos

6.2.1 Métodos cromatográficos

Na técnica de cromatografia de adsorção em coluna utilizou-se gel de sílica 60 (0,063 a 0,200 mm) da Vetec[®] e sílica 60 (0,04 a 0,063 mm) da Merck[®] para cromatografia *flash*. O tamanho e o diâmetro das colunas utilizadas variaram de acordo com a complexidade e massa do material a ser submetido à cromatografia. Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de gel de sílica G60 da VETEC[®] sobre o suporte de vidro e em gel de sílica 60 F₂₅₄ sobre alumínio da Silicycle[®].

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram realizadas através da exposição das mesmas à irradiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpada modelo VL-4. LC da Vilber Loumart e/ou por imersão em solução de vanilina (C₈H₈O₃) 5g/100 mL de ácido perclórico (HClO₄) 0,75 M/100 mL de etanol, seguido de aquecimento em soprador térmico HL-500, da Steinel à aproximadamente 150 ° C, durante alguns segundos.

Para a cromatografia de adsorção em coluna sob média pressão (*flash*) utilizou-se um sistema adaptado com bomba compressora do fabricante NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda.

Foram utilizados solventes de qualidade PA, da Synth[®] ou da Vetec[®], tais como hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, de forma isocrática ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. A remoção dos solventes dos extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório da Büchi Rotavapor *Waterbath* modelo B-480 e R-114, sob pressão reduzida.

6.3 Análises espectroscópicas

6.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho, com janela espectral de 400 a 4000 cm⁻¹, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) na proporção de 1% de amostra, foram obtidos em espectrômetro FTLA 2000-102, ABB-BOMEM do Laboratório de Bioinorgânica da Universidade Federal do Ceará e o posicionamento das deformações e ajuste do espectro foi feito no programa OriginPro 8.

6.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros da marca Bruker[®], modelos Avance DPX-300 e DRX-500 pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, operando nas frequências de 300 e 500 MHz para hidrogênio, e de 75 e 125 MHz para carbono-13, respectivamente.

Os solventes utilização na dissolução das amostras foram clorofórmio (CDCl_3) e metanol (CD_3OD) deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelos sinais dos hidrogênios das moléculas residuais não deuteradas em δ_{H} 7,27 e δ_{H} 3,31, respectivamente. Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos sinais de carbono-13 em δ_{C} 77,23 e δ_{C} 49,1.

A multiplicidade das absorções foi indicada como singlete (*s*); dubleto (*d*); dubleto de dubleto (*dd*), tripleto (*t*) e multipletto (*m*). O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da técnica DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) com ângulo de nutação de 135° , gerando sinais para CH e CH_3 em oposição no plano ao CH_2 . Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais observados no espectro BB (Broad Band).

6.3.3 Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massas (impacto eletrônico a 70 eV) foram obtidos em espectrômetro de massas da Shimadzu[®], modelo QP 5000, DI-50 pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

6.3.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG/DIC)

A identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *B. pulchella* foram realizadas em cromatógrafo CG-EM/DIC, da Shimadzu[®], modelo QP2010 Ultra, equipado com um autoinjeter AOC-20i Shimadzu[®] e coluna capilar de

sílica fundida da Rtx®-5MS Restek (5%-difetil-95%-dimetil polisiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm, onde o gás de arraste é o hélio num fluxo de 1,2 mL/min. Um volume de injeção de 0,5 mL (5 mg.mL⁻¹) foi utilizado, com uma razão de divisão de 1:10. A temperatura do forno foi programada para manter 50 °C por 1,5 minutos, e ter um aumento progressivo de 4 °C por minuto até atingir 200 °C, em seguida ter um aumento progressivo de 10 °C por minuto até atingir 250 °C, temperatura que ficou constante durante 5 minutos.

Os dados de EM e DIC foram simultaneamente adquiridos empregando um Sistema de Detecção de Divisão; a relação de divisão de fluxo foi de 4: 1 (EM: DIC). Um tubo restritor de 0,62 m de comprimento e 0,15 mm de diâmetro interno (coluna capilar) foi utilizado para conectar o divisor ao detector de EM; e um tubo restritor de 0,74 m de comprimento e 0,22 mm de diâmetro interno foi utilizado para conectar o divisor ao detector DIC.

Os dados de EM foram adquiridos no modo de varredura completa (*m/z* de 40-350), a uma velocidade de varredura de 0,3 *scans* por segundo, usando a ionização de elétrons (IE) de 70 eV. A temperatura do injetor foi 250 °C e a temperatura da fonte de íons foi 250 °C. A temperatura do DIC foi definida para 250 °C, e os suprimentos de gás para o DIC foram hidrogênio, ar e hélio em vazões de 30, 300 e 30 mL por minuto, respectivamente. As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos obtidos por CG/DIC e estão colocadas dispostas em ordem de eluição de CG.

As análises de CG/DIC e CG/EM foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

6.4 Rotação óptica específica

Os valores de rotação óptica específica foram determinadas em polarímetro automático digital da Quimis[®], modelo Q760M, potência 35 Watts, tendo como distância do tubo de leitura de 1 dm do Departamento de Química da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB). As medidas foram expressas em $[\alpha]_D^T$, onde “D” é a raia D da luz monocromática de sódio de comprimento de onda igual a 589 nm e T é a temperatura, em °C, na qual foi realizada a medida. Para dissolução das amostras utilizou-se clorofórmio e metanol.

6.5 Obtenção do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella*

Na obtenção do óleo essencial foi utilizado um sistema de hidrodestilação tipo Clevenger modificado por Gottlieb (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960) (FIGURA 104).

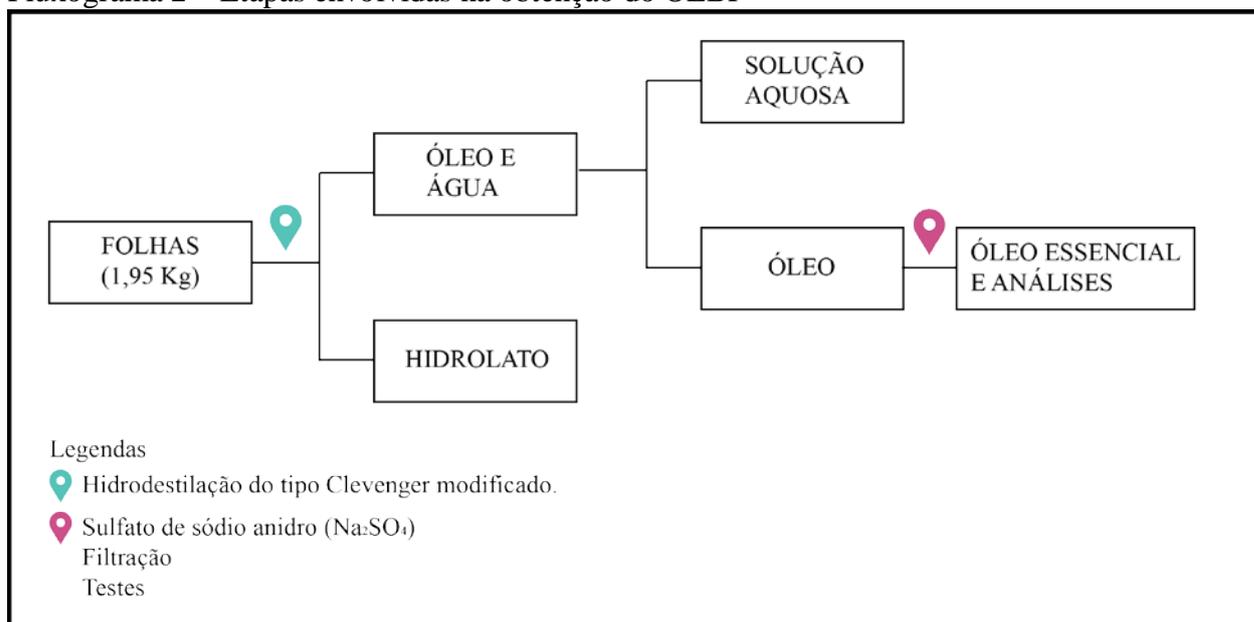
As folhas frescas de *B. pulchella* (1,95 Kg) foram adicionadas em um balão de 5 L de capacidade. Em seguida, foram adicionados 2500 mL de água destilada. Após duas horas sob refluxo, separou-se a mistura óleo/água no doseador. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada, resultando em 258,8 mg de um óleo de coloração amarelada; obtendo-se, portanto, um rendimento de 0,0133%. (FLUXOGRAMA 2).

Figura 104 – À esquerda, sistema de hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger. À direita, separação do óleo essencial e do hidrolato no doseador



Fonte: Jarbas Lima de Carvalho (2013)

Fluxograma 2 – Etapas envolvidas na obtenção do OEBP



Fonte: Jarbas Lima de Carvalho (2014)

6.6 Atividades biológicas

6.6.1 Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella* (OEBP) sobre *Aedes aegypti*

Alíquotas de 1 mg, 2 mg, 5 mg e 10 mg, em triplicata, do óleo essencial das folhas *Bauhinia pulchella* (OEBP) foram, inicialmente, dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido e transferidas para um béquer de 50 mL. Posteriormente, foram adicionadas 50 larvas de terceiro estágio (GADELHA; TODA, 1985) juntamente com 19,7 mL de água. Paralelamente, foram feitos testes em branco, utilizando-se água e DMSO a 1,5%. Após 24 horas foi realizada a contagem das larvas exterminadas e calculada a CL₅₀ (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

6.6.2 Avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella* (OEBP) sobre linhagens celulares tumorais

As linhagens celulares humanas utilizadas no estudo foram HL-60 (leucemia pró-mielocítica), NCI-H292 (carcinoma de pulmão), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HEP-2 (adenocarcinoma cervical) que foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, sendo cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10% de soro fetal bovino e

1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e sob atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e as amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) puro e estéril.

As linhagens NCI-H292 (caarcinoma de pulmão), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HEP-2 (adenocarcinoma cervical) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL e a de HL60 (leucemia pro-mielocítica) foi plaqueada na concentração de $0,3 \times 10^6$. O óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella* (OEBP) previamente dissolvido em DMSO foi diluído em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionado em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolio), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

A concentração inibitória em 50% (CI₅₀) e respectivos intervalos de confiança foram calculados por regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em duplicata, utilizando a doxorubicina como controle positivo.

6.7 Estudo dos constituintes fixos de *Bauhinia pulchella*

6.7.1 Obtenção do extrato etanólico do caule de *Bauhinia pulchella* Benth (EECBP)

O caule (3,65 Kg), após secagem e trituração, foi submetido à extração com etanol por maceração por 48 horas e após sucessivas extrações, os extratos obtidos foram filtrados e concentrados por destilação sob pressão reduzida, resultando na obtenção de 368,3 g de extrato etanólico do caule de *Bauhinia pulchella* (EECBP).

6.7.2.1 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de *Bauhinia pulchella* Benth (EECBP)

Uma alíquota do EECBP (111 g) foi submetida a uma coluna filtrante (L = 14,0 cm e ϕ = 10,0 cm), utilizando 350 g de gel de sílica. Foram utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, como eluentes. As frações obtidas tiveram seus solventes removidos (3,65 Kg) sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resultado do referido fracionamento está mostrado na Tabela 18.

Tabela 18 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do EECBP

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (L)
1-4	Hexano	2
5-14	Diclorometano	4
15-25	Acetato de etila	4
26-29	Acetato de etila/Metanol (90:10)	2
30	Metanol	2

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, resultando em quatro frações (TABELA 19).

Tabela 19 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico do EECBP

FRAÇÃO	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
1-4	0,03	0,03
5-20	9,98	8,99
21-29	18,70	16,85
30	70,42	63,44
TOTAL	99,13	89,31

6.7.2.2 Fracionamento cromatográfico de EECBP (5-20)

A fração EECBP (5-20) (9,98 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica (L= 18,0 cm e $\phi = 4,5$ cm), utilizando 133,31 g de gel de sílica como fase estacionária e hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, como fase móvel (TABELA 20).

Tabela 20 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (5-20)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-3	Hexano	300
4-8	Hexano/Acetato de etila (95:05)	600
9-18	Hexano/Acetato de etila (90:10)	1200
19	Hexano/Acetato de etila (85:15)	100
20-21	Hexano/Acetato de etila (70:30)	300
22-24	Hexano/Acetato de etila (50:50)	400
25-33	Acetato de etila	1000
34-36	Acetato de etila/Metanol (95:05)	500
38	Acetato de etila/Metanol (50:50)	100
39	Metanol	200

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível analisar o perfil das frações coletadas e reuni-las, resultando em dez frações (TABELA 21).

Tabela 21 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (5-20)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-4	24,4	0,24
5-6	725,5	7,27
7-9	357,4	3,58
10	272,7	2,73
11-18	526,0	5,27
19-20	138,7	1,39
21-22	282,0	2,83
23	346,2	3,47
24-31	5473,9	54,85
23-39	303,0	3,04
TOTAL	8449,8	84,67

6.7.2.3 Fracionamento cromatográfico de EECBP (5-6) e isolamento de BP-1

A fração (5-6) (725,5 mg), descrita anteriormente (Tabela 21), foi submetida a uma coluna cromatográfica (L= 27,5 cm e ϕ =2,5 cm), utilizando 60,0 g de gel de sílica e hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade como eluentes (TABELA 22).

Tabela 22 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (5-6)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-80	Hexano	500
81-133	Hexano/Acetato de etila (99:01)	300
134-152	Hexano/Acetato de etila (98:02)	100
153-183	Hexano/Acetato de etila (95:05)	200

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas (TABELA 23).

Tabela 23 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (5-6)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-15	3,6	0,50
16-59	186,4	25,69
60-103	43,8	6,04
104-108	253,5	34,94
109	31,6	4,36
110-111	35,7	4,92
112-113	9,0	1,24
114-129	25,7	3,54
130-183	119,0	16,40
TOTAL	708,3	97,63

A fração (110-111) (35,7 mg), quando analisada por cromatografia em camada delgada, possibilitou a visualização de uma única mancha de coloração azulada. Esta fração apresentou-se como um sólido cristalino de cor branca, solúvel em diclorometano e foi, portanto, denominada BP-1.

6.7.2.4 Fracionamento cromatográfico de EECBP (24-31)

A fração (24-31) (5473,9 mg), obtida a partir da fração EECBP (5-20) (Tabela 21), foi submetida a uma coluna cromatográfica (L = 17,0 cm e ϕ = 4,0 cm), utilizando 98 g de gel de sílica. Foram utilizados hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade, como eluentes (TABELA 24).

Tabela 24 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (24-31)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-108	Hexano/Acetato de etila (40:60)	800
109-132	Acetato de etila	200
133-150	Acetato de etila/Metanol (90:10)	100
151-190	Acetato de etila/Metanol (50:50)	200

Através de análise por CCD foi possível analisar o perfil das frações e reuni-las, obtendo-se um total de doze frações, cujas massas estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (24-31)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-16	18,5	0,34
17-20	22,7	0,41
21-28	106,7	1,95
29-38	128,6	2,35
39-58	947,0	17,30
59-75	396,6	7,25
76-91	241,5	4,41
92-107	205,3	3,75
108-118	144,1	2,63
119-130	1109,3	20,27
131-150	431,0	7,87
151-190	175,6	3,21
TOTAL	3926,9	71,74

6.7.2.5 Fracionamento cromatográfico de EECBP (21-28) e isolamento de BP-2

A fração (21-28) (106,7 mg), obtida a partir de EECBP (24-31) (Tabela 25), foi submetida a uma coluna cromatográfica (L=21,0 cm e ϕ = 2,0 cm), utilizando 30 g de gel de sílica. Hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, foram utilizados como fase móvel (TABELA 26).

Tabela 26 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (21-28)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-75	Hexano/Acetato de etila (60:40)	400
76-84	Metanol	100

A análise das frações por CCD permitiu a reunião das que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, sendo, portanto, obtidas cinco frações (TABELA 27).

Tabela 27 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (21-28)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-40	10,8	10,12
41-59	16,8	15,75
60-70	9,3	8,72
71-81	25,7	24,09
82-84	27,8	26,05
TOTAL	90,4	84,72

A fração (1-40), um sólido avermelhado, apresentou uma coloração avermelhada quando analisada por CCD, foi denominada BP-2.

6.7.2.6 Fracionamento cromatográfico de EECBP (119-130)

A fração (119-130) (1109,3 mg), obtida de EECBP (24-31) (Tabela 25, p. 127), foi submetida a uma coluna cromatográfica (L= 28,5 cm e ϕ = 2,0 cm), utilizando 39 g de gel de sílica. Hexano, acetato de etila e metanol foram utilizados como fase móvel (TABELA 28).

Tabela 28 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (119-130)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-92	Hexano/Acetato de etila (30:70)	400
93-106	Acetato de etila	100
107-120	Metanol	100

Após a análise das frações por CCD, foram reunidas aquelas que apresentavam perfis semelhantes, resultando, portanto, em quatro frações (TABELA 29).

Tabela 29 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (119-130)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-18	12,6	1,14
19-40	537,5	48,45
41-70	142,0	12,80
71-109	127,0	11,45
TOTAL	819,1	73,84

A fração (41-70), descrita anteriormente (Tabela 29), quando analisada por CCD, possibilitou a visualização de duas manchas avermelhadas com fatores de retenção bastante

distintos, sugerindo a presença de duas substâncias na fração. Dessa forma, foi efetuado outro fracionamento para o isolamento desses compostos.

6.7.2.7 Fracionamento cromatográfico de EECBP (41-70) e isolamento de BP-3 e BP-4

A fração (41-70) (142,0 mg), obtida de EECBP (119-130) (Tabela 29), foi submetida a uma coluna cromatográfica (L= 16,5 cm e ϕ = 1,5 cm), utilizando 12,2 g de gel de sílica. Hexano e acetato de etila, em mistura binária, foram utilizados como fase móvel (TABELA 30).

Tabela 30 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (41-70)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-84	Hexano/Acetato de etila (94:06)	200
85	Metanol	100

Após a análise do perfil por CCD, foram obtidas onze frações (TABELA 31).

Tabela 31 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (41-70)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-32	38,4	27,04
33-38	13,5	9,51
39-41	12,2	8,59
42-43	14,6	10,28
44-45	12,2	8,59
46-48	11,0	7,75
49-55	16,7	11,76
56-58	10,3	7,25
59-61	4,9	3,45
62-69	2,6	1,83
70-85	3,4	2,39
TOTAL	139,8	98,45

As frações (42-43) (14,6 mg) e (56-58) (10,3 mg) apresentaram-se com um aspecto viscoso, mostraram coloração vermelha quando reveladas com solução de vanilina, foram denominadas BP-3 e BP-4, respectivamente.

6.7.2.8 Fracionamento cromatográfico de EECBP (10)

A fração (10) (272,0 mg), obtida de EECBP (5-20) (Tabela 21, p. 125), foi submetida a tratamento cromatográfico em coluna ($L = 26,0$ cm e $\phi = 1,5$ cm), utilizando 16,0 g de gel de sílica como adsorvente e hexano, acetato de etila e metanol, como eluentes, conforme mostrado na Tabela 32.

Tabela 32 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (10)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-79	Hexano/Acetato de etila (90:10)	200
80-88	Metanol	100

Através da análise por CCD, as frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, obtendo-se, dessa forma, três frações, cujas massas estão mostradas na Tabela 33.

Tabela 33 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (10)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-15	50,4	18,53
16-69	181,0	66,54
60-70	32,5	11,95
TOTAL	263,9	97,03

6.7.2.9 Fracionamento cromatográfico de EECBP (16-69)

A fração (16-69) (181,0 mg), descrita na Tabela 33, foi submetida a tratamento cromatográfico em coluna ($L = 24,0$ cm e $\phi = 1,5$ cm), utilizando 12,5 g de gel de sílica. Diclorometano e metanol foram utilizados como eluentes, conforme descrito na Tabela 34.

Tabela 34 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (16-69)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-94	Diclorometano	300
95-98	Metanol	100

Após a análise do perfil cromatográfico por CCD, as frações foram reunidas, obtendo-se três frações (TABELA 35).

Tabela 35 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (16-69)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-29	24,0	13,26
30-60	139,5	77,07
61-98	5,9	3,26
TOTAL	169,4	93,59

6.7.2.10 Fracionamento cromatográfico de EECBP (30-60) e isolamento de BP-5

A fração (30-60) (139,5 mg), obtida de EECBP (16-69) (Tabela 35), foi submetida a uma coluna cromatográfica (L = 16,0 cm e ϕ = 1,5 cm), utilizando 12,0 g de gel de sílica como adsorvente. Diclorometano e metanol puros foram utilizados como eluentes (TABELA 36).

Tabela 36 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (30-60)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-32	Diclorometano	100
33-34	Metanol	100

As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, após análise por CCD, obtendo-se, dessa forma, cinco frações (TABELA 37).

Tabela 37 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (30-60)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-4	1,4	1,00
5-9	10,7	7,67
10-14	66,8	47,89
15-23	30,4	21,79
24-34	12,5	8,96
TOTAL	121,8	87,31

A fração (5-9) apresentou-se como um sólido branco cristalino, solúvel em diclorometano e mostrou uma coloração cinza em CCD quando revelada com solução de vanilina. Esta substância foi denominada BP-5.

6.7.2.11 Fracionamento cromatográfico de EECBP (11-18)

A fração (11-18) (526,0 mg), obtida a partir de EECBP (5-20) (Tabela 21, p.125), foi submetida a tratamento cromatográfico em coluna ($L = 30,0$ cm e $\phi = 2,0$ cm), utilizando 38,0 g de gel de sílica como adsorvente e diclorometano como eluente (TABELA 38).

Tabela 38 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (11-18)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-80	Diclorometano	400

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações e reuni-las, conforme mostrado na Tabela 39.

Tabela 39 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (11-18)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-14	10,8	2,05
15-19	4,5	0,86
20-35	143,0	27,19
36-48	163,7	31,12
49-55	30,6	5,82
56-80	30,2	5,74
TOTAL	382,8	72,78

6.7.2.12 Fracionamento cromatográfico de EECBP (20-35)

A fração (20-35) (143,0 mg), obtida a partir de EECBP (11-18) (Tabela 39), foi submetida a tratamento cromatográfico em coluna ($L = 31,0$ cm e $\phi = 2,0$ cm), utilizando-se 40,0 g de gel de sílica como fase fixa e uma mistura de hexano e acetato de etila (80:20) como fase móvel, conforme mostrado na Tabela 40.

Tabela 40 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (20-35)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-83	Hexano/Acetato de etila (80:20)	300

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil cromatográfico das frações e reuni-las, conforme mostrado na Tabela 41.

Tabela 41 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (20-35)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-20	6,0	4,20
21-28	14,9	10,42
29-47	81,0	56,64
48-55	16,5	11,54
56-57	1,0	0,70
58-68	9,0	6,29
69-83	6,5	4,55
TOTAL	134,9	94,34

6.7.2.13 Fracionamento cromatográfico de EECBP (29-47)

A fração (29-47) (81,0 mg), resultante do fracionamento de EECBP (20-35), foi submetida à cromatografia *flash* em uma coluna ($L = 14,5$ cm e $\phi = 1,5$ cm), utilizando 8,1 g de gel de sílica. O eluente utilizado foi uma mistura de diclorometano e acetato de etila, conforme apresentado na Tabela 42.

Tabela 42 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EECBP (29-47)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-68	Diclorometano/Acetato de etila (98:2)	200

Após a análise por CCD, foram reunidas as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (TABELA 43).

Tabela 43 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (29-47)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-9	1,1	1,36
10-22	12,8	15,80
23-36	38,5	47,53
37-50	22,2	27,41
51-68	4,7	5,80
TOTAL	79,3	97,90

6.7.2.14 Fracionamento cromatográfico de EECBP (23-36) e isolamento de BP-6

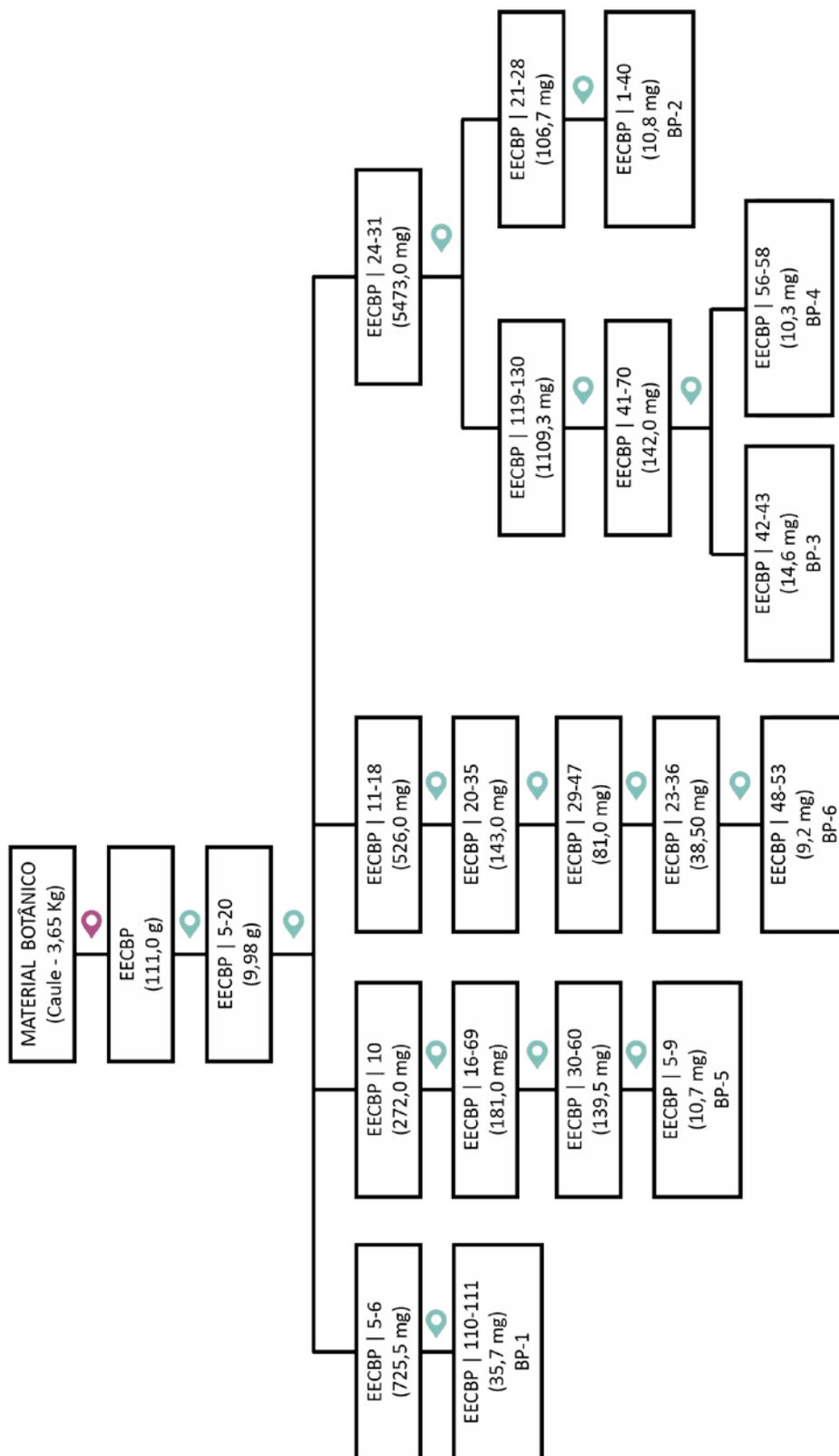
A fração (23-36) (38,5 mg), obtida do fracionamento de EECBP (29-47), foi submetida a tratamento cromatográfico em Sephadex LH-20, utilizando uma coluna (L = 21,0 cm e ϕ 2,0 cm) e metanol como fase móvel. Após a análise do material coletado por CCD, foram obtidas quatro frações, conforme descrito na Tabela 44.

Tabela 44 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de EECBP (23-36)

FRAÇÃO	MASSA (mg)	RENDIMENTO (%)
1-35	4,3	11,17
36-47	23,7	61,56
48-53	9,2	23,90
54-85	1,3	3,38
TOTAL	38,5	100,00

A fração (48-53) apresentou 9,2 mg de um material viscoso e da cor marrom, solúvel em diclorometano, que foi denominado BP-6.

Fluxograma 3 - Etapas envolvendo desde a coleta do material vegetal até o isolamento de BP-1; BP-2; BP-3; BP-4; BP-5 e BP-6.



Legendas:

-  Secagem
-  Extração com solvente
-  Evaporação dos solventes sob pressão reduzida
-  Coluna cromatográfica

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do caule de *Bauhinia pulchella* levou ao isolamento de seis metabólitos secundários que foram caracterizados estruturalmente como a mistura de triterpenos taraxerona e β -amirenona (**BP-1**); como a flavana (+)-3',4'-diidroxifenil-cromano-7-ol (**BP-2**); como as duas flavan-3-ol, denominadas (-)-fisetinidol (**BP-3**) e (+)-epicatequina (**BP-4**); como a mistura de esteroides sitosterol e estigmasterol (**BP-5**) e como o bibenzil 2-hidróxi-3',5'-dimetoxibenzila (**BP-6**), salientando-se que **BP-1** e **BP-4** são substâncias inéditas no gênero *Bauhinia*, enquanto, **BP-2** é inédita na literatura. Este trabalho apresenta o primeiro relato sobre os dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C de **BP-2**, bem como os dados de RMN ^{13}C de **BP-6**.

Os flavonoides, assim como os triterpenos, os esteroides e o bibenzil isolados do caule de *B. pulchella*, reforçam a composição química das espécies do gênero *Bauhinia*.

Através do estudo do óleo essencial das folhas de *Bauhinia pulchella* foi identificado e quantificado 95,68% dos constituintes, sendo α -pineno (23,89%), óxido de cariofileno (22,43%) e β -pineno (12,19%) os constituintes majoritários. Esse óleo essencial quando avaliado sobre larvas de *Aedes aegypti* apresentou valor de CL_{50} igual a $105,93 \pm 1,48$ $\mu\text{g/mL}$, podendo ser, portanto, considerado um bom larvicida natural baseado nos dados apresentados na literatura. Por outro lado, a atividade citotóxica do OEBP sobre as linhagens celulares tumorais humanas MCF-7, NCI-H292, HL-60 e HEP-2 mostrou que o óleo essencial foi mais seletivo para a linhagem celular de leucemia pro-mielocítica com valor de CI_{50} igual a $9,94$ $\mu\text{g/mL}$.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 4a. ed., 2007.
- ALADE, G. O.; ADEBAJO, A. C.; OMOBUWAJO, O. R.; PROKSCH, P.; VERSPOHL, E. J. Quercetin, a minor constituent of the antihyperglycemic fraction of *Bauhinia monandra* leaf. **Journal of Diabetes**, v. 4, p. 439-441, 2012.
- ALI, A.; TABANCA, N.; KURKCUOGLU, M.; DURAN, A.; BLYTHE, E. K.; KHAN, I. A.; BASER, K. H. C. Chemical composition, larvicidal, and biting deterrent activity of essential oils of two subspecies of *Tanacetum argenteum* (Asterales: Asteraceae) and individual constituents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, p. 824-830, 2014.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 450-513, 2013.
- BAIMING, A. T.; REN, F. X.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; QU, A. T.; ZHAO, Y. M. Chemical constituents of *Bauhinia glauca* (Wall. ex Benth.) Benth. subsp. *Hupehana* (Craib) T. Chen. **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v. 47, p. 1796-1798, 2012a.
- BAIMING, A. T.; REN, F. X.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; QU, A. T.; ZHAO, Y. M. Studies on chemical constituents of *Bauhinia glauca*. **Guoji Yaoxue Zazhi**, v. 39, p. 42-44, 2012b.
- BALDÉ, A. M.; PIETERS, L. A.; GERGELY, A.; KOLODZIEF, H.; CLAYERS, M.; VLIETINCK, A. J. A-type proanthocyanidins from stem-bark of *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 337-342, 1991.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BATES, R. B.; JACOBSEN, N. E.; SETZER, W. N.; STESSMAN, C. C. NMR assignments and conformation of taraxerenes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, p. 539-541, 1998.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BIANCO, E. M.; PIRES, L.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; REIS, T. N. V.; VASCONCELOS, E. R. T. P. P.; COCENTINO, A. L. M.; NAVARRO, D. M. A. F. Larvicidal activity of seaweeds from Northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 270-275, 2013.
- BODAKHE, S. H.; RAM, A.; BODAKHE, K. S.; PANDEY, D. P. New polyphenolic aromatic glycoside from *Bauhinia variegata* L. stem bark. **Asian Journal of Chemistry**, v. 22, p. 3549-3553, 2010.

BOONPHONG, S.; PUANGSOMBAT, P.; BARAMEE, A.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory and cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 795-801, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2012.

Disponível em: < http://www.medlearn.com.br/ministerio_saude/atencao_basica/cadernos_atencao_basica_31_praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_fitoterapia.pdf >. Acesso em: 4 junho 2014.

http://www.medlearn.com.br/ministerio_saude/atencao_basica/cadernos_atencao_basica_31_praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_fitoterapia.pdf

BRASIL. Resolução RDC n° 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U.- **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF de 18 de março de 2004.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1347-1354, 2009.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. S. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 99-102, 2003.

COMPAORE, M.; LAMIEN, C. E.; LAMIEN-MEDA, A.; VLASE, L.; KIENDREBEOGO, M.; IONESEU, C.; NACOULMA, O. G. Antioxidant, xanthine oxidase and lipoxygenase inhibitory activities and phenolics of *Bauhinia rufescens* LAM. (Caesalpinaceae). **Natural Products Research**, v. 26, p. 1069-1074, 2012.

CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**, v. 18, p. 460-467, 1995.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 5, 1984. 687 p.

COSTA, O. A. Estudo farmacodinâmico da unha-de-vaca. **Revista da Flora Medicinal**. v. 12, p. 179-189, 1942.

DANAEI, G.; HOORN, S. V.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; EZZATI, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of mine behavioral and environmental risk factor. **The Lancet**, v. 366, p. 1784-1793, 2005.

DA COSTA, L. C. **Biologia floral de espécies do gênero *Arachis* L. (Fabaceae-Papilionoideae) com ênfase em aspectos da morfologia floral e na anatomia de ovários.** 2012, Tese (Doutorado), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

DA SILVA, F. G. E.; MENDES, F. G. S.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; SANTIAGO, G. M. P.; MARIA, A. X. B.; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLI, J.; ROCHA, R. R. Seasonal variation, larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Ruta graveolens* L. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 26, p. 204-209, 2014.

DE CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; DE OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, p. 740-743, 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 3ª Ed. New York: John Wiley & Sons Ltd., 2009.

DOS SANTOS, F. J. B.; JUNIOR, J. S. C.; DE ALMEIDA, A. C.; LUSTOSA, M. C. G.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, P. M. P.; DE FREITAS, R. M. Chemical compounds and some acute toxicological parameters of *Bauhinia platyptala*. **VRI Phytomedicine**, v. 1, p. 56-63, 2013.

FACUNDO, V. A.; POLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v. 38, p. 733-742, 2008.

FARIAS, L. S.; MENDEZ, A. S. L. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *pruinosa*. **Química Nova**, v. 37, p. 483-486, 2014.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, ANGEL.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v. 132, p. 894-904, 2012.

FRANKISH, N.; DE SOUSA, F. M.; MILLS, C.; SHERIDAN, H. Enhancement of insulin release from the β -cell line INS-1 by an ethanolic extract of *Bauhinia variegata* and its major constituent roseoside. **Planta Medica**, v. 76, p. 995-997, 2010.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GÓIS, R. W. S. **Estudo químico e avaliação biológica de *Bauhinia acuruana* Moric.** 2014. 218p. (Doutorado em Química), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemical Analyst**, v. 49, p. 114, 1960.

GUISSONI, A. C. P.; SILVA, I. G.; GERIS, R.; CUNHA, L. C.; SILVA, H. H. G. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua

toxicidade em *Rattus norvegicus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* v. 15, p. 363-367, 2013.

GUPTA, P. K. Pesticide exposure – Indian scene. *Toxicology*. v. 198, p. 83-90, 2004.

GUPTA, A.; SHETH, N. R.; PANDEY, S.; SHAH, D. R.; YADAV, J. S. Design and evaluation of herbal hepatoprotective formulation against paracetamol induced liver toxicity. *Journal of Young Pharmacists*, v. 5, p. 180-187, 2013.

HERNANDES-CHAVEZ, I.; TORRES-TAPIA, L. W.; SIMÁ-POLANCO, P.; DE MARNER, F. J.; FREYER, A.; LEX, J. Antigiardial activity of *Cupania dentate* bark and its constituents. *Journal of Mexican Chemical Society*, v. 56, p. 105-108, 2012.

IMAI, T.; INOUE, S.; OHDAIRA, N.; MATSUSHITA, Y.; SUZUKI, R.; SAKURAI, M.; DE JESUS, J. M. H.; OZAKI, S. K.; FINGER, Z.; FUKUSHIMA, K. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. *The Japan Wood Research Society*, v. 54, p. 470-475, 2008.

JACOBSON, T. K. B.; GARCIA, J.; SANTOS, S. C.; DUARTE, J. B.; FARIAS, J. G.; KLIEMANN, H. J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 35, p. 163-169, 2005.

JAIN, S. A.; PATEL, A. D.; PRAJAPATI, N. K.; PRAJAPATI, S. P. Extraction of flavonoids of seed coat of *Bauhinia tomentosa*. *International Journal of Chemical Sciences*, v. 9, p. 657-663, 2011.

JAIN, R.; YADAV, N.; BHAGCHANDANI, T.; JAIN, S. C. A new pentacyclic phenol and other constituents from the root bark of *Bauhinia racemosa* Lamk. *Natural Product Research*, v. 27, p. 1870-1876, 2013.

JOSHI, A. B.; DESAI, R. R.; BHOBE, M. P. Phytochemical investigation of the hexane extract of stem bark of *Bauhinia purpurea* Linn. *Pharma Chemica*, v. 5, p. 116-121, 2013.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. 10ª Ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

KUMARI, A.; KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant extract synthesized PLA nanoparticles for controlled and sustained release of quercetin: a green approach. *Plos One*, v. 7, p. 41230, 2012.

LEWIS, G.; SCHRINE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. *Royal Botanic Gardens, Kew*. v. 28, 2005.

LIAO, Y.; LI, R. T. Chemical constituents from flowers of *Bauhinia variegata* L. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, v. 25, p. 634-636, 2013.

LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; SOUZA, V. C.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; VAZ, A. M.; SOUZA, E. R.; FILARDI, F. L. R.; VALLS, J. F. M.; GARCIA, F. C. O.; FERNANDES, J. M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C.; PEREZ, A. P. F.; MANSANO, V. F.; MIOTTO, S. T. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MEIRELLES, J. E.; LIMA, L. C. P.; FLORES, A. S.; PINTO, R. B.; RIBEIRO, R. D.; RANDO, J. G.;

SCALON, V. R.; CARDOSO, D. B. O. S.; COSTA, L. C.; SILVA, M. J.; MOURA, T. M.; BARROS, L. A. V.; QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B. Fabaceae. In: Forzza, R. C. *et al.* (Org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro, v. 2, p. 989-1102, 2010.

MALI, R. G.; MAHAJAN, S. G.; MEHTA, A. A. Rakta kanchan (*Bauhinia variegata*): chemistry, traditional and medicinal uses - a review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 314-319, 2007.

MANSUR, M. C. P. P. R.; LEITAO, S. G.; LIMA, L. M. T. R.; RICCI-JUNIOR, E.; DE SOUZA, G. R.; BARBI, N. S.; MARTINS, T. S.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; LEO, R. R. T.; VIEIRA, R. C.; LEITAO, G. G.; SANTOS, E. P. Evaluation of the antioxidant and phototoxic potentials of *Bauhinia microstachya* var. *massababensis* vaz leaf extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 200-206, 2012.

MARNER, J. F.; FREYER, A.; LEX, J. Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3709-3712, 1991.

MARTIN, T. S.; KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; NAKATANI, N. Constituents of *Amomum tsao-ko* and their radical scavenging and antioxidant activities. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, p. 667-673, 2000.

MODH, K. M.; PARMAR, P. T.; PANIGRAHI, B.; ANAND, I. S.; PATEL, C. N. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaves of *Bauhinia variegata* Linn. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p. 45-49, 2011.

MOHAMED, M. A.; MAMMOUD, M. R.; HAYEN, H. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of new triterpene saponin from *Bauhinia variegata* leaves. **Zeitschrift fuer Natuforschung , C: Journal of Biosciences**, v. 64, p. 798-808, 2009.

MOSSNAM, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 1467-1486, 1983.

NEVES, R. T.; RONDON, J. N.; DA SILVA, L. I. M.; PERUCA, R. D.; ITAVO, L. C. V.; CARVALHO, C. M. E.; DE SOUZA, A. P.; FABRI, J. R. Efeito larvicida de *Ricinus communis* L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Digital**. v. 18, p. 127-131, 2013.

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

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; DE MATTOS, M. C.; SEGUNDO, T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. New enamines derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 211-221, 2002.

PARK, H. Y.; TOUME, K.; ARAI, M. A.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKONR, T.; ISHIBASHI, M. β -Sitosterol and flavonoids isolated from *Bauhinia malabarica* found during screening for wnt signaling inhibitory activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, p. 242-245, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4ª Ed. São Paulo: Cengage Learning Edições Ltda., 2010.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. Advances in legume systematic. Part 1. **Royal Botanic Gardens**. v. 1, p. 1-425, 1981.

POLSON, K. A.; BROGDON, W. G.; RAWLINS, S. C.; CHADEE, D. D. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 117, p. 31-38, 2011.

QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. **Royal Botanical Gardens**, p. 71-118, 2009.

RAJKAPOOR, B.; MURUGESH, N.; KRISHNA, D. R. Cytotoxic activity of a flavanone from the stem of *Bauhinia variegata* Linn. **Natural Product Research**, v. 23, p. 1384-1389, 2009.

ROUX, D. G. Structural and chromatographic correlations of some flavonoid compounds. **Journal of Chromatography**, v. 10, p. 473-478, 1963.

SAHA, S.; SUBRAHMANYAM, E. V. S.; KODANGALA, C.; SHASTRY, S. C. Isolation and characterization of triterpenoids and fatty acid ester of triterpenoids from leaves of *Bauhinia variegata*. **Der Pharma Chemica**, v. 3, p. 28-37, 2011.

SALGUEIRO, A. C. F.; LEAL, C. Q.; BIANCHINI, M. C.; PRADO, I. O.; MENDEZ, A. S. L.; PUNTEL, R. L.; FOLMER, V.; SOARES, F. A.; AVILA, D. S.; PUNTEL, G. O. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 81-87, 2013.

SASHIDHARA, K. V.; SINGH, S. P.; MISRA, S.; GUPTA, J.; MISRA-BHATTACHRYA, S. Galactolipids from *Bauhinia racemosa* as a new class of antifilarial agents against human lymphatic filarial parasite, *Brugia malayi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 230-235, 2012.

SAYAGO, C. T. M.; DE CAMARGO, V. B.; BARBOSA, F.; GULARTE, C.; PEREIRA, G.; MIOTTO, S.; CECHINEL FILHO, V.; PUNTEL, R. L.; MENDEZ, V. F. A. Chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts from *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and *B. variegata*. **Acta Biologica Hungarica**, v. 64, p. 21-33, 2013.

SEMWAL, S.; SHARMA, R. K. A new lignan rhamnoside from *Bauhinia retusa* seeds pods (Caesalpinaceae). **Chinese Chemical Letters**, v. 22, p. 1081-1083, 2011a.

SEMWAL, S.; SHARMA, R. K. Antibacterial sesquiterpene lactone glucoside from seed pods of *Bauhinia retusa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, p. 75-79, 2011b.

SENTHILKUMAR, A.; KANNATHASAN, K.; VENKATESALU, V. Chemical constituents and larvicidal property of the essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr. against *Culex quinquefasciatus*. **Parasitology Research**, v. 103, p. 959-962, 2008.

SHANG, X.; LI, S.; WANG, S.; YANG, Y.; SHI, J. Study on flavonoids from *Bauhinia aurea*. **Zhongcaoyao**, v. 40, p. 196-199, 2009.

SHANG, X. Y.; LI, S.; WANG, S. J.; YANG, Y. C.; SHI, J. G.; Chemical constituents of *Bauhinia aurea*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, p. 966-972, 2012.

SILVA, W. J. ; DÓRIA, G. A. A. ; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SILVA, T. M. S.; LINS, C. S. L.; SARMENTA-FILHA, M. J.; RAMOS, C. S.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A. Riachin, a new cyanoglucoside from *Bauhinia pentandra* and its antioxidant activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, p. 685-690, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectral de compostos orgânicos**. 7a Ed. São Paulo, Livros Técnicos e Científicos Editora, 2007.

SINGH, R. S.; SINHA, R.; PANDEY, H. S.; RAO, C. V. Four new aliphatic compounds from *Bauhinia variegata* pods. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 33, p. 144-149, 2011.

SUNDARAM, K. M. S. Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behavior and biological effects. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 31, p. 913-948, 1996.

TAKASUGI, M.; KAWASHIMA, S.; MONDE, K.; KATSUI, N.; MASAMUNE, T.; SHIRATA, A. Antifungal compounds from *Dioscorea batatas* inoculated with *Pseudomonas cichorii*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 371-375, 1987.

TANG, Y-Z.; XING, Y-C.; MEN, R-Z.; PAN, Y.; MENG, D -L.; LI, N.. Bioactive constituents of *Bauhinia glauca* Benth. subsp. *pernervosa*. **Shenyang Yaoke Daxue Xuebao**, v. 31, p. 188-190, 2014.

TANJUNG, M.; SAPUTRI, R. D.; TJAHJANDARIE, T. S. Antioxidant activity of two isomeric benzoxepin derivatives from the stem bark of *Bauhinia aculeata* L. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 705-708, 2014.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T. J.; TOSUN, F.; RÜ, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1352-1364, 2006.

THOMPSON, J. B.; PASCALICCHIO, A. A. E. O impacto da medicina tradicional: Brasil como potência verde mundial. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 7, p. 62-63, 2012.

VAN DEN DOLL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system

including linear temperature programmed gas – liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. *Bauhinia* ser. *Cansenia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) no Brasil. **Rodriguésia**. v. 83, p. 55-143, 2003.

VERMA, T.; CHANDRASHEKAR, K. S.; JOSHI, A. B. α -Amyrin caprylate – a new triterpene isolated from the leaf of *Bauhinia purpurea* Linn. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 2, p. 569-570, 2009.

WU, Z.; WANG, B.; ZHAO, Y.; YANG, X.; LIANG, H. Chalcones from *Bauhinia glauca* subsp. *pernervosa*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 34, p. 1676-1678, 2009a.

WU, Z. B.; ZHAO, Y. Y.; YANG, X. W.; LIANG, H. Flavonoids from *Bauhinia glauca* subsp. *pernervosa*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, p. 628-631, 2009b.

XIAO, K.; ZHANG, H. J.; XUAN, L. J.; ZHANG, J.; XU, Y. M.; BAI, D. L. Stilbenoids: chemistry and bioactivities. **Studies in Natural Products Chemistry**, Atta-ur-Rahman (Ed.), v. 34, p. 469, 2008.

XU, W.; CHU, K.; LI, H.; ZHANG, Y.; HAIYIN, Z.; CHEN, R.; CHEN, L. Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of flavonoids from *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. **Molecules**, v. 17, p. 14323-14335, 2012.

XU, W.; ZHENG, H.; HONG, Z.; TANG, X. RP-HPLC determination of four flavonols in *Bauhinia championii* Benth. **Zhongguo Xiandai Yingyong Yaoxue**, v. 26, p. 763-766, 2009.

YADAV, S.; VERMA, D. L. Antioxidant flavonoids from leaves of *Bauhinia retusa* Roxb. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 32, p. 16-19, 2010.

YUENYONGSAWAD, S.; BUNLUEPUECH, K.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; TEWTRAKUL, S. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 765-769, 2013.

ZHANG, L.; ZHAO, Q.; LIANG, R. J.; CEN, Y. Z. Chemical constituents of *Bauhinia brachycarpa*. **Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa**, v. 24, p. 754-756, 2012.

ZHAO, Y. H.; ZHOU, Y. S.; WANG, S.; LIN, L. W. Optimization of macroporous resin purification process for *Bauhinia championii* by central composite design-response surface methodology. **Zongguo Shiyan Fangjixue Zazhi**, v. 20, p. 36-40, 2014.

ZHAO, Q.; WU, Z.; ZHENG, Z.; LU, X.; LIANG, H.; CHENG, W.; ZHANG, Q.; ZHAO, Y. Phenolic acid derivatives from *Bauhinia glauca* subsp. *pernervosa*. **Yaoxue Xuebao**, v. 46, p. 946-950, 2011.