



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SANDRA REGINA NUNES DE ANDRADE MEDEIROS

**FITODISPONIBILIDADE DE METAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS
BIOLÓGICOS NO ÓLEO DE *Bauhinia unguolata* L. (FABACEAE)**

Boa Vista, RR

2016

SANDRA REGINA NUNES DE ANDRADE MEDEIROS

**FITODISPONIBILIDADE DE METAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS
BIOLÓGICOS NO ÓLEO DE *Bauhinia unguolata* L. (FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos necessários para Título de Mestrado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho

Boa Vista, RR

2016

SANDRA REGINA NUNES DE ANDRADE MEDEIROS

**FITODISPONIBILIDADE DE METAIS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ENSAIOS
BIOLÓGICOS NO ÓLEO DE *Bauhinia unguolata* L. (FABACEAE)**

Dissertação apresentada como Pré-requisito para o Título de Mestrado em Química da Universidade Federal de Roraima - UFRR, defendida em 01 de Novembro de 2016 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho
Orientador / Departamento de Química – UFRR

Prof. Dr. Carlos Ramon Franco
Departamento de Química – UFRR

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Departamento de Química – UFRR

À minha mãe, meu pai, meus irmãos, meu esposo, meu
filho, pelo amor, carinho, orientação e confiança que
sempre depositarem em mim. A todos meus familiares,
pela ajuda, dedicação e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza e meu fiel protetor que tornou possível todas as coisas.

Aos meus familiares, tios, primos, cunhados e cunhadas, minha sogra Dalva e meu sogro Aluisio *in memoriam* e em especial minha mãe Lionete, meu pai, Marcos, Meu esposo Paulo Medeiros, meu filho Paulo filho, meus irmãos Maria de Lourdes, Gislayne, Vanessa, Andressa, Abílio e Mozart, minha avó Laurita, meus avós Maria de Lourdes, Vicente e Abílio *in memoriam*, meus sobrinhos Eric, Debora, Fernanda, Marcos neto, Vínicius, Heloisa, Matheus, Pedro, Leticia, João Miguel, Caio, Mozart Jr, Amanda, Maressa que são a minha base familiar e me tornam a pessoa que sou e não mediram esforços em mais essa etapa da minha vida.

Aos colegas de mestrado que conquistei, em especial, Francisco, meu fiel escudeiro, Andreina, Regildo, Syrlei, Diana, Luciana, Gilmar, Ana Marcia que fizeram parte integrante nos estudos, nas noites de serão, nas dificuldades enfrentadas, como, também, nos momentos de risos e gargalhadas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Alves pela orientação, dedicação, paciência e incentivo que fez com que eu nunca esmorecesse mesmo nas dificuldades.

Aos meus professores, Habel Nasser, Antônio Alves, Henrique Eduardo Bezerra, Ramon Franco, Luiz Antonio e Simone Rodrigues pelo profissionalismo.

Aos meus amigos Cristina e Pedro pela amizade, incentivo, e colaboração.

Ao Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial a Dra. Vany Ferraz, químicas.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da UFMG, em especial a Professora Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, pela colaboração nos Bioensaios.

Aos colegas que fiz na UFMG que nos ajudaram nos testes biológicos, Jeane, Larissa, Amanda, Marília e Matheus.

Aos meus amigos Regina, Rita Faccione e Ester que moram no meu coração.

Aos alunos de IC pela ajuda no laboratório. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

(Marthin Luther King).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A) Árvore de <i>B. unguolata</i> ; B) Folhas de <i>B. unguolata</i> ; C) Flores de <i>B. unguolata</i> ; D) Fruto de <i>B. unguolata</i>	19
Figura 2 -	Distribuição de <i>B. unguolata</i>	20
Figura 3 -	Mecanismo de ação da enzima acetilcolinesterase (AChE)	26
Figura 4 -	Reação de hidrólise da AChE	27
Figura 5 -	Fluxograma do trabalho experimental	35
Figura 6 -	Mapa da localização da espécie de estudo	36
Figura 7 -	Exsicata de <i>B. unguolata</i>	37
Figura 8 -	Teste antimicrobiano	45
Figura 9 -	Óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	47
Figura 10	Cromatograma do O.E. essencial de <i>B. unguolata</i>	50
Figura 11	Variação dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	51
Figura 12	Espectros de Massas do componente β -cariofileno	51
Figura 13	Estruturas químicas dos principais constituintes majoritários identificados por CG-EM e CG-DIC presentes no óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	53
Figura 14	Curva da atividade frente à <i>Artemia salina</i> para o óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	55
Figura 15	Placa de Elisa contendo óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	56
Figura 16	Curva da atividade frente à <i>Candida albicans</i> para o óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	59
Figura 17	Curva da atividade frente à <i>Bacillus cereus</i> para o óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	59
Figura 18	Curva da atividade frente à <i>Staphylococcus aureus</i> para o óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	60
Figura 19	Curva da atividade frente à <i>Salmonella typhimurium</i> para o óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Funções e deficiência dos minerais nas plantas	32
Tabela 2 -	Porcentagem dos constituintes identificados no O.E. de <i>B. unguolata</i> .	49
Tabela 3 -	Número de náuplios mortos com óleo essencial de <i>B. unguolata</i> .	54
Tabela 4 -	Dados de atividade frente à <i>Artemia salina</i> para o óleo essencial de <i>B. unguolata</i>	54
Tabela 5 -	Resultados de inibição da enzima acetilcolinesterase (Alzheimer) e seus respectivos desvios padrão	57
Tabela 6 -	Inibição do O.E. de <i>B. unguolata</i> nos microrganismos testados...	58
Tabela 7 -	Teores dos metais com concentração acima de 1ppm	62

ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
ATCC	American Type Culture Collection
ATCI	Cloreto de Acetilcolina
<i>B. unguolata</i>	<i>Bauhinia unguolata</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infuso de cérebro e coração)
CE ₅₀	Concentração Eficiente 50%
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
D.A	Doença de Alzheimer
DMID	Diabetes melitos insulino dependente
DMNID	Diabetes melitos não insulino dependente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%
ICPOES	Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Individualmente Acoplado
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas Amazônica
KI	Índice de Kovats
MIC	Mínima Concentração Inibitória
mL	Mililitro
mM	Milimol

Nm	Nanômetro
NPPGCeT	Núcleo de Pesquisa e Pós-graduação Ciência e Tecnologia
O.E	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPGQ	Programa de Pós-graduação em Química
S	Desvio Padrão
Tris	Ultrapure Hydrochloride
U/mL	Unidades por mL
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV-Visível	Ultra Violeta Visível
λ	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	FAMÍLIA FABACEAE.....	16
1.2	GÊNERO <i>Bauhinia</i>	17
1.3	ESPÉCIE <i>Bauhinia unguolata</i>	18
1.4	ÓLEOS ESSENCIAIS	21
1.4.1	Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais	22
1.4.1.1	Terpenos	23
1.4.1.2	Monoterpenos	23
1.4.1.3	Sesquiterpenos	23
1.5	DOENÇAS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS RELACIONADAS AO GÊNERO <i>Bauhinia</i>	24
1.5.1	Diabetes	24
1.5.1.1	Insulina	25
1.5.2	Alzheimer	25
1.5.2.1	Enzima acetilcolinesterase (AChE).....	26
1.5.2.2	Inibidores enzimáticos	27
1.6	MICROORGANISMOS ESTUDADOS	28
1.6.1	Fungos	28
1.6.2	Bactérias	29
1.7	MINERAIS	30
1.7.1	Minerais e o Corpo Humano	30
1.7.2	Constituição Mineral nas Plantas	31
1.7.2.1	Funções dos Minerais nas Plantas.....	31
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34

3	METODOLOGIA	35
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	36
3.2	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	37
3.3	CROMATOGRAFIA GASOSA	38
3.3.1	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)	38
3.3.2	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC)	38
3.4	BIOENSAIOS <i>in vitro</i>	39
3.4.1	Avaliação da citotoxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	39
3.4.2	Preparação da solução salina	39
3.4.3	Preparação da solução para os bioensaios de <i>Artemia salina</i>	39
3.4.4	Teste de <i>Artemia salina</i>	40
3.4.5	Verificação da citotoxicidade	40
3.4.6	Cálculo do CL₅₀	41
3.5	TESTE DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (AChE)	41
3.5.1	Preparo da solução tampão Tris/HCl pH 8 (50 mM)	41
3.5.2	Preparo da solução estoque de enzima	41
3.5.3	Preparo da solução da enzima na concentração 0,222 U.mL⁻¹	41
3.5.4	Preparo da solução de trabalho	42
3.5.5	Preparo dos reagentes	42
3.6	BIOENSAIOS PARA BACTÉRIAS E FUNGOS <i>in vitro</i>	43
3.6.1	Preparação da solução trabalho (amostra + Meio de cultura)	43
3.6.2	Preparo do meio de cultura Agar <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)	43
3.6.3	Preparo do meio de cultura Caldo Sabouraud	44
3.6.4	Preparação do inóculo dos microrganismos	44
3.6.5	Padronização dos microrganismos	44
3.6.6	Teste de atividade antibacteriana e antifúngica	44
3.7	ANÁLISE DE METAIS.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL	47
4.2	ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA	48

4.3	DETERMINAÇÃO DA CITOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> ...	54
4.4	RESULTADOS DO TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	56
4.5	BIOENSAIOS <i>in vitro</i> de BACTÉRIAS e FUNGOS	57
4.6	ANÁLISE DE METAIS POR ICPOES NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B.</i> <i>ungulata</i>	61
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, os seres humanos têm contado com a natureza para suas necessidades básicas, para a produção de alimentos, abrigos, roupas, meios de transporte, fertilizantes, fragrâncias e medicamentos. Plantas medicinais formaram por milhares de anos a base da medicina tradicional e continua a fornecer a humanidade novos medicamentos (GURIB-FAKIM, 2006).

No Brasil para uma parcela da população rural ou urbana as plantas medicinais tem sido opção terapêutica por diversos motivos, social, cultural, econômica ou de ordem médica, e esse número vem crescendo com o desenvolvimento de iniciativas que dedicam atenção a elas tanto em medicamentos produzidos pelas indústrias farmacêuticas como fitoterápicos produzidos por diversas entidades e organizações governamentais (MING et al., 2003 in COELHO; COSTA JUNIOR; DOMBROSKI, 2003).

O interesse na natureza como fonte de agentes quimioterapêuticos potenciais continua, pois, produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico em todo o mundo. A grande maioria das pessoas no mundo ainda depende das plantas medicinais para as suas necessidades de cuidados da saúde todos os dias (GURIB-FAKIM, 2006).

De acordo com a organização mundial de saúde (OMS) cerca de 65 a 80% da população mundial não tem atendimento primário de saúde e recorrem à medicina tradicional, na procura de alívio para as suas diversas enfermidades (CALIXTO, 2001).

A importância da utilização de plantas medicinais deve-se em parte pela sua contribuição como fonte natural de fármacos, pois são inúmeros os medicamentos que foram desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais especialmente de plantas, incluindo entre outras a morfina, os digitálicos, pilocarpina, vincristina, vimblastina, artemisina e quinina, as plantas também podem proporcionar grandes chances de se obter uma molécula protótipo devido a diversidade de constituintes presentes nestas (CALIXTO, 2001, NOLDIN et al., 2003) .

Entre as inúmeras espécies de uso medicinal encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencente à família Fabaceae e subfamília (Caesalpinioideae)

que é uma das maiores das angiospermas (SOUZA; LORENZI, 2008, BRACA et al., 2001).

Este gênero é encontrado principalmente nas áreas tropicais, possuindo aproximadamente cerca de 250 a 300 espécies (BRACA et al., 2001, LEWIS; OWEN, 1989).

No Brasil as espécies de *Bauhinia* são conhecidas popularmente como pata de vaca, unha de boi, pé de boi, escada de macaco, unha de jaboti e mororó (SILVA; CECHINEL, 2002, LORENZI; MATOS, 2002). São utilizadas no auxílio do tratamento da diabetes melitos, no controle do colesterol, como diurético e expectorante (CORRÊA, 1998).

Nesta pesquisa objetivou-se caracterizar os componentes voláteis do óleo essencial das folhas de *B. unguolata*, verificar o seu potencial biológico, assim como identificar e quantificar o teor de metais, visando obter informações desta espécie no estado de Roraima.

1.1 FAMÍLIA FABACEAE

Esta família é a terceira maior em angiospermas com aproximadamente 19.400 espécies e 730 gêneros (LEWIS et al., 2005, MORA; ROJAS, 2010). Possui três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (SMITH, 2004). É uma das maiores das dicotiledôneas, são plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anual ou perene e também muitas trepadeiras; vivem nos mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes e estão espalhadas em regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 1993, JOLY 1998, MORA; ROJAS, 2010).

Esta família é praticamente cosmopolita, ou seja, se adapta aos diferentes ambientes e é encontrada praticamente no mundo inteiro, é a segunda maior família em importância econômica como o amendoim (*Arachis*), feijão grande (*cajanus*), grão de bico (*cicer*), ervilha (*pisum*) entre outras. Muitas espécies fornecem importantes forrageiras, tais como a alfafa (*medicago*) e a fava (*vicia*). Muitas são ornamentais, como a pata de vaca (*bauhinia*), acácia, mulungu (*erythria*). Vários gêneros são fontes de madeira de qualidade como *Dalbergia Pterocarpus* (SMITH, 2004, JUDD et al., 2009).

São muito utilizadas como condimentos, aromatizantes e vários outros empregos culinários, para produção de alcaçuz, perfumes e óleos e na produção de medicamentos, como componentes de anticoncepcionais orais e em alguns casos como alucinógenos (LEWIS, 1989). Espécies dessa família são ricas em tanino e resinas (SMITTH, 2004).

Possuem alto metabolismo de nitrogênio e aminoácidos, contém nódulos radiculares, contendo bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium*), possuem cavidades secretoras, geralmente com a presença de taninos, alcaloides, e algumas tem compostos cianogênicos. As folhas em geral são alternas, espiraladas, pinadas ou duplamente pinadas. O fruto é chamado de legume (MORA; ROJAS, 2010, JUDD et al., 2009). As sementes possuem geralmente testa dura, cujas células apresentam forma de ampolheta (JUDD et al., 2009).

As flores são bissexuais radiais a bilaterais vistosas ou não possuem entre 5-15 mm de comprimento às vezes maior como em *Bauhinia* onde podem atingir mais de 10 cm, as cores variam desde brancas, amarelas, azuis, ou vermelhas. Possuem ramos inertes aculeados ou espinhosos (SOBRAL; JARENKOLW, 2006).

1.2 GÊNERO *Bauhinia*

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, que são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 250 espécies (BRACA et al., 2001).

São árvores pequenas que ocorrem geralmente de maneira espontânea, possuem caule duro, com cascas fibrosas e folhas com fendas, tipicamente de espécies desse gênero, que formam dois lobos, cujo formato lembra o rastro da pata de bovinos (LORENZI; MATOS, 2002, 2008).

No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas vulgarmente como pata-de-vaca, unha-de-boi, pé-de-boi, escada-de-macaco, unha de jaboti, mororó (SILVA; CECCHINEL, 2002, CECCHINEL FILHO, 2009).

As folhas são utilizadas tradicionalmente no Brasil com fins curativos. A literatura especializada do começo do século relatava que os curandeiros do interior usavam o cozimento dessas folhas em formas de chá e banhos para curar lepra, furúnculos e picadas de cobra (LORENZI; MATOS, 2008). Muitas destas plantas são

usadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia, e América Central e do Sul (BRACA et al., 2001).

Estudos fitoquímicos, realizados com espécies deste gênero como a *B. forticata* indicam que são constituídos principalmente de glicosídeos, esteróides, triterpenos, lactonas (JOLY, 1993, JOLY, 1998, MARQUES et al., 2012) e flavonóides entre outros como em *B. radiata* Vell, *B. aculeata* L, *B. cupulata* L, *B. forticata* L, *B. longifolia*, *B. purpurea* que apresentaram os flavonoides Kaempferol e Quercetina (SALATINO et al., 1999). Mais pouco se conhece sobre a atividade farmacológica da maioria das substâncias isoladas do gênero *Bauhinia*, porém este gênero é mais frequentemente estudado quanto a sua possível ação hipoglicemiante (SILVA; CECCHINEL, 2002).

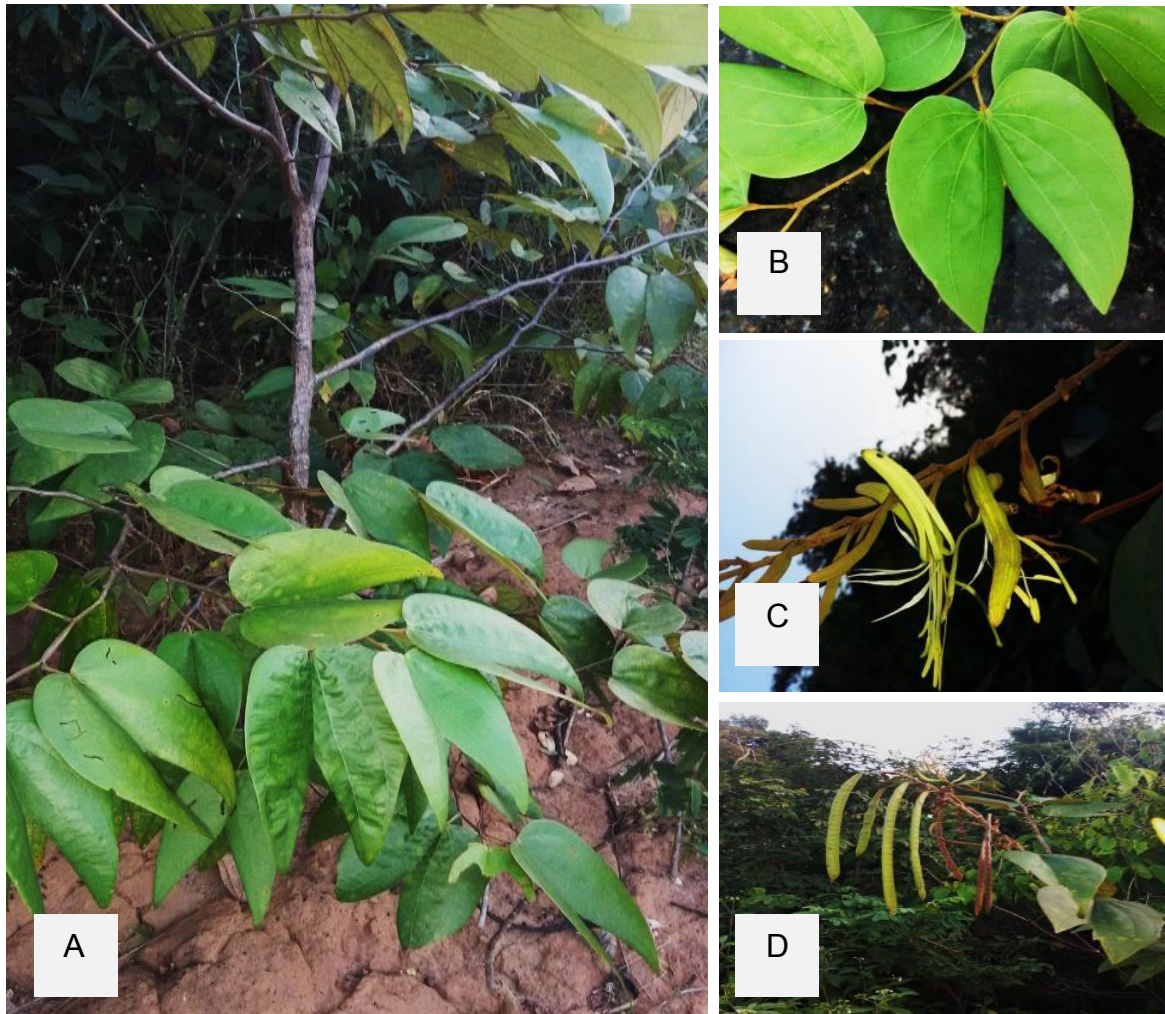
Espécies deste gênero demonstraram também ação musculocida (SINGH, 2012), efeitos antioxidantes (PAULA et al., 2014, PORTS et al., 2013), inibição da acetilcolinesterase (SANTOS et al., 2011) e ação bacteriana (CECCHINEL FILHO, 2000, 2009, KLAFKE et al., 2013).

No extrato das folhas de *B. variegata* foram relatadas as atividades citotóxicas contra células de cancro humano com 90-99% de inibição, assim como ação antioxidante (MISHRA et al., 2013). Mostrando assim que as plantas deste gênero podem ser a grande esperança de se obter potentes fármacos contra a diabetes e doenças relacionadas aos radicais livres, bactérias, dengue e Alzheimer.

1.3 ESPÉCIE *Bauhinia unguolata*

A espécie *Bauhinia unguolata* L. cujo nome *ungulata*, em latim, significa casco ou pata de bovino, pode ser encontrada no Brasil nas regiões tropicais, sendo no nordeste a mais comum. Possuem características e usos semelhantes às demais espécies de *Bauhinia*, são arbustos de 2-6m de altura, com folhas pontiagudas, sementes marrom escuro, flores de cor branca caráter esse que a distingue de outras espécies cultivadas como mostra a Figura 1 a seguir (LORENZI; MATOS, 2002, 2008, LEWIS; OWEN, 1989).

Figura 1 – A) Árvore de *B. unguolata*; B) Folhas de *B. unguolata*; C) Flores de *B. unguolata*; D) Fruto de *B. unguolata*.



Fonte: A autora.

B. unguolata é a espécie estudada de maior extensão de distribuição geográfica, dentre as demais espécies de *Bauhinia*, no Brasil se estende desde a floresta amazônica e nas florestas de refúgio do Ceará. É considerada uma confirmação da presença do elemento amazônico na flora nordestina e do Mato Grosso, em regiões com influência da vegetação amazônica (VAZ; TOZZI, 2003).

A Figura 2 apresenta alguns pontos onde foram encontrados a espécie *B. unguolata*.

Figura 2 – Distribuição de *B. unguolata* no mundo



Fonte: Discover-life (2016).

Podem ser encontrada nas margens de rios, floresta com campos, floresta seca de savana, cerrado, na encosta da serra da Lua, campos alagados periodicamente, área de carrasco, caatinga arbórea, cerradões e vegetação secundária (VAZ; TOZZI, 2003).

Estudos demonstram que esta espécie além de baixar o nível de glicose, diminuem também o colesterol e os triglicérides. Inclusive foi registrada em pesquisa a presença de insulina nos cloroplastos das células foliares desta planta (LORENZI; MATOS, 2008).

Morais et al. (2005), reporta a utilização de *B. unguolata* pelos índios Tapebas no Ceará para o tratamento da diabetes. Sendo assim este gênero é mais frequentemente estudado quanto a sua ação hipoglicemiante (SILVA et al., 2002, PEPATO et al., 2002).

Foi isolada das sementes de *B. unguolata* uma nova lectina denominada BUL, que demonstrou atividade antifúngica e anti-proliferativa *in vitro* contra a linha celular HT-29 do adenocarcinoma do cólon humano (SILVA et al., 2014).

Em salatino et al. (1999), foram isolados os flavonoides Kaempferol e quercetina, bem como Neto et al. (2008), identificou os flavonóides, quercitina, quercitina-3-o-arabinofuranosideo e quercitrina, um inositol metoxilado e os alcalóides, harmano e eleaginina, no extrato etanólico das folhas, comprovando que

esta espécie possui na sua constituição química flavonóides e alcalóides entre outros.

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os compostos orgânicos de vegetais vêm sendo isolados desde os tempos antigos. Aquecendo-se os materiais vegetais por meio de destilação a vapor podem-se obter compostos com aromas característicos conhecidos como óleos essenciais.

Os óleos essenciais se encontram na maioria dos vegetais superiores, onde se estima cerca de 17.500 espécies aromáticas (BRUNETON, 2001). Também chamados de óleos voláteis, essenciais ou etéreos (CUNHA et al., 2004).

Em geral os óleos essenciais possuem propriedades antissépticas, refrescantes, secretólicas, rubefacientes, anti-inflamatória, anestésica local, bactericida, virucida e fungicida (SOBRAL; JARENKOW, 2006, BAKKALI, 2008, SOUZA; PALAZZO; LOPES, 2011). Estimulante do aparelho digestivo, dismenorreicas (canela e açafrão), abortivas (losna e arruda), sedativas (melissa e camomila), efeito analéptico (cânfora), expectorantes (guaicol, tomilho e eucalipto), anti-helmíntica (eucalipto) (COSTA, 2002).

Muitas dessas propriedades também desempenham um importante papel na própria proteção dessas plantas na natureza a protegendo, contra microrganismos patogênicos e herbívoros, reduzindo o seu apetite em comê-las. Esses óleos também podem atrair insetos para garantir a dispersão de pólen e sementes, contribuindo para a disseminação dessas plantas em seu habitat (BAKKALI, 2008).

Geralmente são líquidos a temperatura ambiente, sua densidade é inferior a da água (com exceção dos óleos de cravo, canela, sassafrás), possuem índice de refração elevado e a maioria desviam a luz polarizada, lípidos e poucos são coloridos, que podem ser encontrados em todas as partes da planta como, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes e frutos (BAKKALI, 2008). Sendo que as folhas de ramos idosos mostram-se mais ricas em óleo do que em plantas jovens como na essência de eucalipto e no período de floração se concentram nas flores (COSTA, 2002).

São obtidos mais comumente por arraste a vapor ou por hidrodestilação, sendo o rendimento bastante variável, em média 0,1%, como o óleo essencial de Alfazema (CUNHA et al., 2004).

As essências alteram-se com maior ou menor facilidade, na dependência da natureza química dos seus constituintes em concordância com o meio. Os principais fatores que as modificam podemos citar, o ar, a luz, o calor, presença de metais pesados, água e impurezas diversas. Dentre as alterações reconhecem-se mudanças no aroma, sabor, cor, transparência, fluidez, densidade, solubilidade, polarização, refração e quantidade relativa dos seus constituintes majoritários e característicos (COSTA, 2002).

Frequentemente são encontrados em regiões de clima quente e temperados, onde representam grande importância na farmacopeia popular (BAKKALI, 2008). Aparecem em grupos de vegetais evolucionários mais comumente nas gimnospermas (COSTA, 2002).

Os óleos essenciais representam importante matéria prima para as indústrias Farmacêutica, cosmética e alimentícia (BIZZO, 2009, CUNHA et al., 2004).

Os principais óleos essenciais no mercado mundial são os de: Laranja (*Citrus sinensis* L.) Osbeck; Menta japonesa (*Mentha arvensis* L., var. *piperascens*); Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill); Citronela (*Cymbopogon winterianus*); Hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.); Limão (*Citrus limon* L.); Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.); Cedro (*Juniperus virginiana* L.); Cânfora (*Cinnamomum camphora* L.); Coentro (*Coriandrum sativum* L.); Grapefruit (*Citrusparadisi* Macfady); Patchouli (*Pogostemon cablin*) (BIZZO, 2009).

1.4.1 Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais possuem uma mistura de substâncias complexas voláteis e hidrofóbicas, tais como terpenos e fenilpropanoides (CUNHA et al., 2004).

1.4.1.1 Terpenos

Os terpenos possuem uma estrutura comum, suas fórmulas representam a união de duas, três, quatro, seis, oito ou mais unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno ou metil-butadieno). Sendo os monoterpeno com $n=2$, e sesquiterpenos com $n=3$, são compostos encontrados principalmente nos óleos essenciais.

Os terpenos são divididos em monoterpenos (10 Carbonos com atividade anti-irritante), sesquiterpenos (15 Carbonos com atividade antimicrobiana) e diterpenos (20 Carbonos). Detém aromas agradáveis, geralmente possuem insolubilidade ou pouca solubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos, fungicida (SOBRAL; JARENKOW, 2006, BAKKALI, 2008, SOUZA; PALAZZO, LOPES, 2011, SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

1.4.1.2 Monoterpenos

Os monoterpenos são os constituintes da série dos terpenos com exceção dos hemiterpenos, que são pouco frequentes. São o resultado do acoplamento de duas unidades isoprenicas. A maioria dos monoterpenos se encontra de forma livre (óleos essenciais). Especialmente no reino animal (salvo alguns insetos), são raros em fungos, se encontram na forma halogenada, encontram-se amplamente distribuídos em algas e vegetais superiores. Exemplos de monoterpenos são: mirceno, pineno, iridano, careno, limoneno, entre outros (BRUNETON, 2001).

1.4.1.3 Sesquiterpenos

Um grande número de sesquiterpenos são constituintes frequentes de óleos essenciais de vegetais superiores. Estes compostos podem influenciar nas propriedades farmacológicas dessas frações voláteis, como é o caso do bisabolol encontrado no óleo essencial de *Manzanilla*. Dentre as propriedades biológicas podemos citar, reguladores do crescimento (ácido abscísico), atrativos de inseto (Germancreno-D, α copaeno), anti- bacteriana, anti -fúngicos , anti-helmínticos , anti

-malária e moluscicida. Exemplos são o santonin o qual é utilizado como um anti-helmíntico e como um anti-malárico (GURIB-FAKIM, 2006).

Exemplos de sesquiterpenos são β -bisaboleno, β -cariofileno, longifoleno, farnesol, patchulol, entre outros (BRUNETON, 2001).

1.5 DOENÇAS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS RELACIONADAS AO GÊNERO *Bauhinia*

1.5.1 Diabetes

O diabetes melitos é considerado uma das principais síndromes de evolução crônica que acometem o homem moderno em qualquer idade, condição social e localização geográfica. É caracterizado por uma deficiência absoluta ou relativa de insulina que irá influenciar negativamente o metabolismo dos glicídios, proteínas, lipídios, água, vitaminas e minerais, e, durante a sua evolução, na dependência do controle metabólico obtido, podendo haver complicações (OLIVEIRA; MILECH, 2006).

Esta doença envolve uma deficiência de insulina, como também um excesso de outros hormônios, como hormônio do crescimento, glicocorticoides e glucagon. Por consequência, o pâncreas está envolvido na homeostasia da glicose, na hipófise anterior e o córtex supra-renal (JACOB, 1998).

Acredita-se que o diabetes melitos de início juvenil [Diabete melito insulino-dependente (DMID)] tenha uma etiologia autoimune crônica, que geralmente existe durante anos numa fase pré-clínica. A suscetibilidade ao DMID é herdada, e o principal gene associado à predisposição é o complexo de histocompatibilidade maior (MHC) no cromossomo 6 (JACOB, 1998).

Na Diabetes tipo I (DMID) não há nenhuma insulina no plasma, sendo, portanto necessária à reposição de insulina (JACOB, 1998).

Na Diabete tipo II [de início na maturidade, diabete melito não-insulino-dependente (DMINID)], pode ser devido a um defeito no receptor situado a membrana das células beta do pâncreas (JACOB, 1998).

Em ambos os tipos de diabetes melitos, ocorre aumento nas concentrações plasmáticas de glucagon imunorreativo, sobretudo durante a cetoacidose. A

supressão normal do glucagon pela hiperglicemia também está afetada (JACOB, 1998).

A diabetes gestacional pode ser definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiramente reconhecido durante a gravidez. Esta definição independe do tratamento utilizado ou da continuidade do quadro após a gestação. Seis semanas ou mais após o parto, a mulher deve ser reclassificada. Na maioria dos casos, a regulação da glicemia retorna ao normal (OLIVEIRA; MILECH, 2006).

1.5.1.1 Insulina

A insulina é um hormônio secretado pelo pâncreas e atua como regulador do metabolismo da glicose. Quando ocorre a deficiência desse hormônio no organismo acarreta a doença diabetes mellitus (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Consiste em duas cadeias de aminoácidos unidas por ligações dissulfeto podendo haver variação na sequência entre as espécies. Ocorrem na forma de monômero, dímero ou hexamero. Acredita-se que a forma biologicamente ativa seja o monômero (JACOB, 1998, TYMOCZKO; BERG; STRYER, 2011).

O diabético produz insulina insuficiente para impermeabilizar todas as células para entrada de glicose, o que determina o aumento da concentração de glicose no sangue (hiperglicemia) e o excesso é eliminado na urina, ainda que o indivíduo não a use. (SANCHES; NARDY; STELLA, 2012), isso resulta em uma sede excessiva, visão turva, fadiga e infecções de difícil cura (TYMOCZKO; BERG; STRYER, 2011).

O indivíduo com sintomas característicos de diabetes apresenta níveis de glicemia plasmática venosa maior que 126 mg/L, confirmadas em duas ou mais ocasiões (NETO, 2003).

1.5.2 Alzheimer

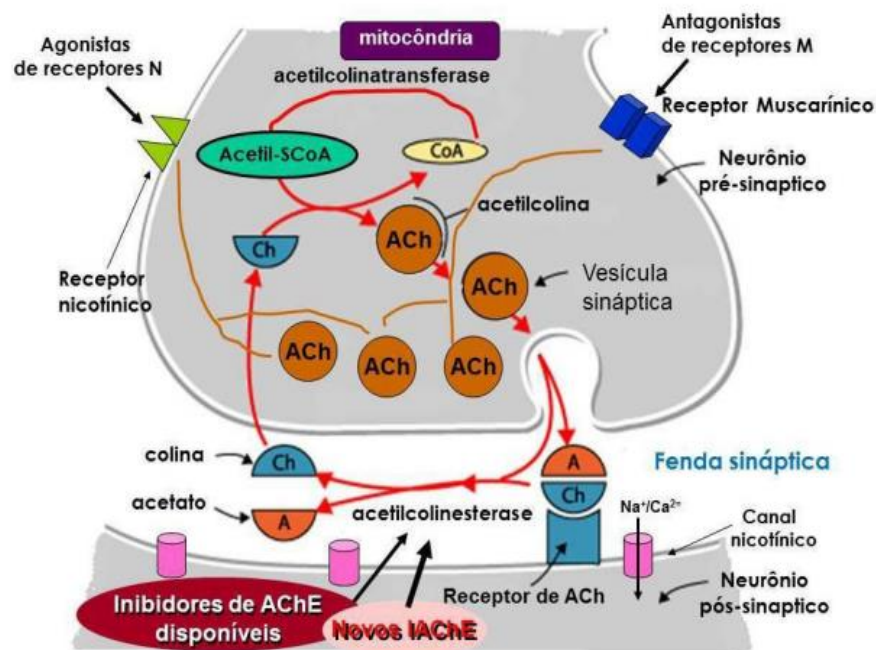
A doença de Alzheimer (D.A) é uma doença relacionada com a idade a partir dos 65 anos, está associada ao encolhimento do cérebro e perda localizada de neurônios principalmente no hipocampo e na parte basal do prosencéfalo. A perda de neurônios colinérgicos é característica da doença, e acredita-se que esteja por trás da deficiência cognitiva e da perda de memória de curto prazo. As principais

características patológicas da D.A compreendem placas amiloides, agregados neurofibrilares e perda de neurônios (particularmente neurônios colinérgicos) (GARETH, 2003). A D.A afeta o *status* cognitivo do doente que apresenta entre outros sintomas dificuldade de relacionar nomes, de vestir-se, realizar tarefas domésticas simples, depressão e distúrbios do sono (NETO, 2003).

1.5.2.1 Enzima acetilcolinesterase (AChE)

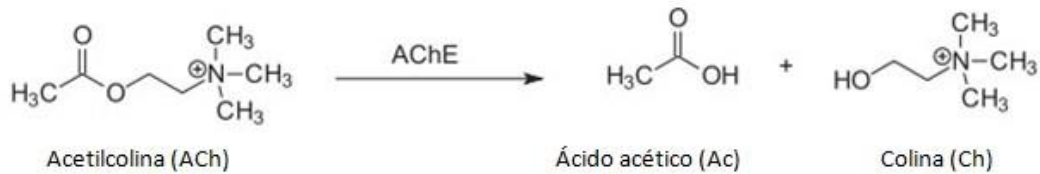
Esta enzima é uma destruidora da acetilcolina (AChE) que é o principal neurotransmissor secretado por axônios do sistema nervoso central composta por duas partes a colina e o acetato. A AChE é extremamente potente dissociando-a em dois constituintes a colina e o acetato tornando-a inativa. Uma molécula de AChE quebra mais de cinco mil moléculas de AChE, por segundo. Depois que a AChE é destruída na membrana pós-sináptica, a colina volta para os botões terminais por meio de rejeição e é convertida novamente em AChE, a metade da colina é recuperada e reciclada (CARLSON, 2002). A Figura 3 mostra como a enzima Acetilcolinesterase funciona dentro da célula e a Figura 4 a reação de hidrólise da Acetilcolina.

Figura 3 - Mecanismo de ação da enzima acetilcolinesterase (AChE).



Fonte: Viegas (2011).

Figura 4 - Reação de hidrólise da AChE.



Fonte: Petronilho; Villar (2014).

1.5.2.2 Inibidores enzimáticos

O uso de substâncias para inibir a ação enzimática é importante na intervenção terapêutica. Estas são usadas para interromper etapas essenciais de uma importante via metabólica responsável por uma condição patológica. Os compostos utilizados para esse fim possuem uma ampla faixa de estruturas (GARETH, 2003).

Estima-se que 79 enzimas e 24 tipos de diferentes receptores totalizem os alvos terapêuticos dos fármacos sintéticos empregados atualmente e a acetilcolinesterase é uma dessas enzimas (BARREIRO; MANSSOUR, 2001). Muitos dos fármacos que atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase como a galatamina, rivastigmina, tacrina e donepezila melhoram ou retardam os efeitos da D.A, porém, podem causar efeitos adversos como lesão hepática além de serem muito caros (RANG; DALE et al., 2011, NETO, 2003).

O estudo de plantas medicinais capazes de inibir a AChE vem aumentando consideravelmente, tais como no trabalho de Santos et al. (2011), que obteve resultados de inibição para a AChE em extratos de plantas do gênero *Bauhinia*.

A atividade de inibição dessa enzima foi constatada também em folhas de *Rhodostemonoda*, *phoneparvifolia* *Madriñán* (ALCÂNTARA et al., 2010), bem como um alcaloide huperzina-A, isolado da erva rasteira *Huperzia serrata* apresentou um bom potencial de inibição desta enzima, caracterizando um protótipo natural para o tratamento da D.A. (BARREIRO; MANSSOUR, 2001).

1.6 MICRORGANISMOS ESTUDADOS

Homem e micróbios partilham uma vida em comum há muitos anos, desde a pré-história, os microrganismos provocam doenças na humanidade. No entanto as causas dessas doenças começaram no século XIX, com os trabalhos de Pasteur e Koch, que conseguiram mostrar a origem das infecções do homem e outros animais (TAVARES, 2009).

1.6.1 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos que incluem os cogumelos, bolores e leveduras (BURTON; ENGELKIRK, 1998). Não são microrganismos fotossintetizantes, com exceção dos fungos que possuem parede celular, muitos são unicelulares e formam esporos, que são dispersos por corrente de ar. Alguns mais primitivos são ameboides, outros movem-se por meio de flagelos (PELCZAR JUNIOR et al., 1997).

Estes microrganismos podem se encontrar praticamente em todo lugar, como na matéria orgânica, no ar, água, solo, em plantas e animais. Vivem também em ambientes não favoráveis ao crescimento de microrganismos em materiais adversos, causando deterioração do couro e plásticos, de geleias, conservas, vinho entre outros. Secretando enzimas digestivas em plantas e animais mortos, decompõem este material que podem ser absorvidos por eles ou por outros organismos vivos (BURTON; ENGELKIRK, 1998).

Ao longo dos últimos dez anos as infecções causadas por fungos tem aumentado. Estão ocorrendo como infecções hospitalares e em indivíduos com a imunidade comprometida (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As infecções ocasionadas por fungos, geralmente envolvem a pele e mucosas do corpo, acredita-se que estes lesam a membrana celular, levando a perda de componentes essenciais das células (GARETH, 2003); e são chamadas de micoses, superficiais, cutâneas, subcutâneas ou sistêmicas (BURTON; ENGELKIRK, 1998). A *Candida albicans*, chamada de levedura, causa a candidíase, uma doença da mucosa da boca, vagina e trato alimentar (PELCZAR JUNIOR et al., 1997).

Os agentes fungistáticos e fungicidas bloqueiam o ataque dos fungos. A ação fungistática de um fármaco impede a reprodução dos fungos, com o resultado de que estes morrem naturalmente, no entanto, a ação fungicida mata os fungos. Exemplos de fármacos antifúngicos são econazol, miconazol, cetoconazol entre outros (GARETH, 2003).

1.6.2 Bactérias

As bactérias são microrganismos que possuem grande variedade morfológica e fisiológica. Quanto à morfologia, muitas bactérias são simples, mais algumas possuem formas ou arranjos incomuns (PELCZAR JUNIOR et al., 1997). Apresentam grande diversidade, podendo variar desde esferas, a espirais e filamentos longos. Podem se classificar como esféricas (cocos); bastão ou bacilos; curvadas ou em forma de espiral (BURTON; ENGELKIRK,1998).

Os antibióticos são substâncias produzidas por uma espécie de fungo, que age sobre as bactérias, matando ou interrompendo o seu crescimento, e um dos primeiros antibióticos foi a penicilina proveniente do fungo *Penicillium notatum* em 1928. Outros antibióticos foram sendo descobertos e já se produzem os semissintéticos, que são naturais porém modificados quimicamente (ROLLAND; XAVIER, 1997).

Agentes antibacterianos agem em vários sítios, inibindo a síntese da parede bacteriana. São exemplos de fármacos antibacterianos: penicilina, benzilpenicilina, ampicilina entre outros (GARETH, 2003), porém é certo que existem algumas bactérias naturalmente resistentes a esses medicamentos, no entanto essa resistência vem se tornando maior pelo uso abusivo destes, pois uma modificação no seu genoma lhe dá esse novo carácter (ROLLAND; ROLLAND XAVIER, 1997).

Dentre as bactérias aqui estudadas todas são patogênicas ao homem, como o *Bacillus cereus* que é uma bactéria frequente no meio ambiente e ocasiona intoxicação alimentar especialmente em alimentos que contém amido, como o arroz e derivados do milho, a *Salmonella thyfimurium* é a causadora da febre tifoide, o *Staphylococcus aureus* produz muitas toxinas e ocasiona muitas infecções em cirurgias e se ingeridas causam infecção alimentar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

1.7 MINERAIS

O estudo de minerais em plantas medicinais vem sendo estudado há alguns anos, visando obter informações sobre o teor destes para uma possível fonte alternativa complementar para o organismo, como reporta Almeida et al. (2002).

Nos seres humanos os minerais são considerados essenciais ao organismo seja em quantidades traço ou não para manter o funcionamento normal do corpo (NETO, 2003) e nas plantas os minerais possuem diversos papéis, tais como funções estruturais, enzimáticas, regulatórias e iônicas, no entanto a sua deficiência pode afetar o seu desenvolvimento e até causar a sua morte (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2011).

1.7.1 Minerais e o Corpo Humano

Os metais geralmente são encontrados no organismo na forma de quelatos, ou seja, combinados com outros constituintes, tais como os hormônios, as proteínas e os aminoácidos. As principais fontes de metais estão nos alimentos de origem vegetal ou animal (LOHMANN, 2012). No entanto não são sintetizados pelo organismo, fazendo-se necessário obtê-los através de uma boa alimentação (PINHEIRO; PORTO; MENEZES, 2005). Dentre os elementos abordados e quantificados neste estudo podemos citar a importância desses elementos para o organismo.

O Sódio (Na), por exemplo, é essencial na absorção de glicose e transporte de várias substâncias no organismo e facilita a manutenção do equilíbrio ácido base.

O Cálcio (Ca) é um dos mais importantes, sua principal função é estruturar os ossos e os dentes, ativar algumas reações de coagulação sanguínea e liberar energia necessária para contração muscular.

O Fósforo (P) é constituinte de ossos e dentes, participa na formação de ácidos nucleicos e estoque e utilização de energia corpórea (NETO, 2003).

O Silício (Si) é o segundo elemento mais importante em concentração na terra e é encontrado na forma de silicatos. Sua ação fisiológica é fundamental, pois é necessário para a formação de ossos, cartilagem e tecido conjuntivo.

O Enxofre (S) possui funções energéticas e de desintoxicação, está presente na síntese de proteínas e aminoácidos. É indispensável à produção de colágeno,

sendo muito indicado no tratamento da acne, urticaria, rinite alérgica, alergias alimentares e reumatismo de natureza inflamatória e degenerativa entre outros (LOHMANN, 2012).

1.7.2 Constituição Mineral nas Plantas

O termo elemento mineral se aplica a todos os elementos que são necessários ao desenvolvimento e reprodução das plantas. Baseado nas suas concentrações podem ser classificados em macronutrientes (N, P, Ca, K, Mg e S) cuja concentração nos vegetais é superior a 0,1% e micronutrientes (Fe, Cu, Cl, Zn, Mn, B, Mo, Co e Ni), esses se encontram geralmente com concentrações inferiores a 100 ppm (CASTRO; KLUGE, PERES, 2005).

Os minerais compõem cerca de 15 a 20% da massa das plantas não lenhosas sendo o restante composto por água (SALISBURY; ROSS, 2013), nos quais em sua maioria são absorvidos do solo pelas raízes.

As frações minerais das plantas podem variar e dependem de fatores tais como idade, espécie, condições de desenvolvimento e da disponibilidade desses elementos em seu substrato, ou seja, uma planta pode ser capaz de absorver ou acumular um ou mais elementos diferentes de outras, mesmo tendo sido desenvolvidas nas mesmas condições. Essas diferenças podem ter relação com a taxonomia da planta, por exemplo, as fabaceae possuem um teor de cálcio maior que as gramíneas, que são ricas em silício, por outro lado nas folhas de algumas monocotiledôneas e da maioria dos cereais o conteúdo de silício é aproximadamente 3% da massa seca e na maioria das dicotiledôneas em particular fabaceae é cerca de 0,5% (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005).

1.7.2.1 Funções dos Minerais nas Plantas

Os minerais possuem diversos papéis nas plantas, como funções estruturais, enzimáticas, regulatórias e iônicas, no entanto a sua deficiência pode afetar o seu desenvolvimento e até causar a sua morte (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2011). As principais funções e sintomas de deficiência dos minerais nas plantas são listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Funções e deficiência dos minerais nas plantas.

MINERAIS	FUNÇÕES	SINTOMAS
Mo	Fixação do nitrogênio e redução do nitrato	Clorose seguida de necrose
Ni	Parte essencial no metabolismo do nitrogênio	Manchas necróticas nas pontas das folhas
Co	Ativador ou componente de enzimas envolvidas na oxidação ou redução	Folhas jovens verdes escuras enroladas e deformadas
Zi	Ativador ou componente de muitas enzimas	Redução do tamanho das folhas, clorose internerval
Mn	Ativador de enzimas e requerido para a liberação do oxigênio na fotossíntese	Clorose internerval
B	Influência na utilização do Ca^{+2} e síntese de ácidos nucleicos	Falha no alongamento das raízes, folhas enroladas e verde-claras na base.
Fe	Síntese da clorofila	Clorose interneval das folhas jovens, caules curtos e finos
Cl	Envolvido na osmose e no equilíbrio iônico	Folhas murchas com manchas cloróticas e tornam-se bronzeadas.
S	Componente de alguns aminoácidos e proteínas	Folhas jovens com nervuras verdes e aéreas verdes claras
P	Componente de compostos fosfatados que contem energia (ATP e ADP)	Plantas acumulam antocianinas, tornando-se vermelhas ou roxas.
Mg	Componente da molécula da clorofila, ativador de enzimas	Folhas cloróticas, podendo avermelha-se
Ca	Componente da parede celular, envolvido na permeabilidade da membrana celular, cofator de enzimas	Ápices caulinares e radiculares morrem
K	Envolvido na osmose e no equilíbrio iônico e na abertura e fechamento dos estômatos, ativador de enzimas	Folhas cloróticas geralmente as mais velhas, caules frágeis e estreitos
N	Componente de aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, ácidos nucléicos, clorofilas e coenzimas	Clorose generalizada especialmente nas folhas mais velhas

Tabela adaptada.

Fonte: Raven; Evert; Eichhorn (2011) e Taiz; Zeiger (2010).

Vários fatores podem afetar a absorção de nutrientes pelas plantas tais como, a temperatura, a umidade, aeração, pH do solo, interações iônicas entre outros. A variação de temperatura pode diminuir a permeabilidade das células, a velocidade do processo de transferência e a ocorrência de reações, a umidade está relacionada ao fluxo de água no solo que permite a solubilização e transporte desses nutrientes, a baixa umidade acarreta a deficiência mineral. A diminuição da aeração, baixa a assimilação dos íons requeridos em maior quantidade pela planta, como o potássio e o fosfato e na mesma proporção o decréscimo na tenção de O₂ nos tecidos e por a decomposição anaeróbica da matéria orgânica ser incompleta pode formar produtos intermediários, como ácidos orgânicos que podem acumular-se em concentrações tóxicas. Oscilações de pH exerce a influência sobre a disponibilidade de vários nutrientes essenciais como também a disponibilidade de elementos que podem exercer fitotoxicidade. Em solos ácidos, os elementos Al, Fe, Mn, e Mo estão sob a forma de espécies solúveis, e podem ser extremamente tóxicos para a maioria das plantas, no entanto aumentando-se o pH essas espécies tornam-se insolúveis diminuindo suas concentrações na solução. A disponibilidade dos macronutrientes é máxima entre pH 6 e 7. A interação iônica entre cátions e ânions na solução do solo pode acarretar na inibição ou absorção de um determinado elemento na presença de outro, como o magnésio pode aumentar a absorção de fosforo enquanto baixas concentrações de zinco também pode induzir o mesmo efeito (KERBAUY, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a composição química e avaliar a atividade biológica do óleo essencial das folhas de *Bauhinia unguolata* em Boa Vista, Roraima.

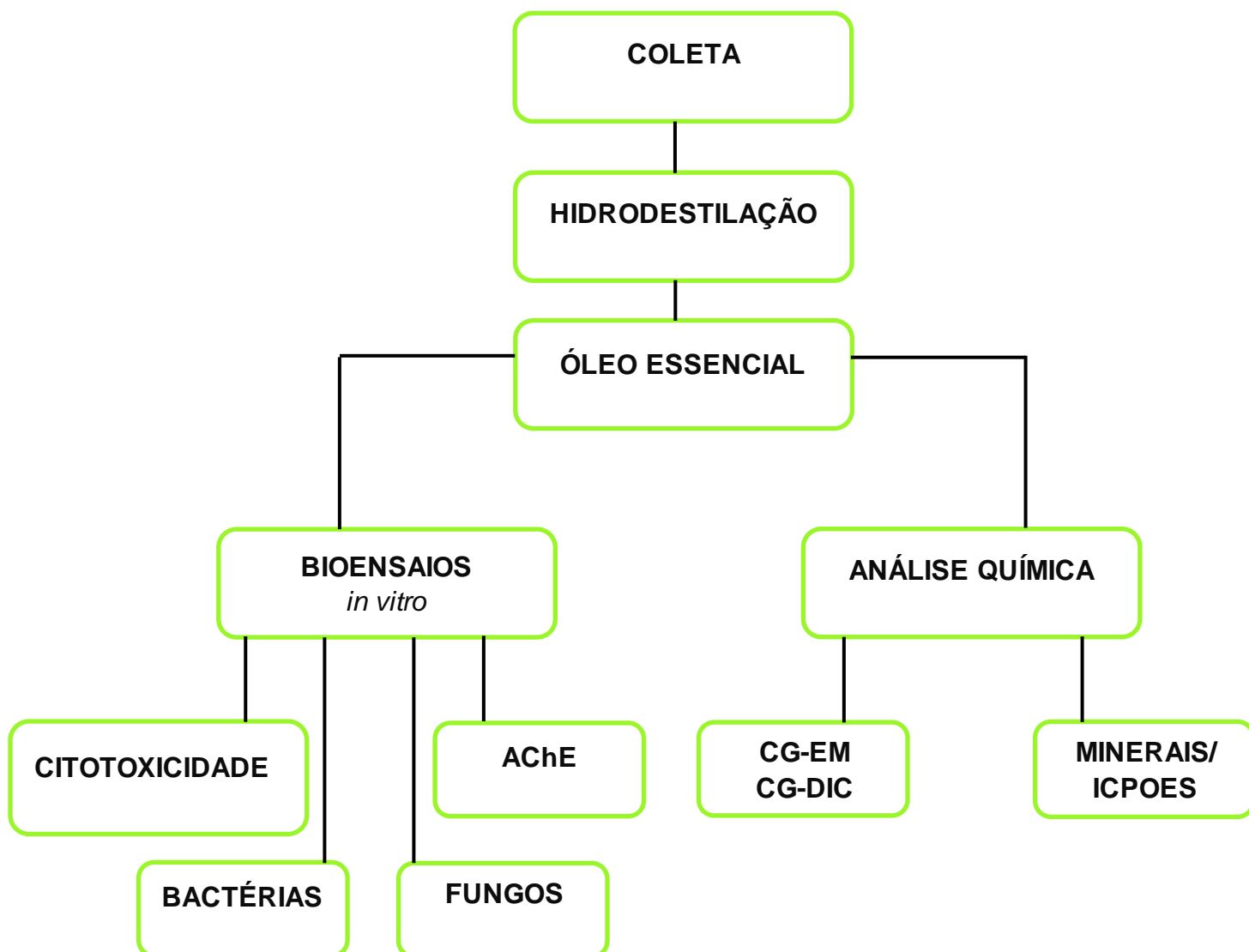
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar e quantificar os componentes voláteis orgânicos do óleo essencial das folhas de *B. unguolata* através de CG-DIC/CG-EM.
- ✓ Extrair o óleo essencial por hidrodestilação e obter o seu rendimento.
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana e fungicida do óleo essencial das folhas de *B. unguolata*.
- ✓ Verificar a inibição da enzima Acetilcolinesterase (Alzheimer).
- ✓ Testar a citotoxicidade do óleo essencial pelo teste de *Artemia salina*.
- ✓ Identificar e quantificar os minerais no óleo essencial através de ICPOES.

3 METODOLOGIA

A seguir, apresenta-se um fluxograma na (Figura 5), que resume a sequência dos procedimentos desenvolvidos durante a realização deste trabalho.

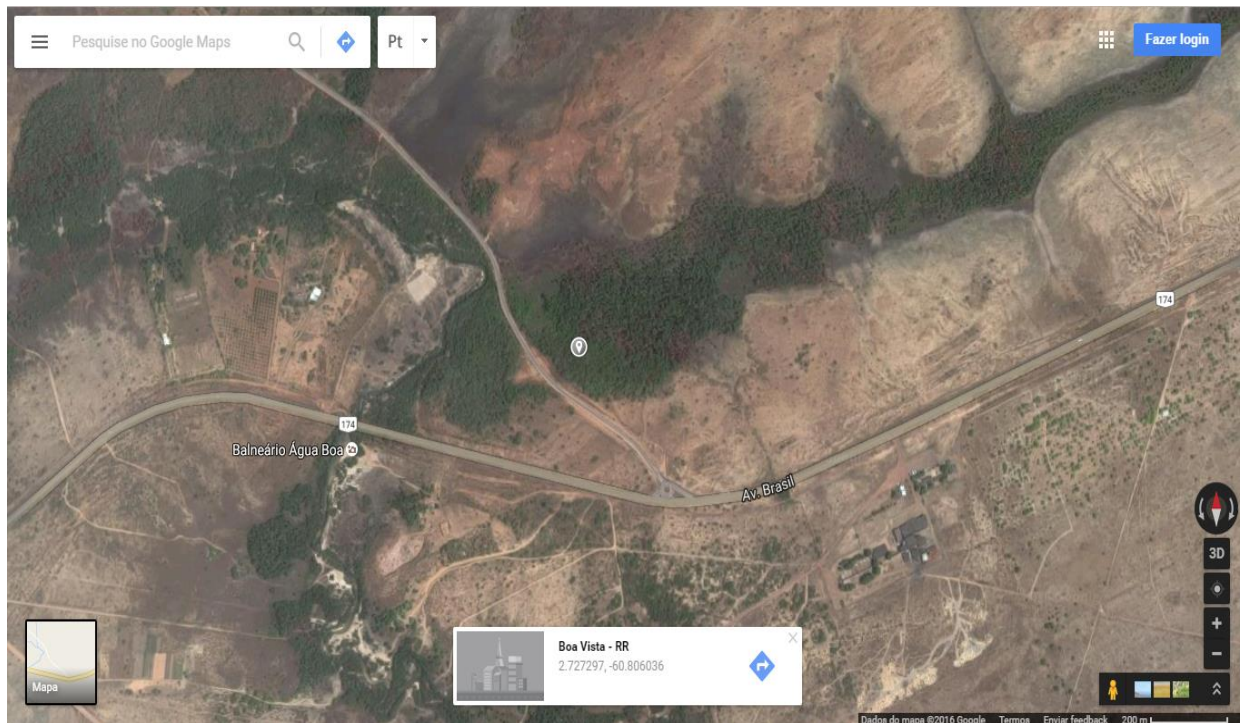
Figura 5 - Fluxograma do trabalho experimental



3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Para a realização dos trabalhos experimentais foram utilizadas folhas frescas de *B. unguolata*, coletadas no mês de janeiro de 2016 nas proximidades da BR 174, na Vicinal Água Boa a 11 km da cidade de Boa Vista, no estado de Roraima. Localizada a 2°43'37" de latitude N e 60°48'21" de longitude W como mostra a Figura 6.

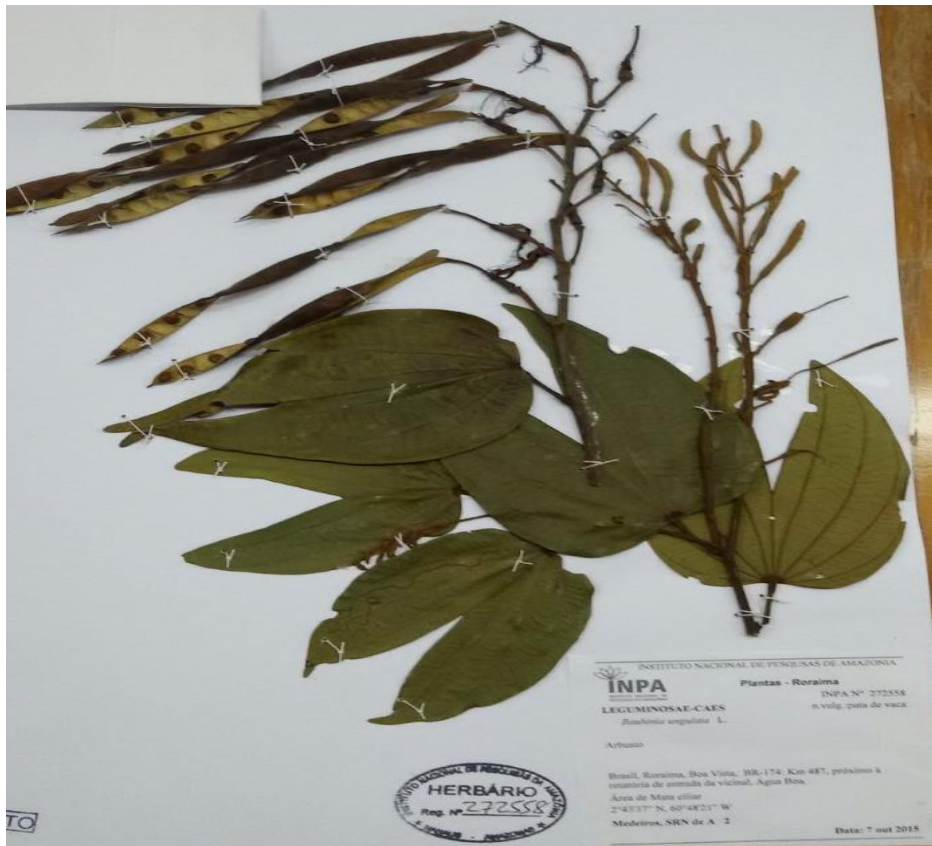
Figura 6 - Mapa da localização da espécie de estudo



Fonte: GoogleMaps (2016).

Para identificação da espécie, uma amostra foi enviada ao Herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas), cuja exsicata encontra-se depositada sob o nº 272558, identificada pelo técnico José Ferreira Ramos como mostra a Figura 7.

Figura 7 - Exsicata de *B. unguolata*



Fonte: Autora.

3.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material coletado foi devidamente lavado com água corrente, seguido de água destilada para a remoção de quaisquer impurezas, deixando certo tempo em repouso à temperatura ambiente para que fosse eliminado o excesso de água.

Nesse processo foram utilizados 600 g de folhas frescas que foram cortadas em partes menores e depositadas em balão de fundo redondo, utilizando como solvente água destilada. O material vegetal foi submetido a um processo de hidrodestilação, em um aparelho do tipo Clevenger, marca Spell com duplo condensador, por um período de destilação de 3:00 horas ininterruptas, este procedimento foi desenvolvido em triplicata. Em seguida, o material foi seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco âmbar e colocado no freezer para posteriores análises.

3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA

3.3.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

A determinação dos constituintes do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* foi feita sob a orientação da professora Dra. Vany Ferraz do Departamento de química do laboratório de cromatografia da UFMG.

A análise para identificação dos constituintes voláteis de *B. unguolata* foi realizada em um equipamento CGMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu). Equipado com uma Coluna: Rxi-1MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Restek). A temperatura da coluna foi de 50 °C (3 min), sendo 3 °C.min⁻¹, até 230 °C. Foi injetado 1 μL de amostras do óleo essencial diluídas a 1% em clorofórmio, o injetor com temperatura inicial de 250 °C, com razão em modo Split (1:10), Interface CG-EM a 250 °C. Detector MS (Impacto eletrônico a 70 eV) a 250 °C. A vazão do gás de arraste (Hélio) foi de 2,0 mL.min⁻¹. O espectro de massa de cada componente do óleo essencial da *B. unguolata* foi criteriosamente analisado em comparação aos espectros do acervo das bibliotecas espectral (NIST11), utilizando Software GCMS Solution (Shimadzu).

3.3.2 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC)

A quantificação dos componentes do óleo essencial da *B. unguolata* foi realizada por meio da cromatografia gasosa, utilizando como equipamento o Cromatógrafo a Gás HP 7820A (Agilent). Equipado com uma coluna capilar com dimensões 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm (Agilent), com temperatura de 50°C (0 min), 3 °C /min, até 230 °C. Foi injetado 1 μL de amostras do óleo essencial diluídas a 1% em clorofórmio, com temperatura inicial de 250 °C em razão Split (1:30). O detector DIC, com temperatura de 250°C. O gás de arraste, H₂ a 3 mL.min⁻¹. Software de aquisição de dados: Ezchrom Elite Compact (Agilent).

3.4 BIOENSAIOS *in vitro*

3.4.1 Avaliação da citotoxicidade frente à *Artemia salina*

A Metodologia empregada para a toxicidade sobre *Artemia salina* é a metodologia segundo Mayer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1993).

3.4.2 Preparação da solução salina

Um aquário serviu como incubadora, onde foi adicionada uma solução salina artificial (40g de sal grosso em 1L de água destilada). O pH foi ajustando entre 8 e 9 com uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 a 10%). A incubadora foi iluminada artificialmente com uma lâmpada fluorescente com aeração. Em um dos lados da incubadora, foram colocados aproximadamente 100 mg de ovos de *Artemisa salina*. Parte do sistema foi coberto com papel alumínio para que os organismos ao nascerem, permanecessem isolados em um dos lados do aquário devido à diferença de iluminação. Os náuplios foram atraídos pela iluminação depois da eclosão facilitando a separação destes e das cascas dos cistos. Durante a incubação, a temperatura foi mantida em torno de 25°C e a eclosão dos ovos foi monitorada a cada 12 horas sendo verificada no período de 48 horas.

3.4.3 Preparação da solução para os bioensaios de *Artemia salina*

Partiu-se de uma solução de 25 mL contendo $1000 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ da amostra, solubilizada em Tween 80 a 1% e completados com água salina.

A partir da primeira solução, pipetou-se volumes de 12,5 mL a tubos contendo 1 mL de uma solução de Tween 80 a 1% em solução salina e completados com 10 mL de solução salina, para obter a concentração de $500 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$. As demais soluções de concentração inferior (250 e $125 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) foram obtidas conforme já descrito, e utilizando-se a seguinte Equação 1:

$$\text{Equação 1: } C_1.V_1 = C_2.V_2$$

3.4.4 Teste de *Artemia salina*

Após o período de incubação de 24 horas, 10 organismos (náuplios de *A. salina*) foram selecionados e expostos nos tubos de ensaios com as diferentes concentrações diluídas.

Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração. Uma solução salina sem extrato foi utilizada como controle positivo também em triplicata, onde foi submetida ao mesmo procedimento experimental que os grupos tratados com as amostras em estudo para efeitos comparativos da influência do veículo utilizado sobre a resposta das larvas de *A. salina*.

Este sistema incubado foi em temperatura ambiente por 24 horas, sem aeração sendo os frascos mantidos sob iluminação. Após 24 horas foram contados o número de larvas mortas e vivas em cada frasco, através da visualização macroscópica e os valores registrados em formulário.

3.4.5 Verificação da citotoxicidade

Decorrido o tempo de 24 e 48 horas foi realizado a contagem do número de náuplios vivos e mortos e calculada a probabilidade de mortalidade de acordo com a Equação 2:

$$\text{Equação 2: Probabilidade de Mortalidade (\%)} = \frac{r}{n} \times 100$$

Onde: r = número de *artemias* mortas; n = número de *artemias* totais no tubo de ensaio.

Os valores em porcentagem da probabilidade de mortalidade foram corrigidos levando-se em consideração a porcentagem de mortalidade no teste controle negativo de acordo com a Equação 3 de Abbot (ABBOT, 1925).

$$\text{Equação 3: \% Probabilidade de Mortalidade} = 100 \left(\frac{\% T - \% C}{100 \% - \% C} \right)$$

Onde: %T representa a mortalidade de *artemias* testadas com a amostra de interesse; %C, a mortalidade de *artemias* utilizadas no controle.

Na interpretação dos resultados foi determinada a Concentração Letal 50% (CL₅₀).

3.4.6 Cálculo do CL₅₀

Para a obtenção da CL₅₀ no teste de avaliação de toxicidade utilizou-se o programa estatístico Microsoft Excel 2010.

3.5 TESTE DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

3.5.1 Preparo da solução tampão Tris/HCl pH 8 (50 mM)

Para preparar uma solução de 2 mL de Tris/HCl, pesou-se 398,08 mg do sal Utrapure Tris Hydrochloride e adicionou-se 25 mL de água destilada. Conferiu-se o pH em 8.

3.5.2 Preparo da solução estoque de enzima

Diluiu-se 0,77 mg da enzima no volume de 500 µL da solução tampão Tris/HCl pH 8 no próprio frasco da enzima, para adquirir uma solução de concentração de 1000 U.mL⁻¹. A enzima ficou em solução por 20 minutos e depois, sob agitação, por um período de 10 a 15 minutos, no próprio frasco da enzima, para adquirir uma solução de concentração de 1000 U.ml⁻¹.

3.5.3 Preparo da solução da enzima na concentração 0,222 U.mL⁻¹

Adicionou-se 1µL da solução estoque (1000 U.mL⁻¹) em 4,5 mL da solução Tris/HCl (50mM). Depois agregou-se albumina sérica bovina 0,1% (p/v): 4,5 mg.

3.5.4 Preparo da solução de trabalho

Preparou-se uma solução do óleo essencial em tampão Tris/HCl, DMSO, ou solvente adequado, na concentração 10 mg.mL^{-1}

3.5.5 Preparo dos reagentes

Para a solução de ATCI (15mM): Preparou-se 1 mL de solução, pesou-se 4,08 mg de iodeto de acetilcolina e dissolveu-se em 1 mL de água destilada. Para Solução de DTNB (3mM): Pesou-se 2,38 mg de DTNB e dissolveu-se em 2 mL de solução de DTNB (3mM): Pesou-se 2,38 mg de DTNB e dissolveu-se em 2 mL de Solução de DTNB (3mM): Pesou-se 2,38 mg de DTNB e dissolveu-se em 2 ml de solução tampão Tris/HCl pH 8. Adicionou-se 11,69 mg de NaCl (0,1M) e 8,132 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à solução.

O teste de atividade inibitória do óleo estudado sobre a enzima acetilcolinesterase foi realizado no Laboratório Biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a coordenação da Professora Dr^a Jacqueline Aparecida Takahashi, foi conduzido com base no método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Rhee et al. (2001), em microplacas de 96 poços. Eserina e galantamina foram utilizadas como inibidores padrão (10 mg.mL^{-1}) e como controle negativo foi realizado o ensaio sem a presença de inibidor. Os testes foram realizados em quintuplicata. Em cada poço foram dispensados 25 μL de iodeto de acetilcolina (15 mM); 125 μL de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB); 50 μL de tampão tris-HCl pH 8 0,1% p/v de albumina sérica bovina e 25 μL de óleo (10 mg.mL^{-1}) solubilizados em Tween/DMSO/30%. A leitura das placas foi realizada em 405 nm por 9 vezes em um período de 10 minutos. Logo após a primeira leitura foi adicionado 25 μL da enzima acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*, Sigma Aldrich) ($0,222\text{U.mL}^{-1}$) e realizada 9 leituras em um período de 10 min em 405 nm. A interferência da hidrólise espontânea do substrato foi corrigida a partir da subtração da média da absorbância medida antes da adição da enzima. A porcentagem de inibição da enzima foi calculada a partir Equação 4.

$$\text{Equação 4: \% inibi\c{c}\tilde{a}o} = [(C - A) \times 100]/C$$

Onde: C = controle contendo enzima e substrato.

A = ensaio contendo o extrato, enzima e substrato.

3.6 BIOENSAIOS PARA BACTÉRIAS E FUNGOS *in vitro*

As culturas de micro-organismos utilizadas neste experimento foram: duas bactérias Gram-negativas: *Salmonella typhimurium* (S.T.) ATCC 13311 e *Citrobacter Freundii* (ATCC8090), duas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (S.A.) ATCC25923 e *Bacillus cereus* (B.C.) ATCC11778 e um fungo (levedura) *Candida albicans* (C.A.) ATCC 18804.

3.6.1 Preparação da solução trabalho (amostra + Meio de cultura)

Foram pesados 0,0125mg da amostra e transferida para frascos tipo eppendorf em seguida solubilizada em 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução com concentração de 12,5 mg.mL⁻¹ (óleo essencial). Após homogeneização pipetou-se 124 µL desta solução para um frasco eppendorf, contendo 2976 µL de meio de cultura BHI a fim de se obter uma solução final de 250 µg.mL⁻¹. O antibiótico Ampicilina foi preparado seguindo o mesmo procedimento, sendo que a concentração utilizada foi de 12,5 mg.mL⁻¹.

3.6.2 Preparo do meio de cultura Agar *Brain Heart Infusion* (BHI)

Para o preparo do meio de cultura, dissolveu-se 3,4 g de Agar *Brain Heart Infusion* (BHI) em 400 mL.mL⁻¹ de água destilada. Homogeneizou-se e submeteu-se ao autoclave a solução por 15 min a 121 °C.

3.6.3 Preparo do meio de cultura Caldo Sabouraud

Para o preparo do meio de cultura Caldo Sabouraud dissolveu-se 1,8 mg em 60mL de água destilada. Homogeneizou-se a solução e submeteu-se ao autoclave por 15 min a 121 °C.

3.6.4 Preparação do inóculo dos microrganismos

Para as bactérias foram preparados um pré-inóculo em triplicata no qual pipetou-se 100 µL de microrganismo estocados, onde foram inoculados em tubos de ensaios contendo 3,0 mL do meio de cultura BHI previamente esterilizado. Para a levedura o meio utilizado foi o caldo Sabouraud. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 24 h para posterior padronização. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bünsen.

3.6.5 Padronização dos microrganismos

500 µL do pré-inóculo foram transferidos para um erlenmeyer contendo 4,5 mL de água destilada estéril. O inóculo foi padronizado no intervalo de transmitância de 74-75% para bactérias e 75-76% para levedura em espectrofotômetro de 600 nm.

3.6.6 Teste de atividade antibacteriana e antifúngica

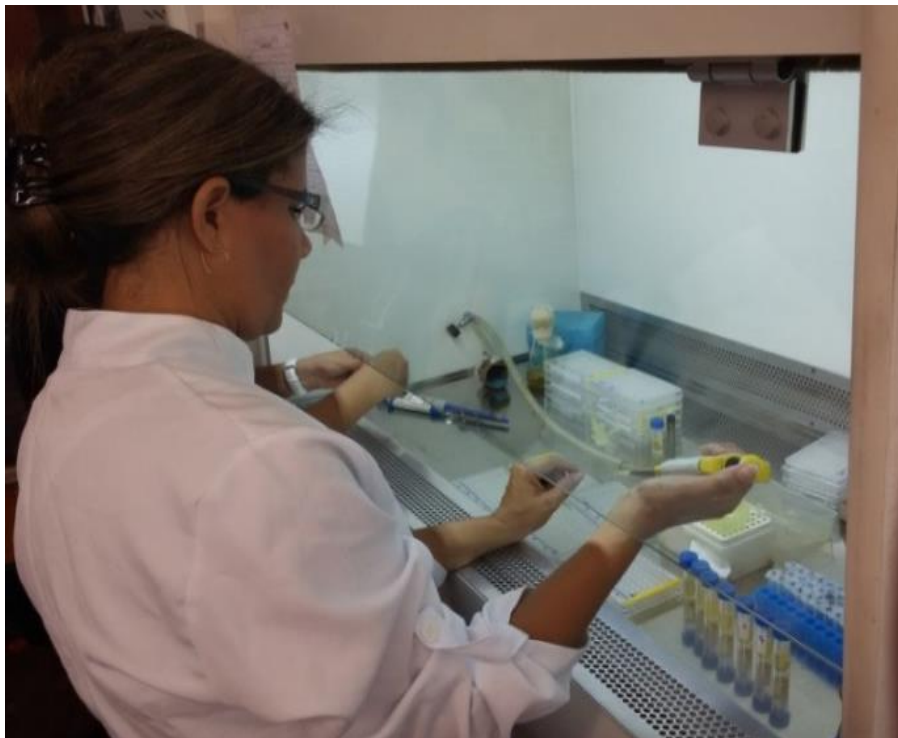
Os testes foram realizados em placa de Elisa de 96 poços, em triplicada. Em cada poço foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI, em seguida foram adicionados no primeiro poço 200 µL da solução da amostra (solução trabalho).

Homogeneizou-se a solução e 100 µL foram transferidos para os próximos poços e, assim, sucessivamente, fazendo a microdiluição, desprezando-se os 100 µL finais.

Foram testados as 8 concentrações. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 µL do inóculo padronizado do micro-organismo a ser testado. Foram

preparados os controles, um controle para o crescimento do micro-organismo, no qual não houve adição da solução da amostra (solução trabalho), um controle para o branco em que não se adicionou o inóculo microbiano e um controle dos padrões, ampicilina para as bactérias e miconazol para o fungo. Um controle contendo 100 µL do meio de cultura BHI e outro contendo o meio sabouraud, como mostra a Figura 8 a seguir.

Figura 8 - Teste antimicrobiano.



Fonte: Autora.

As placas foram colocadas em estufa a 37 °C e, após 24 horas, foi realizada a leitura do teste em leitor de placa de Elisa (492 nm). Os resultados foram calculados como percentagem de inibição utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{AC1 - AC2}{AH - AM} \times 100$$

AC1 = absorvância da amostra; AC2 = absorvância da amostra de controle; AH = absorção de microorganismos no controle e AM = absorvância do controle do meio de cultura.

3.7 ANÁLISE DE METAIS

Para a análise dos metais foi utilizado o método de ICPOES realizado pelo laboratório da central Analítica da Universidade de São Paulo USP, onde a digestão das amostras foi feita utilizando ácido nítrico (HNO_3) concentrado e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% e aquecimento em forno de micro-ondas. O equipamento utilizado foi o Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICPOES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos. Os parâmetros utilizados na análise foram: potência de 1400 W, numa rádio frequência de 27,12 MHz, vazão do gás de plasma $12 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, vazão do gás auxiliar de $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, a velocidade da bomba foi de 30 RPM e nebulizador crossflow.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *B. unguolata* obtido por hidrodestilação apresentou uma coloração amarelo claro e odor característico como pode-se observar na Figura 9.

Figura 9 - Óleo essencial de *B. unguolata*



Após a obtenção do óleo essencial de *B. unguolata* por hidrodestilação, foi possível obter o rendimento do óleo por meio da seguinte Equação 5:

Equação 5:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{massa do óleo essencial obtido (g)}}{\text{massa do material vegetal (g)}} \times 100$$

$$\text{Rendimento} = \frac{0,3987 \text{ g}}{600 \text{ g}} \times 100$$

$$\text{Rendimento} = 6,65 \times 10^{-2} \%$$

Desta forma verificou-se um rendimento de $6,65 \times 10^{-2} \%$ do óleo essencial das folhas frescas de *B. unguolata*, valor superior ao obtido por Gramosa et al. (2009), em

seu estudo desenvolvido com esta espécie na região Nordeste, que foi de 7×10^{-3} % e o de Neto (2006) que foi de 1×10^{-2} %.

De acordo com a literatura, observou-se que os rendimentos dos óleos essenciais obtidos de espécies do gênero *Bauhinia* variaram, dentre eles destacaram-se a *B. acuruana* com 1×10^{-2} % (GOIS et al., 2011) e *B. rufa* com $3,7 \times 10^{-1}$ % (SILVA; CAMARA, 2014). Segundo Simões e Spitzer (2004) e Bruneton (2001) dependendo da parte da planta, tipo de coleta, condições climáticas e métodos de extração, os óleos essenciais, podem sofrer variações em seu rendimento. Por exemplo, na espécie *Menta piperita* (hortelã pimenta) em períodos de dias longos e noites curtas, o rendimento do óleo essencial é maior e apresenta um aumento de mentofurano; ao contrário nas noites frias favorecem a formação de mentol.

A composição de um óleo essencial é determinada pela espécie vegetal que o produz e pela parte do vegetal em que se encontra (folhas, cascas, sementes e raiz) e pode variar qualitativamente ou quantitativamente. A concentração de cada um dos constituintes do óleo essencial pode alterar durante seu desenvolvimento; por exemplo, no coentro (*Coriandrum sativum* L.) o teor de linalol é de 50% maior nos frutos secos do que nos verdes, na camomila (*Matricaria recutita*) quando colhida pela manhã apresenta maior teor em α -bisabolol (princípio ativo com atividade anti-inflamatória), porém se colhida no final da tarde apresenta apenas vestígios (COELHO; COSTA JUNIOR; DOMBROSKI, 2003).

4.2 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRÁFIA GASOSA

A análise cromatográfica do óleo essencial de *B. unguolata* revelou 18 componentes correspondendo a 66,5% da composição do óleo essencial, sendo os 33,5% restantes não identificados. Dentre os compostos identificados 9 são majoritários que correspondem a 61,11%.

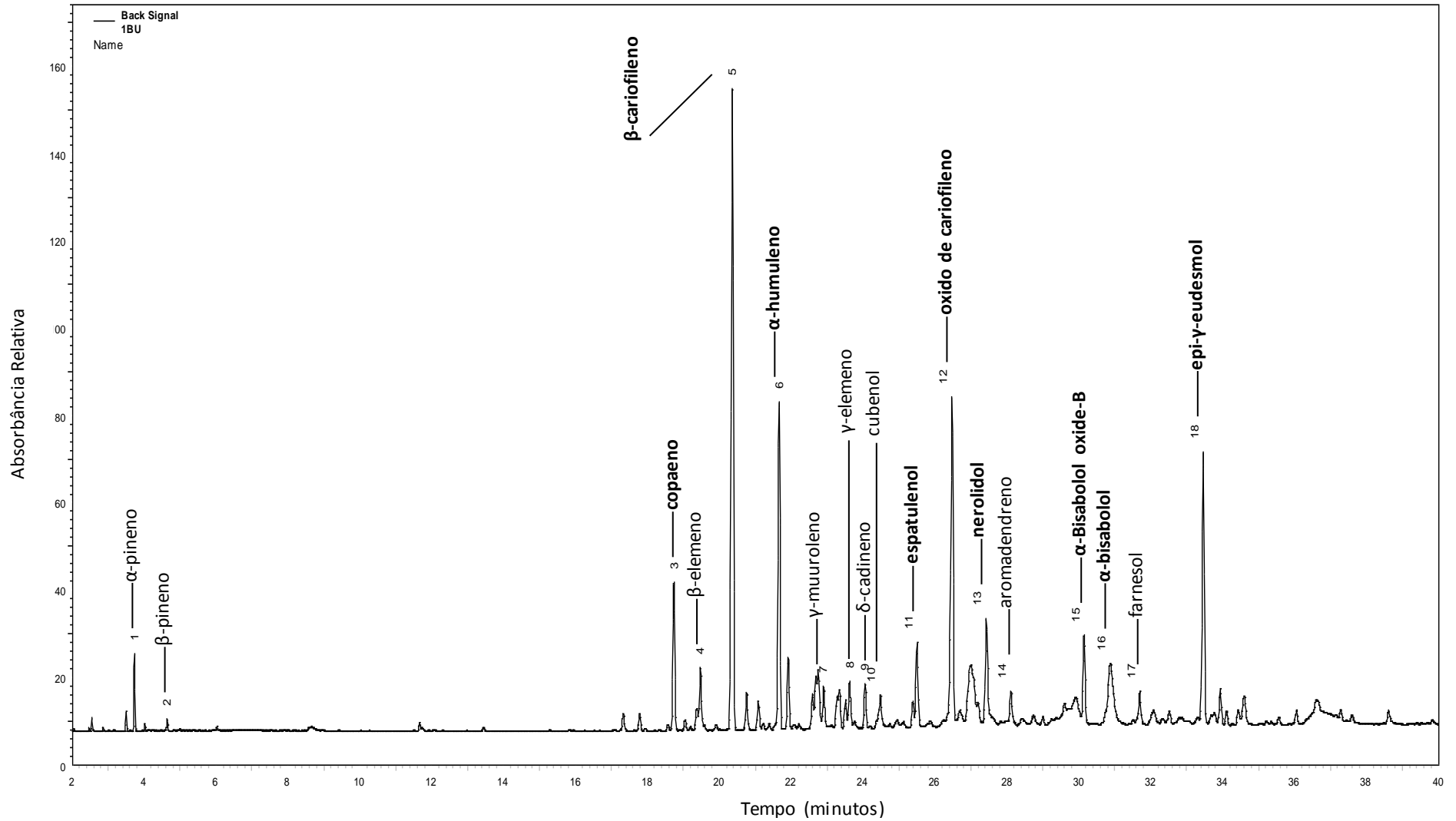
Os componentes identificados no presente estudo, em ordem decrescente de porcentagem foram, o β -cariofileno (15,9%), óxido de cariofileno (9,2%), α -humuleno (8,1%), epi- γ -eudesmol (7,5%), α -bisabolol (4,7%), copaeno (3,5%), nerolidol (3,3%), α -Bisabolol óxido-B (2,5%), espatulenol (2,1%), β -elemeno (1,8%), cubenol (1,4%),

γ -elemeno (1,3%), farnesol (1,2%), δ -cadineno, γ -muuroleno (1,1%) e aromadendreno (1%), α -pineno (0,8%) e β -pineno (0,2%).

Na Tabela 2 e Figura 9 encontram-se respectivamente os componentes químicos gerais, com suas porcentagens em massa, e o cromatograma obtidos pela análise cromatográfica CG-DIC do óleo essencial das folhas de *B. unguolata* onde se destacaram os sesquiterpenos.

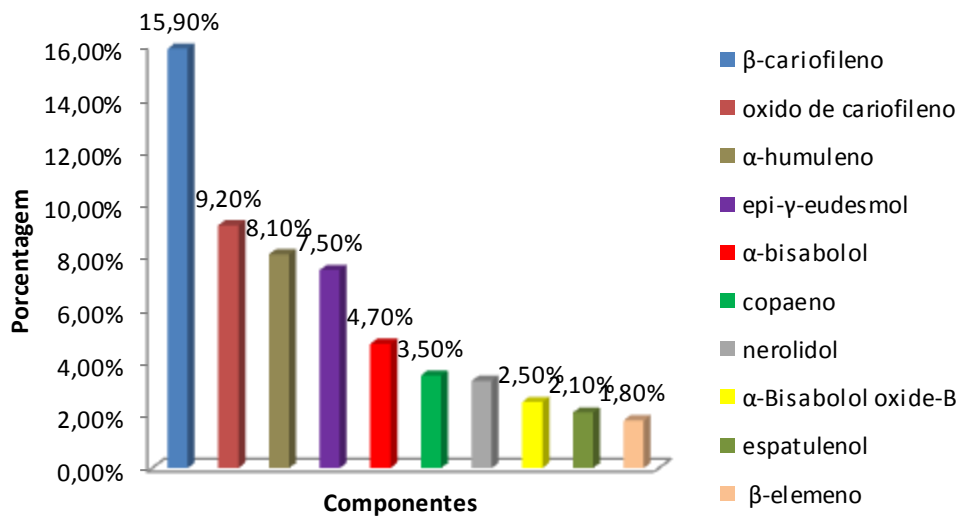
Tabela 2 - Porcentagem dos constituintes identificados no O.E. de *B. unguolata*

Pico	Constituinte	Índice kovats	1BU Area	1BU %
1	α -pineno	972	228798	0,8
2	β -pineno	996	53858	0,2
3	Copaeno	1370	999332	3,5
4	β -elemeno	1389	502121	1,8
5	β-cariofileno	1413	4531553	15,9
6	α-humuleno	1447	2302563	8,1
7	γ -muuroleno	1480	305438	1,1
8	γ -elemeno	1499	363997	1,3
9	δ -cadineno	1510	302924	1,1
10	Cubenol	1522	388178	1,4
11	Espatuleno	1549	611896	2,1
12	óxido de cariofileno	1575	2611601	9,2
13	Nerolidol	1600	941423	3,3
14	Aromadendreno	1618	287445	1,0
15	α-Bisabolol óxido-B	1672	711066	2,5
16	α-bisabolol	1691	1333254	4,7
17	Farnesol	1713	327718	1,2
18	epi-γ-eudesmol	1760	2122981	7,5
	Outros		9548036	33,5
	Identificados		18926146	66,5
	Total		28474182	100,0

Figura 10 - Cromatograma do O.E. essencial de *B. unguolata*

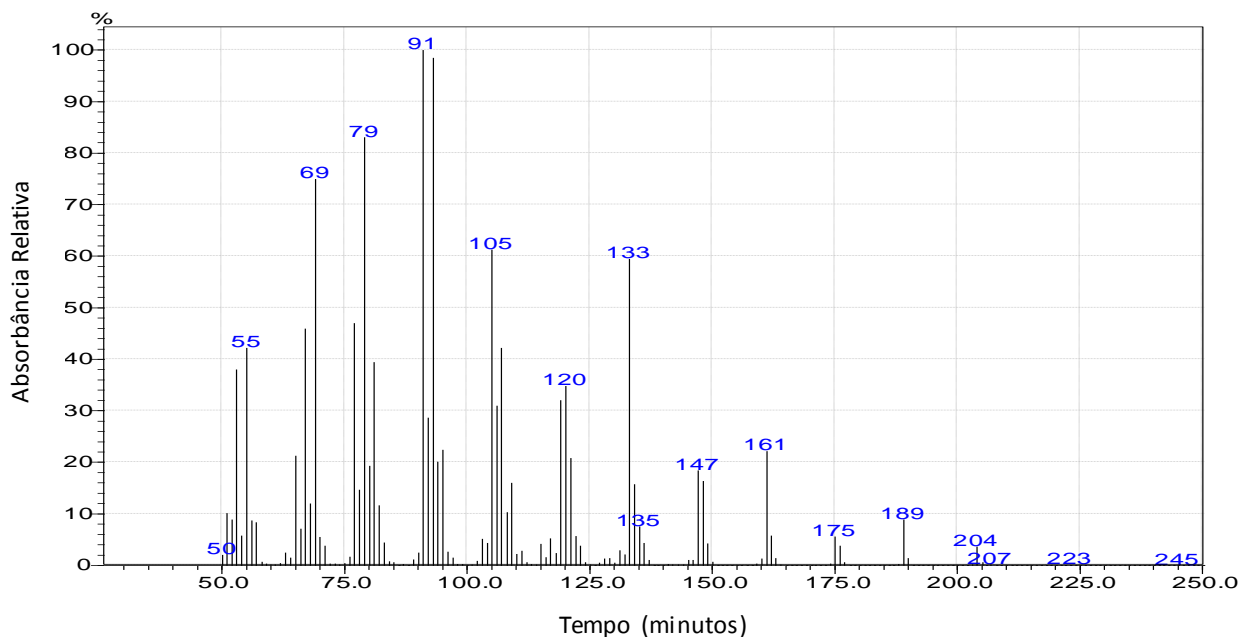
Destacando-se entre os majoritários o β -cariofileno (15,9%), oxido de cariofileno (9,2%), α -humuleno (8,1%), epi- γ -eudesmol (7,5%), α -bisabolol (4,7%), copaeno (3,5%), nerolidol (3,3%), α -Bisabolol oxide-B (2,5%), espatulenol (2,1%) e β -elemeno (1,8%). A variação destes componentes majoritários pode ser acompanhada pelo gráfico da Figura 11.

Figura 11 – Variação dos componentes majoritários do óleo essencial de *B. unguata*



O espectro de massas do componente β -cariofileno, de maior porcentagem encontra-se na Figura 12.

Figura 12 – Espectros de Massas do componente β -cariofileno



Em Gramosa et al. (2009) foram identificados 13 compostos, representando 95,9% do teor do óleo essencial de *B. unguolata*, sendo os componentes majoritários, espatulenol (47,7%), óxido de cariofileno (18,3%), humuleno epoxido II (5,2%), β -cariofileno (4,2%), α -humuleno (3,5%) e α -copaeno (2,9%).

Em Duó-Bartolomeu et al. (2014) foram identificados as substâncias germacreno-D, biciclogermacreno, β -elemeno, trans-cariofileno, α -humuleno, espatulenol, trans-nerolidol, β -ionona e β -elemeno.

Como podemos observar o óleo essencial de *B. unguolata* coletada em Boa Vista, Roraima na Região Norte, diferencia quanto à quantidade de compostos identificados, em porcentagem e composição química com relação ao trabalho de Gramosa et al. (2009), destacando-se principalmente os constituintes majoritários, isto deve-se ao fato de que a produção e liberação de substâncias voláteis pelas plantas podem ter relação com a interação entre elas e outros organismos, bem como influência de fatores bióticos e abióticos, tais como clima, solo, região e horário de coleta (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Observa-se assim que o espatulenol apresentou-se como o constituinte majoritário para o óleo essencial de *B. unguolata* nos estudos de Gramosa et al. (2009), com um percentual de 47,7. Porém no presente estudo este composto apresenta-se em menor quantidade (2,1%).

Neste estudo verificou-se também que o constituinte de maior percentual, foi o β -cariofileno (15,9%), segundo Neto (2006) o β -cariofileno também foi o constituinte majoritário com 25,65%, ao contrário de Gramosa et al. (2009), onde este componente obteve uma porcentagem inferior com (4,2%).

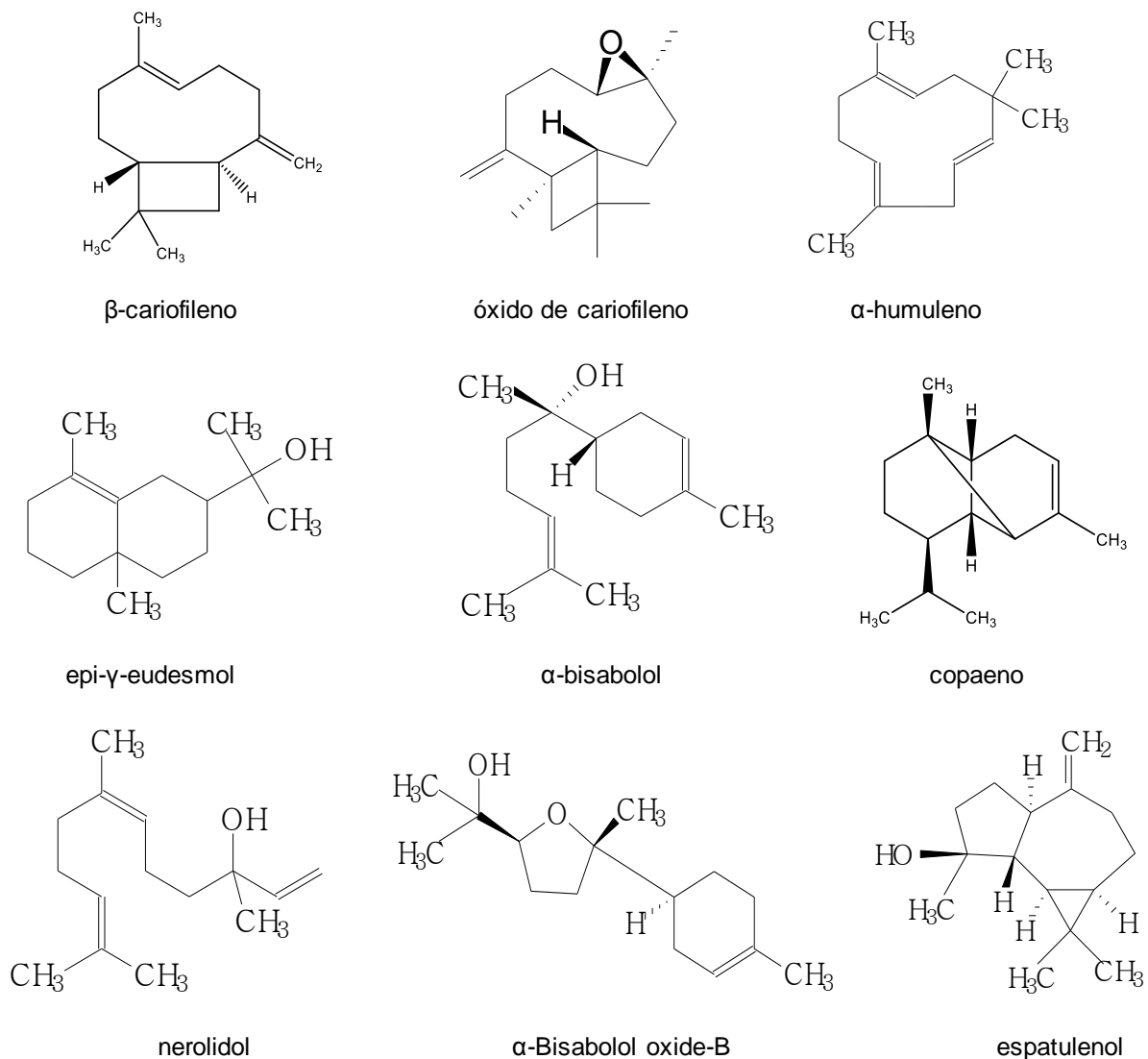
O componente α -bisabolol com (4,7%) não foi identificado nos trabalhos acima citados e nem em outras regiões para a espécie *B. unguolata*. Podendo indicar assim que possa ter ocorrido a formação de um novo quimiótipo para esta espécie em Boa Vista, RR.

Esta diferença deve-se ao fato de que a composição química de um óleo essencial é determinada pela espécie vegetal que o produz e pela parte do vegetal em que se encontra (folhas, cascas, sementes e raiz) e podendo variar qualitativamente ou quantitativamente. Assim como a concentração de cada um dos constituintes do óleo essencial pode alterar durante seu desenvolvimento, por exemplo, no coentro (*Coriandrum sativum* L.) o teor de linalol é de 50% maior nos frutos secos do que nos verdes, na camomila (*Matricaria recutita*) quando colhida

pela manhã apresenta maior teor em α -bisabolol (princípio ativo com atividade anti-inflamatória), porém se colhida no final da tarde apresenta apenas vestígios (COELHO; COSTA JUNIOR; DOMBROSKI, 2003). Assim como no trabalho de Neto (2006) com esta mesma espécie *B. unguolata*, no horário de 9hs da manhã, o isoleno, α -humuleno, ledol e espatulenol, não possui nem vestígio, sendo que no período de 12hs possuem concentrações de 1,02%, 0,81%, 0,78% e 2,10%, respectivamente.

A estrutura química dos compostos majoritários para o óleo essencial de *B. unguolata* estão apresentados na Figura 13, às moléculas foram construídas com auxílio do Software Chemwin 5.0.1.

Figura 13 - Estruturas químicas dos principais constituintes majoritários identificados por CG-EM e CG-DIC presentes no óleo essencial de *B. unguolata*



4.3 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Após o período de 24 horas foi obtido a quantidade de náuplios mortos e vivos tratados com o óleo essencial de *B. unguolata* (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de náuplios mortos com óleo essencial de *B. unguolata*

	Concentração do Óleo Essencial									
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		C	
	V*	M*	*V	*M	*V	*M	*V	*M	*V	*M
A*	1	9	2	8	4	6	5	5	10	0
D*	1	9	1	9	4	6	6	4	10	0
T*	1	9	2	8	5	5	7	3	10	0
X*	1	9	1,6667	8,3333	4,3333	5,6667	6	4	10	0

V*= vivos; M*= mortos; A*=amostra; D*=duplicata; T*=triplicata; X*= média.

A Tabela 4 mostra a porcentagem de mortalidade obtida para o óleo essencial de *B. unguolata*.

Tabela 4 – Dados de atividade frente à *Artemia salina* para o óleo essencial de *B. unguolata*

Concentração	Atividade para <i>A. salina</i> (% de Mortalidade)
1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	90%
500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	83%
250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	57%
125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40%
Controle	0%

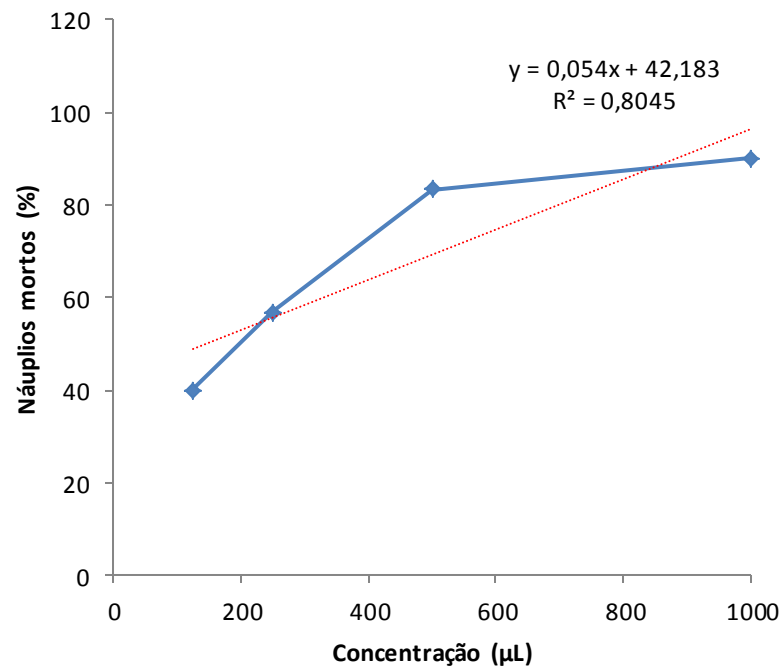
No tubo de ensaio do controle não houve mortalidade dos náuplios, não sendo necessária a aplicação da fórmula de Abbott para correção dos valores.

Obtidos os percentuais de mortalidade para a *A. salina* com auxílio do Software Microsoft Excel 2010, foram plotados gráficos e obtidas as regressões lineares entre

as concentrações utilizadas com o óleo essencial de *B. unguolata* e suas respectivas atividades para *A. salina*.

As interpretações dos resultados de toxicidade foram realizadas levando em conta o exposto pela literatura, onde pode-se classificar como altamente tóxico os valores de CL_{50} entre 0-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; toxicidade moderada entre 500-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e baixa toxicidade ou atóxico os valores acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MEYER et al., 1982; LOPES et al., 2002; RODRIGUES et al., 2009). A Figura 14 apresenta a atividade para o óleo essencial.

Figura 14 – Curva da atividade frente à *Artemia salina* para o óleo essencial de *B. unguolata*



Através da Equação 6 de regressão linear.

Equação 6:

$$Y = A + BX$$

Calcula-se a CL_{50} . Considerando $Y = 50$, $A = 42,183$ e $B = 0,054$, encontra-se o valor de X que é igual a 144,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

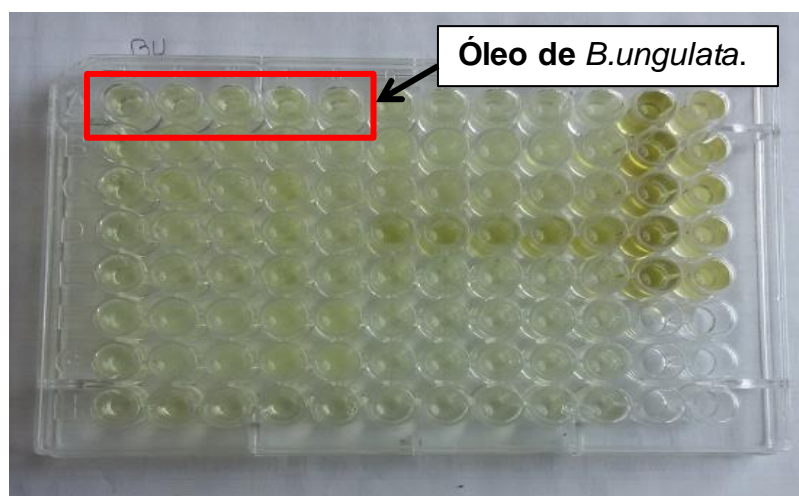
De acordo com Meyer et al. (1982), Lopes et al. (2002) e Rodrigues et al. (2009) pode-se verificar que o óleo essencial de *B. unguolata* apresentou letalidade frente ao microcrustáceo. Sendo considerado uma amostra de alta toxicidade, baseando-se no valor do CL_{50} encontrado que foi inferior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

De acordo com a literatura Amarante (2011), em uma análise geral, os extratos de plantas e seus derivados que apresentam uma alta toxicidade contra a *A. salina* são indicativos de alto potencial para atividades biológicas. No extrato etanólico de espécies deste gênero como *B. forticata* foi considerada atóxico (FIGUEIRA; BRITO; SILVA, 2012) por outro lado a espécie *B. variegata* apresentou atividade citotóxica frente a *A. Salina* (MARTINEZ, 2011) com estes dados reforça a importância do método, sendo muito útil a utilização deste bioensaio, quando se pretende desenvolver estudos biológicos.

4.4 RESULTADOS DO TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Os resultados foram obtidos conforme a leitura da placa de Elisa mostrada na Figura 15.

Figura 15 - Placa de Elisa contendo óleo essencial de *B. unguolata*



A Tabela 5 apresenta os valores de inibição obtidos para o óleo de *B. unguolata*.

Tabela 5 - Resultados de inibição da enzima acetilcolinesterase (Alzheimer) para o óleo essencial de *B. unguolata* e seus respectivos desvios padrão

Amostra	% de Inibição
<i>B. unguolata</i>	95,96 ± 0,62
Eserina	91,93 ± 1,30
Galantamina	94,36 ± 1,14

O óleo essencial de *B. unguolata* apresentou um bom potencial de inibição, correspondendo a 95,96%, superior aos padrões utilizados eserina e galatamina que apresentaram inibição de 91,93% e 94,36%, respectivamente.

Segundo o trabalho de Santos et al. (2011), com espécies de *Bauhinia* realizado em Minas gerais a espécie *B. unguolata* apresentou um índice de retenção da enzima acetilcolinesterase de 0,46, no extrato das flores, assim como *B. variegata* e *B. candida* apresentaram índices de retenção de 0,31 cada, no entanto, o extrato das folhas não teve inibição. O método utilizado foi o de TLC (cromatografia em camada fina). A espécie em estudo obteve um resultado superior com 95,6% de inibição, este fato pode estar relacionado aos componentes voláteis α -bisabolol e β -cariofileno presentes nesta espécie, já que estas substâncias estão relacionadas com a inibição da AChE em doenças neurodegenerativas como a DA (FERREIRA, 2014, NURULAIN, 2015), mostrando assim que a espécie *B. unguolata* pode conter um princípio ativo que possa contribuir contra essa doença de Alzheimer.

4.5 BIOENSAIOS *in vitro* de BACTÉRIAS e FUNGOS

Os resultados das inibições para os microrganismos estão apresentados na Tabela 6, os microrganismos aqui estudados foram, as bactérias Gram positivas *Bacillus cereus* (BC) e *Stafylococcus aureus* (ST) e Gram negativas *Salmonella thyfimurium* (ST) e *Citrobacter freundii* (CF), o fungo (levedura) foi a *Candida albicans* (CA) que são patogênicos aos seres humanos.

Tabela 6 – Inibição do O.E. de *B. unguolata* nos microrganismos testados

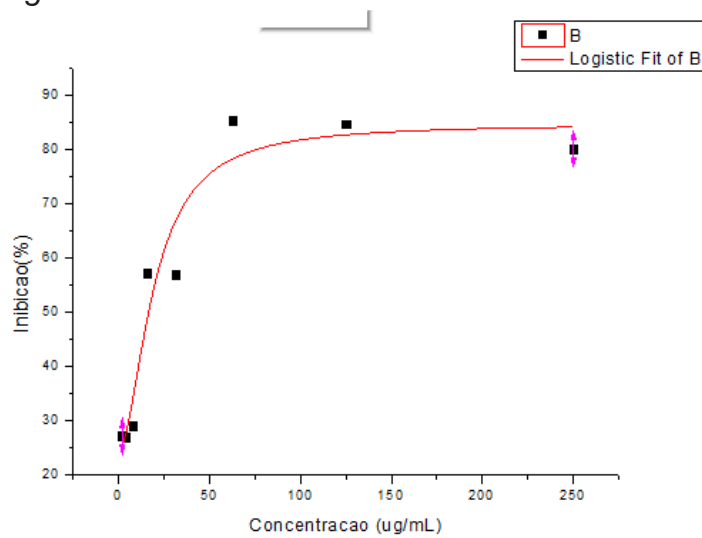
<i>Candida albicans</i>	% de inibição do crescimento
01 (250 µg/mL)	80,1343
02 (125 µg/mL)	84,7649
03 (62,5 µg/mL)	85,4366
04 (31,25 µg/mL)	56,9459
05 (15,62 µg/mL)	57,2994
06 (7,81 µg/mL)	29,0209
07 (3,90 µg/mL)	26,9000
08 (1,95 µg/mL)	27,1828
<i>Bacillus cereus</i>	% de inibição do crescimento
01 (250 µg/mL)	65,5548
02 (125 µg/mL)	51,6757
03 (62,5 µg/mL)	46,8181
04 (31,25 µg/mL)	46,2503
05 (15,62 µg/mL)	34,7370
06 (7,81 µg/mL)	25,0217
07 (3,90 µg/mL)	15,7164
08 (1,95 µg/mL)	19,4070
<i>Staphylococcus aureus</i>	% de inibição do crescimento
01 (250 µg/mL)	66,4138
02 (125 µg/mL)	65,0842
03 (62,5 µg/mL)	66,4138
04 (31,25 µg/mL)	64,7084
05 (15,62 µg/mL)	58,8410
06 (7,81 µg/mL)	58,6964
07 (3,90 µg/mL)	59,5636
08 (1,95 µg/mL)	54,1585
<i>Salmonella typhimurium</i>	% de inibição do crescimento
01 (250 µg/mL)	68,7884
02 (125 µg/mL)	67,3210
03 (62,5 µg/mL)	52,4886
04 (31,25 µg/mL)	58,8340
05 (15,62 µg/mL)	55,0268
06 (7,81 µg/mL)	52,9645
07 (3,90 µg/mL)	52,7266
08 (1,95 µg/mL)	36,5060
<i>Citrobacter freundii</i>	% de inibição do crescimento
01 (250 µg/mL)	46,1639
02 (125 µg/mL)	45,7653
03 (62,5 µg/mL)	41,6571
04 (31,25 µg/mL)	41,4118
05 (15,62 µg/mL)	22,3116
06 (7,81 µg/mL)	24,6417
07 (3,90 µg/mL)	12,1944
08 (1,95 µg/mL)	15,6894

Com os valores percentuais das inibições do óleo essencial de *B. unguolata* para os microrganismos testados, foram plotados gráficos com o auxílio do software origin 8.0, como se pode observar na Figura 16, 17,18 e 19 e por meio da Equação 7, foi realizado o cálculo da Concentração Inibitória 50% (IC₅₀).

Equação 7:

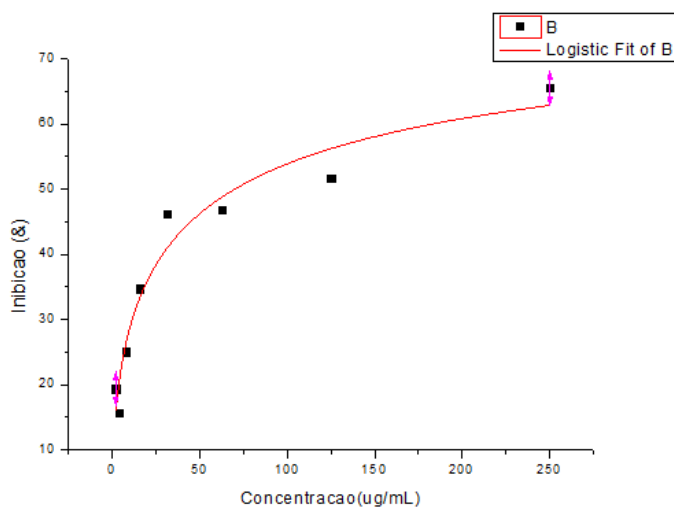
$$Y = A2 + (A1-A2) / (1 + (x/x0) ^p).$$

Figura 16 - Curva da atividade frente à *Candida albicans* para o óleo essencial de *B. unguolata*



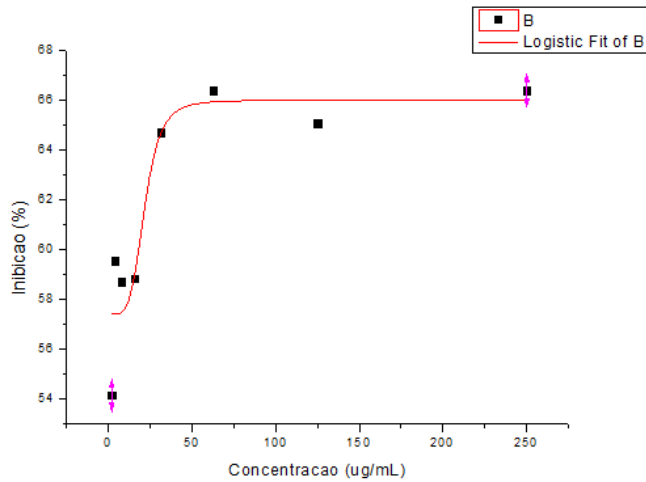
$$IC_{50} = 16,4 \mu\text{g/mL}^{-1}$$

Figura 17 - Curva da atividade frente à *Bacillus cereus* para o óleo essencial de *B. unguolata*



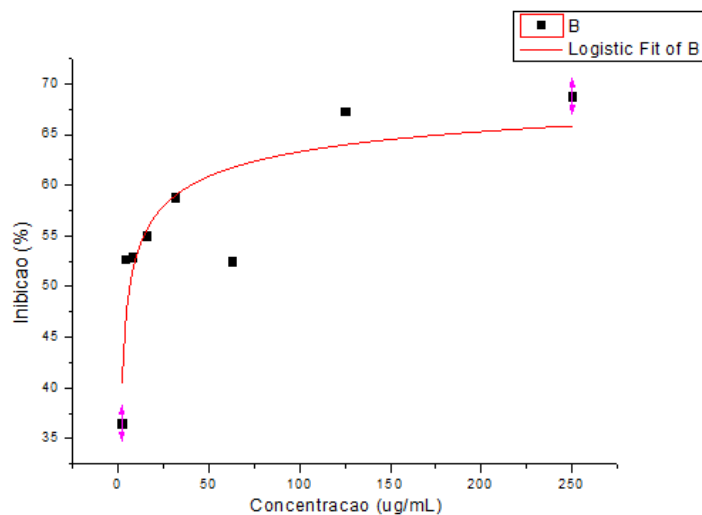
$$IC_{50} = 69,9 \mu\text{g/mL}^{-1}$$

Figura 18 - Curva da atividade frente à *Staphylococcus aureus* para o óleo essencial de *B. unguolata*



$$IC_{50} < 1,95 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Figura 19 - Curva da atividade frente à *salmonela typhimurium* para o óleo essencial de *B. unguolata*



$$IC_{50} = 6,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Ao analisar os valores percentuais de inibição e IC_{50} , pode-se verificar que para *C. albicans* inibiu o microrganismo até a concentração de $15,62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ do óleo essencial, considerando inibições superiores a 50%, esse valor está de acordo com o IC_{50} , pois o mesmo é de $16,4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Vale ressaltar que as três maiores concentrações foram as que obtiveram maiores inibições variando entre 80 a 85%.

Para *B. cereus* verificou-se que para esse microrganismo foi possível inibir até a concentração de $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, considerando inibições superiores a 50%. Confirmado pelo valor de IC_{50} igual a $69,9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. As demais concentrações

mesmo não apresentando inibições superiores a 50% podem ser consideradas bem eficazes, tratando-se de uma material vegetal bruto.

O óleo essencial inibiu o *S. aureus* em todas as oito concentrações testadas, considerando inibições superiores a 50% e apresentou um $IC_{50} < 1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$, confirmando a eficiência em inibir esse microrganismo.

A *S. typhimurium* foi inibida até a concentração de $3,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$, considerando inibições superiores a 50%, esse dado representa o grande potencial em inibir o microrganismo, visto que nesta concentração foi utilizada uma quantidade mínima de óleo essencial e o $IC_{50} = 6,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ confirma esse dado.

Para a bactéria *C. freundii*, não foi verificada uma inibição eficiente considerando inibições superiores a 50%, porém apresentou inibições próximas a 50% até a concentração de $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O IC_{50} não foi calculado, pois não apresentou inibição superior a 50%.

Dados da literatura indicam que espécies deste gênero *Bauhinia* demonstraram também ação muscolicida (SINGH; SINGH, 2012), larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (GOIS et al., 2011), antiviral, contra o *Arbovirus mayaro* MAYV (SANTOS et al., 2014), efeitos antioxidantes (SANTOS et al., 2014.; GRAMOSA et al., 2009; PAULA et al., 2014) , inibição da acetilcolinesterase (SANTOS et al., 2011), ação antibacteriana (CECHINEL FILHO, 2000, 2009), anti-helmíntica, em *B. variegata* contra *Ferentima posthuma* e *Ascaridia galli* (BAIRAGI; ABIHJEET; KNIMASE, 2012) e atividade antitumoral testadas em ratos (RAJKAPOOR; JAIKAK; MURUGESH, 2003).

Os percentuais de inibição apresentados para os microrganismos foram satisfatórios para a maioria dos testes desenvolvidos, para a espécie em estudo. Sabe-se que foi utilizado o óleo essencial puro, sem isolamento de substâncias e de acordo com Andrade et al. (2011), o isolamento de substâncias puras, identificação e análise de atividades biológicas compõem aspectos fundamentais na busca de fármacos de origem vegetal. Sendo estes próximos passos a serem desenvolvidos.

4.6 ANÁLISE DE METAIS POR ICPOES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. unguata*

Por meio da análise qualitativa foi possível identificar os elementos traços com concentração inferior a 1 ppm, sendo estes Ag, Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K,

Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn e entre 1 e 100 ppm os elementos Ca, Na, P, S e acima de 100 ppm o elemento silício (Si).

Com a análise quantitativa foi possível obter as concentrações para cada elemento que apresentaram-se acima de 1ppm e estes teores encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Teores dos minerais com concentração acima de 1 ppm

Elemento	Resultado 1 (ppm)	Resultado 2 (ppm)	Média (ppm) ± S
Ca	10,02	7,50	8,77 ± 2,96
Si	113,22	185,21	149,22 ± 12,2
Na	25,15	26,01	25,58 ± 5,05
P	11,35	10,76	11,06 ± 3,32
S	30,67	30,27	30,47 ± 5,51

Analisando a Tabela 7 o elemento silício foi o metal que apresentou maior concentração, sendo esta de 149,22 ppm, seguido do enxofre de 30,47 ppm. O elemento com menor teor foi o cálcio com 8,77 ppm.

De acordo com a literatura o silício (Si) aumenta a tolerância ao excesso de estresse sofrido pelas plantas, e é capaz de formar barreiras contra infecções fúngicas, aumenta a resistência dos tecidos e estimula o crescimento da planta (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005, TAIZ; ZAGER, 2010).

Em espécies do gênero *Bauhinia* como a *B. forticata* concentrações de Fe, K, Zn e Cu foram quantificados sendo os níveis maiores de Zn. Não foi detectado a presença dos metais como o Pb, Cr e Ni (FRANCO et al., 2011), que são considerados metais pesados (BAIRD, 2002), diferente do presente trabalho em que esses elementos estão presentes com teores menores que 1 ppm, no entanto esta quantidade não é considerada tóxica. A concentração de metais pesados menor que 1ppm em *B. unguata* pode está relacionada à presença do elemento silício que

possui a capacidade de diminuir a toxicidade de muitos metais pesados (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005, TAIZ; ZAGER, 2010).

Já no trabalho de Silva (1992), em Carajás no Pará foi encontrado teores de ferro em folhas de *B. pulchella* considerado alto e tóxico de 3500 ppm, no entanto no presente estudo este metal encontra-se abaixo de 1 ppm. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de que a disponibilidade de metais nas plantas depende de vários fatores que regulam a passagem desses elementos da fase sólida para a líquida, dentre eles são o pH, arejamento, matéria orgânica, temperatura e a presença de outros elementos, bem como o ambiente em que a planta se encontra (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005).

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *B. unguolata* no município de Boa Vista, Roraima, apresentou rendimento superior aos encontrados na literatura, com uma coloração amarela clara. Com os estudos realizados esse fato provavelmente possa ser explicado pela influência dos fatores da sazonalidade, que indicam que o clima, índice pluviométrico, exposição ao sol e solo interferem diretamente no rendimento e composição química do óleo.

Pelas técnicas de cromatografia gasosa CG-EM e CG-DIC, foi realizada a qualificação e quantificação dos constituintes voláteis do óleo essencial e foram identificados 18 constituintes, a maioria pertencente a classe dos sesquiterpenos, sendo os majoritários o β -cariofileno (15,9%), oxido de cariofileno (9,2%), α -humuleno (8,1%), epi- γ -eudesmol (7,5%), α -bisabolol (4,7%), copaeno (3,5%), nerolidol (3,3%), α -Bisabolol oxide-B (2,5%) e espatulenol (2,1%). Vale ressaltar que a espécie em Roraima apresentou o constituinte α -bisabolol, que ainda não havia sido identificado para a espécie supracitada.

Apresentou alta toxicidade frente à *A. salina*, indicando que possui promissores dados para produção de antimicrobianos de importância para a área farmacêutica.

Com relação a inibição para acetilcolinesterase, verificou-se um elevado grau de inibição, que foram superiores aos padrões utilizados no experimento.

Nos Bioensaios, o óleo apresentou boas atividades inibindo a maioria dos microrganismos com valores superiores a 50%, sendo estas para *Candida albicans* com 85%, *Bacillus cereus* com 65,5% e *Staphylococcus aureus*, 66,4% e *Salmonella typhimurium* 68,7%. O *Citrobacter freundii* não apresentou inibição eficiente, porém apresentou 46,1% de inibição.

Na análise qualitativa de metais foram identificados elementos traços com concentração inferior a 1ppm, sendo estes Ag, Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn e entre 1 e 100 ppm, os elementos Ca, Na, P, S e acima de 100 ppm o elemento silício (Si). Dentre os elementos acima citados foi determinada a concentração em ppm para os elementos, Ca com 8,77 ppm, P com 11,06, Na com 25,58 ppm e S com 30,47, sendo o de maior teor o Si com 149,2 ppm elemento este muito importante para o desenvolvimento da planta. Os resultados quantitativos

desses metais mostram que no óleo essencial de *B. unguolata* o teor de metais considerados tóxicos está no limite permitido.

Diante dos resultados dos bioensaios preliminares o óleo essencial das folhas de *B. unguolata* que apresentou toxicidade ativa e inibições para os microrganismos estudados *in vitro*. Esses dados incentivam novas pesquisas para o isolamento de substância desta espécie na busca de alternativas terapêuticas que possam servir para novas fontes de fármacos a partir de plantas medicinais no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA et., al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemono daphne*, *Parvifolia madrinã* (Lauraceae). **Acta Amazônica**, v. 40(3), p. 567-572, 2010.
- ALMEIDA, B. M. M., et al. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. **Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.22 (1), p. 94-97, 2002.
- AMARANTE, C. B. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*), **Acta Amazonica**, v. 41(3), p. 431-434, 2011.
- ANDRADE, L.C., et al. Ensaio biológicos utilizados na pesquisa de produtos naturais. In: SOUZA; MELLO; LOPES. **Farmacognosia**: Coletânea científica, Ouro Preto: Ufop, p. 157-176, 2011.
- BAIRAGI, S. M.; ABHIJEET. A. A; KNIMASE, P. In vitro Anthelmintic Activity of *Bauhinia variegata* Bark (Leguminosae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v 4, p. 3, 2012.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. Ed. 2, Porto Alegre: Bookman, p. 622, 2002.
- BAKKALI, F., et al. Biological effects of essential oils – A review, **Food and Chemical Toxicology**, 46, p. 446 - 475, 2008.
- BIZZO, R. H. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e pesquisas, **Quima. Nova**, Vol. 32, v. 3, p. 588-594, 2009.
- BRACA. A., et al. Antioxidant Principles from *Bauhinia terapotensis*. **Jornal Natural Products**, 7, 64, p. 892-895, 2001.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia**: Fitoquímica plantas medicinales, ed. 2, Zaragoza-Espanha: ACRIBIA, S.A, p. 1-1099, 2001.
- CALIXTO, J.B.; Medicamentos Fitoterápicos, In: YUNES, R.; CALIXTO, J.B., **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal**, Chapecó, SC: Argos, p. 297, 2001.
- CARLSON, R. N. **Fisiologia do comportamento**, ed. 7, São Paulo: Manole LTDA, p. 699, 2002.
- CASTRO, C. R. P; KLUGE, A. R; PERES, P. E. L. **Manual de Filosofia Vegetal: Teoria e prática**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 640, 2005.
- CECHINEL FILHO, V. Principais Avanços e Perspectivas na Área de Produtos Naturais Ativos: Estudos Desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALE. **Química Nova**, 5, p. 680-685, 2000.

- CECHINEL FILHO, V. Produtos Naturais e Sintéticos com Potencial Terapêutico: 15 anos de Estudos realizados no núcleo de investigações Químico - Farmacêutico no NIQFAR/UNIVALE. **Revista Fitos**, 4, 2, p. 6-23, 2009.
- COELHO, F. M; COSTA JUNIOR, P; DOMBROSKI, D. L. J. **Etinobiologia, etinoecologia e plantas medicinais**, ed. 1, Cuiabá: Unicem, p.149-156, 2003.
- CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINCAS, L.E.M. **Plantas Medicinais: do cultivo a terapêutica**. Ed. 6ª, Petrópolis RJ: Vozes, 1998.
- COSTA, F.A. **Farmacognosia**, Lisboa: Fundação calouste gulbenkian, p.1-1031, 2002.
- CUNHA, A.P., et al. **Plantas medicinais e produtos vegetais em cosmética**, Lisboa: Fundação calouste gulbenkian, p. 9-310, 2004.
- DUÓ - BARTOLOMEU, A. C., et al. COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Bauhinia forficata* L. In: Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins. 2014. Campos do Jordão. Campos do Jordão (SP). SIMCRO, p. 94, 2014.
- FIGUEIRA, A. C. G; BRITO A. F; SILVA, G. A. Avaliação da Toxicidade de Plantas Medicinais Brasileiras por meio de Bioensaios com *Artemia salina*. V.3, n.3, p. 8-13, 2012.
- FERREIRA, D.A.S. The protective effect evaluation of β -caryophyllene in cellular models of neurodegenerative diseases. College science pharmaceutical in Ribeirão Preto. **Doctoral thesis**. p.1-71. (2014).
- FRANCO, M. J; et al. Determinação de Metais em Plantas Medicinais Comercializadas na Região de Umuarama- PR. **Arq. Ciências Saúde**. Unipar, v.15, n.2, p.121-122, 2011.
- GARETH, T. **Química medicinal: uma introdução**, 1 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTD, p. 413, 2003.
- GOIS, R.W.S.; et al. Chemical Composition and Larvicidal Effects of Essential oil from *Bauhinia acuruana* (Moric.) against *Aedes aegypti*. **The Journal of Essential Oil Research**, 23, p. 59-62, 2011.
- GRAMOSA, V. N.; et al, M.N.D. Volatile components of the essential oil from *Bauhinia unguolata* L. **Journal of essential oil research**, 21, 6, p. 495-496, 2009.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of today and drugs of tomorrow. **Molecular Aspectos oh Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.
- JACOB, S.L. **Farmacologia: National medical series para estudos independentes**, ed.4, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. S.A, p. 364, 1998.
- JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. ed, 11ª, São Paulo: Nacional, p. 777, 1993.

- JOLY, A.B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. ed. 12ª: São Paulo: Nacional, p.777, 1998.
- JUDD, W.S., et al. **Sistemática Vegetal**: Um Enfoque Filogenético, ed.3, Porto Alegre: Artmed, p. 371-372, 2009.
- KLAFKE, B. G. Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from *Bauhinia variegata* L. var. *variegata* expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**. V.115, p. 1222-1230, 2013.
- KERBAUY, B. G. **Fisiologia Vegetal**. ed. 2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.431, 2008.
- LOHMANN, P. Dossiê: os minerais na alimentação. **Food Ingredients Brazil**, v.4, p. 48-65, 2008.
- LEWIS, G.P; OWEN, P.E. **Legumes of the Ilha de Maracá**. Kew, Royal Botanic Gardens, p. 1-95, 1989.
- LEWIS G., et al. Tribo Cercideae In: **Legumes of the World**. Kew- Plants People Possibilities, v.1, p.57-67, 2005.
- LOPES, W.B., et al. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica Horizonte Científico**, v.1, p.1-11, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p. 512, 2002.
- LORENZI, H; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exótica cultivadas**, ed. 2, São Paulo: Nova Odessa, p.7-544, 2008.
- BARREIRO, J.E; MANSSOUR, F. A. C. **Química Medicinal: As Bases da Moleculares da Ação dos Fármacos**, ed. 1, Porto Alegre: Artmed, 2001.
- MARQUES., et al. Caracterização fotoquímica e físico química das folhas de *Bauhinia forticata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 33, 1, p. 57-62, 2012.
- MARTINEZ, M. M. M., et al. Actividade antibacteriana y citotoxicidade in vivo de extratos etanólicos de *Bauhinia variegata*. L (Fabaceae), **Revista Cubana de Plantas medicinales**, v.16 (4), p.313- 323.
- MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. **Simple bench-top bioassays (BS & PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress in human medicinal agents from plants**. Nova York: Kinghorn & Balandrini, p.112-37, 1993.
- MEYER, B.N., et al. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

- MING, C.L. et al. Manejo e cultivo de plantas medicinais: Algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. In: COELHO, F. M; COSTA JUNIOR, P; DOMBROSKI, D. L. J. **Etinobiologia, etinoecologia e plantas medicinais**, ed. 1, Cuiabá: Unicem, p.149-156, 2003.
- MISHRA, A.; et al. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidante, and anticancer activities. **Biomed Research Internacional**. V.10, 2013.
- MORAIS, S.M.; et al. Plantas Medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brasilian journal of pharmacognosy**, 15, 2, p.169-177, 2005.
- MORA, P. C. M; ROJAS, J. M. E. **Plantas del centro experimental amazônico-CEA- Mocoa, Putumayo**. ed. 1, Universidade Nacional da Colômbia, 2010.
- NETO, T.F. **Nutrição Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 510, 2003.
- NETO, M.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil**. 2006. p.170 . Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Universidade federal do Ceará. Fortaleza. 2006.
- NETO, M.M., et al. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 3, p. 227-229, 2008.
- NOLDIN, V.F., et al. Composição Química e Atividades Biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, V. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.
- NURULAIN, S., et al. Inhibitory actions of bisabolol on α 7- nicotinic acetylcholine receptors. **Review Neuroscience**.v.306, p. 91-99, 2015.
- OLIVEIRA, P. E. J; MILECH, A. **Diabetes mellitus: clinica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**, São Paulo: Atheneu, p. 345, 2006.
- PAULA, S.C.; et al. Potencial antioxidante de *Bauhinia unguolata*. **Revista Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, 35, 2, p. 217-222, 2014.
- PELCZAR, J.M. Jr., et al. **Microbiologia conceitos e aplicações**, v.1, ed. 2, São Paulo: Person, p.1-524, 1997.
- PETRONILHO, C. E; VILLAR, F. D. J. Agentes para a Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Revista Virtual de Química**. V.6, n. 3, p. 671-686.
- PEPATO, M.T.; et al. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forticata* decoction in Streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 81, p.191-197, 2002.
- PINHEIRO, M. D; PORTO, A. R. K; MENEZES, S. E. M. **A Química dos Alimentos: carboidratos, vitaminas e minerais**. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, p. 52, 2005.

- PORTS, S. P., et al. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, 53, p. 875-881, 2013.
- RAJKAPOOR, B.; JAYAKAK, B.; MURUGESH, N. Antitumour Activity of *Bauhinia variegata* on Dalto's Asiatic lymphoma. **Journal of Ethnopharmacology**. 89, 107-109, 2003.
- RANG, P.H; DALE, M.M. et al. **Farmacologia**, ed. 7, Rio de Janeiro: Elsever Ltda, p. 768, 2011.
- RAVEN, H.P; EVERT, F. R; EICHHORN. **Biologia Vegetal**, ed. 7, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 830, 2011.
- RHEE, I. K, .et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal Chromatogr** n. 915: p.217-223, 2001.
- RODRIGUES, G. A., et al. Bioensaio com *Artemia salina* para detecção de toxinas em alimentos. **Estudos**, goiana, v. 36, n. 5/6, p. 795-808, 2009.
- ROLLAND, L; ROLLAND, X. **Bactérias, Vírus e Fungos**, Lisboa: Piaget, p. 117, 1997.
- SALATINO, A., et al. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Brasilian journal of botany**, 22, 1, p. 17-20, 1999.
- SALLISBURY, B. F; ROSS, W. C. **Fisiologia das Plantas**, ed. 4, São Paulo: Cengage Learning, p. 2013.
- SANCHES, G. A. J; NARDY, C. B. M; STELLA, B. M. **Bases da Bioquímica e Tópicos da Biofísica: Um marco inicial**, Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, p. 302, 2012.
- SANTOS, A.E., et al. Quercetin and quercetin 3-glicosides from *Bauhinia longifolia* (Bong) steud. Show anti-Mayaro virus activity. **Parasites e Vectors**, 7, p. 130, 2014.
- SANTOS, K.M., et al Acetylcholinesterase Inhibition from Startin extracts of *Bauhinia variegata* L, *Bauhinia* Var. *candida* (Aiton) Buch – ham and *Bauhinia unguolata* L. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44, 6, p.741-783, 2011.
- SANTOS, M.P., et al. Perfil de flavonóides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de *Bauhinia purpúrea* (Fabaceae) da Região Amazônica. **Química Nova**, 37, 1, p. 89-94, 2014.
- SILVA, F. F. M. Distribuição de metais pesados na vegetação metalofila da cerra de carajás. **Acta Botânica Brasileira**, 6,1, p. 107-122, 1992.

SILVA, F.R.M.B., et al. Acute effect of *Bauhinia forticata* on serum glucose levels in normal and alloxan- induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 83, p.33-37. 2002.

SILVA, H.C.; et al. BUL: A novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, 49, p.203-209, 2014.

SILVA, K. L. C; CAMARA, C. A. G. Composição química e avaliação do potencial acaricida do óleo essencial das folhas da espécie *Bauhinia rufa* Steud frente ao ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch. In: 54º Congresso Brasileiro de Química CBQ, 54, 2014, Natal.

SILVA, L.K.; CECCHINEL FILHO, V. Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição Química e Potencial Farmacológico. **Química Nova**, 3, p.449-454, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **ÓLEOS VOLÁTEIS**. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS/ Florianópolis: Editora UFSC, 2004.

SINGH, L.C; SINGH, D.K; SINGH, K.V. Characterization of the molluscicidal activity *Bauhinia variegata* and *Mimusops clengi* plant extracts against the fasciola vector *Limnaea acuminata*. **Revista Instituto Medical Tropical**, 53, p.3, 135-140, 2012.

SMITH., et al. **Flowering plants of the neotropics**, New Jersey: Prince, p. 594, 2004.

SOBRAL, M; JARENKOW, A. J. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul**, São Carlos: Rima, p. 108-114, 2006.

SOLOMONS, G. W. T; FRYHLE. B. C. **Química Orgânica**, v. 2, p. 613. Rio de Janeiro: LTC, p. 613, 2012.

SOUZA, H. G; PALAZZO, C. J; LOPES, P. N. **Farmacognosia: Coletânea científica**, Ouro Preto: UFOP, p. 19-371, 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2ª. ed.; Instituto Plantarum: São Paulo : Nova Odessa, p. 704,2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Artmed S.A. ed. 4, p. 818, 2010.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**, ed.2, São Paulo: Atheneu, p1-599, 2009.

TYMOCZKO, L. J; BERG, M. J; STRYER, L. **Bioquímica Fundamental**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 748, 2011.

TORTORA, J. G; FUNK, R. B; CASE L C. **Microbiologia**, ed.10, São Paulo: editora Artmed, p.934, 2012.

VAZ, F. S. M. A; TOZZI, A. G. M. A. *Bauhinia Ser. cansenia* (Leguminosae: Caesalpinioideae no Brasil), **Rodriguesia**, 54, 83, p. 55-143, 2003.

VIEGAS, F. P. D. Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamativo. **Revista Virtual de Química** V. 3, n.4, p. 286-306, 2011.