

**ESTUDO FITOQUÍMICO E MORFOLÓGICO
DAS FOLHAS DE *Bauhinia holophylla* STEUD.**

GRÉCIA OIAMA DOLABELA BICALHO

2002

GRÉCIA OIAMA DOLABELA BICALHO

ESTUDO FITOQUÍMICO E MORFOLÓGICO DE FOLHAS DE *Bauhinia*
holophylla STEUD.

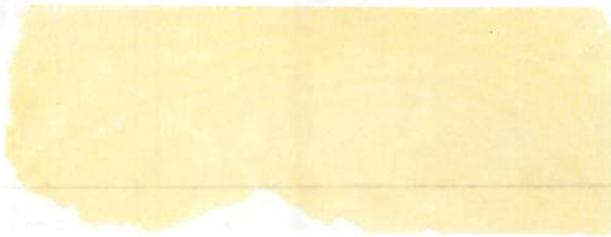
Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração
em Agroquímica e Agrobiotecnologia, para obtenção do
título de "Mestre".

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Bicalho, Grécia Oiama Dolabela

Estudo fitoquímico e morfológico das folhas de *Bauhinia holophylla* Steud. /
Grécia Oiama Dolabela Bicalho. -- Lavras : UFLA, 2002.

74 p. : il.

Orientadora: Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Bauhinia holophylla*. 2. Óleo essencial. 3. Morfologia. 4. Fitoquímica. 5.
Miroró. 6. Histórico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.323

-633.883323

-634.973323

GRÉCIA OIAMA DOLABELA BICALHO
ESTUDO FITOQUÍMICO E MORFOLÓGICO DE FOLHAS DE *Bauhinia*
***holophylla* STEUD.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 27 de fevereiro de 2002

Dra. Celeste Maria Patto de Abreu

UFLA

Dr. José Donizete Alves

UFLA

Maria das Graças Cardoso
Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais,

Affonso Dolabella Bicalho (“*in memorium*”) e

Maria de Oliveira Bicalho,

pela presença constante material e espiritual, fazendo-me um ser humano inteiro e com força necessária para querer sempre crescer,

OFEREÇO

À minha família, em especial às minhas irmãs,
Prof.^a.Dr.^a.Solange de O. Bicalho e Profa. Dra.
Urquiza de O. Bicalho, e a todos os
professores deste imenso Brasil,

DEDICO

Os maiores sucessos, as maiores idéias (as maiores idéias constituem os maiores sucessos) são compreendidos muito tarde; as gerações contemporâneas não os vivem, embora vivam quase.

Acontece na vida tal como no reino dos astros. A luz das estrelas mais longínquas chega muito tarde até nós e, no entanto, o homem chega a negar que tais estrelas existam.

De quantos séculos necessita um espírito para ser compreendido?

Frederic Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu de graça a vida e possibilitou-me dela usufruir na plenitude e que, velando por mim ao longo dessa trajetória, tornou possível a realização de um sonho.

À Unimontes, que acreditou em mim e permitindo-me a saída, em um horário compatível de trabalho, possibilitou-me conduzir com êxito o Curso de Mestrado.

À UFLA, pela acolhida e atenção, fazendo-me sentir parte integrante dessa novel Instituição de Ensino

A Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso, “graça” de orientadora em toda a sua dimensão, pois qual anjo bom pairando com sua presença constante, demonstrou todo o seu potencial de ser humano, e com competência, disponibilidade, carinho e respeito, tornou possível meu aprendizado, capacitando-me para enfrentar mais uma etapa da vida. Aproveito para agradecer a toda sua família (que tive o prazer de conhecer) , em especial a D.Aparecida, a responsável por tudo e por todos.

Aos meus co-orientadores: Profa. Dra. .Angelita Duarte Corrêa (Depto. de Química/UFLA) pelas discussões, amizade, auxílio na química analítica e na Bioquímica vegetal; Prof. PhD. Dr. José Eduardo Brasil P. Pinto (Depto. Fitotecnia/UFLA), pelas orientações em plantas medicinais e pela amizade; Prof. Ms. Manoel Losada Gavilanes (Depto. de Biologia/UFLA), amigo e colega de área, que sempre esteve disponível ao meu auxílio, responsável pela minha orientação botânica. Obrigada a todos vocês que não mediram esforços e me auxiliaram neste trabalho.

A Profa. Celeste Maria Patto de Abreu, por ser amiga, passada por “osmose”, mas eu conquistei meu cantinho nesse coração imenso, que acreditou em meu potencial desde que aqui cheguei, que me escutou e me ajudou em tudo,

na bioquímica, na estatística, nos papos descontraídos, pela profissional e pela pessoa, minha eterna gratidão.

Ao meu querido, amado sobrinho e afilhado Afonso Dolabella Bicalho Roumillac (meu “mouse-man”), por toda apresentação gráfica da dissertação, as quais levaram fins de semana e madrugadas de trabalho. O que seria de mim sem você?

Aos meus irmãos, Luis Carlos Marti Dolabela Bicalho (Caiô) e Wladimir Dolabela Bicalho (Gordinho), por toda ajuda e por acreditarem em mim, vindo ao meu auxílio, sem dia ou hora, resolvendo todos os meus problemas “astrais”, minha eterna gratidão.

Ao meu bem, meu marido, Luís Antônio, pelas incontáveis ausências e pela compreensão das mesmas. Eu te amo.

Ao Chefe do Depto. de Química/UFLA, Prof. Dr. Ruy Carvalho, pela boa convivência e “altos papos”.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Agroquímica e AgroBioquímica, Prof. Dr. Mauro dos S. de Carvalho, muito obrigada.

Aos membros do Colegiado do Depto. de Química, obrigada.

Aos professores do curso de pós-graduação em Agroquímica e Agrobioquímica do Depto. de Química da UFLA, pelo profissionalismo e competência, dando-me a possibilidade de compartilhar de seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Custódio Donizete, pela amizade e todos os ensinamentos, principalmente com o processo de liofilização.

Ao Prof^o Dr. Luciano Paiva, amigo de partilhar comigo alegrias e tristezas, profissional brilhante e um professor notável que muito me ensinou nos métodos bioquímicos, meu apreço e minha amizade.

Ao Prof. Evaristo de Castro (Depto. de Biologia/UFLA), amigo passado por “osmose”, meu colega de profissão e a quem devo a parte morfológica deste trabalho e tantas boas discussões. Valeu!

A Profa. Dra Josefina (Depto. de Química/UFLA) pelo apoio, ajuda, “dicas valiosas” e turismo em Poços de Caldas. As colegas Ana Paula, Ellen, Maria Carolina, e os colegas, Nilmar (Bach), Fabiano, Breno, obrigada. A Cleusa (nossa querida “Creide”), o meu eterno agradecimento por todas as “aulas de análise de cachaça” e pelo simples fato de ser você.

A Dra. Norma Eliane e ao Dr. Sebastião Márcio (“Tiãozinho”), meus amigos do Laboratório de Química Orgânica, obrigada pela força, ajuda e inúmeros bons momentos de papo e jantares, que nos proporcionaram maior entrosamento.

A Cíntia (Entomologia/UFLA), obrigada pela parte cultural, boas conversas e e-mails que preenchem minha caixa postal, obrigando-me a trabalhar a Internet.

A toda a equipe do Depto. de Química /Análise Foliar: Wilsinho, Guimarães, e todos que eu não nomeei, muito obrigada.

A Vera, secretária do Depto. de Química da UFLA, que sempre esteve comigo partilhando das minhas atividades (fax então nem se comenta), meu muito obrigada do fundo do coração. À Miriam, secretária da Pós-graduação, por tantos “galhos” quebrados.

Ao Carlinhos (DBI/UFLA) pelas noites e madrugadas no Laboratório de Morfologia, ao Marcelo Cirillo (Estatística/UFLA), pela parte estatística da dissertação. Obrigada.

A Prof. Ms. Assunção (Pró-Reitora de Ensino-Unimontes), a minha madrinha Prof^o Ms. Mariléia (Coordenadora dos Cursos de Extensão - Unimontes), eu sempre te disse que “quem tem madrinha não morre pagã”; Profa. Ms. Tânia (Pró-Reitora de Pesquisa-Unimontes); Profa. Ms. Ilva (Coordenadora da Pós-graduação), sem vocês apoiando-me eu não teria vencido. Muito Obrigada.

A Profa. Ms. Dulcivânia (Unimontes), companheira de Biologia e minha “eterna Chefe”, amiga de todas as horas, que compreendendo a necessidade de minhas atividades, procurou conciliar o meu quadro de horários.

Aos professores Dr. Paulo Sérgio e Ms. Santos D’Angelo (Unimontes) verdadeiros amigos que sempre torceram por mim, incentivando-me cada vez mais e, sem os quais, eu nem aqui estaria, serei eternamente grata. Obrigada, mesmo, amigos!

A Profa. Dra. Vânia Déa (Depto. de Ciência dos Alimentos), pela amizade a mim dispensada (também por “osmose”).

A Tina e Sandra (Depto. de Ciência dos Alimentos/UFLA), pelo auxílio e doação de reagentes para execução do *screening* fitoquímico. Muito obrigada, meninas!

A Profa. PhD Dra. Alaíde Marques (Fitoquímica/ Farmácia e Bioquímica da UFMG), pela acolhida, auxílio no material científico e doação de todos os reagentes pedidos á execução desta dissertação.

Ao Prof. Phd. Dr. David Lee Nelson (ICEX/UFMG), pelas análises de GC/MS.

A Profa. PhD. Dra Dorila Piló Veloso (ICEX/UFMG), pelas análises em RMN.

A amiga Maria José Marques (Zezé) da SBQ-BH (ICEX/UFMG), pelo apoio científico e conversas tão agradáveis.

Ao Prof. Dr. Evandro de Castro (DQ/UFU-MG), pelas análises em CG/EM).

A Andréa Yu Kwan Villar Shan, amiga, companheira, interlocutora, química competente e sagaz, que dividiu comigo seus conhecimentos e seu precioso tempo, que tantas vezes veio ao meu auxílio no laboratório e na computação, meu mais profundo obrigada e minha eterna admiração.

Aos jovens alunos do Laboratório de Química Orgânica da UFLA, sob a orientação da Dra. Maria das Graças: Fábio da C. Aguiar, Priscila M. Aguiar, Vanisse de F. Silva, Flávio Henrique da C. Bolzan, Thaisa Marques, Welington José Fernandes, Anaílda Lana, Luciano D. Gonçalves. Com vocês eu aprendi química laboratorial; cada um contribuiu para o meu crescimento pessoal e no grupo, agradeço do fundo do coração todos os momentos que convivi no dia-a-dia durante esses dois anos. Sem vocês, eu não teria conseguido. Vocês, sim, fazem o “show da vida continuar”. Obrigada por me ensinarem e me ajudarem em todos os momentos.

Aos meus colegas de mestrado Andréa Shan, Andrea Xisto, Cristiane J. Bastos, Ênio N. de O Júnior, Regina Célia Pinheiro, Hernetete de J. S. Oliveira, João Marcos P. Alvarenga, Flávia R. da Cunha, Liliam Aparecida Paim, Geveraldo Maciel, José Geraldo Galvão, Edécio N. de O Júnior, obrigada pela convivência e aprendizado. Aos novos colegas do mestrado: Ana Carolina L. Amorim (obrigada pelas madrugadas comigo no computador e por tantos e-mails, que me obrigaram a aprender Internet e rir bastante, valeu minha “gata”), Itânia P. Soares, Carmen Wobeto, Adriana Aparecida S. Valle, Alexandre dos S. Anastácio, desejo sucesso agora e sempre!.

Ao Ênio, amigo que sempre esteve disposto a me auxiliar na química, e que me deu a brilhante idéia de liofilizar as folhas da *Bauhinia holophylla*. Obrigada! A Regina Pinheiro, muito obrigada por apresentar-me a cidade de Lavras, os papos, os inúmeros cafés e lanches, as tantas noites e madrugadas de estudo e pousada. A Profa. Cristiane Bastos obrigada, pelas inúmeras madrugadas ensinando-me química.

Aos professores do Depto. de Fisiologia Vegetal, por terem me aceitado para o curso de Doutorado, permitindo que meus estudos na área de pesquisa continuem, muito obrigada ao Prof. Coordenador da Pós-Graduação, PhD Dr. Donizete, Dra. Ângela, Dr. Amauri, Dr. Nelson, PhD. Dr. Luis Edson, Pró-

Reitor da Pós-Graduação, e demais profissionais, técnicos e pessoal administrativo, e onde existe o café mais gostoso da Universidade.

À APG (UFLA), nossa associação, que sempre esteve pronta para lutar por nós. Valeu “galera”, muito obrigada pelo apoio.

À Faepe, por inúmeros cursos que realizei (apesar de ter de pagá-los) e que me possibilitou conhecer tantas pessoas novas, entre todas Vera Paiva (“*in memorium*”), uma amizade instantânea, porém duradoura, e Profa. Luciane (“*in memorium*”), que incentivou me e ensinou me em tão pouco tempo a beleza da informática. Vocês serão sempre lembradas por mim. Obrigada!

A Lorena, minha profa de Inglês/Espanhol (Faepe/UFLA), por ser minha amiga e por ter dispensado seu valioso tempo comigo estudando periódicos em inglês/espanhol pelas madrugadas adentro.

À Biblioteca da UFLA, nas pessoas de Marcinho, Ana, Miguelito (só eu o chamo assim) e todos os demais que eu não nomeei, obrigada por todo o carinho e atenção a mim dispensada.

Ao pessoal da limpeza na pessoa de D. Raquel, que sempre manteve o laboratório nas melhores condições para o prosseguimento dos trabalhos. Obrigada.

Ao Xerox/UFLA, na pessoa da “Fran” e da sua equipe, obrigada por me atenderem sempre bem e com presteza, e me deixarem pendurar!

A Cantina do Saulo/Angélica-UFLA e a todos os “gatos” e as “gatas” da cozinha, obrigada por cuidarem de mim, da minha “comidinha” e do meu café! Valeu “gente”!

Marcinho (meu “personal trainer”), e a todos os guardas de segurança (UFLA), que sempre zelaram pela minha segurança nas madrugadas de trabalho dentro dos Laboratórios de Química Orgânica/ Morfologia, obrigada.

Aos amigos que adquiri na cidade de Lavras, Juventino Júnior (P&C), Flávio (Video Way), Ju e Ed (mercearia), Laurindo Júnior e Márcia (meus

senhorios), Júnior (Antônio Américo/ Shan), Sr. Toninho (caldo de feijão), Roberto (peixe), Homero (Cultura-teatro) e todos que direta ou indiretamente, contribuíram para minha estadia, meu muito obrigada por tornarem minha vida na cidade a melhor possível. Eu amo Lavras....

BIOGRAFIA

Grécia Oiama Dolabela Bicalho nasceu em Franca Estado de São Paulo, e desde os cinco anos reside em Belo Horizonte com a família de nove irmãos, sendo a mais nova. Formou-se na PUC/MG (Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais em Ciências Biológicas com muitos anos de experiência na profissão, participa de projetos educacionais na rede privada e pública, ministra aulas no segundo grau, pré-vestibulares, faculdades e universidades, levando o ensino de terceiro grau ao interior de Minas Gerais. Participou de inúmeros concursos, passando em todos, inclusive de contos e poesias; é homeopata, terapeuta floral de Minas e do Planalto Central, fitoterapeuta e praticante, desde muito tempo, de toda a medicina holística e natural. Apicultora e filiada a Apimig, sendo membro também da Famig. Participante ativa de ações voluntárias junto à comunidade, tais como: preservação do meio e coleta seletiva do lixo, benefícios do mel e da própolis na alimentação escolar, uso de alimentação alternativa e agricultura orgânica, montagem de bibliotecas nas escolas públicas do interior de Minas Gerais, em que os projetos de cursos emergenciais da PUC/MG realizavam -se; por Belo Horizonte e por todo o interior de Minas Gerais.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Retrospectiva histórica das plantas medicinais.....	4
2.2 Aspectos taxonômicos do gênero em estudo.....	8
2.3 Aspectos taxonômicos de <i>Bauhinia holophylla</i> Steud.....	9
2.4 Compostos orgânicos presentes em <i>Bauhinia</i> spp.....	13
2.5 Aspectos farmacológicos de <i>Bauhinia</i> spp.....	16
2.6 Compostos primários e secundários	18
2.6.1 Óleos essenciais ou óleos voláteis.....	21
2.6.2 Flavonóides.....	24
2.6.3 Taninos.....	26
2.6.4 Saponinas.....	27
2.6.5 Cumarinas.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material Botânico.....	30
3.1.1 Metodologia de Coleta do Material Vegetal.....	30
3.1.2 Morfologia	32
3.1.3 Anatomia.....	32
3.1.4 Cortes a mão livre	32
3.2 Preparação dos extratos.....	32
3.2.1 Testes fitoquímicos – Prospecção fitoquímica	35
3.2.2 Fracionamento dos extratos.....	36
3.2.3 Caracterização e identificação das substâncias.....	40

3.2.4	Extração do óleo essencial e identificação de seus componentes	40
3.3	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Aspectos morfológicos da planta.....	43
4.1.1	Descrição da morfologia da <i>Bauhinia holophylla</i>	43
4.1.2	Tricomas secretores e tectores.....	44
4.2	Avaliação fitoquímica dos extratos	47
4.2.1	Preparação dos extratos.....	47
4.2.2	Screening fitoquímico	48
4.2.3	A cromatografia	51
4.2.4	Caracterização e isolamento dos constituintes químicos	51
4.2.5	Aspectos físico-químico das substâncias isoladas	53
4.2.6	Obtenção do óleo essencial analisando diferentes parâmetros.....	54
4.3	Análise estatística.....	56
4.3.1	Dados estatísticos.....	56
4.3.1.1	Interpretação	57
5	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS	65
	ANEXOS A	70

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

-CH₃ – Grupo Metila.

-CH₂ – Grupo Metilênico.

-CH – Grupo Metínico.

-C=O – Grupo Carbonila.

CCD – Cromatografia de Camada Delgada.

CG – Cromatografia em Fase Gasosa.

CLC – Cromatografia Líquida de Coluna.

EM – Espectrofotometria de Massa.

g – Grama

°GL – Gay Lussac

g/mol – Grama por mol

I₂ – Iodo.

L – Litro.

mL – Mililitro.

NaCl – Cloreto de sódio.

-OH – Hidroxila.

P₂O₅ – Pentóxido de fósforo.

RMN¹ H – Ressonância Magnética Nuclear de Próton.

Teste F – teste de Friedman.

RESUMO

BICALHO, Grécia Oiama Dolabela. **Estudo fitoquímico e morfológico de folhas de *Bauhinia holophylla* Steud.** LAVRAS: UFLA, 2002. 74 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia)*

Bauhinia holophylla é uma planta vulgarmente conhecida como miroró, mororó, pata-de-vaca, unha-de-vaca, pata-de-boi, sendo comum no Cerrado mineiro. Na localidade do norte do Estado de Minas Gerais, o miroró é amplamente utilizado em forma de chá de suas folhas, com o propósito de emagrecimento. Com base nesse princípio, realizaram-se pesquisas fitoquímicas das folhas de *Bauhinia holophylla* em 6 etapas principais e complementares. As folhas foram coletadas na cidade de Lavras-MG, em campos abertos de Cerrado. Experimentalmente, no laboratório de Química Orgânica da UFLA (Universidade Federal de Lavras), foram realizados: extração de óleo essencial, pela técnica “arraste a vapor” das folhas frescas (0,01%) secas à sombra (0,02%), secas em estufa ventilada a 42 °C (0,04%) e liofilizadas (0,05%), as quais passaram por análises em Infravermelho e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massa. Os estudos foram conduzidos com o objetivo de estabelecer procedimentos mais precisos, de modo a otimizar o tempo, rendimento quantitativo e qualitativo do óleo essencial extraído. Levantamento estatístico foi efetuado de modo a comparar o rendimento do óleo essencial das folhas entre dois aparelhos de Clevenger. Para a extração a frio, foram utilizadas 500g de folhas secas e trituradas, formando uma “torta”, que passou por uma série de solventes (de polaridade crescente) e que, forneceu extratos majoritários: etanólico (4,121%) e metanólico (3,432%), os quais foram separados para a coluna cromatográfica e análise em cromatografia de camada delgada. O *screening* fitoquímico clássico revelou (análises qualitativas) a presença de inúmeros compostos orgânicos, entre eles os flavonóides, taninos, saponinas, derivados de cumarinas, carotenóides, catequinas, purinas, depsídeos e depsidonas, açúcares redutores, esteróides e triterpenóides, ácidos orgânicos e azulenos. No Departamento de Biologia da UFLA (Universidade Federal de Lavras), Laboratório de Morfologia Vegetal, as folhas de *Bauhinia holophylla* foram utilizadas para determinação dos índices estomáticos e de tricomas secretores, bem como para estudos morfo-anatômicos, provas histoquímicas e preparação de exsiccatas que serão

* Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças Cardoso (Orientador), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA, Ms. Manoel Losada Gavilanes - UFLA, Dra. Angelita Duarte Corrêa - UFLA.

depositadas em diferentes herbários do País. Após os experimentos, concluiu-se que os solventes mais adequados para a extração das folhas de *Bauhinia holophylla* foram o etanol e o metanol, e o processo de liofilização para extração de óleo obteve maior rendimento em peso.

ABSTRACT

BICALHO, Grécia Oiama Dolabela. **Phytochemical and morfological study of leaves of *Bauhinia holophylla* Steud.** LAVRAS: UFLA, 2002. 74 p. (Dissertation - Mastery in Agronomy)*

Bauhinia holophylla is ordinary known as “miroró”, “mororó”, “pata-de-vaca”, “unha-de-vaca” e “pata-de-boi”, and this plant is common in the ridge of mountain of Minas Gerais. At the north of the state of Minas Gerais, *Bauhinia* leaves are widely used in tea preparations in order to make people to lose weight. Based on this principle, many phytochemical researches of *Bauhinia holophylla* were realized in 6 main and complementary steps. The leaves were collected in Lavras city – MG, in open meadow fields. At the Organic Chemistry Laboratory of UFLA (Lavras Federal University) experimental studies were made, such as: extraction of essential oil by the steam dragging technique of the green leaves (0,01%) wich were dried in shade (0,02%), dried in aerated stove at 42 °C (0,04%) and lyophilized (0,05%), which were analyzed by infra-red and gaseous chromatography with mass spectrometry. The studies were leading with the purpose of stablishing more exact procedures in order to optimize the time and quantitative and qualitative yield of the essential oil extracted. A statistic study was done to compare the essential oil yield in two Clevenger equipments. For the extraction at environmental temperature, 500g of dried and grinded leaves forming a “dough”, that passed through a series of solvents (of increasing polarity) and supplied major extracts: ethanolic (4,121%) and methanolic (3,432%) which were separated for the chromatographic column and thin layer chromatography analysis. The classical phitochemical *screening* revealed (qualitative analysis) the presence of numerous organic composites, such as: flavonoids, tanines, saponines, cumarine derived substances, carotenoids, catequines, purines, depsides and depsidines, reductive sugars, steroids and triterpenoids, organic acids and azulenes. At the Vegetable Morphology Laboratory of the Biology Department (UFLA) the *Bauhinia holophylla* leaves were used to determine the secreting trichomes, as well as morph-anatomical studies, histochemical proofs and preparation of exsiccated samples that will be placed in different herbaria around the country. After these experiments, it was concluded that the most adequate solvents to extract the substances from the

* Guidance Committee: Dra. Maria das Graças Cardoso (Adviser), PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA, Ms. Manoel Losada Gavilanes - UFLA, Dra. Angelita Duarte Corrêa – UFLA (Co-advisers)

Bauhinia holophylla leaves were ethanol and methanol and the lyophilizing process to extract the oil obtained the best yield in weight.

1 INTRODUÇÃO

O hábito tradicional de aplicação de plantas no restabelecimento da saúde pela comunidade nos últimos anos tornou-se mais intenso em todo o mundo civilizado. Nossos ancestrais tiveram as suas próprias experiências com a flora e selecionaram as plantas úteis existentes na natureza sob vários enfoques. Esse legado veio subsidiar as gerações que nos precederam, e que, por sua vez, ampliaram essas descobertas, de modo que plantas similares encontradas nas proximidades locais foram sendo testadas no tratamento de sintomas semelhantes. Posteriormente, os botânicos classificaram essas novas plantas como pertencentes às mesmas famílias e, às vezes, aos mesmos gêneros. Inúmeros autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos realizados com espécies da flora nativa, ressaltando as potencialidades de várias delas, bem como da necessidade de maiores estudos na riquíssima flora brasileira, levando-se em conta não só o valor das plantas medicinais como recurso terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos. A alta nos preços dos medicamentos tem levado uma boa parte da população a se voltar para o uso da flora medicinal, na esperança de minorar ou conter seus sofrimentos. Com a demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, o cultivo e/ou o extrativismo dessas tornou-se uma alternativa cada vez mais importante na agricultura nacional. O comércio de ervas tidas como medicamentosas já se apresenta como uma nova opção de sobrevivência para inúmeras famílias. Salienta-se, portanto, que nas pequenas e grandes cidades, os raizeiros, com suas bancas ambulantes, e os balcões definitivos de casas especializadas no ramo têm-se multiplicado.

O uso de terapias alternativas disponíveis, a Fitoterapia, a prática do uso de plantas ou suas partes com finalidades terapêuticas vêm-se impondo

atualmente e já não pode ser considerado como simples modismo. Mesmo com o avanço da Química, ainda é grande a utilização de infusões vegetais sem qualquer comprovação científica de sua eficácia, sendo, na maioria das vezes, empregadas fundamentando-se no conhecimento empírico ou tradicional da população.

As plantas, ao se desenvolverem em diversos ambientes, apresentam uma enorme flexibilidade de adaptação implicando modificações nas formas anatômicas, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Atualmente, tem aumentado a atenção ao comportamento bioquímico das plantas e sua adaptação aos diferentes ambientes envolvendo o metabolismo primário e secundário. As respostas bioquímicas para vários fatores ambientais dos vegetais envolvem uma ou mais alterações bioquímicas das células das plantas. Essa variação pode ocorrer ao longo do seu desenvolvimento, dependendo de inúmeras características, tanto genéticas (indivíduos, populações), ecológicas (pressões de variações no clima, solos, competidores entre outros), quanto fisiológicas (estádios de desenvolvimento, ritmo estacional, rotas metabólicas alternativas, hormônios e estágio reprodutivo).

A produção de metabólitos secundários está sujeita à variação de fatores exógenos e endógenos; portanto, no cultivo de espécies medicinais, deve-se levar em conta fatores genéticos, fisiológicos e ecológicos que influenciam a produção de fármacos, lembrando que nem sempre as condições ideais para o desenvolvimento e produção de biomassa são as mais adequadas para a produção de princípios ativos de interesse. Uma planta medicinal pode ser eficiente em um ambiente e ser ineficiente em outras condições.

As pesquisas com plantas medicinais em menor ou maior grau abrangem o universo de diferentes áreas do conhecimento. À Botânica, na qual os estudos atêm-se à identificação, descrição morfológica e compilação de dados em herbários, complementa-se à quimiotaxonomia, que utiliza os produtos do

metabolismo secundário em estudos visando ao estabelecimento de *relações filogenéticas*; na Etnofarmacologia, o estudo concentra-se no levantamento de informações junto à população, concernentes à forma de preparo, período de coleta e indicações terapêuticas. A Fitoquímica compreende estudos referentes ao isolamento, purificação e determinação estrutural dos princípios ativos, enquanto a Farmacologia e a Bioquímica verificam as ações biológicas alegadas ou buscam atividades ainda não relatadas, avaliam a toxicidade e determinam o mecanismo de ação. A interdependência dessas áreas revela o valor de suas contribuições e, dentro desse contexto, verifica-se que técnicas de manejo de culturas ainda são escassas. Percebe-se que as pesquisas com plantas medicinais visando aos aspectos etnobotânico, químico, farmacológico pré-clínico e clínico conduzem à utilização da planta com segurança e eficácia terapêutica. Na atualidade, o que tem recebido atenção especial da ciência reside no conhecimento sobre as interações entre os fatores do ambiente físico e a biossíntese de compostos secundários, particularmente no que se refere ao fotocontrole de aspectos qualitativos e quantitativos sobre a via dos fenilpropanóides.

Com o presente trabalho objetivou-se o estudo fitoquímico e morfológico das folhas de *Bauhinia holophylla* Steud., vegetal genuinamente brasileiro e presente no Cerrado e na transição do Cerrado/Caatinga de Minas Gerais, tendo em vista a hipótese levantada pela comunidade de Montes Claros sobre as características emagrecedoras e hipoglicêmicas dessa planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Retrospectiva histórica das plantas medicinais

A origem do uso das plantas medicinais pelo homem remonta à pré-história. Alimentando-se de ervas e raízes, aqueles primatas utilizavam os vegetais por instinto, como medicamento. Registros arqueológicos provam que há milênios, diversos povos, principalmente os orientais, conheciam o poder das plantas medicinais como substâncias aromáticas, óleos essenciais, remédios, venenos ou como expansoras de consciência (apurando os sentidos e provocando sensações diferentes daquelas conhecidas neste plano de realidade).

A história do uso de ervas como medicamento está associada a lendas, práticas mágicas e ritualísticas. A Índia possui a mais antiga prática médica: a medicina Ayurvédica, existente há mais de 10 mil anos. Baseada nos Vedas (livro sagrado contendo mais de 700 produtos diferentes), foi a pioneira em codificar o uso de perfumes e substâncias aromáticas para fins cerimoniais e terapêuticos. Sempre conhecida como o “Maná das Drogas Ativas”, esse país exportava canela, mirra, sândalo, gengibre, coentro e cardamomo.

A civilização egípcia, com aproximadamente 4 mil anos, ficou conhecida como o berço da medicina, perfumaria e farmácia. Os egípcios utilizavam ervas na religião, saúde e higiene. Conheciam os efeitos das substâncias aromáticas no corpo e na psiquê. Os sacerdotes faziam suas preparações lendo fórmulas e entoando cânticos, enquanto os alunos misturavam os ingredientes. O processo de maceração e pulverização podia durar meses, até chegar a determinada fragrância para uso cerimonial. Atenção especial era dada às ervas aromáticas, pois acreditavam que os aromas espantavam os espíritos das doenças.

O Egito era famoso pelo seu conhecimento na cosmética, exportava óleos perfumados, unguentos, cremes e vinhos aromáticos para todo o mundo.

Os egípcios conheciam as propriedades da papoula (sonífera, calmante), silia (estimulante cardíaco), babosa (beleza), óleo de rícino (catártico), etc. Fórmulas complicadas eram criadas combinando-se substâncias de origem vegetal, animal e mineral. Dos vegetais, faziam purgantes, diuréticos, vermífugos, condimentos para a cozinha e cosméticos. Muitos desses conhecimentos tiveram origem na cultura hebraica, conforme pode ser verificado nas citações bíblicas. Os egípcios eram mestres no embalsamento de cadáveres. Retiravam os órgãos internos, introduziam perfumes, resinas e fragrâncias preparadas. O poder anti-séptico desses óleos era tão grande, que após milhares de anos, os tecidos encontravam-se em bom estado de conservação.

A China, possuindo também uma medicina tradicional, há 2 mil anos publicou o primeiro livro de ervas medicinais com 365 espécies catalogadas. Os chineses desenvolveram estudos contínuos e, 700 anos depois, publicaram a primeira farmacopéia com mil plantas diferentes. Eles cultivavam ruibarbo, acônito, romã e gengibre (considerado sagrado e empregado em diversas doenças). Os chineses conheciam mais de 125 drogas consideradas tóxicas, utilizando-as com eficácia nas enfermidades. Em 1578, Li-Chi-Chen reuniu todos os conhecimentos existentes no campo da Farmacologia, com 1954 prescrições médicas, relacionando mais de mil drogas de origem vegetal, animal e mineral, distribuído em 16 capítulos.

Os assírios, babilônicos, fenícios e árabes também conheciam os poderes das plantas. Relacionaram 250 ervas com propriedades curativas e os diversos modos de aplicação: infusão, cataplasma, inalação. Faziam uso do hortelã, aniz, beladona, de águas aromáticas e tinturas. Os babilônicos, através do código de hamurabi, fizeram regulamentações sobre o exercício da medicina, prevendo severa punição para quem exercesse mal a profissão de médico, chegando a imputar pena de morte ao infrator.

Os gregos muito contribuíram para o avanço da Farmacologia. Hipócrates, intitulado o Pai da Medicina, escreveu em 400 a.C., a obra "*Corpus Hipocraticum*", onde abordava a arte de curar com diversas espécies vegetais, ressaltando a importância da alimentação natural como base para o tratamento das doenças.

Os romanos absorveram todo esse conhecimento e ficaram famosos pelo emprego de plantas venenosas com as quais muitas vezes livrava-se dos inimigos. Discórides (século I d.C.) foi o fundador da matéria médica e publicou um livro com uma listagem de 600 ervas medicinais. Plínio, no mesmo século, foi o responsável pela teoria afirmando que para cada doença haveria uma planta específica para o seu tratamento. Possivelmente, baseado em seus estudos, desenvolveu-se a doutrina dos signos, onde as divindades afirmavam que "cada planta trazia em si, um sinal de sua utilidade para a medicina". Este foi responsável por uma enciclopédia de plantas medicinais com 37 volumes. A queda do império Romano e o advento do Cristianismo trouxeram um declínio das artes e das ciências de maneira geral, mas graças à civilização árabe, a alquimia teve um grande avanço. Os árabes reavivaram o uso da antiga alquimia, com origem no Deus Egípcio *Tehuti* e aperfeiçoaram as técnicas. O filósofo Avicena inventou a serpentina refrigerada que foi um "achado" no processo de destilação.

A visão alquimista era, de certa forma, uma busca espiritual, em que a destilação era o símbolo da purificação. Afirmavam os alquimistas que tudo na natureza era feito de um corpo físico, uma alma e um espírito. O princípio básico era "dissolve e coagula" isto é, dissolver o corpo físico e condensar depois a alma e o espírito, concentrando, dessa forma, todo o poder curativo: a Quintessência. As substâncias eram destiladas inúmeras vezes, a fim de retirar todas as impurezas e transformar-se em um poderoso remédio. As Quintessências (os óleos essenciais) foram, durante séculos, o único meio de

combater as epidemias da época. A alquimia foi levada para a Europa pelos Cruzados, mas por causa dos dogmas da Igreja, defendidos pela Santa Inquisição, muitos filósofos, alquimistas e curandeiros foram perseguidos e até queimados na fogueira.

No século XV, com o Renascimento, houve um grande impulso na pesquisa científica e no método experimental. Na corte de Luis XIV, o médico Nicholas Lemery descreveu diversos preparados no livro "*Dictionaire des Drogues Simples*". Nessa época, difundiu-se muito, o uso da água de melissa e da água de colônia.

No século XVI, destaca-se principalmente o médico suíço Paracelso (1493-1541) que reativou o princípio da similitude onde a forma exterior da planta indicava para qual órgão ela servia. Aprofundou essa teoria, estabeleceu semelhanças entre a cor, a forma do remédio e os sintomas a ser tratado. Escreveu livros sobre Botânica Oculta e deu grande impulso à Química Farmacêutica. Segundo este, o propósito da Química era vencer as doenças e não garantir a felicidade a quem encontrasse a Pedra Filosofal. Foi o precursor da Medicina Natural. Afirmava que o papel do médico era estimular a resistência do organismo, usando remédios naturais, ajudando a desenvolver a capacidade de auto cura do doente o qual deveria ter sempre pensamentos positivos. Depois de Paracelso, destaca-se Samuel Hahnemann, responsável pelos fundamentos da medicina homeopática, retirando das plantas, o valor terapêutico através da dinamização infinitesimal do seu poder de cura.

No Continente sul americano, os Incas desenvolveram sua terapia natural baseada nos conhecimentos das tribos, que dominavam com o emprego de plantas psicoativas, buscando estados alterados de consciência, o que os possibilitava "ver" com a percepção a causa das doenças e o remédio da natureza para se realizar a cura.

O conhecimento indígena não pode ser aqui esquecido, pois tem provocado espanto na ciência contemporânea por tratar-se de um outro tipo de ciência, muito antiga, que difere dos princípios da lógica e dos cinco sentidos convencionais, conduzindo a estados alterados de consciência. Richard Schultze, um dos maiores botânicos do mundo moderno, afirma que tratar desse assunto é um verdadeiro desafio, pois, dentro da medicina indígena, a doença do corpo e da alma está intimamente ligada.

As divindades existentes nas plantas são manipuladas com grande sabedoria pelo Xamanismo Amazônico, uma tradição importantíssima, baseada no uso de plantas sagradas como o cipó jagube (*Banisteriopsis caapi*) e a folha rainha (*Psychotria viridis*) que, em cozimento originam o chá Ayahuasca, conhecido como Santo Daime, Vegetal Iagé, Camampi, etc. A utilização de ervas medicinais é muito importante para o Xamã ou curandeiro, pois muitas receitas dependem do seu conhecimento no preparo do medicamento, ou seja, a “bebida mágica”. No caso, o Santo Daime irá mostrar a ele quais as ervas que aquela pessoa precisa para se restabelecer.

A partir do século XIX começou a haver um declínio da terapia vegetal. Os cientistas passaram a reproduzir em laboratórios apenas os princípios ativos mais importantes das plantas. Mesmo assim, descobriram a penicilina (do bolor do pão) e a aspirina (da bétula, gualtéria e ulmária).

Com o advento da II Guerra Mundial e o avanço dos medicamentos sintéticos e da indústria farmacêutica, o uso das plantas medicinais foi totalmente esquecido, ficando até a década de 80 a Botânica separada da Medicina, quando, então, passou a ser revalorizada pelo seu poder curativo.

2.2 Aspectos taxonômicos do gênero em estudo

O gênero *Bauhinia* é pré-lineano e foi descrito em 1703 por Charles Plumier. A partir do século XIX começaram as divergências entre os

taxonomistas; alguns adotando o conceito clássico e amplo de *Bauhinia* e outros fundando gêneros afins, que seriam reconhecidos mais tarde como seções do referido gênero (Vaz, 1979). Finalmente, Benth (1870) manteve o sentido amplo de *Bauhinia*, dividindo as espécies brasileiras em três seções. Uma delas, a seção *Pauletia* (Cav.) DC, abrange as espécies não-escandentes arbustivas e arbóreas, incluindo *Bauhinia holophylla*. As outras duas, *Scnella* e *Tylotaea*, incluem espécies escandentes, lianas e arbustos, e a maioria das espécies da seção *Tylotae* ocorre na Floresta Pluvial Tropical Amazônica, com forte endemismo (Vaz, 1979).

Esse gênero apresenta atualmente cerca de 915 espécies. Tem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Ceará, Paraná, Santa Catarina e em outros países da América Latina, como Paraguai, Peru, Bolívia, Uruguai e Argentina e, em outros continentes, como o Asiático e o Africano (Corrêa, 1984; Rezende, 1987; Schacht, 1992).

2.3 Aspectos taxonômicos de *Bauhinia holophylla* Steud.

Bauhinia holophylla Steud é uma leguminosa que pertencia originalmente à família *Leguminosae*, sub família *Caesalpinioidea*. Entretanto, segundo a classificação recente de Cronquist (1981), a espécie passa a pertencer à Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Subclasse *Rosidae*, ordem *Fabales*, à família *Caesalpinaceae*. Está classificada na seção *Pauletia* dentro do gênero *Bauhinia* e possui sinônimos científicos. No Brasil, existem 64 espécies de *Bauhinia* sp., que se distribuem por todo o território brasileiro (Salatino, 1976). Esse ressalta ainda, sobre a importância de se conhecer as espécies do gênero, considerando o interesse taxonômico, filogenético, ecológico e econômico. Entre elas, destaca-se *Bauhinia holophylla* Steud., que segundo Costa (1942) é uma espécie genuinamente brasileira.

Vulgarmente conhecida como miroró, mororó, pata-de-vaca, pata-de-boi, pata-de-anta, é um vegetal arbustivo, originário do Cerrado brasileiro, atingindo de 1 a 5 metros de altura em sua fase adulta, apresentando caule não muito lenhoso e ramos finos (ao que o povo da região norte mineira denomina de “vara” do miroró). As folhas são, na sua maioria inteiras e algumas parcialmente divididas no ápice em dois lobos ovais (lembrando a pata-de-vaca) ou lanceolados e glabras nas duas faces, palminérveas, com nove nervuras principais (variando de nove a doze nervuras dependendo do tamanho da folha) e de consistência membranácea (Figuras 1, 2, 3).

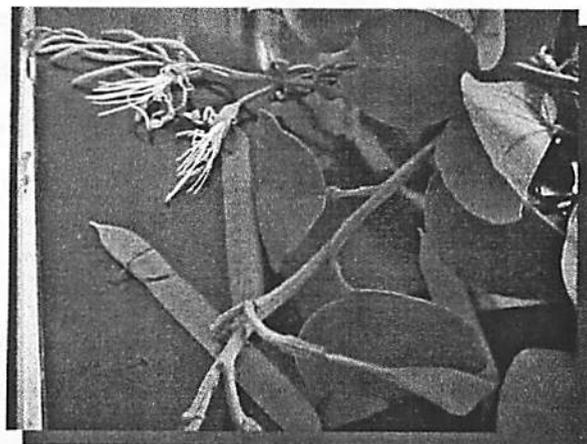


FIGURA 1 - Aspecto morfológico de *Bauhinia holophylla* Steud

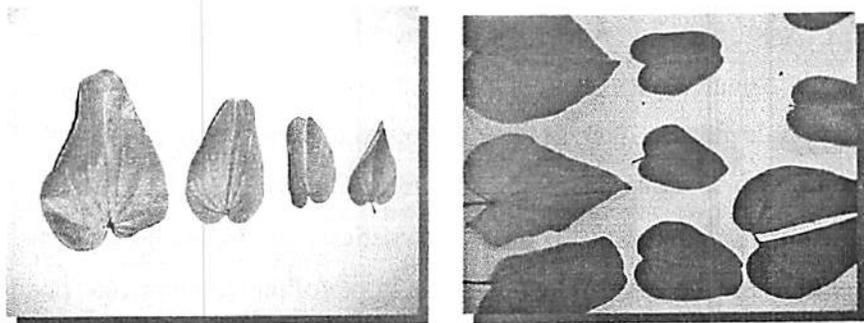


FIGURA 2 - Folhas de *Bauhinia holophylla* Steud

As flores , brancas, possuem cálice em tubo fino e pétalas largo-lineares ou oblongas. Essas são hermafroditas, possuindo de 5 a 8 centímetros de comprimento; o cálice é gamossépalo; a corola dialipétala, com cinco pétalas brancas, dez estames e um carpelo central, ovário súpero, linear. A floração ocorre, normalmente, de novembro a dezembro (Figura 3).

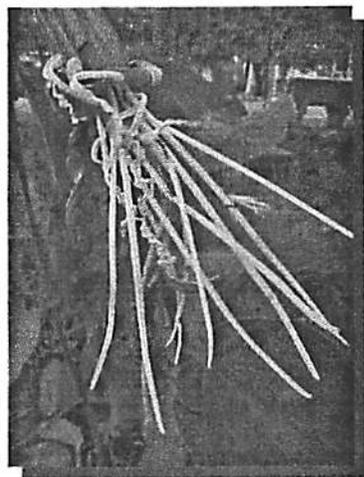


FIGURA 3 - Flor de *Bauhinia holophylla* Steud

Em relação à polinização, pelas características das flores, quando analisadas em conjunto, verifica-se que certas combinações produzem um determinado tipo de flor, ao qual está associado um mecanismo de polinização definido, caracterizando uma síndrome específica (Faegri & Pijl, 1979). Com base na literatura, verificou-se que certas características das flores de *Bauhinia holophylla* enquadram-se na síndrome de quiropterofilia (polinização por morcegos), tais como: flores brancas, grandes, expostas acima da folhagem. As espécies dessa plantas apresentam flores com grandes quantidades de pólen, outra característica importante da síndrome de quiropterofilia. Entre essas espécies, encontram-se *Bauhinia benthamian* (Ramirez *et al.*, 1984), *Bauhinia pauletia* (Heithaus *et al.*, 1974), *Bauhinia multinervia* (Hokche & Ramirez, 1990), *Bauhinia rufa* (Sazima & Sazima, 1978), *Bauhinia bongardii* (Bergallo, 1990). De acordo com Faegri & Pijl (1979), a síndrome de polinização pode ser entendida como o conjunto de características morfológicas e fisiológicas das flores que estão relacionadas com os hábitos e a morfologia dos polinizadores.

O fruto é uma vagem chata, característica da família das Leguminosas, de 4 a 7 centímetros de comprimento e grande número de sementes (Figura 4). O tipo de dispersão da *Bauhinia holophylla*, bem como de outras espécies do gênero, é autocórica, apresentando deiscência abrupta, permitindo, assim, que suas sementes sejam lançadas. Essa característica é uma reação da natureza à preservação da espécie, que é faneroépigea, isto é, os cotilédones libertam-se dos tegumentos e tornam-se foliáceos (Brandão & Cunha, 1991; Carvalho, 1994; Beltrati & Paoli, 1989).

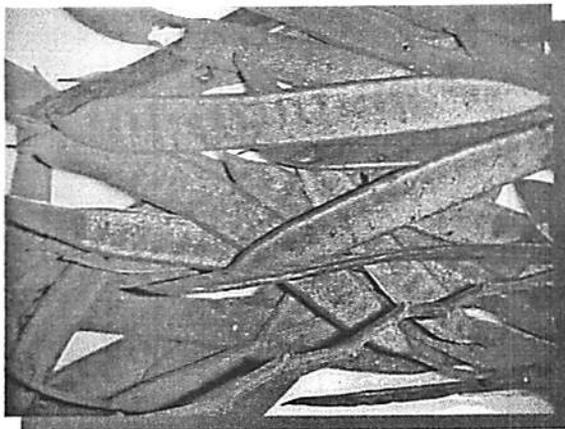


FIGURA 4 - Frutos de *Bauhinia holophylla* Steud

2.4 Compostos orgânicos presentes em *Bauhinia* spp.

Com relação à pesquisa de compostos orgânicos o gênero *Bauhinia* é pouco estudado, e até 1988, somente cerca de 10 espécies de *Bauhinia* sp. tinha sido investigada fitoquimicamente (Achenbach *et al.*, 1988). Dentre as substâncias presentes no gênero, o grupo das fitohemaglutininas tem sido o mais estudado. Compostos fenólicos, como flavonóides e ácido gálico, e substâncias terpênicas são encontradas em diversas referências do gênero. Na espécie *B. variegata* isolou-se do caule, em extrato etanólico, o canferol-3-glicosídeo (Gupta *et al.*, 1980). Pesquisas posteriores desenvolvidas por Anjaneyulu (1984), utilizando o caule de *B. racemosa*, identificaram em extrato etanólico, o composto 1,7 dihidroxi-3-metoxi-2 metil = 1 dibenzeno (2,3-6,7) oxepina conhecido popularmente como pacharina. Das cascas de *B. splendens* os pesquisadores Laux, *et al.*, (1985) conseguiram identificar o sitosterol, estigmasterol, ácido esteárico e uma dimetilenodioxiflavona denominada bausplendina. Posteriormente, pesquisando *B. candicans*, além do sitosterol 3-O- α -D-xiluranofuranosídeo, esses mesmos pesquisadores caracterizaram

glicosídeos esteroidais, todos eles com sitosterol como aglicona, porém com glicopirranose, xilopirranose e riburanofuranose (Iribarren & Pomílio, 1987).

Estudos realizados com a espécie *B. manca* mostraram a presença de vários flavonóides. Esses, foram identificados a partir de extratos diclorometânicos de partes lenhosas do vegetal, tais como o canferol, apigenina, luteolina entre outros (Achenbach, *et al.*, 1988).

Kumar *et al.* (1990), pesquisando folhas e caules de *B. vahlii*, identificaram e caracterizaram em extratos hexanólicos de caule as substâncias metil-4-O-metilgalatopiranosil e catequina, além do ácido betulínico, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, canferol e agatisflavona. Recentemente, Kuo, *et al.* (1998), trabalhando com caules da espécie *Bauhinia purpurea* identificaram no seu extrato metanólico vinte e dois compostos, incluindo flavonóides, fenóis, cromonas e açúcares e um novo composto, o 6-butil-3-hidroxi-flavanona, 6-(3 oxobutil)-taxifolin.

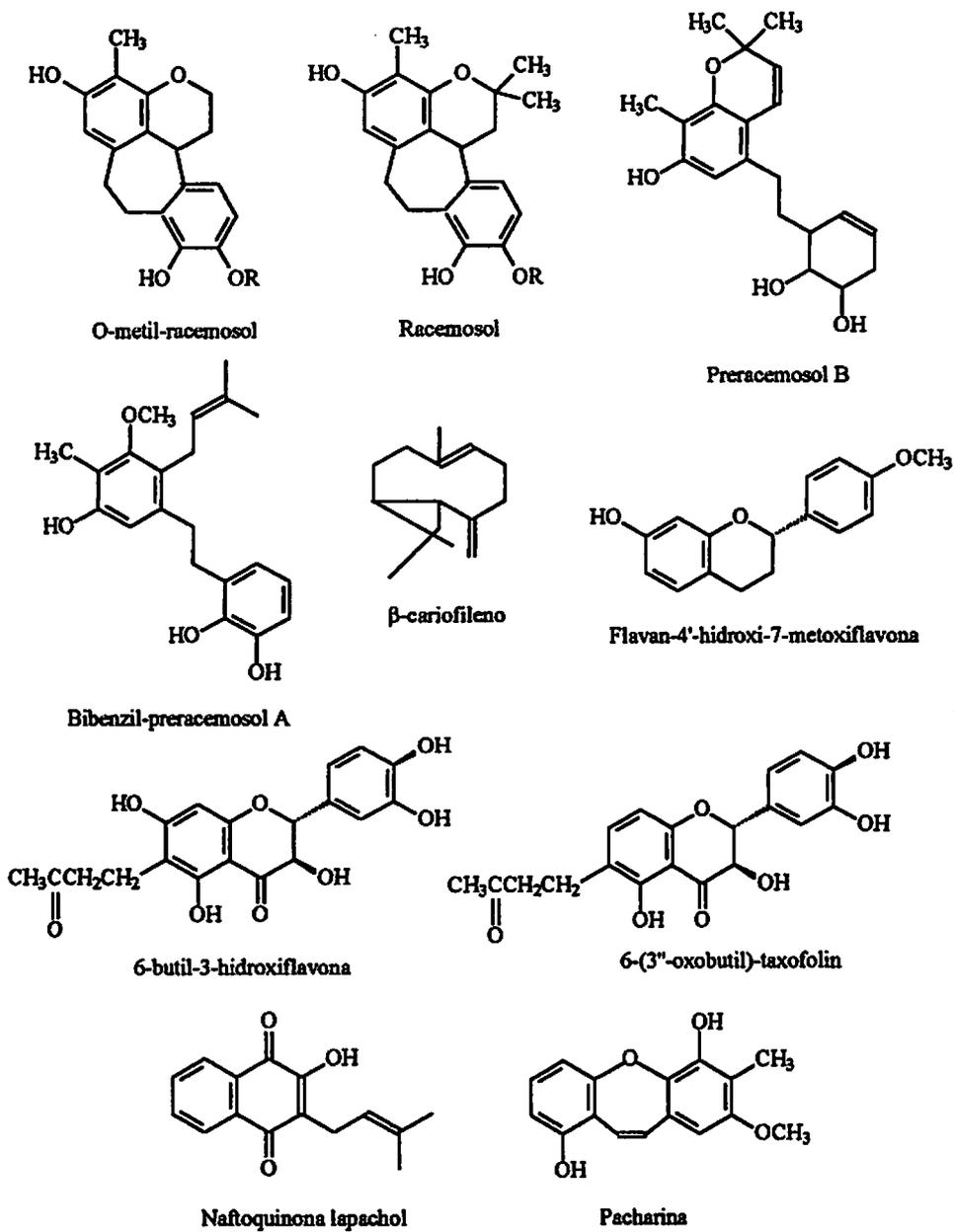


FIGURA 5 - Estruturas de alguns compostos presentes em diferentes espécies de *Bauhinia* spp.

Atribuíram a atividade antidiabética desses extratos às diversas substâncias que são encontradas, tais como: β sitosterol (Ambike *et al.*, Achenbach, *et al.*, 1988), flavonóides (Abd-el-Wahab *et al.*, 1987), mucilagens (Tomoda *et al.*, 1989), saponinas (Atta-Urrahman & Zamam, 1989) e possivelmente, uma guanidina, taninos e ácido clorogênico (Costa, 1975).

2.5 Aspectos farmacológicos de *Bauhinia* spp.

Existem atualmente cerca de 280.000 espécies de angiospermas espalhadas no mundo. Dessas, apenas uma pequena percentagem foi adequadamente estudada quanto à sua atividade farmacológica. Possivelmente, existem agentes mais valiosos contidos em plantas que ainda não foram descobertos nem estudados quanto a suas possíveis aplicações terapêuticas.

As plantas do gênero *Bauhinia* são amplamente utilizadas na medicina popular de vários países para o tratamento de diversas patologias, especialmente contra diabetes. O diabetes, caracterizado por elevados níveis de glicose no sangue e excesso de urina com sabor adocicado, é, atualmente, uma das doenças mais importantes que afetam a humanidade. Seu tratamento é feito, principalmente, à base de injeções de insulina, sendo sua ingestão ineficaz. Extratos de partes de plantas, como folhas, raízes ou sementes, têm sido utilizados, através dos tempos, pela medicina popular de praticamente todas as populações humanas no tratamento do diabetes.

O mais antigo registro de estudo clínico do uso da *Bauhinia forficata* como planta antidiabética foi feito por Juliani (1931). Conhecendo a fama da pata-de-vaca, comprovou sua eficácia pelo acompanhamento clínico e exames laboratoriais de casos de glicosúria, em que os pacientes foram tratados com chás de extrato de folhas de *Bauhinia forficata*. Todos os seus pacientes apresentaram redução da taxa de glicose no sangue. Observou-se que o efeito não era permanente e que, quando o tratamento era interrompido, os sintomas de

diabete voltavam. Após a redução na taxa de glicose no início do tratamento, o chá exercia uma função reguladora, mantendo baixo o teor de glicose no sangue. As observações do pesquisador não atestaram a capacidade de reduzir a poliúria, mas essa vem sendo ressaltada na farmacognosia (Cruz, 1965).

Compostos com propriedade anti-hiperglicêmica do tipo do metformin (N,N-dimetil guanidina) foram originalmente detectados na planta *Galega officinalis*, da família das leguminosas. Logo após a realização dos estudos que levaram à descoberta da insulina no pâncreas de cães, dois dos cientistas envolvidos apresentaram resultados, nos quais sugeriam a presença de substâncias possivelmente similares à insulina em extratos das mais diversas plantas (Collip, 1923; Best *et al.*, 1924).

Em 1976, Khann *et al.* forneceram indícios mais concretos sobre a presença de insulina em plantas. Baseados nas experiências da medicina popular indiana, isolaram de frutos e de sementes de *Momordica charantia* da família das Cucurbitáceas (melão-de-São-Caetano) uma fração protéica que reagia com anticorpo contra a insulina humana. Posteriormente, Collier *et al.* (1987) relataram o isolamento de proteínas de folhas de espinafre e de centeio e de plantas de *Lemna gibba* G3, que exibiam a propriedade de ligação ao receptor de insulina humana.

Recentemente, Oliveira *et al.* (1999) investigaram a presença de insulina nos vegetais da família das Leguminosas, utilizando o tegumento de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), feijão de corda (*Vigna unguiculata*), feijão-de-boi (*Canavalia braziliensis*) e com as folhas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), plantas bastante utilizadas no Brasil para controle do diabetes (Panizza, 1997). Além de evidenciada a presença de insulina em vagens e tegumentos de sementes de feijão-de-corda em formação, os pesquisadores detectaram a presença da insulina nas folhas de pata-de-vaca. Pela importância dessa descoberta, verifica-se que a insulina encontra-se predominantemente

associada aos cloroplastos, que são as organelas responsáveis pelos processos fotossintéticos que ocorrem nas folhas verdes (Azevedo, 2000). Diante dos resultados obtidos com plantas da família das Leguminosas, e tendo em vista os resultados obtidos com plantas de outras famílias, os pesquisadores utilizaram técnicas de imun química (ELISA) das folhas de plantas de um maior número de espécies. Essas foram selecionadas, não somente por sua conhecida ação anti-hiperglicêmica relatada na medicina popular, mas para cobrir um grande número de espécies dos diferentes grupos de vegetais, incluindo plantas típicas da Região Amazônica, conhecida por sua grande biodiversidade (Collier *et al.*, 1987; Khann *et al.*, 1976).

2.6 Compostos primários e secundários

Qualquer sistema vivo depende de processos bioquímicos complexos que caracterizam o seu metabolismo, isto é, o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo na célula, em presença de enzimas específicas que garante uma certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina rotas ou vias metabólicas, nas quais os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados, são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, respectivamente, são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação. Durante esses processos, uma série de compostos é sintetizada e degradada por meio de reações mediadas por enzimas. Os processos comuns a todos os vegetais pelos quais são sintetizados e utilizados açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e os polímeros derivados (polissacarídeos, proteínas, lipídeos, RNA e DNA) constituem o metabolismo primário, que é executado por vias comuns a todos os vegetais. Outras vias são, no entanto, utilizadas na produção de compostos que, de forma geral, não parecem ter uma função direta no crescimento e desenvolvimento,

sendo, portanto, os seus produtos denominados compostos secundários ou metabólitos secundários (Figura 6).

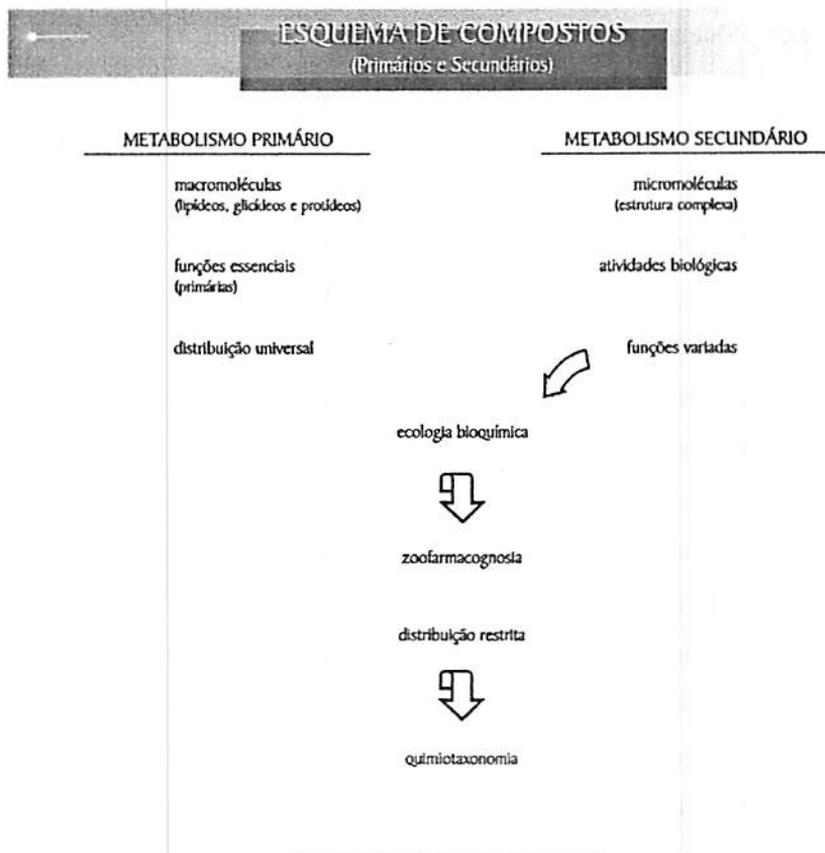


FIGURA 6 - Metabolismo primário e secundário

Até poucos anos atrás, não se conheciam as funções dos compostos secundários. Esses, tinham papel reconhecido em processos de transporte, respiração, assimilação e diferenciação; na realidade, foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. No entanto, atualmente estudos têm

indicado a inter-relação entre os metabólitos primários e secundários e as diversas funções desempenhadas pelos produtos secundários, como hormônios, transportadores de elétrons, pigmentos fotossintéticos e componentes estruturais de membrana. Outras funções, como defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e em alelopatias, estão sendo largamente pesquisadas (Wink, 1990; Harbone, 1988).

Segundo Rhodes (1994), a riqueza de metabólitos secundários em plantas é, pelo menos parcialmente, explicável, pelo simples fato de que os vegetais estão enraizados no solo e não podem se deslocar; eles não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais. O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, e a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, e frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos são de importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e da perfumaria, entre outras. Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse deriva principalmente do grande número de substâncias farmacologicamente importantes (Simões, 2000).

Os produtos secundários podem ser divididos em três grupos principais, de acordo com a sua rota biossintética: terpenos ou terpenóides, compostos fenólicos (lignina, flavonóides, isoflavonóides, taninos) e compostos contendo nitrogênio (alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, entre outros) (Figura 7).

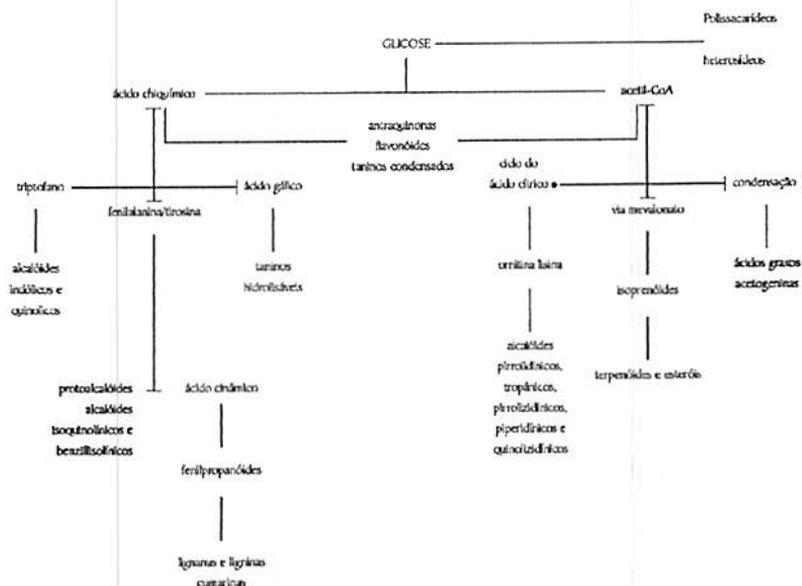


FIGURA 7 - Grupos de metabólitos e sua divisão

2.6.1 Óleos essenciais ou óleos voláteis

Entre os metabólitos secundários citados anteriormente, destacam-se as substâncias voláteis, que se difundem com facilidade a partir da evaporação, constituindo um verdadeiro elo de ligação entre a fonte produtora e o meio ambiente. Consideradas por muito tempo mero desvio das funções vitais da planta, elas são fundamentais para a inter-relação dos organismos, contribuindo, assim, de maneira decisiva para a interação co-evolucionária e para o equilíbrio entre os reinos vegetal e animal (Craveiro & Machado, 1986).

A ISO (*International Standard Organization*) define óleos voláteis como produtos obtidos de partes das plantas por meio da destilação por arraste com

vapor d'água. De uma forma geral, são misturas complexas de misturas voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem normalmente líquidas, de aparência oleosa à temperatura ambiente, originando, daí, a designação de óleo. Entretanto, a sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se assim, dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo, por isso, também chamados de essências. Eles são também solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos (Simões, 2000).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (Simões & Spitzer, 1999).

Siani *et al.* (2000) citam que os óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema; exercem papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores.

As substâncias voláteis não se formam por um único caminho, mas contêm substâncias dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como ácidos graxos e seus ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos e cumarinas. Os fenilpropanóides e,

especialmente, os terpenóides, são os principais constituintes dos óleos essenciais:

De acordo com Banthorpe & Charlwood (1980), os terpenóides são de larga distribuição no reino vegetal, e todas as plantas têm habilidade de produzir esse tipo de molécula em forma de cadeias lineares; no entanto, alguns terpenóides estão mais ou menos presentes em determinadas classes de vegetais. Dados de 1980 indicam que apenas cerca de 8% das quase meio milhão de espécies de plantas existentes tinham sido estudadas quimicamente, e que a presença de monoterpenos e sesquiterpenos apresentam distribuição restrita nas diversas classes vegetais. Constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, e esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno (Figura 8). Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (Simões, 2000). Os compostos terpenóides, assim como os demais metabólitos secundários, originam-se de rotas alternativas do metabolismo primário, em resposta à adaptação do organismo ao meio em que vive.

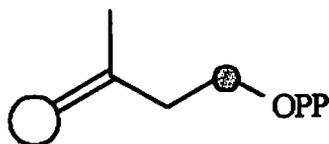


FIGURA 8 - Esqueleto básico do isopreno

A maior parte dos fenilpropanóides enquadra-se na faixa dos voláteis com ação biológica e pertence à classe dos “arrastáveis com vapor”, isto é, substâncias que possuem baixo peso molecular e podem ser extraídas de plantas pela passagem de vapor e posterior condensação. Encontra-se nessa classe

aromatizantes tradicionais, como o eugenol, obtido do óleo de cravo, a vanilina, da baunilha, entre outros (Craveiro & Machado, 1986).

Os óleos essenciais aparecem em grupos de células diferenciadas, que podem ser classificadas como estruturas secretoras externas e internas. As estruturas externas fazem parte da epiderme ou são modificações dessas, tais como pêlos glandulares ou tricomas secretores. Estes últimos foram encontrados nas folhas de *Bauhinia holophylla* Steud.

Uma das aplicações tradicionais dos óleos essenciais é na medicina, como relata Buchbauer (1993). Segundo esse, os óleos essenciais são utilizados desde a época da Rainha Cleópatra do Egito, quando era aplicado tanto medicinalmente, como para fins de desinfecção de ambientes. O uso de óleo de mirra, óleo de cedro e de outros aromáticos no processo de mumificação evidencia bem suas propriedades anti-sépticas (Tisserand, 1993).

Atualmente, têm-se inúmeras comprovações de que muitos dos óleos essenciais possuem atividade antibacteriana, e outras aplicações muito difundidas relacionam-se a utilização na culinária na forma de condimento, e na agricultura, já que pesquisadores dessa área alegam que alguns dos constituintes dos óleos essenciais podem atuar como antimicrobianos e outros como repelentes ou tóxicos para os herbívoros (Saito, 2000).

2.6.2 Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios UV), ações antifúngicas e antibacterianas e atração de polinizadores.

O esqueleto básico dos flavonóides compreende dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6), o qual resulta de rotas biossintéticas separadas; a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido

malônico (Figura 9). A primeira origina a fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos; a segunda resulta no outro anel aromático (anel A) do esqueleto básico dos flavonóides.

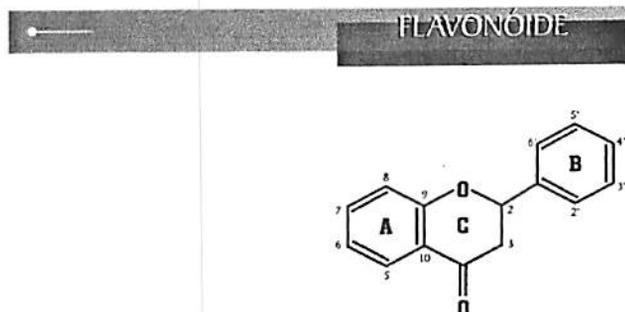


FIGURA 9 - Esqueleto básico dos flavonóides

De maneira geral, o excesso de luz estimula a formação dos flavonóides e outros compostos filtradores de luz ultravioleta (UV), que funcionam na proteção dos fotossistemas contra o excesso de luz visível e protegem o DNA contra os danos da radiação UV. Níveis crescentes de irradiância favorecem o acúmulo de flavonóides totais em relação ao tratamento mais sombreado. Considerando que flavonóides e outros fenólicos são citados na literatura como substâncias que podem funcionar como filtros de radiações para determinados comprimentos de onda, como a ultravioleta, e essa radiação estimula a síntese desses compostos, é lícito estabelecer que plantas com maior exposição à luz concentrem maiores teores de flavonóides, entre outros compostos filtradores.

Além dessas importantes atividades fisiológicas na planta, os flavonóides são considerados, em estudos com espécies medicinais, como substâncias altamente ativas, com variados efeitos terapêuticos como anticânceres, antiinflamatórios e hipoglicemiantes, apresentando ainda atividade contra artrite e malária, dentre outras desordens fisiológicas.

Dessa forma, por meio de pesquisas que investiguem os efeitos da irradiância sobre a síntese dessas substâncias pode-se sugerir condições de cultivo que otimizem a sua produção.

2.6.3 Taninos

Os taninos são substâncias com sabor adstringente, de estrutura variada, com massa molar compreendida entre 300 a 2000 g/mol, com propriedade de curtir a pele morta, transformando-a em couro. Em pele viva, promove adstringência. São particularmente abundantes em certas famílias, como *Leguminosae*, *Rosaceae*, *Mirtaceae*, *Rubiaceae*, etc (Silva, 1995).

Essas substâncias podem estar distribuídas em diversos órgãos: folhas (abacate, chapéu-de-couro, cravinho, confrei, espinheira-santa, goiabeira, mentrasto, orégano, poejo, pitanga, quebra-pedra, sabugueiro, tanchagem, tomilho etc), sumidades florais e frutos.

São bons inibidores enzimáticos e atuam como anti-venenamento por determinados alcalóides. São muito utilizados em loções cosméticas (limpeza de pele) e como anti-diarréicos, por suas propriedades adstringentes, veinotrópicas (aumentam a resistência das veias e pequenos vasos) e hemostáticas. Apresentam ação antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória ovariana, antiespasmódica e hipoglicemiante.

Podem ser classificados em taninos hidrolisáveis (derivados do ácido gálico e do ácido elágico) e condensados (derivados da catequina). Estes últimos são representados pelas catequinas, diferindo fundamentalmente dos

elagotanos, por apresentarem estrutura muito semelhante aos flavonóides (flavan-3-ol) e não possuírem açúcares em sua molécula.

2.6.4 Saponinas

As saponinas são heterosídeos formados por constituintes aglicônicos de natureza esteróide ou triterpênica, ligadas a longas cadeias glicídicas (Costa, 1978).

De acordo com Oakenfull (1981), as saponinas são substâncias sólidas, brancas ou amareladas, geralmente amorfas, dispersíveis na água. O fato de suas soluções aquosas formarem espuma persistente por agitação e muitas vezes serem hemolíticas, não é exclusivo das saponinas, mas comuns às substâncias tensoativas em geral, não podendo ser prova inequívoca da presença de saponinas. Esses compostos ocorrem em uma grande variedade de plantas, algumas usadas como alimento, como, soja, grão-de-bico, amendoim (Leguminosas) e espinafre. Inúmeras saponinas têm sido identificadas em diversas plantas nos últimos anos, tendo suas estruturas químicas elucidadas e suas ações farmacológicas estudadas (Mahato *et al.*, 1988).

Dentre essas propriedades farmacológicas, destacam-se suas atividades como expectorantes e antiinflamatórias. É bem conhecido que dietas com saponinas reduzem o colesterol plasmático em animais. As saponinas na dieta formam complexos com ácidos biliares, impedindo a sua reabsorção e aumentando sua excreção fecal. Dessa forma, ocorre estímulo da conversão hepática do colesterol em ácidos biliares, pela inibição da hidroxilase microsomal, que catalisa a reação (Mahato *et al.*, 1988; Oakenfull, 1981; Goodman & Gilman, 1978).

Com relação à toxicidade, segundo Kajiki (1996), a ingestão oral de saponinas é praticamente inócua, mas quando injetadas na corrente sanguínea, agem como poderosos hemolíticos, mesmo em altas concentrações.

Hostettmann, Kizu & Tomomori (1982) demonstraram a atividade moluscucida de várias saponinas contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*. Jain & Tripathi (1991) sugerem que plantas como *Agave cantala*, *Phaseolus vulgaris* (Leguminosa) e *Balanites roxburghii* produzem saponinas para evitar o ataque de moluscos e insetos fitófagos.

2.6.5 Cumarinas

As cumarinas são compostos derivados da benzopirona. Ocorrem nas plantas em sua forma livre ou como heterosídeos (ligados a açúcares). São encontrados principalmente nas famílias *Leguminosae*, *Rutaceae*, *Labiatae*, *Gramineae*, *Umbelliferae*. e em outras famílias com menor frequência.

São derivadas de lactonas do ácido D-hidroxi-cinâmico e apresentam odor característico, usado em perfumes como fixador. São largamente utilizadas como anticoagulantes orais (warfarina e bis-hidroxi-cumarina), têm propriedades estrogênica (cumestrol), fotossensibilizante (bergapteno, psoraleno), antibacteriana (novobioscina), vasodilatadora (visnadina) e antiespasmódica (escopoletina) (Silva, 1995).

Na área de medicamentos, destacam-se os derivados da 4-hidróxi-cumarina, o que levou à descoberta da ação anticoagulante do dicumarol, o primeiro fármaco que constituiu o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico da 4-hidroxi-cumarina, do qual derivam importantes fármacos, como a warfarina, entre outros (Hardman & Limbird, 1996). Cumarinas contendo grupos di-hidroxilados em posição orto como a fraxetina, esculetina e 4-metilesculetina são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem íons ferro. Essas propriedades as tornam substâncias de interesse como antioxidantes, de possível aplicação na prevenção de doenças causadas por radicais livres (Martín-Aragón *et al.*, 1996).

Vários trabalhos científicos já foram realizados evidenciando as importantes atividades farmacológicas apresentadas pelas xantonas. De todas as atividades atribuídas às xantonas, talvez a mais interessante seja a ação inibitória da enzima monoamino-oxidase (MAO), atividade relacionada com o tratamento de estados depressivos. Algumas xantonas (naturais e sintéticas) apresentam atividade antimicrobiana e diversas outras atividades foram atribuídas, como inibição da agregação plaquetária, ações hepatoprotetora, antiinflamatória e hipoglicêmica, entre outras. Por outro lado, a toxicidade de xantonas ainda é pouco estudada (Simões, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

O presente trabalho foi realizado com plantas adultas de *Bauhinia holophylla*, provenientes dos campos de Cerrado aberto na cidade de Lavras, localizados ao sul da Estação Rodoviária da cidade. A identificação botânica da espécie foi realizada por comparação com material existente no Herbário da ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA-MG). Uma exsicata coletada no local de estudo citado anteriormente foi incorporada ao acervo do Herbário, sob o registro nº 17056.

3.1.1 Metodologia de Coleta do Material Vegetal

O objeto de estudo foram as folhas de *Bauhinia holophylla*. Folhas saudias, sempre do 3º, 4º e 5º nós (folhas expandidas), com ausência de infecções, foram coletadas de 30 espécimes adultos vigorosos de janeiro a dezembro de 2001, e separadas para estudos morfoanatômicos e químicos (Figura 10).

Para o estudo anatômico, foram coletados e feitos cortes histológicos de cada planta adulta na região das folhas do terceiro, quarto e quinto nós, contadas a partir do nó apical, exposta ao sol, observadas sem auxílio de lupa. Dessas, foram selecionadas regiões do ápice, base, limbo, margem, nervura central e pecíolo (Figura 11).

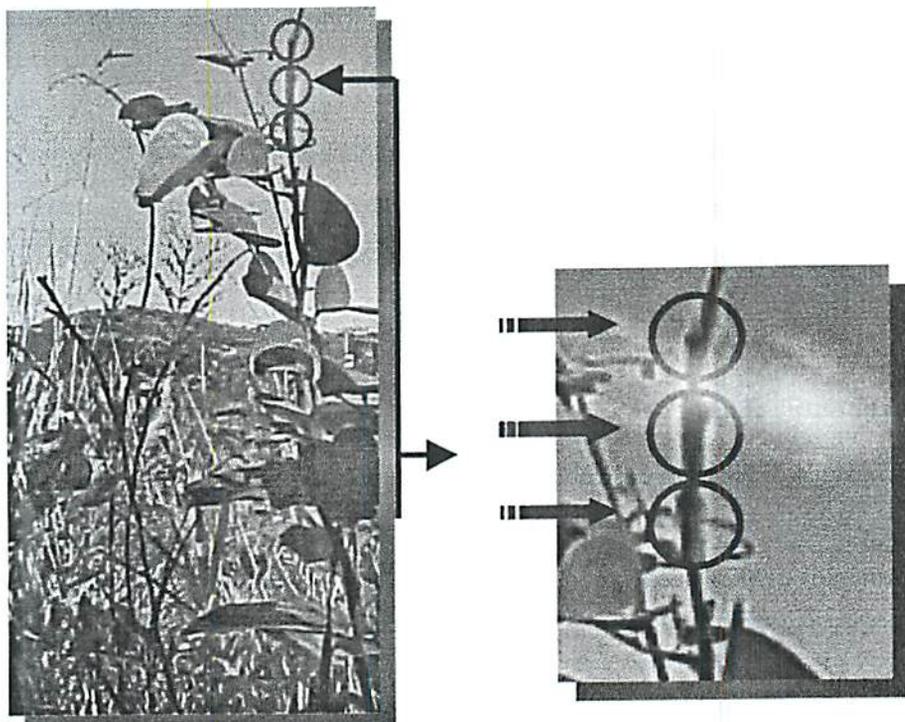


FIGURA 10 - Partes da planta coletada

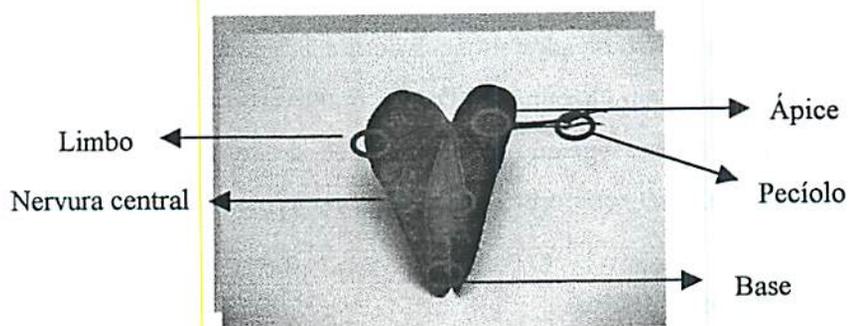


FIGURA 11 - Metodologia de coleta e de corte das folhas de *B. holophylla* Steud

3.1.2 Morfologia

Os dados morfológicos, como altura da planta, comprimento e largura foliar, foram coletados no campo em plantas adultas e, posteriormente, a partir de exsicatas, tais dados foram comparados com as descrições de Salatino (1976) e Steud (1976).

3.1.3 Anatomia

O estudo anatômico das folhas de *Bauhinia holophylla* foi realizado com material fresco, fixado em FAA 70% (Johansen, 1940) por 72 horas e, posteriormente, conservados em álcool 70 °GL. Uma parte do material foi separada para a série alcoólica/xilólica.

3.1.4 Cortes à mão livre

Com auxílio de lâminas de barbear, foram feitos cortes transversais e inclusão do material em isopor, sendo esses submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio a 50% e lavados em água destilada, neutralizadas em água acética 1:500 e montadas em glicerina a 50%. O corante utilizado foi a mistura de azul de astra/safranina, seguindo-se os métodos descritos por Bukatsch (1972). Dessa maneira, foram confeccionadas lâminas semipermanentes.

3.2 Preparação dos Extratos

Utilizaram-se folhas frescas, que foram pesadas e trituradas em triturador do tipo Hamilton Beach, secas em estufa com circulação mecânica (estufa ventilada) modelo 320-SE Fanem e mantidas a 42 °C.

Para obtenção dos extratos brutos cada uma das cinco amostras contendo 500 g de folhas em 2 L de solvente foi macerada a frio, com o solvente hexano,

protegida da luz, por oito dias consecutivos . Em seguida a amostra foi filtrada em funil de Büchner, obtendo-se a torta, que foi levada à estufa ventilada a 42 °C por 24 horas, completando-se assim, a evaporação do solvente. O filtrado de cada extração foi submetido ao evaporador rotatório modelo Büchi B-480, sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato bruto.

Esse permaneceu em estufa à temperatura de 42 °C para completa evaporação do solvente. Em seguida, a torta foi submetida à extração com o clorofórmio, pela metodologia acima descrita. Esse processo foi repetido com os solventes acetato de etila, etanol e metanol, conforme descrito (Figura 12).

EXTRAÇÃO A FRIO

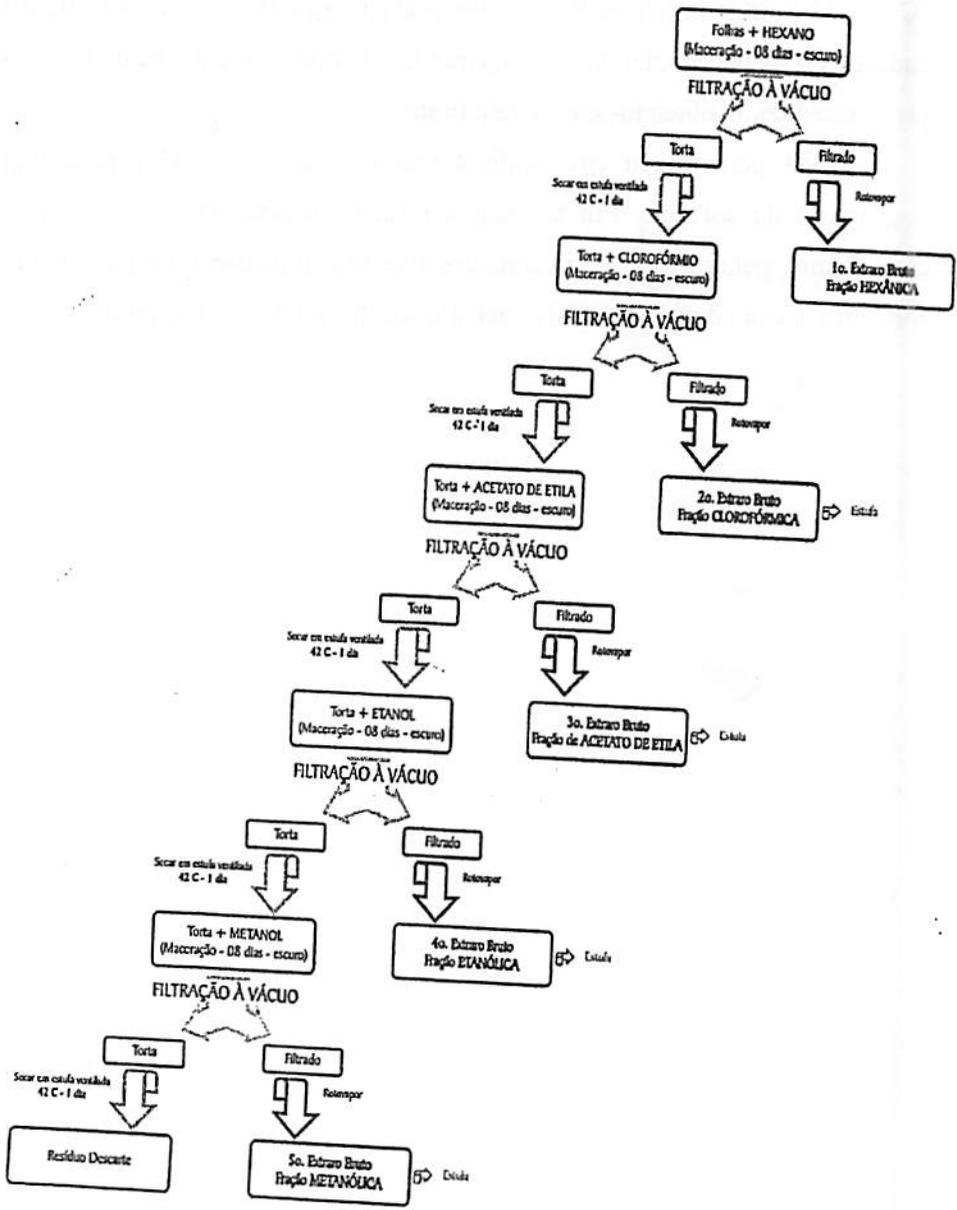


FIGURA 12 – Esquema geral da extração dos metabólitos secundários com solventes de polaridades crescentes modificado (Matos, 1988).

3.2.1 Testes fitoquímicos – Prospecção fitoquímica

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida da principal etapa, que é o isolamento e purificação dos constituintes químicos fixos das plantas. A escolha do solvente para extração deve ser feita tendo-se em vista os objetivos do estudo e os resultados da abordagem. Deve-se ter em conta que solventes pouco polares (éter de petróleo, hexano, benzeno, clorofórmio) extraem da planta, mais facilmente, mistura de compostos de baixa polaridade e compostos polares pouco hidrófilos. Em contrapartida, deve-se considerar que compostos mais polares e hidrófilos são também extraídos com mais facilidade em presença de etanol ou metanol. Compostos que se comportam como ácidos ou bases lipossolúveis são extraídos, de preferência, utilizando suas propriedades de formarem sais hidrossolúveis, com bases inorgânicas, no caso dos ácidos e, com ácidos inorgânicos, no caso das bases orgânicas (Matos, 1997).

Os testes fitoquímicos foram realizados com extratos brutos da folha fresca (30 g). Para obtenção desses, os materiais foram triturados e secos em estufa ventilada a 42 °C e em seguida, foram colocados sob refluxo etanólico durante 24 horas, seguindo-se a filtração em funil de Büchner. O processo foi repetido 4 vezes com o mesmo material. Todos os extratos foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório, cujo resíduo obtido foi utilizado para a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse, por meio de reações químicas específicas, que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (Matos, 1997; Simões *et al.*, 2000) (Figura 13).

REAÇÕES DE SCREENING FITOQUÍMICO CLÁSSICO

CLASSE QUÍMICA	METODOLOGIA
Ácidos Orgânicos	Teste com reativo de Pascová
Açúcares Redutores	Teste com reativo de Fehling A e B
Polissacarídeos	Teste com Iugol
Proteínas e aminoácidos	Reação de Molish
Taninos	Teste com $FeCl_3$ a 1%
Catequinas	Reação com vanilina 1% e HCl conc.
Flavonóides	Reação com HCl conc. e fita de magnésio
Sesquiterpenlactonas e lactonas	Reação com Cloridrato de Hidroxilamina, solução metanólica de KOH 10%, HCl 1N e $FeCl_3$
Azulenós	Reação com reativo de Kaiser
Carotenóides	Teste com ácido trifluoroacético
Esteróides e Triterpenóides	Teste de Lieberman-Burchard
Depsideós e Depsideonas	Teste com $FeCl_3$ a 1%
Derivados da Cumarina	Teste com solução etérea do extrato e NaOH 1 N
Saponina Espumática	Teste com H_2O dest. e etanol 800GL
Alcalóides	Teste com reagente de Bouchardal, Dragendorff, Bertrand e Mayer
Purinas	Teste com $HCL_6 N$ e H_2O_2 30%
Antraquinonas	Reação com benzeno e $NH_4 OH$ 10%

FIGURA 13 – Reações de *screening* fitoquímico clássico realizadas com folhas de *Bauhinia holophylla* Steud

3.2.2 Fracionamento dos extratos

Os extratos brutos etanólico e metanólico das folhas foram utilizados para as análises cromatográficas. Empregaram-se 0,1055g do extrato bruto etanólico (rendimento do extrato 4,12%) e 0,1036g do extrato bruto metanólico (rendimento do extrato 3,432%), dissolvidos em 5 mL de etanol e 5 mL de metanol, respectivamente. Os extratos foram submetidos à cromatografia líquida de coluna (CLC), utilizando-se uma coluna de 50 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro, recheada de sílica gel 60, 70-230 mesh Merck®, eluída com: hexano, clorofórmio, acetato de etila, propanol, etanol, metanol, ácido acético e água. Esses solventes foram definidos pela série eluotrópica em cromatografia de camada delgada (CCD). Coletaram-se dezoito frações de 30 mL (Figuras 14 e 15).

Reuniram-se as frações obtidas em seis subfrações: subfração A, decorrente da união das frações clorofórmio e clorofórmio/acetato de etila; subfração B, união das frações acetato de etila, acetato de etila/propanol e propanol, subfração C, propanol/etanol, etanol, etanol/metanol e metanol; subfração D, metanol/ácido acético e ácido acético; sub-fração E, ácido acético/água e subfração F, consistindo somente da fração aquosa.

A subfração C foi submetida a uma nova CLC, seguindo-se o mesmo procedimento inicial. Na segunda CLC, foram obtidas seis subfrações que foram submetidas a CCD, com a obtenção de três manchas semipuras, as quais sofrerão o processo de recristalização para purificação. Da subfração F, foram obtidas quatro subfrações, duas das quais apresentaram-se com formação de cristais (precipitação), que foram filtrados e levados à estufa 45 °C. Após 24 horas, foram deixados em um dessecador com pentóxido de fósforo (P_2O_5) por vários dias.

COLUNA A — EXTRATO ETANÓLICO
(00,1055 g)

PROPOÇÃO	SOLVENTE (ml)		No. DE FRASCOS (ml)	PROPOÇÃO	SOLVENTE (ml)		No. DE FRASCOS (ml)	
1:3	9,5	ACETATO DE ETILA	FASE INTERMEDIÁRIA X 01 = 30 ml	1:3	9,5	METANOL	ETANOL + METANOL	
	7,5	CLOROFÓRMIO			7,5	ETANOL		
1:1	5,0	ACETATO DE ETILA		1:1	5,0	METANOL	FASE INTERMEDIÁRIA X 01 = 30 ml	
	5,0	CLOROFÓRMIO			5,0	ETANOL		
3:1	7,5	ACETATO DE ETILA		3:1	7,5	METANOL		
	9,5	CLOROFÓRMIO			9,5	ETANOL		
1	10	ACETATO DE ETILA	ACETATO DE ETILA X 02 = 120 ml	1	10	METANOL	METANOL X 02 = 120 ml	
1	50	ACETATO DE ETILA		1	50	METANOL		
1:3	9,5	PROPANOL	ACETATO DE ETILA + PROPANOL	1:3	9,5	ÁC. ACÉTICO	METANOL + ÁC. ACÉTICO	
	7,5	ACETATO DE ETILA			7,5	METANOL		
1:1	5,0	PROPANOL		FASE INTERMEDIÁRIA X 01 = 30 ml	1:1	5,0	ÁC. ACÉTICO	FASE INTERMEDIÁRIA X 01 = 30 ml
	5,0	ACETATO DE ETILA				5,0	METANOL	
3:1	7,5	PROPANOL		3:1	7,5	ÁC. ACÉTICO		
	9,5	ACETATO DE ETILA			9,5	METANOL		
1	10	PROPANOL	PROPANOL X 02 = 120 ml	1	10	ÁC. ACÉTICO	ÁC. ACÉTICO X 02 = 120 ml	
1	50	PROPANOL		1	50	ÁC. ACÉTICO		
1:3	9,5	ETANOL	DENOROU MAIS A PASSAR NA COLUMNA	1:3	9,5	H ₂ O	ÁC. ACÉTICO + H ₂ O	
	7,5	PROPANOL			7,5	ÁC. ACÉTICO		
1:1	5,0	ETANOL		FASE INTERMEDIÁRIA X 01 = 30 ml	1:1	5,0	H ₂ O	FASE INTERMEDIÁRIA X 01 = 30 ml
	5,0	PROPANOL				5,0	ÁC. ACÉTICO	
3:1	7,5	ETANOL		3:1	7,5	H ₂ O		
	9,5	PROPANOL			9,5	ÁC. ACÉTICO		
1	10	ETANOL	ETANOL X 02 = 120 ml	1	10	H ₂ O	H ₂ O X 02 = 120 ml	
1	50	ETANOL		1	50	H ₂ O		
				1	10	H ₂ O		
				1	50	H ₂ O		

FIGURA 14 - Fracionamento do extrato etanólico

COLUNA B – EXTRATO METANÓLICO
(00.1055 g)

PROPOÇÃO	SOLVENTE (mL)	Nº. DE FRASCOS (mL)	PROPOÇÃO	SOLVENTE (mL)	Nº. DE FRASCOS (mL)
1:3	2,5	ACETATO DE ETILA	1:3	2,5	METANOL
	7,5	CLOROFÓRMIO		7,5	ETANOL
1:1	5,0	ACETATO DE ETILA	1:1	5,0	METANOL
	5,0	CLOROFÓRMIO		5,0	ETANOL
3:1	7,5	ACETATO DE ETILA	3:1	7,5	METANOL
	2,5	CLOROFÓRMIO		2,5	ETANOL
1	10	ACETATO DE ETILA	1	10	METANOL
1	50	ACETATO DE ETILA	1	50	METANOL
1:3	2,5	PROPANOL	1:3	2,5	ÁC. ACÉTICO
	7,5	ACETATO DE ETILA		7,5	METANOL
1:1	5,0	PROPANOL	1:1	5,0	ÁC. ACÉTICO
	5,0	ACETATO DE ETILA		5,0	METANOL
3:1	7,5	PROPANOL	3:1	7,5	ÁC. ACÉTICO
	2,5	ACETATO DE ETILA		2,5	METANOL
1	10	PROPANOL	1	10	ÁC. ACÉTICO
1	50	PROPANOL	1	50	ÁC. ACÉTICO
1:3	2,5	ETANOL	1:3	2,5	H ₂ O
	7,5	PROPANOL		7,5	ÁC. ACÉTICO
1:1	5,0	ETANOL	1:1	5,0	H ₂ O
	5,0	PROPANOL		5,0	ÁC. ACÉTICO
3:1	7,5	ETANOL	3:1	7,5	H ₂ O
	2,5	PROPANOL		2,5	ÁC. ACÉTICO
1	10	ETANOL	1	10	H ₂ O
1	50	ETANOL	1	50	H ₂ O
			1	10	H ₂ O
			1	50	H ₂ O

FIGURA 15 – Fracionamento do extrato metanólico

3.2.3 Caracterização e identificação das substâncias

As substâncias foram caracterizadas pelos valores de R_f (fator de retenção), ponto de fusão, solubilidade, espectrofotometria de Infra Vermelho e foram encaminhadas para as análises de Espectroscopia de Massa (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN^1H). O espectrofotômetro utilizado foi da marca Shimadzu, modelo FTIR – 88201, e para o ponto de fusão, utilizou-se a técnica de Thiele.

3.2.4 Extração do óleo essencial e identificação de seus componentes

O método utilizado para obtenção do óleo essencial foi o de arraste a vapor, utilizando o aparelho de Clevenger modificado por Wasicky (máquina 1). Do material vegetal selecionado, 100 gramas de folhas frescas trituradas foram submetidas ao processo de arraste de vapor por 4 horas, para a obtenção do hidrolato. Obteve-se 2 L de hidrolato, o qual foi submetido a um processo de partição com 1L diclorometano. Reuniram-se as frações orgânicas, adicionou-se sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou o solvente utilizando-se evaporador rotatório do tipo Büchi B-480, obtendo-se um líquido incolor, amarelo bem claro. O mesmo procedimento foi realizado com material vegetal seco à sombra, seco na estufa ventilada a 42 °C, e com material vegetal liofilizado, com quatro repetições, nos meses de fevereiro a junho (Figura 16 - Aparelho antigo de Clevenger- máquina 1- Laboratório de Química Orgânica – UFLA).

A metodologia anteriormente descrita foi utilizada com um novo aparelho de Clevenger (máquina 2) nos meses de agosto até dezembro. Com o novo aparelho, foram utilizados 30 g de folhas frescas e o tempo de extração decaiu para 40 minutos. Foram realizadas quatro repetições (Figura 17).

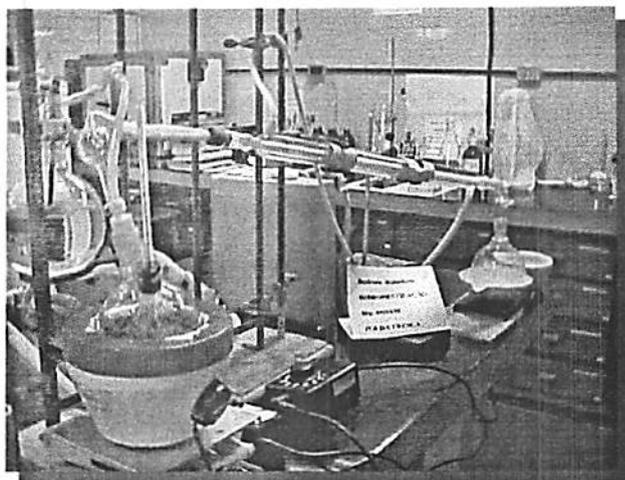


FIGURA 16 - Aparelho de Clevenger antigo, modificado (Máquina 1)

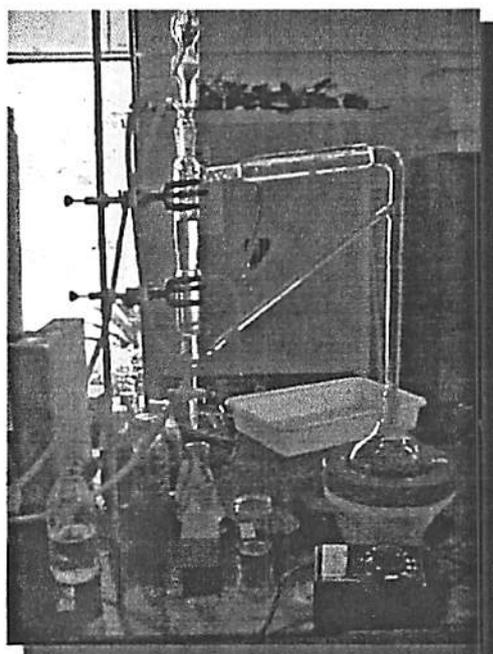


FIGURA 17 - Aparelho de Clevenger novo, modificado (Máquina 2)

3.3 Análise estatística

Foram utilizadas comparações de médias nos ensaios em blocos casualizados por métodos não paramétricos.

A partir dos dados do rendimento de óleo essencial extraído das folhas de *Bauhinia holophylla*, tirou-se uma média das quatro repetições realizadas para cada tratamento utilizado (folhas frescas, secas à sombra, secas na estufa ventilada a 42 °C e folhas liofilizadas).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspectos morfológicos da planta

4.1.1 Descrição da morfologia da *Bauhinia holophylla*

A epiderme, tanto adaxial quanto abaxial, é pouco cutinizada. Apresentam células pequenas e de paredes espessas. Possui diversos tipos de tricomas (tectores e glandulares), em maior quantidade na epiderme abaxial. O mesofilo é heterogêneo assimétrico. O parênquima paliçádico é composto de um só extrato celular. O lacunoso, que é amplo, possui glândulas secretoras. Na nervura central, Figura 18 (detalhe do mesofilo foliar), tanto na parte superior como na inferior encontra-se um tecido colenquimatoso composto por dois extratos celulares. Os elementos condutores são representados por um xilema em forma de arco e cortado no sentido radial por raios unisseriados medulares. O floema compõe-se de numerosos tubos crivados e os raios medulares provindos do xilema o cortam também no sentido radial. Opostos ao xilema, encontram-se de 3 a 6 conjuntos líbero-lenhosos. O periciclo é composto por fibras isoladas. Na superfície adaxial da folha, observa-se que as células epidérmicas possuem paredes retas ou levemente curvas, são de diferentes tamanhos e, em sua maioria, poliédricas. Os estômatos são raros nessa epiderme. Entre as células epidérmicas, encontram-se os tricomas secretores e os tricomas tectores.

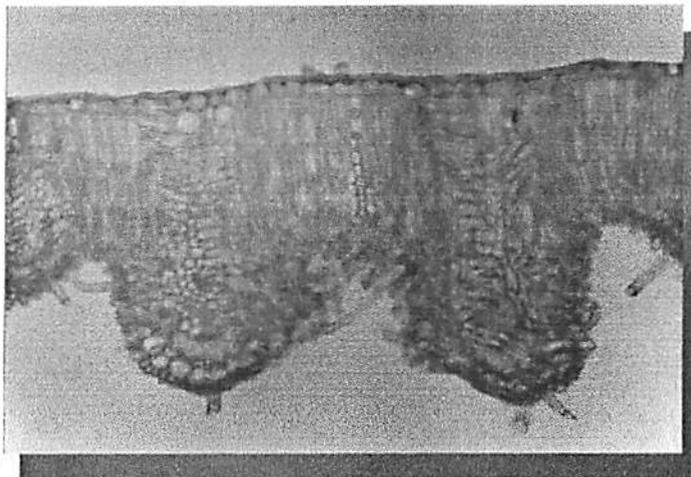


FIGURA 18 - Aspecto do mesofilo foliar de *Bauhinia holophylla*

4.1.2 Tricomas secretores e tectores

O tricoma ou um pêlo é formado pelo desenvolvimento de uma célula epidérmica. Pode ocorrer divisão celular e, assim, o pêlo torna-se multicelular. Pêlos multicelulares podem consistir de uma fileira única de células ou de muitas fileiras. Os tricomas são, algumas vezes, também classificados como pêlos glandulares, que possuem função secretora (Cutter, 1986).

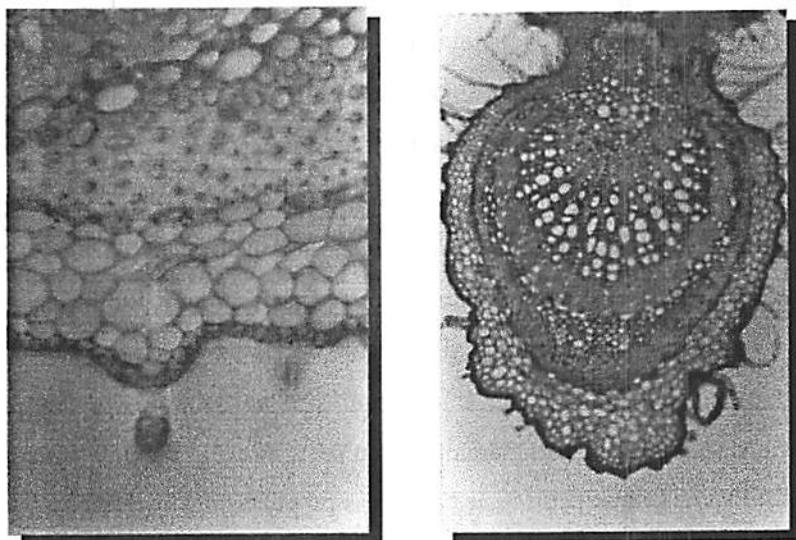
Observa-se, pela Figura 19a, um tricoma glandular expelindo uma gotícula de óleo, e na Figura 19b, em detalhe, a localização desse tricoma na região da nervura central.

Os tricomas tectores formados por 3-8 células são cônicos, com ápice afilado e base intumescida.

Na superfície abaxial, os estômatos são as estruturas mais abundantes com relação aos tricomas secretores e tectores. Os tricomas secretores ou glandulares são de diversos tamanhos, localizam-se sobre o limbo e as nervuras e são revestidos por uma cutícula delgada. Esses apêndices são saculiformes,

formados por duas células, uma basal mais curta e estreita e outra apical dilatada. A célula basal desses tricomas localiza-se entre as células epidérmicas.

A relação entre os tricomas secretores, estômatos e células epidérmicas variam nas diferentes regiões da folha.



(a)

(b)

FIGURA 19 - Corte transversal na altura da nervura central da folha de *Bauhinia holophylla*. (a) Tricoma glandular expelindo uma gotícula de óleo, (b) detalhe da nervura central onde o tricoma glandular se localiza

Pelo fato de se ter observado que algumas regiões, como o limbo, a margem e o ápice, mantêm uma paridade entre tricomas tectores e tricomas secretores ou glandulares, e que nas regiões de nervura central e da base os tricomas são mais numerosos, pode-se formular uma hipótese de que o índice de tricomas seja proporcional à produção de óleo. Como se tem pequena

porcentagem de tricomas glandulares, é justificável que se tenha também pequena proporção de óleo, o que poderá vir a ser tema de trabalho futuramente.

Em pesquisa com *Bauhinia holophylla* ocorrem os dois tipos de tricomas: os tectores (em maior quantidade) e os secretores (em menor quantidade), principalmente na epiderme abaxial e próximo às nervuras; porém nos primeiros, têm-se suas paredes delgadas e lume largo diminuindo sua resistência mecânica a prováveis ataques de herbívoros, ao passo que os segundos são distribuídos irregularmente, sugerindo principalmente um mecanismo de defesa química para a planta.

Hanberlandt (1965), estudando a secreção de óleo, observou que essa protegia contra ataque de animais, e a volatilização desse atuava contra o aumento de temperatura interna e, conseqüentemente, contra o aumento de transpiração. Em estudos sobre o comportamento dos tricomas, Levin (1973) observou que esses têm um papel de defesa mecânica e química nas plantas, por meio dos tricomas tectores e dos tricomas glandulares ou secretores, que exudam terpenos, fenóis, alcalóides ou outras substâncias olfativas ou gustativas repelentes.

As estruturas secretoras sofreram uma evolução de célula oleífera à cavidade ou canal secretor, e pêlo glandular ou tricomas (Gottlieb & Salatino, 1987). É importante salientar que essas características também foram observadas neste trabalho, em que o conteúdo oleífero encontra-se em células especiais (detectadas, porém não avaliadas), e também nos tricomas glandulares ou secretores, inferindo-se que a espécie estudada apresenta, ao mesmo tempo, caráter primitivo e evoluído.

Segundo os autores citados no parágrafo anterior, os óleos essenciais evoluíram de óleos terpênicos a lignóides e novamente terpênicos. Esses constituem uma característica primitiva na linhagem evolutiva de angiospermas, que são substituídas por outros sistemas defensivos como alcalóides, e que, na espécie estudada, apresenta um dos dois tipos de substâncias, pois alcalóides não

foram detectados em quatro das reações realizadas no *screening* fitoquímico clássico: reações de Mayer, Dragendorff, Bertrand e Bouchardat .

Salatino (1976) caracterizou, mediante análise bioquímica da cera da cutícula das folhas de *Bauhinia holophylla* Steud, a presença de quercetina, carboidratos, glicose, galactose, ramnetol, rhamnose, alcanos, ácido tartárico, taninos pirocatequínicos e óleo essencial β -cariofileno

Segundo Gottlieb & Salatino (1987), os constituintes dos óleos essenciais estão envolvidos em todos os aspectos da interação planta-micróbio, planta-planta e planta animal. Para esses, em *Bauhinia*, o componente majoritário do óleo essencial é o β cariofileno.

4.2 Avaliação fitoquímica dos extratos

4.2.1 Preparação dos extratos

Segundo Matos (1997), usualmente, o que se pode inferir é que, em uma breve análise, buscam-se o isolamento e a caracterização de compostos de interesse biológico, que originarão novos compostos não registrados na literatura especializada, ou intermediários de processos de biossíntese de importância quimiotaxonômica. Perante tais fatos, tenta-se encontrar e isolar substâncias de interesse econômico, principalmente novos agentes medicamentosos, ou novas fontes de compostos raros já utilizados, ou ainda compostos que possam ser utilizados como precursores de síntese dessas substâncias (Matos, 1997). A abordagem fitoquímica, além de facilitar a escolha do material a ser estudado, nos poupa tempo e torna menos onerosos testes futuros.

4.2.2 Screening fitoquímico

O teste fitoquímico preliminar foi realizado com os extratos etanólicos brutos e, como muitos desses testes baseiam-se em mudanças de coloração, surgiram dificuldades em visualizar alguns resultados positivos. As análises realizadas determinaram a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, catequinas, taninos, flavonóides, sesquiterpenlactonas e outras lactonas, carotenóides, azulenos, esteróides e triterpenóides, depsídeos e depsidonas, derivados cumarínicos, saponina espumídica e purinas. Em contrapartida, deve-se considerar que não foram detectados alcalóides (Figura 20).

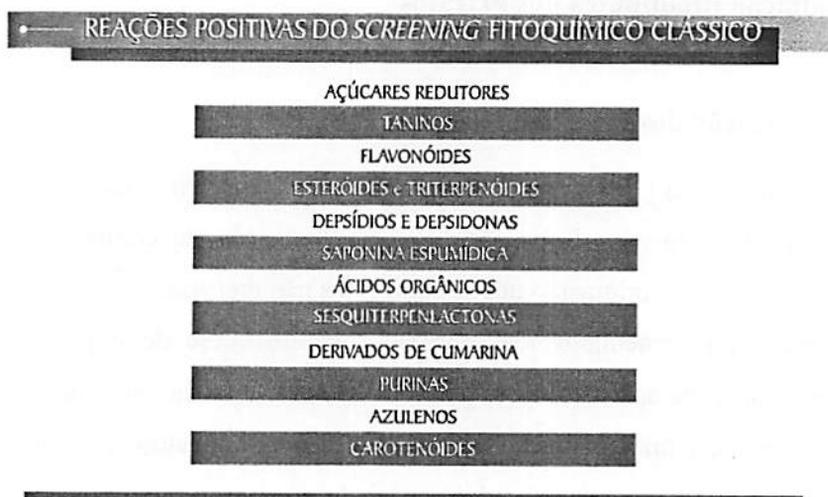


FIGURA 20 - *Screening* fitoquímico positivo do extrato bruto das folhas de *Bauhinia holophylla*

Apesar de esses testes serem uma análise de prospecção fitoquímica da composição dos extratos, sendo apenas um indicativo da ausência ou presença de determinados compostos, pode-se inferir que não houve surpresa quanto à

presença de flavonóides estando coerente com dados anteriormente citados e por causa de uma maior presença de substâncias polares nas folhas da *B. holophylla*, visto que flavonóides apresentam vários grupos hidroxilas em sua estrutura. Por outro lado, o que se pode inferir é que esse grupo de compostos tem ampla distribuição no reino vegetal. A presença de açúcares redutores é justificável, pois vários açúcares comuns nas plantas têm essa característica, como glicose, frutose, xilose, maltose, entre outros. Esses açúcares fazem parte do metabolismo primário das plantas, mas podem fazer parte da estrutura dos compostos secundários, principalmente na forma de heterosídeos, nos quais uma parte é constituída por um açúcar ou ose e, a outra parte, por um grupamento ativo, como flavonóide, saponina e outros.

Os esteróides e triterpenóides, apesar de serem substâncias apolares, podem ser também justificados por participarem da estrutura de outros compostos polares, como, por exemplo, das saponinas, também presentes na prospecção dos extratos brutos de *B. holophylla*.

A presença de taninos parece justificável. Salatino (1976) extraiu das folhas de *Bauhinia holophylla* taninos condensados. Provavelmente, esses não estejam correlacionados com a ação antidiabética, como sugerido por Costa (1975). A maioria dos taninos encontrados em folhas é considerada compostos de defesa, principalmente contra a herbivoria; porém, há outras formas de defesa que são desempenhadas por outros compostos (Turner, 1995).

Outras espécies do mesmo gênero (*Bauhinia*) já são também muito conhecidas da medicina popular, graças a sua ação antidiabética, que foi comprovada por Juliane (1931) por meio de acompanhamento clínico de pacientes com glicosúrias, tratados com chás de extratos de suas folhas. Apesar da importância da unha-de-vaca, miroró, como são conhecidas todas as *Bauhinia*, Crus (1982) observou que ela foi pouco estudada e pouco se conhece de sua composição bioquímica e do seu metabolismo, originando muitas

especulações sobre os compostos que poderiam promover as propriedades que lhe são atribuídas .

Em trabalhos realizados por Costa (1942), foi observado que nas folhas de *Bauhinia forficata* Link, após extração, diversas substâncias foram identificadas entre as quais, um glicosídeo (que propôs denominar bauinosídeo), traços de óleos essenciais, alcalóides e taninos, a presença de quercitina, glicose, ramnose, ácido tartárico e guanidina. Resultados similares ao trabalho em questão foram encontrados por Miyake *et al.* (1986), que detectaram a presença de quercitina e confirmaram a presença de todas as substâncias separadas por Costa (1942). Outras espécies do mesmo gênero, também conhecidas como anti-diabéticas em suas regiões de ocorrência, têm sido estudadas e todas as análises têm constatado a presença de flavonóides, todos com estrutura semelhante à quercitina. Perante tais fatos, vários autores vêm especulando que a ação hipoglicêmica das *Bauhinia* sp. é ocasionada pelos flavonóides, influenciando no seu estudo. Diversos compostos considerados hipoglicêmicos têm sido identificados, mas poucos tiveram a sua eficácia comprovada isoladamente. Entre as diversas categorias de compostos orgânicos conhecidos, destacam-se flavonóides, glicosídeos e taninos.

Outro aspecto importante a ser considerado é o processo utilizado na extração que pode influenciar consideravelmente os resultados do estudo experimental.

O termo compostos fenólicos abrange uma ampla faixa de substâncias em plantas, as quais possuem em comum anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes. Essas substâncias tendem a ser solúveis em água, uma vez que elas ocorrem, freqüentemente combinadas com açúcares, como glicosídeos, e estão geralmente localizadas no vacúolo celular. Entre os compostos fenólicos naturais, dos quais vários milhares de estruturas são conhecidas, os flavonóides formam o maior grupo, apesar de fenóis

monocíclicos, fenilpropanóides e quinonas fenólicas existirem em quantidades consideráveis.

No gênero *Bauhinia*, a quercetina possivelmente ocorre com alta frequência, tendo sido relatada em *Bauhinia reticulata*, *Bauhinia tomentosa*, *Bauhinia thonningii* e *Bauhinia holophylla* (Salatino, 1976).

4.2.3 A cromatografia

A cromatografia de coluna foi utilizada para separar e purificar com precisão mais elevada os diferentes componentes químicos do extrato. A cromatografia de camada delgada, certificou a pureza da amostra, pela separação das diferentes substâncias das folhas de *B. holophylla*.

As substâncias foram caracterizadas pelos seus fatores de retenção (R_f) que é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel), que foram calculados com base na média dos resultados de três placas, cujas manchas foram reveladas em atmosfera de iodo (I_2).

$$R_f' = 5,6 / 7 = 0,8. R_f'' = 5,3 / 7 = 0,757. R_f''' = 5,1 / 7 = 0,728.$$

$$\text{Média de } R_f + R_f'' + R_f''' = 0,761666$$

4.2.4 Caracterização e isolamento dos constituintes químicos

Os compostos A_1 e B_1 , isolados dos extratos etanólico e metanólico respectivamente, apresentaram solubilidade em clorofórmio, tetracloreto de carbono, benzeno e tolueno.

Os espectros de infravermelho dos compostos A_1 e B_1 foram similares (Figuras 21 e 22), apresentando as seguintes absorções: duas bandas pequenas, em 3550 cm^{-1} e 3404 cm^{-1} , equivalente aos estiramentos assimétricos e simétricos de ligações N-H de aminas primárias, confirmadas pela presença de um pico agudo e intenso em 1622 cm^{-1} , proveniente de vibrações de deformação

angular da ligação N-H, e dois picos, em 669 cm^{-1} e 601 cm^{-1} , equivalentes a deformações fora do plano dessa ligação.

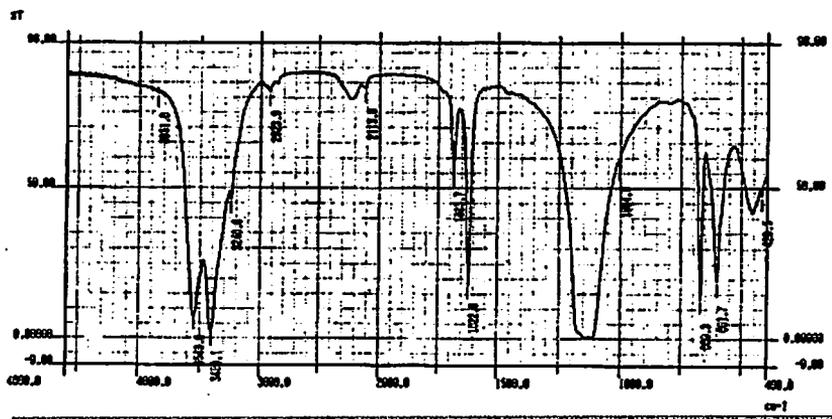


FIGURA 21 - Espectro de IV da Amostra A₁ isolada em extrato etanólico

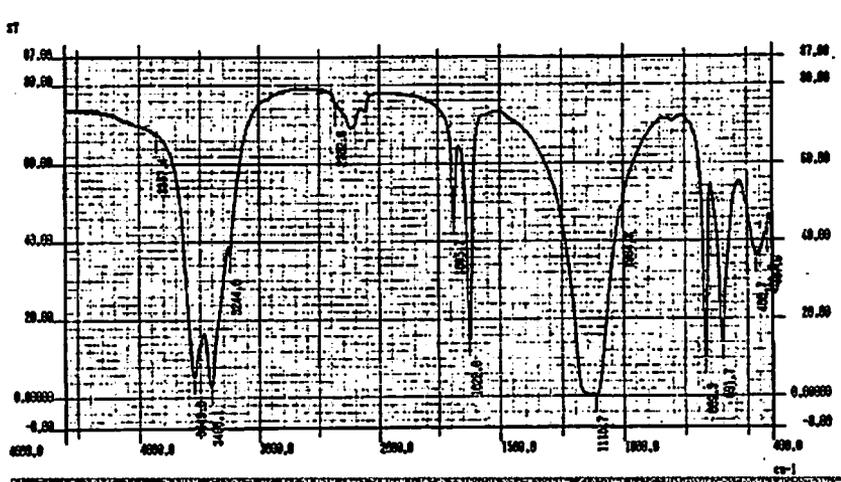


FIGURA 22 - Espectro de IV da Amostra B₁ isolada em extrato metanólico.

4.2.5 Aspectos físico-químico das substâncias isoladas

Pelos resultados dos ensaios de solubilidade, constataram-se solubilidade completa em tetracloreto de carbono, clorofórmio e acetato de etila, e solubilidade parcial em em acetato de etila, éter etílico, diclorometano, dimetilsulfóxido, éter de petróleo e hexano e, insolúvel nos demais solventes (Tabela 1).

TABELA 1 - Solubilidade das amostras A₁ e B₁ de *Bauhinia holophylla*

Solvente	Solubilidade	
	A1	B1
Água	I	I
Ácido acético	I	I
Metanol	I	I
Etanol	I	I
Butanol	I	I
Acetona	I	I
Acetato de Etila	P	S
Éter Etilico	P	P
Clorofórmio	S	S
Benzeno	S	I
Diclorometano	P	P
Dimetilsulfóxido	P	P
Tetracloreto de Carbono	S	S
Éter de Petróleo	P	I
Hexano	P	I

S: solúvel / P: parcialmente solúvel / I: insolúvel

Cada substância sólida, cristalina e pura está definida pelo seu ponto de fusão. Assim, determina-se essa constante física com o fim de avaliar o estado de pureza das substâncias isoladas. Por vezes, essas se decompõem antes de fundirem; porém, se tal transformação ocorrer sempre à mesma temperatura, pode se utilizar o mesmo modo como método de reconhecimento.

No presente trabalho, os valores de p_f encontrados para os extratos puros foram da Amostra A₁ 310°C e da Amostra B₁ 316 °C.

Pelo fato de o ponto de decomposição das substâncias ter atingido valores acima de 300 °C, sugere-se que os compostos isolados possam ser sais inorgânicos ou até mesmo açúcares.

4.2.6 Obtenção do óleo essencial analisando diferentes parâmetros

Realizaram-se 4 repetições, para cada parâmetro de folha, obtendo-se os seguintes rendimentos: 0,01% com as folhas frescas, 0,02% com as folhas secas na sombra, 0,04% com as folhas secas em estufa ventilada a 42 °C e 0,05% com as folhas liofilizadas.

Os espectros de Infravermelho em NaCl (cm^{-1}) foram bastante similares. Em todos, observa-se uma banda nítida compreendida entre 3430-3435 cm^{-1} , a qual é atribuída a ligação OH de álcoois. No intervalo compreendido entre 3078-2856 cm^{-1} , observa-se um sinal característico de grupos metila ($-\text{CH}_3$), metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$). Em 1728 cm^{-1} , há um pico nítido, evidenciando a presença do grupo carbonila ($-\text{C}=\text{O}$). Os sinais de absorção centrados em 1261 e 1020 cm^{-1} podem ser atribuídos à ligação de álcoois primários, secundários e terciários.

Em conseqüência do maior rendimento do óleo essencial em peso, conclui-se que, para essa espécie, o processo de liofilização apresentou melhores resultados.

Pelo método comparativo e analisando apenas o rendimento em peso do óleo essencial extraído das folhas de *B. holophylla*, conclui-se também que por causa das folhas apresentarem baixos índices de essência nesse órgão, pode-se inferir que não se trata de uma planta aromática.

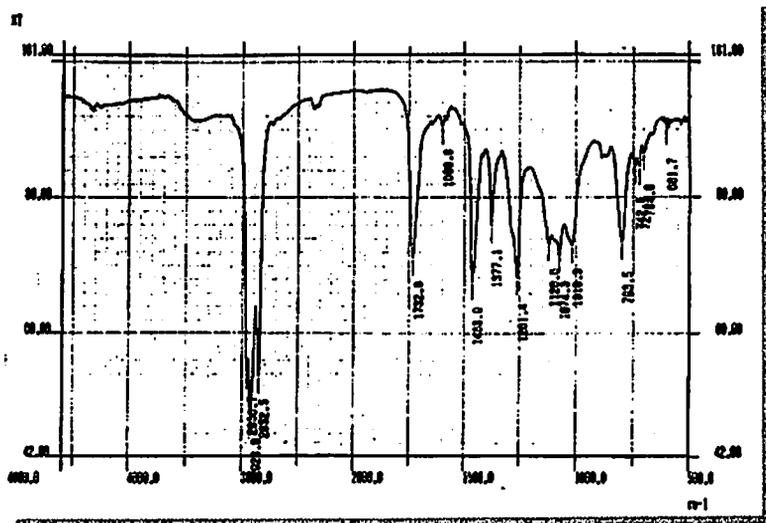


FIGURA 23 - Espectro IV do óleo essencial extraído das folhas liofilizadas de *Bauhinia holophylla*

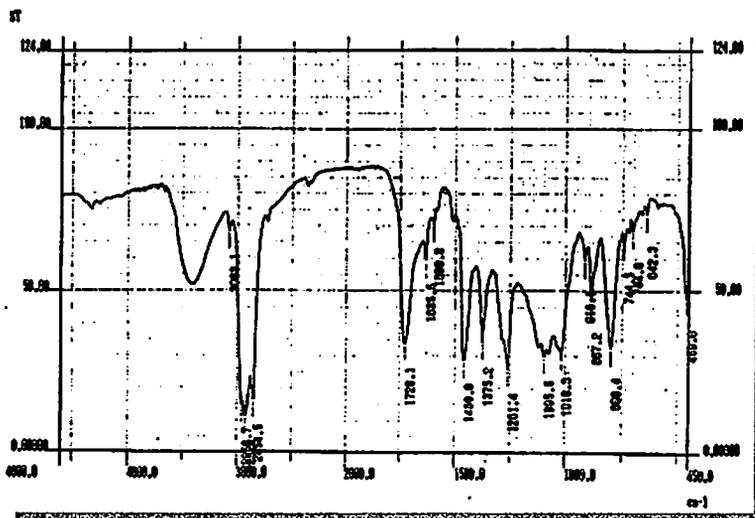


FIGURA 24 - Espectro IV do óleo essencial extraído das folhas secas na estufa a 42 °C de *Bauhinia holophylla*

4.3 Análise estatística da extração de óleo por arraste a vapor

Na tabela 2 encontram-se os valores médios de rendimento de extração de óleo para as duas máquinas estudadas. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Entretanto se observarmos o rendimento de óleo extraído pela máquina 2 no material liofilizado concluímos que em termos econômicos ou comerciais é bastante significativo.

4.3.1 Dados estatísticos

O teste de Friedman aplicado às ordens das observações dentro de cada bloco.

Hipóteses associada :

$H_0 : t_1=t_2=t_3=t_4$

$H_1 : \text{Pelo menos dois tratamentos diferem entre si.}$

Resultado do Teste de Friedman
(probabilidade) P-Valor = 0.112

4.3.1.1 Interpretação

Em virtude de o P_Valor ser superior ao valor nominal fixado em 5%, conclui-se que o teste é não-significativo, ou seja, em relação às máquinas (1 e 2), o rendimento na extração do óleo executado pela máquina 2 apresentou um resultado bem superior.

TABELA 2 - Média dos valores referente ao rendimento de extração de óleo

Blocos	Tratamentos mg/100 g			
	Fresca (t1)	Liofilizada (t2)	Seca à sombra (t3)	Seca na estufa (t4)
Máquina 1	0,0155	0,0533	0,0246	0,0426
Máquina 2	0,0686	0,2267	0,0807	0,1594

5 CONCLUSÕES

- Os solventes mais adequados para a extração das folhas de *Bauhinia holophylla* foram o etanol e o metanol demonstrando assim a presença de elevado teor de substâncias polares.
- O processo de liofilização das folhas de *Bauhinia holophylla* apresentou maior rendimento na extração do teor de óleo em peso que qualquer outro dos três tratamentos.
- A extração do óleo essencial pela máquina 2 - Clevenger - obteve maior rendimento na extração e em menor tempo.
- Este gênero parece apresentar uma dicotomia de flavonóis, com espécies apresentando quercetina e outro grupo canferol.
- Não foi detectada a presença de alcalóides nos extratos brutos. Assim, pode ser necessária a utilização de outra metodologia para confirmação da ausência total de alcalóides nas folhas de *Bauhinia holophylla*.
- Quanto à morfologia interna foram detectados e fotografados diversos tricomas, do tipo glandulares localizados em toda a extensão da nervura central em maior quantidade, com presença de óleo essencial no seu interior e, tricomas tectores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS

ABD-EL-WAHAB, S. M.; WASSELL, G.M.; AMMAR, N. M.; HANNA, T. Flavonoids constituents in the different organs of selected *Bauhinia* and their effect on blood glucose. *Herba*, Budapest, v. 26, n. 1, p. 27-39, 1987.

ACHENBACH, H.; STOCHER, M.; CONSTENLA, M. Flavonoids and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 27, n.6, p. 1835-1841, June 1988.

ANJANEYULU, A S. R.; REDDY, A. V. Raghava; REDDY, D. S. K.; ADHIKESAVALU, D.; CAMERON, T. S. Pacharin: a new dibenzene (2,3-6,7) Oxepin derivative from *Bauhinia racemosa* Lamk. *Tetrahedron*, Oxford, v. 40, n. 21, p. 4245-4252, June 1984.

ATTA-UR-RAHAMN; ZAMAN, K. Medicinal plants with hypoglycemic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 27, n. 4, p. 1-55, 1989.

AZEVEDO, C. R. Investigações sobre a presença de insulina em folhas de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) utilizadas no tratamento do diabetes. 2000. Monografia (Graduação, UENF)

BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. Morfologia, anatomia e desenvolvimento das sementes e plântulas de *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p. 583-590, maio 1989.

BENTHAM, G. Leguminosae II et III (Swartziaae, Caesalpinieae, Mimoseae). In: MARTIUS, C. F. P. *Flora brasiliensis*. Mönaco: C. Wolf and Fil, 1870. v. 15, pt. 2.

BERGALLO, H. G. Biologia floral e polinização de *Bauhinia bongardii* Steud na Serra dos Carajás, Pará. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 401-405, maio 1990.

BEST, C. H.; SMITH, R. G.; SCOTT D. A. – An insulin-like material in various tissues of the normal and diabetic animal. *American Journal of Physiology*, Baltimore, v. 68, p. 161-182, 1924.

BRANDÃO, M.; CUNHA, L. H. S. de. Dispersão de plantas lenhosas do Cerrado. II-Greminação e desenvolvimento. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 38-46, 1991.

BUKATSH, F. Benerkungren zur doppelfarbung astrablau/safranina. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, p. 255, 1972.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, PR.: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640p.

COLLIER E.; WATKINSON A.; CLELAND C. F.; ROTH J. Partial P and characterization of an insulin like material from spinach and *Lemna gibba*. G3. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 13, p. 6238-6247, May 1987.

COLLIP J. B. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 56, p. 513-543, 1923.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal/Ministério da Agricultura, 1984. v. 5, 687p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. v. 1, p.94-95.

COSTA, O. A. Estudo farmacológico da unha de vaca – *Bauhinia forficata* Link. **Revista da Flora Medicinal**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 175-179, 1975. Congresso Brasileiro de Farmácia, 3, Rio de Janeiro.

COSTA, O. A. Plantas hipoglicemiantes brasileiras. **Leandra**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 6, p. 95-106, 1975.

CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 26, p. 54-63, mar./abr. 1986.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

FAEGRI, K.; PIJL, L. van der. **The principles of pollination ecology**. London: Sin. Ass. 1979. 224p.

GERLACH, D. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Thieme Verlag, 1977. 311p.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. v. 1, 668p.

GOTTILIED, O. R.; MORS, W. B. Potential utilization of Brazilian nood extratives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 28, n. 2, p. 196-215, Mar./Apr. 1980

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-170.

GUPTA, A K.; VIDYAPATI, T. J. CHAWAN, J. S. Chemical examination of the stem of *Bauhinia variegata*. *Planta Médica*, Stuttgart, v. 38, n. 2, p. 174-176, 1980.

HARBORNE, J. B. *Introduction to ecological biochemistry*. 3. ed. London: Academic press, 1988. 356p.

HEITHAUS, E. R.; FLEMING, T. H.; OPLER, P. A. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a sazonal tropical forest. *Ecology*, Washington, v. 56, n. 3, p. 841-854, Apr. 1975.

HOSTETTMANN, K.; KIZU, H.; TOMOMORI, T. Molluscicidal properties of various saponins. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 44, n. 1, p. 34-35, 1982.

IRIBARREN, A. M. POMÍLIO, A. B. Sitosterol 3-O- α -D-xyluronofuranoside from *Bauhinia candicans*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 26, n. 3, p. 857-858, Mar. 1987.

JAIN, D. C.; TRIPATHI, A. K. Insect feeding deterrent activity of some saponin glycosides. *Phytoterapy Research*, v. 5, p. 139-141, 1991.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1940. 532p.

JULIANI, C. Ação hypoglycemiante da "Unha-de-vaca" (*Bauhinia forficata*). *Jornal dos Clínicos*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 12, p. 165-169, 1931.

KAJIKI, F. O. Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. 1996. 96p.

Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

KHANN, P.; NAG T. N.; CHANDRAJAIN S.; MOHAN, S. **United States Patent**. 3: 945-988, 1976.

KUMAR, R. J.; DAVID, G. L.; KRUPADANAM, M. Phenolic constituents from the pods of *Bauhinia vahlii*. **Fitoterapia**, Milan, v. 61, n. 5, p. 456-460, Nov./Dec. 1990.

KUO, Y.-H.; YEH, M.-H. A Novel 6-Butyl-3-Hidroxyflavanone from Heartwood of *Bauhinia purpurea*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 8, 2529-2530, Dec. 1998.

LAUX, D. O.; STEFANI, G. M.; GOTTLIEB, O. R. Bausplendin, a dimethylenedioxyflavone from *Bauhinia splendens*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 1081-1084, May 1985.

MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 3037-3067, 1988.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 3. ed. Viçosa: UFV, 1998. 219p.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC 1997. 141p.

OAKENFULL, D. Saponins in food – a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 7, n. 1, p.19-40, 1981.

OLIVEIRA, A. E. A.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; XAVIER NETO, J.; PEREIRA, A. C.; VIEIRA, J. G. H.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO J. – Jack bean seed coat contains a protein with complete seuqence homology to bovine insulin. **Prot. Pept. Letter**, v. 6, p. 15-21, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesidade está associada a 80% dos casos de diabetes. **O Globo**, Rio de Janeiro, 6 dez. 1998.

PANIZZA S. **Plantas que curam** (Cheiro de Mato). 15. ed. São Paulo: IBRASA, 1997. 279p.

REZENDE, M. H. **Anatomia foliar comparada de duas espécies de *Bauhinia* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae)**. 1987. 72p. Dissertação (Mestrado –

Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 24, n. 1, p. 1-20, Jan. 1994.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. *Plantas aromáticas e seu uso na agricultura*. Jaguariúma: FUNEP/EMBRAPA, 2000. 46p.

SALATINO, A. *Morfologia, anatomia e fitoquímica da folha de Bauhinia holophylla (Bongard) Steudel*. 1976. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências, São Paulo.

SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Bat pollination of the Passion flower, *Passiflora mucronata* in Southeastern Brazil. *Biotropica*, St. Louis, v.10, n. 2, p. 100-109, June 1978.

SCHACHT, W. H.; LONG, J. N.; GOBENA, A. Aboveground biomass accumulation in coppicing woodland, northeast Brazil. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v. 55, n. 1/4, p. 201-208, Dec. 1992.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de ; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognesia da planta ao medicamento*. 2. ed. Rio Grande do Sul: UFSC, 2000. 82p

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Abordagens Biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. (org.). *Farmacognesia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121.

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA: construindo pontes entre as ciências tradicionais e as ciências convencionais: desafios para o próximo milênio, 3., 2000, Piracicaba. *Resumos...* Piracicaba, 2000. 179p.

TISSERARD, R. *A arte da Aromaterapia*. 13. ed. São Paulo: Roca, 1993., 393p.

TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; OSHIMA, Y.; TAKAHASHI, M.; MURAKAMI, M.; HIKINO, H. Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. *Planta Médica*, Stuttgart, v. 53, n. 1, p. 8-12, 1987.

VAZ, A. M. S. F. Considerações sobre a taxonomia do gênero *Bauhinia* L. Sect. *Tylotaea* Vogel (Leguminosae-Caesalpinoideae) do Brasil. *Rodriguesia*, Rio de Janeiro, v. 31, n. 51, p. 127-234, dez. 1979.

WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell culture in phytochemistry**. San Diego: Academic Press, 1990. v. 4, cap. 2, p.17-42.

YOUSIF, G.; ISKANDER, G. M.; EISA, E. B. Investigation of the alkaloidal components in the Sudan flora. *Fitoterapia*, Milan, v. 54, n. 2, p. 81-85, Apr. 1983.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

AKHTAR, A. H.; AHMAD, K. U. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 46, n. 1, p. 1-6, Dec. 1994.

ALFERMANN, A.W.; PETERSEN, M. Natural product formation by plant cell biotechnology. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p.199-205, Nov. 1995.

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado – Espécies Vegetais Úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, Washington, v. 228, n. 4704, p. 1154-1160, June 1985.

BALOGUN, R. O.; JONES, R. J.; HOLMES, J. H. G. Digestibility of some tropical browse species varying in tannin content. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 77-88, June 1998.

BANCHES, A.; NARDINO, M. **Nomes populares e científicos das plantas do Rio Grande do Sul**. UNISINOS, 1999. 202p.

BERNARDO, R. R.; PINTO, A. V.; PARENTE, J. V. Steroidal saponins from *Smilax officinalis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 465-469, Feb. 1996.

BHARTIYA, H. P.; GUPTA, P. C. A chalcone glycoside from the seeds of *Bauhinia purpurea*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 2051-2056, May 1980.

BIOBRÁS – Uma Nova Era no Tratamento do Diabético Brasileiro. <<http://www.biobras.com.br/releases04.htm>> Acesso em(1998).

BRACA, A.; De TOMMASI, N.; Di BARI, L.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I. Antioxi-deant principles from *Bauhinia tarapotensis*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 52, n. 7, p. 892-895, July 2001.

CLEMENTE FILHA, A. C. Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de *Bauhinia forficata* Link e *Plantago major* L. 1996. 67p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal/Ministério da agricultura, 1997. v. 6, p.612-615.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972. v. 2, 514p.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa – para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 743p.

FORT, D. M.; JOLAD, S. D.; NELSON, SUSAN, T. Lithospermoside from *Bauhinia fassoglensis* (Fabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, n. 29, p. 439-441, May 2001.

FRANCO, L. F. **As sensacionais 50 plantas medicinais - campeãs de poder curativo**. Curitiba: O Naturalista, 1996. p.220-223.

FRANCO, L. L. **As sensacionais 50 plantas medicinais – campeãs de poder curativo**. 4. Ed. Curitiba: O Naturalista, 1999. v. 1, 235p.

FURLAN, M. R. **Cultivo de plantas medicinais**. Cuiabá: SEBRAE, 1998. 137p. Coleção Agroindústria, 13.

GEISSMAN, T. A ; CROUT, D. H. G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. Califórnia: Freeman, Cooper and Company, 1969. 592p.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 1987. 467p.

GOTTILIED, O. R.; MORS, W. B. Potential utilization of Brazilian nood extratives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 2, p. 196-215, Mar./Apr. 1980

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-170.

HARBORNE, J. B. Methods of plant analysis. In: HARBORNE, F. B. (Ed.). **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.** Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. p.1-36.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. (Ed.) **The flavonoids: advances in research.** New York: Chapman and Hall, 1982. 327 p.

IVORRA, M. D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A review of natural products and plant as potential antidiabetic drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 27, n. 3, p. 243-275, Dec. 1989.

JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNY, R. C. **Análise química quantitativa.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 712p.

KISIEL, W.; ZIELINSKA, K. A novel flavone glycoside from the stem of *Bauhinia purpuria*. **Fitoterapia**, Milan, v. 71, n. 1, p. 88-90, 2000.

KITTAKOOP, P.; KIRTIKARA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimalarial prepracemosols A and B, possible biogenetic precursors of racemosol from *Bauhinia malabarica* Roxb. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 4, p.349-352, Oct. 2000.

LUK, S. F.; LAU, O. W. Leaves of *Bauhinia blakeana* as indicators of atmospheric pollution in Hong Kong. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 3113-3120, Dec. 2000.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The sistematic identification of flavonoids.** New York: Springer-Verlag, 1970. 370p.

MONTANARI JR., I. A Pesquisa Agrícola com Plantas Medicinais. In: SEMANA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DE LAVRAS, 15., 1998, Lavras. **Palestra...** Lavras: UFLA, 1998.

OLIVA, M. L. V.; ANDRADE, S.; BATISTA, I. F. C.; SAMPAIO, M. U.; JULIANO, M.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E. A.; SAMPAIO, C. A. M. Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xá inhibitor isolated from *Bauhinia unguolata* seeds. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 45, n. 1/3, p. 145-149, Dec. 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Obesidade está associada a 80% dos casos de diabetes.** O Globo, Rio de Janeiro, 6 dez. 1998.

PIMENTA, D. S. A botânica e a interdisciplinaridade no controle de qualidade dos fitoterápicos, In: SEMINARIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 3., 1997, Ouro Preto. Anais... Ouro Preto: UFOP, 1997. p.42.

PRABHAKAR, P.; GANDHIDASAN, R.; RAMAN, P. V.; KRISHNASAMY, N. R.; NANDURI, S. De-O-Methylracemosol: A tetracyclic 2,2-dimethylchroman from the roots of *Bauhinia racemosa* Phytochemistry, Índia, v. 36, n. 3, p. 817-818, dec. 1994.

PYKE D. A. Preamble: the history of diabetes. New York: Jonh Wiley 1999.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; GIANNASI, D. E.; Flavonoids and the taxonomy of *Cercis*. Biochemical Systematics and ecology, Oxford, v. 28, n. 6, p. 545-550, June 1999.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. Cerrado ambiente e flora. EMBRAPA-CPAC, 1998. 556p.

SAZIMA, I. Observations on the feeding habits of phyllostomatid bats (*Carollia*, *Anoura* and *Vampyrops*) in Southeastern Brazil. Journal of Mammalogy, New York, v. 57, n. 2, p. 381-382, May 1976.

SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Quiropterofilia em *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae), na Serra do Cipó, Minas Gerais. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 405-416, abr. 1975.

SILVERSTEIN, R. M; BASSLER, G. C.; MORRIL T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 387p.

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA: construindo pontes entre as ciências tradicionais e as ciências convencionais: desafios para o próximo milênio, 3., 2000, Piracicaba. Resumos... Piracicaba, 2000. 179p.

SOARES, B. G.; SOUZA, N. A ; PIRES, D. X. Química orgânica: teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 322p.

TAYLOR, R. S. L.; HUDSON, J. B.; MANANDHAR, N. P.; TOWERS, G. H. N. Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. Journal of Ethnopharmacology, Clare, v. 53, n. 2, p. 97-104, Apr. 1996.

TURKENBURG, van D. M. G. W. **Crystallographic studies of modified insulin** (A thesis submitted to the Degree of Doctor of Philosophy Department of Chemistry). (1996).

VENÂNCIO, T. M.; AZEVEDO C. R.; OLIVEIRA, A E. A.; MACHADO, A L. T.; CUNHA, M. D. A.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. Presença de insulina durante o desenvolvimento de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], em sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. E folhas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link, mororó). In: 51 CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51., 2000, Brasília. Resumos... Brasília, 2000. p.14.

VIANA, E. P.; SANTA-ROSA, R. S.; ALMEIDA, S. S. M. S.; SANTOS, L. S. Constituents of the stem bark of *Bauhinia guianensis*. *Fitoterapia*, Milan, v. 70, n. 5, p. 111-112, Sept. 1998. Phytochemical Communication.

ANEXOS A

TABELA 1A - Matriz de Correlação para Tratamento - Folha Fresca (100grs).....	71
TABELA 2A: Matriz de Correlação para tratamento - Folha Liofilizada (100grs).....	72
TABELA 3A: Matriz de Correlação para o tratamento - Folha seca a Sombra (100 grs).....	73
TABELA 4A: Matriz de Correlação - Tratamento folha seca a estufa (100grs).....	74

TABELA 1A: Matriz de Correlação para Tratamento – Folha Fresca (100 g)

	Fev	Mar	abr	maio	junho	Agosto	Set	Out	Nov	Dez
Fev	1,0000									
mar	0,9022	1,0000								
abr	-0,1254	0,2528	1,0000							
maio	-0,1518	0,2740	0,9626	1,0000						
junho	0,7641	0,4234	-0,5223	-0,6543	1,0000					
Agosto	0,9160	0,9087	-0,1344	-0,0498	0,5157	1,0000				
Set	-0,7085	-0,3358	0,7146	0,7926	-0,9648	-0,5345	1,0000			
Out	-0,1573	0,2836	0,8360	0,9534	-0,7366	0,0586	0,8033	1,0000		
Nov	0,9644	0,7613	-0,2943	-0,3660	0,9075	0,8073	-0,8563	-0,4039	1,0000	
Dez	0,4228	0,7652	0,6144	0,7391	-0,2582	0,6173	0,3170	0,8186	0,1697	1,000

Obs : Valores em negrito/Vermelho correspondem a forte correlação negativa.

Valores em negrito/Preto correspondem a forte correlação positiva.

TABELA 2A: Matriz de Correlação para tratamento – Folha Liofilizada (100 g).

	Fev	mar	abr	maio	junho	Agosto	Set	Out	Nov	Dez
Fév	1,0000									
mar	0,4048	1,0000								
abr	-0,4016	0,6749	1,0000							
maio	-0,8578	-0,4472	0,2463	1,0000						
junho	0,1641	-0,2423	-0,3714	0,3617	1,0000					
Agosto	0,4968	0,9578	0,5594	-0,3854	0,0445	1,0000				
Set	-0,1588	-0,7427	-0,6131	0,5446	0,8282	-0,5225	1,0000			
Out	0,7969	0,8118	0,1688	-0,8830	-0,3100	0,7652	-0,7063	1,0000		
Nov	0,4054	0,2215	-0,1018	0,1034	0,8906	0,4918	0,4832	0,1007	1,0000	
Dez	0,2972	-0,0092	-0,2453	0,2348	0,9718	0,2774	0,6730	-0,1039	0,9727	1,0000

Obs : Valores em **negrito/Vermelho** correspondem a forte correlação negativa.

Valores em **negrito/Preto** correspondem a forte correlação positiva.

TABELA 3A: Matriz de Correlação para o tratamento – Folha seca à Sombra (100 g).

	Fev	mar	abr	maio	junho	Agosto	Set	Out	Nov	Dez
Fev	1,0000									
mar	0,9912	1,0000								
abr	0,9375	0,8915	1,0000							
maio	0,4891	0,5678	0,4004	1,0000						
junho	0,9661	0,9912	0,8239	0,6029	1,0000					
Agosto	-0,1100	-0,1569	-0,1844	-0,8418	-0,1540	1,0000				
Set	-0,3038	-0,3714	-0,2910	-0,9611	-0,3906	0,9578	1,0000			
Out	-0,9813	-0,9518	-0,9869	-0,4478	-0,9028	0,1529	0,3015	1,0000		
Nov	0,9881	0,9983	0,8971	0,6078	0,9881	-0,2138	-0,4216	-0,9535	1,0000	
Dez	0,6119	0,5631	0,8106	0,5299	0,4737	-0,6151	-0,5812	-0,7314	0,5993	1,0000

Obs : Valores em negrito/Vermelho correspondem a forte correlação negativa.

Valores em negrito/Preto correspondem a forte correlação positiva.

TABELA 4A: Matriz de Correlação – Tratamento folha seca na estufa (100 g).

	Fev	mar	abr	maio	junho	Agosto	Set	Out	Nov	Dez
Fev	1,0000									
mar	0,9182	1,0000								
abr	0,9538	0,8005	1,0000							
maio	0,8374	0,9705	0,6556	1,0000						
junho	0,6552	0,3758	0,6177	0,3575	1,0000					
Agosto	-0,2835	-0,0139	-0,2187	-0,0663	-0,9022	1,0000				
Set	-0,9415	-0,7921	-0,9986	-0,6390	-0,5805	0,1739	1,0000			
Out	0,0062	-0,3904	0,2007	-0,5078	0,5636	-0,6086	-0,1943	1,0000		
Nov	-0,1852	-0,4150	-0,2370	-0,3176	0,6099	-0,8896	0,2777	0,6013	1,0000	
Dez	0,0000	-0,3891	0,1431	-0,4627	0,6526	-0,7477	-0,1264	0,9782	0,7504	1,0000

Obs : Valores em **negrito/Vermelho** correspondem a forte correlação negativa.

Valores em **negrito/Preto** correspondem a forte correlação positiva.