



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE CLIMÁTICA E DE PARÂMETROS
LABORATORIAIS SOBRE O TEOR DE FLAVONÓIDES EM *Bauhinia cheilantha*
(BONG.) STEUDEL**

TADEU JOSÉ DA SILVA PEIXOTO SOBRINHO

RECIFE, 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE CLIMÁTICA E DE PARÂMETROS
LABORATORIAIS SOBRE O TEOR DE FLAVONÓIDES EM *Bauhinia cheilantha*
(BONG.) STEUDEL**

TADEU JOSÉ DA SILVA PEIXOTO SOBRINHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profª. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti
de Amorim

Co-orientador: Prof. Dr. Ulysses Paulino de
Albuquerque

Profª. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Orientadora)

Prof. Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque (Co-Orientador)

RECIFE, 2008

Peixoto Sobrinho, Tadeu José da Silva.

Influência da sazonalidade climática e de parâmetros laboratoriais sobre o teor de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (BONG.) Steudel/ Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho – Recife: O Autor, 2008.

59 folhas. il.,fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008.

Inclui bibliografia.

1. *Bauhinia cheilantha*. 2. Pata de vaca. 3. Flavonóides. 4. Ecologia química. 5 Validação. I. Título.

**615
615.1**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2008-027**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Recife, 28 de fevereiro de 2008.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2008 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura:

EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque (Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura:

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Antonio José Alves (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-Reitor

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pró-Reitor para assuntos de Pesquisas e Pós-Graduação

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

José Thadeu Pinheiro

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Jane Sheila Higino

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Samuel Daniel de Sousa Filho

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pedro José Rolim Neto

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Beate Saegesser Santos

Dedico este trabalho aos meus pais, Fausto e Fátima Peixoto, por todo o amor, educação, incentivo e paciência que sempre me fortalece e nunca deixam faltar. A Thamyris, companheira fiel que sempre alegra e traz amor à minha vida. Aos familiares, Gabriela, Lafaete, Iuri, Ana Paula e Gleyd por todo o apoio e admiração. Todos vocês foram fundamentais para mais esta realização profissional e pessoal.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado à vida e me fortalecer nas horas difíceis.

À Universidade Federal de Pernambuco, e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter concedido a realização deste curso.

À amiga e também orientadora Profa. Elba Amorim, que sempre tem paciência e sabedoria para me conduzir até este momento de realização profissional e pessoal.

Ao co-orientador Prof. Ulysses Albuquerque por me oferecer a oportunidade de aprender com seus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Profa. Miracy de Albuquerque pelos dados de especificidade e ao Prof. Pedro Rolim Neto pelos resultados de reprodutibilidade.

Aos funcionários da Estação Climatológica de Caruaru da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) pelo apoio logístico.

Aos professores Antonio Alves, Antonio Fernando, Jane Higino e Julianna de Albuquerque por terem aceitado o convite de participar da defesa e contribuir com este trabalho.

Aos amigos e pesquisadores do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), Diego, Jenifer, Jorge, Libni, Luciana, Renato, Sâmea, Tássia Campos, Tássia Camila e Valerium, que sempre me apóiam, acreditam e trazem alegria ao dia-a-dia e em especial a Henrique, João, Késsio e Tiago que contribuíram significativamente para a conclusão deste estudo.

Aos amigos e pesquisadores do Laboratório de Etnobotânica Aplicada (LEA) Alysson, Cecília, Ernani, Genildo, Gustavo, Luciana, Marcelo, Patrícia, Reinaldo, Shana, Taline, Viviane, Vital, e em especial a Júlio, Nelson e Thiago, por incentivar e ajudar a concluir este trabalho.

A todos os professores e estudantes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela crença em minhas aspirações.

Muito Obrigado!

**"Se você acha que pode,
você está certo. Se você
acha que não pode,
também estará certo".**

(Henry Ford)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	Gênero <i>Bauhinia</i>	14
2.1.1	<i>Aspectos botânicos</i>	14
2.1.2	<i>Aspectos fitoquímicos</i>	15
2.1.3	<i>Aspectos farmacológicos</i>	18
2.2	Flavonóides	19
2.2.1	<i>Propriedades químicas</i>	19
2.2.2	<i>Propriedades farmacológicas</i>	20
3.	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4.	ARTIGO 1 - Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de <i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steudel	24
5.	ARTIGO 2 - Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os níveis de flavonóides em <i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steudel	38
6.	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	54

RESUMO

INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE CLIMÁTICA E DE PARÂMETROS LABORATORIAIS SOBRE O TEOR DE FLAVONÓIDES EM *Bauhinia cheilantha* (BONG.) STEUDEL

Os flavonóides constituem uma classe amplamente distribuída no Reino vegetal e apresentam diversas funções biológicas e atividades farmacológicas. Este grupo tem sido bastante relatado no gênero *Bauhinia*, sendo o possível responsável por suas indicações populares. *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel é uma espécie nativa da Caatinga e possui diversos usos etnofarmacológicos. Fatores ambientais podem interferir na síntese destes metabólitos, alterando as respostas terapêuticas esperadas. No Brasil, diversos fitoterápicos possuem em sua constituição plantas do gênero *Bauhinia*, entretanto, por não estar de acordo com as normas vigentes, muitos não possuem registro. A Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, determina que para validar a metodologia analítica faz-se necessário avaliar os parâmetros especificidade, linearidade, robustez, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. O presente estudo visa compreender as condições ambientais que a Caatinga desempenha sobre a produção de flavonóides e validar a metodologia analítica empregada. Amostras de *B. cheilantha* foram coletadas no fragmento de Caatinga pertencente à Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), em Caruaru/PE durante os meses de abril a setembro/2006. O material testemunho foi depositado no Herbário Prof. Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Após secagem, as folhas foram pulverizadas e quantificadas por metodologia espectrofotométrica, sendo os resultados expressos como equivalentes do padrão rotina (em µg/mL). Os dados pluviométricos foram obtidos na Estação Climatológica do IPA. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa *BioEstat* 4.0. Todos os parâmetros exigidos pela RE nº 899 foram avaliados e estão de acordo com as normas, o que confirma a validação do método. Não foi possível correlacionar a produção de flavonóides com a pluviosidade. Contudo, foi observado que o teor destes metabólitos é maior nos indivíduos da borda do fragmento. A realização deste estudo contribui para a compreensão da ecologia química de plantas da Caatinga, uma vez que há poucas pesquisas enfocam este tema e forneceu às indústrias o procedimento analítico validado para a realização mais eficiente do controle de qualidade de seus produtos comercializados.

Palavras chave: *Bauhinia cheilantha*, pata-de-vaca, flavonóides, ecologia química, validação.

ABSTRACT

THE INFLUENCES OF SEASONAL CLIMATIC FACTORS AND LABORATORY PARAMETERS ON THE FLAVONOID CONTENT OF *Bauhinia cheilantha* (BONG.) STEUDEL

Flavonoid compounds are widely distributed within the plant kingdom and have numerous biological functions and diverse pharmacological activities. Flavonoids are closely associated with the genus *Bauhinia* and they are probably responsible for many of its attributes in traditional folk medicine. *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel is a native species of the Caatinga biome and has many ethnopharmacological uses. Environmental factors can influence in metabolite synthesis, altering the expected therapeutic actions of a plant extract. Many phytotherapeutic recipes in Brazil contain components derived from plants of the genus *Bauhinia*, although these herbal medicines often do not fulfill established governmental health norms and are not yet duly registered. Resolution RE 899 of May 29, 2003, of the National Agency for Health Control determined that in order to validate an analytical methodology the parameters of specificity, linearity, robustness, as well as the limits of detection, quantification, precision, and exactness must be evaluated. The present study examined the effects of environment conditions in the Caatinga biome on flavonoid synthesis and validated the analytical methodology used. Samples of *B. cheilantha* were collected in a fragment of Caatinga vegetation during the period between April and September, 2006, at the Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) station in Caruaru, Pernambuco State, Brazil. Reference plant material was deposited in the Prof. Vasconcelos Sobrinho Herbarium at the Universidade Federal Rural de Pernambuco. After drying, the sample leaves were pulverized and extracted, and various parameters quantified using spectrophotometer methodologies. The results are expressed in terms of a rutin standard (in µg/ml). Rainfall data was obtained from a weather station at the IPA. The results were statistically analyzed using the *BioEstat* 4.0 software program. All of the parameters demanded by the RE 899 regulation were evaluated and are in agreement with those norms, which validates the methodology. It was not possible to correlate flavonoid production with rainfall parameters. However, it was observed that the plants at the forest edge have higher levels of flavonoid compounds. This study contributed to our knowledge of the chemical ecology of Caatinga plants, especially as very little research has yet been focused on this theme, and it likewise offers valid analytical procedures to industries to insure more efficient quality control of their products.

Key words: *Bauhinia cheilantha*, pata-de-vaca, flavonoid, chemical ecology, validation

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais superiores possuem uma ampla classe de substâncias denominadas metabólitos secundários que estão envolvidas principalmente com a defesa vegetal (Genovese & Lajolo, 2001). Derivado da rota metabólica dos fenilpropanóides, os flavonóides compõem um grupo bastante diversificado e apresentam até o momento mais de nove mil estruturas identificadas, com várias funções biológicas, tais como defesa a herbivoria, perpetuação de espécies por atrair animais dispersantes de sementes e proteção contra aos raios ultravioleta (Martens & Mithöfer, 2005; Zuanazzi & Montanha, 2005). Os flavonóides também desempenham atividades farmacológicas, sendo as principais: antioxidante, antidiabética, antiinflamatória, antitumoral, antimicrobiana e hipocolesterolemizante (Harborne & Williams, 2000; Martens & Mithöfer, 2005; Zuanazzi & Montanha, 2005).

Vários fatores podem interferir, quantitativamente ou qualitativamente, na produção de metabólitos secundários, como os flavonóides. As diferenças na produção de flavonóides entre estações climáticas podem estar relacionadas com defesa à herbivoria, já que em períodos chuvosos aumenta o número de insetos herbívoros, enquanto que ao se aproximar da estiagem, ocorre um decréscimo significativo, seguindo um padrão sazonal (Iannuzzi *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.* 2002).

Solar *et al.* (2006) verificaram que há diferenças no conteúdo de flavonóides em *Juglans regia* L. (Juglandaceae) ao longo das estações do ano. Já um estudo com *Cistus ladanifer* L. (Cistaceae), mostrou que a síntese de flavonóides diferiu entre estações e entre dois grupos. No Grupo I (região com menor pluviosidade) ocorreu um aumento na síntese de flavonóides do inverno ao verão, enquanto que no Grupo II (região com menor pluviosidade) esse aumento foi três vezes maior (Sosa *et al.*, 2005). A sazonalidade climática parece ser um fator importante também para taninos, como verificaram Monteiro *et al.* (2006) para duas espécies típicas do bioma Caatinga ao longo de períodos de estiagem e de chuva.

A formação de bordas causadas pela fragmentação florestal também pode interferir na produção de metabólitos secundários, pois que causam impactos sobre as relações ecológicas e alteram as condições microclimáticas (Debinski, Holt, 1999; Laurance, Yensen, 1991; Murcia, 1995; Saunders *et al.*, 1991). Barbosa *et al.* (2005) verificaram que a assembléia de herbívoros é significativamente maior na borda, seguido de trilhas e interior da mata.

Muitas plantas que possuem compostos flavônicos em sua constituição são empregadas com finalidade terapêutica, sendo bastante usada por diversas indústrias para

produzir fitoterápicos. Contudo, para se obter registro e posterior comercialização deste tipo de medicamento, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução R.D.C. nº. 48 de 16 de maio de 2004, recomenda a validação da metodologia analítica quando a mesma não constar em farmacopéias ou monografias oficiais. (Brasil, 2004). A Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, determina que para validar a metodologia é preciso avaliar os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limite de detecção, limite quantificação, robustez, precisão e exatidão (Brasil, 2003).

Desta forma, um estudo dedicado a avaliar os teores de flavonóides da espécie nativa da Caatinga *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel, que é usada para o tratamento de diversas enfermidades e comercializada em feiras livres, em relação à influência ambiental, bem como validar uma metodologia analítica viável e de baixo custo para que possa ser utilizada nos laboratórios de controle de qualidade, contribui com o conhecimento científico e com o desenvolvimento tecnológico.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Bauhinia*

2.1.1 Aspectos botânicos

O Brasil é detentor de grande diversidade biológica com importantes famílias de plantas medicinais empregadas no dia-a-dia de várias comunidades, sendo muitas delas alvo de constantes pesquisas científicas, o que desperta interesse econômico mundial (Gottlieb *et al*, 1998). Pertencente à família Caesalpiniaceae, o gênero *Bauhinia* inclui um vasto número de espécies medicinais ou ornamentais, naturais ou introduzidas, bem distribuídas nos diversos biomas brasileiros (Albuquerque, 1997; Haver, 2002; Silva & Cechinel Filho, 2002).

Este gênero compreende cerca de 300 espécies (Pizzolatti *et al*, 2003; Silva & Cechinel Filho, 2002) sendo que destas, 64 ocorrem no território nacional (Haver, 2002). Conhecida por mororó, pata-de-vaca ou unha-de-vaca, o gênero *Bauhinia* possui plantas muito utilizadas no Brasil, podendo ser encontrada na composição de diversos fitoterápicos industrializados ou comercializadas em feiras livres (Albuquerque *et al*, 2005; Melo *et al*, 2004).

Em Pernambuco, destacamos *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel (sinonímia *Pauletia cheilantha* Bong.) (Fig. 1) que apresenta importantes propriedades medicinais atribuídas popularmente (Agra *et al.*, 2007a,b; Albuquerque *et al*, 2007a,b). Esta espécie exibe diversos usos populares, onde suas sementes, folhas e cascas do caule, são comumente coletadas com finalidade alimentícia, medicinal ou madeireira em quintais agroflorestais e matas próximas às comunidades, e por esta razão, pode estar ameaçada por extrativismo descomedido (Albuquerque & Andrade, 2002a,b; Albuquerque *et al*, 2005).



FIGURA 1 - (a) Aspecto do fragmento de Caatinga onde foram realizadas as coletas, (b) folha jovem e adulta, (c) marcação individual (d) e ramo com inflorescência terminal de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel.

2.1.2 Aspectos fitoquímicos

Na Tabela 1 podem ser encontrados os principais grupos de metabólitos secundários identificados no gênero *Bauhinia*. Entretanto, há pouca informação científica sobre extração e identificação dos compostos químicos presentes na espécie *B. cheilantha*.

TABELA 1 – Levantamento dos compostos químicos do Gênero *Bauhinia*, Família Caesalpiniaceae.

Espécie	Composto	Referência
<i>B. aculeata</i> L.	β -Bourboneno; β -Elemeno; Lepidozenol; Eremofileno	Duarte-Almeida <i>et al</i> , 2004
<i>B. brevipes</i> Vogel	α -Copaeno; β -Elemeno; β -Cubebeno; <i>allo</i> -Aromadendreno; α -Amorfenol; Germacreno D; β -Selineno; χ -Elemeno; δ -Cadineno; Viridiflorol; Spatulanol; Aromadendreno; α -Cadinol; χ -Cadineno; Valenceno	Duarte-Almeida <i>et al</i> , 2004
<i>B. candicans</i> Benth.	Sitosterol; Campesterol; Estigmasterol; Colesterol; Estigmasta-3,5-dieno-7-ona; Sitosterol 3-O- β -glucosídeo; Sitosterol 3-O- α -D-xilurono-furanosídeo; Kaempferol 3-O- β -rutinosídeo; Kaempferol 3-O- β -rutinosídeo; 7-O- α -rhamno-piranosídeo; Trigonelina	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. championii</i> (Benth.) Benth.	Ácido gálico; Bauhinina	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. forficata</i> Link	Canferol; 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilcanferol; 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilquercetina; 3-O-[α -L-raamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosilcanferol; 3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosilquercetina	Pizzolatti <i>et al</i> , 2003
	Kaempferitrina; Sitosterol; Kaempferol-3-O- α -Diraminosídeo	Silva & Cechinel Filho, 2002
	α -Pineno; α -Copaeno; β -Elemeno; β -Cariofileno; Bicclogermacreno; α -Humuleno; Isômero Copaeno	Duarte-Almeida <i>et al</i> , 2004
	Sitosterol; Estigmasterol; 4-hidroxi-7-metoxiflavona; Lapachol; Di-hidro- α -lapachona	Viana <i>et al</i> , 1999
<i>B. guianensis</i> Aubl.	Sitosterol; Sitosterol-3-O- β -D-glucosídeo; Estigmasta-4-eno-3-ona; Estigmasta-4-eno-3,6-diona; Ácido cinâmico; cinnamoil- β -D-glucose; Éster metílico do ácido (E)-4-hidroxi-cinâmico; Éster metílico do ácido (E)-4-hidróxi-3-metoxicinâmico; Ácido gálico, Galato de metila; Éster metílico do Ácido 4-hidroxi-2-etoxibenzóico; Éster metílico do Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico; Éster metílico do Ácido 3,4-dihidroxibenzóico; ω -Hidroxiopropioguaiacona; Siringaresinol; (7S,8R,8'R)-5,5-dimetoxilarici-resinol; Apigenina; Chisoeriol ; Luteolina 5,3-dimetoxi; Kaempferol; Isoliquiritigenina; Isoliquiritigenina 2-metoxi; Isoliquiritigenina 4-metoxi; Echinatina; 2,4-di-hidroxi-4-metoxi-di-hidrochalcona; (2S)-Narigenina (2S)-Eriodictiol; (2S)-Liquiritigenina; (2S)-Liquiritigenina 7-metoxi; (2S)-iquiritigenina 4-metoxi; (2S)-7,4-Di-hidroxi-flavona; (2S)-7,3-Dimetoxi-4 hidroxi-flavona; (2S)-3,4-Dimetoxi-7-hidroxi-flavona; (2S)-7,4-Dimetoxi-3-hidroxi-flavona; Obtustireno-5,7-di-hidroxicromona; (2R,3R)-3-O-galoilepicatequina	Silva & Cechinel Filho, 2002
	Sitosterol; Estigmasterol; Bausplendina; Quercetina; Rutina; Galato de etila	Silva & Cechinel Filho, 2002

<i>B. longifolia</i> (Bong.) Steudel	β -Cariofileno; Germacreno D; Bicyclogermacreno; Espatuleno; Aromadendreno; Isoespatuleno; γ -Cadineno	Duarte-Almeida <i>et al</i> , 2004
<i>B. multinervia</i> (Kunth)DC.	5,7,5'-tri-hidroxi-2'-O-ramnosil-flavona; 5,7,2'-trihidroxi-5'-O-ramnosil-flavona	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. pentandra</i> (Bong.) Steudel	β -Cariofileno; γ -Elemeno; α -Elemeno; Óxido de Cariofileno	Duarte-Almeida <i>et al</i> , 2004
	Campesterol; Estigmasterol; β -Sitosterol; Δ 5-Avenasterol; Δ 7-Estigmasterol; Δ 7-Avenasterol; β -Tocoferol; δ -Tocoferol	Ramadan <i>et al</i> , 2005
<i>B. purpurea</i> L.	6-butil-3-hidroxiflavanona	Kuo <i>et al</i> , 1998
	5,6-dihidroxi-7-metoxiflavona 6-O- β -D-xilopiranosídeo	Yadava & Tripathi, 2000
	Isoquercitrina; Quercetina; Astragalina	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. racemosa</i> Lam.	Pacharina; Racemosol; Des-O-metilracemosol	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. rufa</i> (Bong.) Steudel	α -Pineno; <i>allo</i> -Aromadendreno; α -Amorfeno; Germacreno D; Germacreno B; Bicyclogermacreno; δ -Cadineno; Viridiflorol; Espatuleno; α -Cadinol; cis- α -Bisaboleno; γ -Cadineno; Globulol; Lepidozenol	Duarte-Almeida <i>et al</i> , 2004
<i>B. rufescens</i> Lam.	5,6-di-hidro-11-metoxi-2,2,12-trimetil-2H-nafto-[1,2- ϵ][1]-benzopirano-8,9-diol; 11-metoxi-2,2,12-trimetil-2H-nafto-[1,2- ϵ][1]-benzopirano-8,9-diol; 1,7,8,12b-tetra-hidro-2,2,4-trimetil-2H-benzo-[6,7]-ciclo-hepta-[1,2,3-de] [1]benzopirano-5,10,11-triol	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. thonningii</i> Schum.	Grifonilida	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. tomentosa</i> L.	Isoquercitrina; Quercetina; Rutina	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. uruguayensis</i> Benth.	Estigmasta-1,3,5-trieno; Estigmasta 3,5-dieno; Campesterol; Estigmasterol; Sitosterol; Estigmasta-4,6-dien-3-ona; Sitosterol-3-O- α -D-riburono-furanosídeo; Sitosterol -3-O- β -D-xilopiranosídeo; Sitosterol-3-O- α -D-xiluronofuranosídeo; Sitosterol -3-O- β -D-glucopiranosídeo; Quercetina -3-O- α -L-ramnopiranosídeo; Kaempferol -3-O- α -L-ramnopiranosídeo	Silva & Cechinel Filho, 2002
<i>B. vahlii</i> Wight & Arn.	Campesterol; Estigmasterol; Sitosterol; Quercetina; Quercetina-3-glucosídeo; Kaempferol; Agathisflavona; Ácido betulínico	Silva & Cechinel Filho, 2002
	α -Copaeno; β -Elemeno; β -Cariofileno; Isocariofileno; <i>allo</i> -Aromadendreno; <i>allo</i> -Aromadendreno Germacreno D; γ -Elemeno; δ -Cadineno; Espatuleno; Ledeno	Duarte-Almeida <i>et al</i> , 2004
<i>B. variegata</i> L.	Lupeol; Sitosterol; Narigenina-5,7-dimetoxi-4-ramnoglucosídeo; Kaempferol-3-galactosídeo; Kaempferol-3-ramno-glucosídeo	Silva & Cechinel Filho, 2002
	(2S)-5,7-dimetoxi-30,40-metilenedioxiflavanona	Reddy <i>et al</i> , 2003

2.1.3 Aspectos farmacológicos

Estudo realizado com *Bauhinia forficata* Link. demonstrou que o tratamento do extrato foliar em ratos normais, normais suplementados com glicose e diabéticos induzidos por aloxano, diminuíram os níveis de glicose sanguínea, enquanto que a administração oral da fração butanólica, não demonstrou efeito hipoglicêmico em ratos normais hiperglicêmicos alimentados com glicose (Silva *et al.*, 2002). Fuentes *et al.*, (2004) observaram que o extrato bruto foliar de *Bauhinia candicans* Benth, possui atividade hipoglicemiante associado com a diminuição da excreção urinária de glicose em coelhos com diabetes induzida por aloxano, e que a fração butanólica exibiu os resultados mais promissores, indicando que o extrato de *B. candicans* aumentou o metabolismo periférico da glicose.

Argolo *et al.* (2004), verificaram que as frações clorofórmio e acetato de etila do extrato etanólico de *Bauhinia monandra* Kurz exibiram excelente concentração de inibição (IC_{50} 2.06 ± 0.02 e IC_{50} 2.16 ± 0.01 mg/g DPPH, respectivamente), sugerindo que o extrato de *B. monandra* possui pronunciada atividade antioxidante quando comparado a catequina (controle positivo) e outros extratos vegetais. Também foi observado que o extrato metanólico de *Bauhinia racemosa* Lam. removeu os radicais livres induzidos por DPPH e ânion superóxido e perceberam que a atividade antioxidante aumentou concentração-dependente, tendo resultados satisfatório em todas as análises (Kumar *et al.*, 2005).

Gupta *et al.*, (2004) perceberam que o extrato metanólico de *B. racemosa* aumentou os níveis de glutathione, superóxido dismutase e catalase, exibindo efeito antitumoral por modular a peroxidação lipídica e aumentar o sistema de defesa antioxidante em camundongos com carcinoma de Ehrlich. Também foi observado que o extrato metanólico de *B. racemosa* possui potencial atividade antiinflamatória contra as fases aguda e crônica, antipirética, analgésica central e periférica (Gupta *et al.*, 2005).

Outra atividade farmacológica observada em *B. racemosa* foi a ação anti-ulcerogênica, desempenhada pelo extrato metanólico dos brotos florais que diminuíram, significativamente, a produção de ácidos gástricos e a concentração de pepsina, acarretando em menor índice de úlceras induzidas por aspirina em ratos (Akhtar & Ahmad, 1995).

Quintans-Júnior *et al.* (2002), avaliaram o potencial anticonvulsivante de plantas da região nordeste do Brasil e verificaram que *Bauhinia guianensis* Aubl. apresentou um aumento significativo na latência para o surgimento de convulsões do tipo clônicas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), efeito este que é semelhante ao de drogas clássicas usadas para o tratamento de epilepsias.

Luna *et al.* (2005) procurando avaliar o potencial larvicida e moluscicida de espécies medicinais do nordeste do Brasil, notaram que o extrato do caule de *B. cheilantha* (500 ppm) obteve 100% de mortalidade frente às larvas de *Aedes aegypti* e o extrato da raiz (100 ppm) apresentou 100% de toxicidade seletiva sobre *Artemia salina* Leach.

Estudos realizados por Guimarães-Beelen *et al.* (2006) confirmaram os resultados encontrados por Araújo Filho *et al.* (2005), que estudando a importância de plantas forrageiras da Caatinga, mostrou excelentes resultados para *B. cheilantha*, tendo emprego na pecuária, apresentando altos valores nutricionais em várias fases fenológicas.

Contudo há poucos estudos para comprovação científica das atividades popularmente atribuídas a *B. cheilantha*, como tônico, depurativo, antidiabético, hipolipidêmico, antihipertensivo, antiinflamatório, contra reumatismo, enxaqueca, problemas do sistema respiratório, renal e nervoso (Agra *et al.*, 2007a,b; Albuquerque *et al.*, 2007a,b).

2.2 Flavonóides

2.2.1 Propriedades químicas

Os flavonóides compõem uma classe de substâncias de origem natural com extensa diversidade estrutural, cuja síntese não ocorre na espécie humana (Zuanazzi & Montanha, 2004). Atualmente, já foram identificadas mais de nove mil substâncias pertencentes a este grupo (Martens & Mithöfer, 2005).

Como podem ser vistos na Figura 2, os flavonóides são constituídos por um esqueleto simples composto de dois anéis fenólicos (A e B) interconectados por uma cadeia propiônica, que podem estar associados a carboidratos (heterosídeos), não associados (agliconas) e ainda polimerizados (antocianinas) (Martens & Mithöfer, 2005; Zuanazzi & Montanha, 2004). O anel A é proveniente da via do acetato (Malonil-CoA), enquanto que o anel B juntamente à ponte de três carbonos é oriundo do ácido chiquímico (p-Cumaril-CoA) (Ugaz, 1994; Zuanazzi & Montanha, 2004).

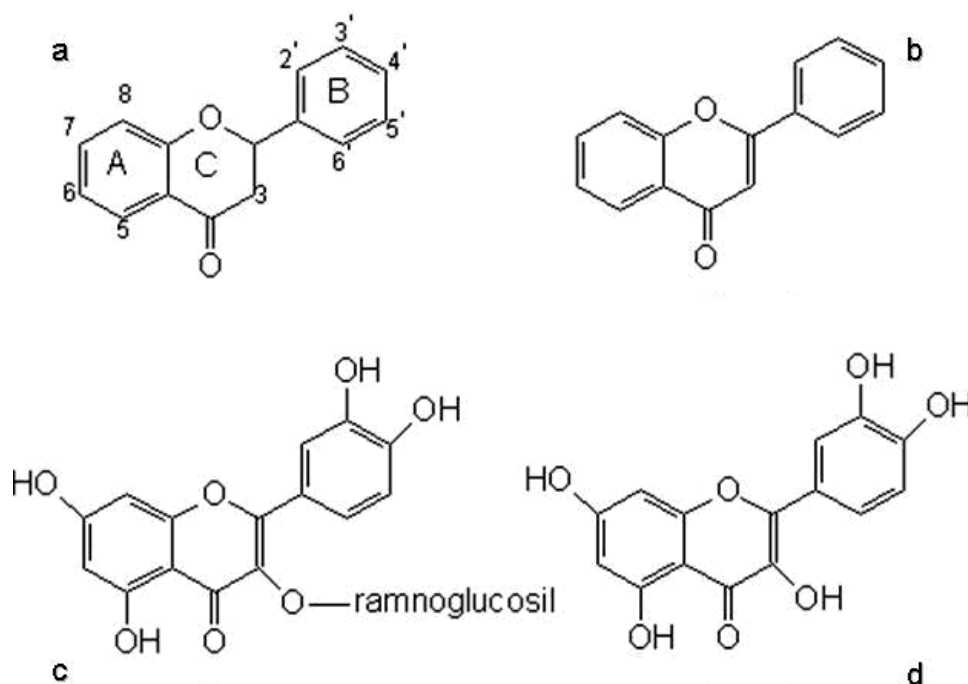


FIGURA 2 - Estruturas flavônicas: (a) Núcleo básico dos flavonóides (b) Estrutura dos flavonóis (c) Rutina (d) Quercetina. Fonte: UGAZ, 1994.

2.2.2 Propriedades farmacológicas

Esses compostos possuem uma série de propriedades atribuídas na medicina popular e muitas destas estão sendo testadas empiricamente, como a atividade antimicrobiana, antioxidante, hipocolesterolemia, hipoglicêmica (Chicaro et al., 2004; Cottiglia et al., 2001; Cushnie & Lamb, 2005; Fuhrman et al., 2002; Gläber et al., 2002; Jung et al., 2006; Süzgeç et al., 2005) e até para prevenir acidentes isquêmicos (Dajas et al., 2003).

Do tronco de *Erythrina latissima* E. Mey. (Fabaceae) foram isolados dois isoflavonóides e um flavanona que apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida mycoderma* (Chacha et al., 2005). Martini et al. (2004), isolaram sete flavonóides de *Combretum erythrophyllum* (Burch.) Sond. (Combretaceae) e verificaram que todos os compostos demonstraram boa atividade frente a *Vibrio cholerae* e *Enterococcus faecalis*, ramnocitrina e quercetin-5,3-dimetileter também foram ativos contra *Micrococcus luteus* e *Shigella sonnei*.

Sala *et al.* (2003) observaram que o flavonóide tilirosídio extraído de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don f. (Asteraceae) inibiu, significativamente, os teste *in vivo* de edema da pata-de-rato induzido por fosfolipase A₂ e a inflamação de orelha-de-rato induzida por 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), indicando atividade antiinflamatória comparada a ciproheptadina, potente anti-histamínico e antiserotoninérgico. O uso de quercetina em ratos cirróticos diminuiu de modo significativo, as alterações causadas pela cirrose, aumentando o tempo de sobrevivência das cobaias (Miltersteiner *et al.*, 2003).

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio de quantificação espectrofotométrica, a influência da pluviosidade e do efeito de borda sobre a síntese de flavonóides totais em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel, e validar a metodologia analítica empregada.

3.2 Objetivos específicos

- Validar metodologia analítica para quantificação de flavonóides presentes nas folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel.
- Avaliar a influência do efeito de borda e interior de mata sobre o teor de flavonóides de *B. cheilantha*.
- Analisar as alterações dos níveis de flavonóides em *B. cheilantha* causados pela alteração pluviométrica no bioma Caatinga.

4. Artigo I:

Validação de metodologia espectrofotométrica
para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia
cheilantha* (Bong.) Steudel

4. ARTIGO 1

ARTIGO 1 SUBMETIDO A:

Revista: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

Autores: Peixoto Sobrinho, T.J.S.; Silva, C.H.T.P.; Nascimento, J.E.; Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.; Amorim, E.L.C.

Título: Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel

Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel

Validation of the spectrophotometer methodology for quantifying flavonoid content in *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel

Tadeu J. S. Peixoto Sobrinho¹, Carlos H. T. P. Silva¹, João E. Nascimento¹, Júlio M. Monteiro², Ulysses P. Albuquerque², Elba L. C. Amorim^{1*}

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco

² Laboratório de Etnobotânica Aplicada, Departamento de Biologia, Área de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

Os laboratórios de fitoterápicos necessitam de metodologias que assegurem o controle de qualidade de seus produtos quando os mesmos não constam em farmacopéias ou monografias oficiais. Baseado-se neste fato, o presente estudo visa validar uma metodologia analítica de quantificação de flavonóides contidos nos extratos da pata-de-vaca (*Bauhinia cheilantha* [Bong.] Steudel), através de espectrofotometria no visível, como equivalentes de Rutina (µg/mL). Todos os parâmetros exigidos pela ANVISA foram avaliados. No teste de especificidade observou-se a existência de pico máximo a 420 nm. O método foi considerado linear e com alta sensibilidade de quantificação (2,51 µg/mL). O método também mostrou-se robusto e com elevada recuperação (98,36%). Os resultados obtidos para repetibilidade, precisão intermediária (intra-corrida e inter-corridas) e reprodutibilidade certificaram a precisão do método com valores entre 0,31 e 3,58%, sendo também considerado exato (95,71-105,50%). Com este estudo, o método proposto foi considerado específico, preciso, reprodutível, exato, de baixo custo e fácil execução.

Unitermos: validação analítica, espectrofotometria, rutina, pata-de-vaca.

ABSTRACT

Phytotherapeutic laboratories require access to methodologies that guarantee quality control for their products when these items are not already registered in pharmacopeias or official monographs. As such, the present study sought to validate analytical methodologies for quantifying natural flavonoids contained in extracts of “pata-de-vaca” (*Bauhinia cheilantha* [Bong.] Steudel) using visible light spectrophotometry and a rutin standard (µg/ml). All of the parameters required by ANVISA were evaluated. The specificity test revealed a

* E.L.C. de Amorim, Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS/UFPE - Av. Prof Arthur de Sá, s/n - CEP: 54.740-521 Cidade Universitária – Recife/PE, Brasil. Fone: (81) 2126-8511 e-mail: elba@ufpe.br

maximum absorption peak at 420 nm. The methodology was considered linear and of high quantification sensitivity (2.51 µg/ml). The methodology also proved to be robust, and had high recovery levels (98.36%). The results obtained for repeatability, intermediate precision (intra- and inter-run), and reproducibility all certified the precision of the method, with values between 0.31 and 3.58%; the methodology was also considered exact (95.71-105.50%). This study demonstrated that the proposed methodology can be considered specific, precise, reproducible, exact, of low cost, and easy to perform.

Uniterms: analytical validation, spectrophotometry, rutin, pata-de-vaca.

INTRODUÇÃO

O gênero *Bauhinia* (Caesalpiniaceae) possui aproximadamente 300 espécies e, no Brasil, podemos encontrar cerca de 20% destas em seu território (Haver, 2002; Silva, Cechinel Filho, 2002), muitas presentes na composição de diversos fitoterápicos ou comercializadas em feiras livres (Melo *et al*, 2004). Apesar de ser bastante empregada na medicina popular (Albuquerque, Andrade, 2002a,b; Albuquerque *et al*, 2005), o gênero *Bauhinia* até o momento não faz parte da Farmacopéia Brasileira (Melo *et al*, 2004).

Bauhinia cheilantha (Bong.) Steudel é uma espécie amplamente usada na medicina tradicional de diversas comunidades rurais, podendo ser encontrada em quintais agroflorestais ou em áreas de mata de Caatinga (Albuquerque, Andrade, 2002a). É uma espécie de expressiva importância local sendo usada na produção de remédios tradicionais com ação antiinflamatória, antidiabética, para distúrbios digestivos, reumatismo e sedativa (Albuquerque *et al*, 2005; Almeida *et al*, 2005). Todavia, ainda são escassos os estudos que investiguem sua atividade biológica. Por exemplo, o efeito hipoglicemiante da fração butanólica do extrato foliar foi testada em ratos diabéticos induzidos por aloxano (Silva, Cechinel Filho, 2002).

Outras espécies do gênero *Bauhinia*, por sua vez, já foram os objetivos de diferentes investigações. Argolo *et al* (2004) estudando a ação antioxidante das folhas de *Bauhinia monandra* Kurz., mostrou que os extratos clorofórmico e acetato de etila, apresentaram excelente atividade, com concentração de inibição IC₅₀ de 2 mg/g de DPPH e porcentagem de inibição IP de 60-65%. Esta atividade foi atribuída aos esteróides e flavonóides presentes nas folhas, indicando potente atividade antioxidante quando comparada ao grupo tratado com catequinas e com outros extratos vegetais.

A ação andiabética de diferentes frações do extrato foliar de *Bauhinia candicans* Benth. foi avaliada por Fuentes *et al* (2004). O tratamento de 8 mg/kg da fração III (Kaenferol-3-O-rutinosídeo) reduziu, significativamente, os níveis de glicemia, evidenciando

uma atividade mais pronunciada. Estes resultados sugerem que os extratos de *B. candicans* aumentam o metabolismo da glicose e que podem conter princípios ativos com propriedades hipoglicemiantes.

Durante os últimos anos, diversos fitoterápicos que possuem em sua constituição plantas do gênero *Bauhinia*, tiveram seu registro indeferido por estar em desacordo com a legislação vigente (Brasil, 2007). Para a regularização de fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige através de sua Resolução R.D.C. nº 48, de 16 de Março de 2004 (Brasil, 2004), entre outras recomendações, a validação da metodologia analítica para registro do produto acabado.

A Resolução R.E. nº 899 de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003) da ANVISA, determina em seu “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, bem como os critérios estabelecidos na norma Q2(R1) do ICH (1996) “Validation of analytical procedures: text and methodology” que a metodologia considerar-se-á validada, desde que sejam avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Por tanto, a validação de metodologias analíticas necessita ser específica, robusta, sensível, precisa e exata, constituindo fundamental importância para o controle de qualidade dos produtos e sendo parte das normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle (Pimentel, Barros Neto, 1996; Barros Neto *et al*, 2002).

Em virtude das necessidades normativas no que se refere à regularização de fitoterápicos, o enfoque deste trabalho foi validar uma metodologia por espectrofotometria capaz de quantificar os constituintes flavônicos presentes nas folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel, para que possa ser usada rotineiramente nos laboratórios de controle de qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos

Empregaram-se espectrofotômetro GBC UV/Visível 911A (Melbourne) e cubeta de quartzo 1 cm de caminho óptico para validar o método proposto. Em todos os parâmetros foram utilizadas balanças (Sartorius) e vidrarias (Satelit) analíticas.

Reagentes e padrão de referência

Os solventes usados para quantificar os flavonóides de *B. cheilantha* (Bong.) Steudel foram todos de grau analítico: metanol p.a. Cinética Reagentes & Soluções e Dinâmica Reagentes Analíticos, ácido acético glacial p.a. Merck, cloreto de alumínio 99,5% Vetec Química Fina e piridina Vetec Química Fina 99,0%. Como padrão para flavonóides, foi utilizado Rutina (Merck), com grau de pureza de 99,5%.

Amostra vegetal

As folhas de *B. cheilantha* foram obtidas na Estação Experimental da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA (08°14'18,2"S e 35°54'57,1"), situado no Agreste pernambucano, sendo a identificação confirmada pelo Prof. Dr. Ulysses P. de Albuquerque, do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Após secagem à temperatura ambiente, as folhas foram pulverizadas em triturador industrial e devidamente armazenadas até os procedimentos de validação.

Procedimentos Experimentais

O padrão (Rutina) foi preparado em balão volumétrico de 100 mL com metanol, obtendo-se concentração final de 0,5 mg/mL. De cada amostra vegetal pulverizada 0,5 g foi transferido para Erlenmeyers de 50 mL, sendo adicionados 25 mL de metanol e aquecidos em chapa de aquecimento (até ebulição) por trinta minutos. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e transferidos quantitativamente para balões volumétricos de 50 mL. O resíduo do material foi lavado com 25 mL de metanol e novamente filtrado para o balão, tendo o volume completado com metanol.

Desta solução, foi pipetada e transferida uma alíquota para balão volumétrico de 25 mL, no qual foram adicionados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução piridina-metanol (2:8) e 2,5 mL de uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%, utilizando-se água destilada para completar o volume do balão. A solução branco foi preparada com todos os reagentes anteriores (exceto extrato ou padrão) em balão de 25 mL. Após intervalo de 30 minutos em repouso à temperatura ambiente, as leituras foram realizadas a 420 nm em cubeta de quartzo de 1 cm.

Parâmetros de validação

O ensaio de especificidade foi conduzido com os extratos metanólicos das amostras foliares de *B. cheilantha* pulverizadas e Rutina como padrão, ambos à concentração de 18 µg/mL, para verificação de possíveis interferentes. Os espectros de absorbância foram realizados na faixa compreendida entre 300-500 nm e forneceram os dados para construção do gráfico de especificidade.

Para a linearidade foi usada a média de três intervalos com repetições autênticas, que contemplavam seis concentrações da solução de Rutina 0,5 mg/mL (6,0-20,0 µg/mL). Após relação linear visual, os resultados foram analisados estatisticamente para definir o coeficiente de determinação mínimo aceitável ($R^2 = 0,99$), a equação de regressão, o ajuste linear e o desvio-padrão relativo (Barros Neto *et al*, 2002; Brasil, 2003).

Os limites de detecção e quantificação foram estimados (em µg/mL) considerando o desvio-padrão em razão ao coeficiente angular (inclinação da reta) obtidos pela linearidade, onde foram utilizadas as equações 1 e 2 para determinar o limite de detecção e quantificação, respectivamente (Brasil, 2003).

$$\begin{aligned} LD &= DP_a \times 3/IC \text{ (Equação 1)} \\ LQ &= DP_a \times 10/IC \text{ (Equação 2)} \end{aligned}$$

Onde o LD é o limite de detecção; LQ é o limite de quantificação; DP_a é o desvio-padrão relativo; IC é a inclinação de curva de calibração.

O parâmetro recuperação foi realizado com três amostras em triplicata e o resultado foi obtido através da equação 3.

$$R (\%) = \frac{CTF - CFE}{CFP} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

CTF compreende a concentração total de flavonóides (padrão Rutina adicionado ao extrato foliar de *B. cheilantha*), CFE compreende a concentração de flavonóides no extrato foliar e CFP a concentração de flavonóides do padrão Rutina. R (%) é a recuperação obtida (Brasil, 2003).

Os fatores a serem considerados para analisar a robustez foram: tempo de extração (20 e 40 minutos), estabilidade de leitura (20 e 40 minutos) e diferentes fabricantes de solventes (Cinética e Dinâmica), o que está de acordo com o preconizado pela ANVISA (Brasil, 2003). Os resultados foram avaliados mediante comparação através da análise de variância.

Os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foram determinados por seis amostras de mesma concentração (18 µg/mL) executados no mesmo dia (intra-corrida) e dois dias consecutivos por analistas diferentes (inter-corridas) (Brasil, 2003). Os resultados foram expressos como desvio-padrão relativo (equação 4). A reprodutibilidade foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e compreendeu seis amostras de mesma concentração (18 µg/mL). A exatidão foi avaliada por três controles (em triplicata) de concentração baixa (9,0 µg/mL), média (18 µg/mL) e alta (27 µg/mL). A exatidão (equação 5) foi calculada, individualmente para cada controle.

$$\text{DPR (\%)} = \text{DP/CMD} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$
$$\text{E (\%)} = \text{CME/CT} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

Onde o DPR (%) é a precisão; DP é o desvio-padrão; CMD é a concentração média determinada; E (%) é a exatidão; CME é a concentração média experimental; e CT é a concentração teórica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Especificidade

Na Figura 1 podemos observar o espectro obtido para o extrato de *B. cheilantha* (18 µg/mL) e para a Rutina (18 µg/mL), na faixa compreendida entre 300-500 nanômetros, sendo evidenciado apenas um pico de absorção máxima a 420 nm. Com isso, confirmamos que neste comprimento de onda é possível quantificar especificamente o padrão para flavonóide e os contidos no extrato, mesmo na presença de impurezas.

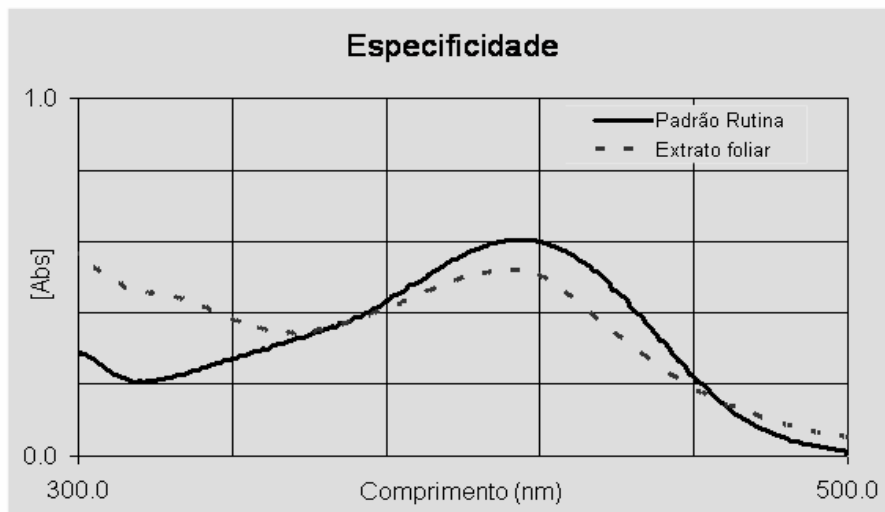


FIGURA 1 – Especificidade do método construído com padrão rutina (18,0 µg/mL) e com o extrato foliar de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel (18,0 equivalentes de rutina). Amplitude compreendida entre 300-500 nm. Identificação de pico máximo a 420,0 nm. Abs= Absorvância.

Linearidade e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 420 nm para as concentrações estudadas (6,0-20 µg/mL). A equação da regressão linear média obtida a partir de três curvas de calibração, foi $y = 0,0256x + 0,0141$, onde y é a absorvância (nm) e x a concentração (µg/mL) em equivalentes de Rutina (Fig. 2).

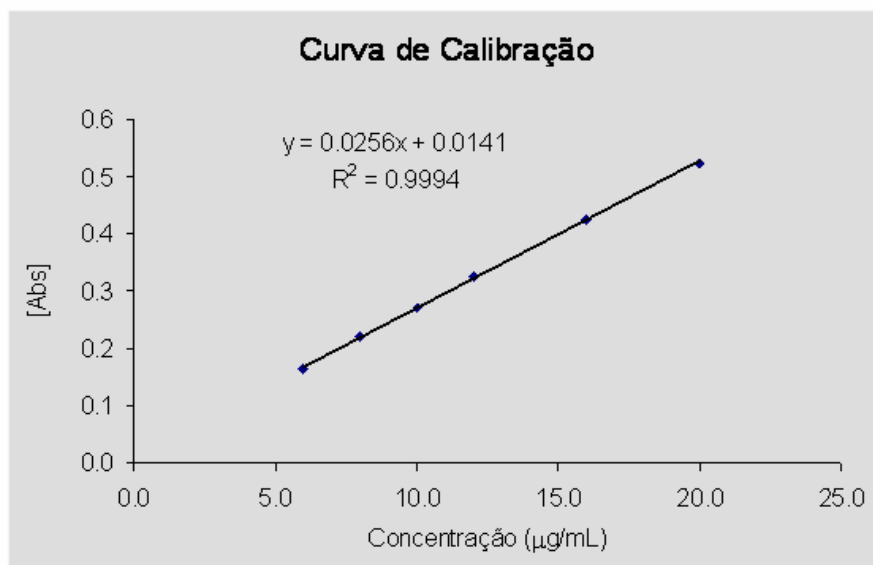


FIGURA 2 – Curva de calibração construída com padrão rutina (6,0-20,0 µg/mL) a 420 nm, onde a equação linear média obtida foi $y = 0,0246x + 0,0141$. Os valores são referentes aos dados da Tabela I. Abs = Absorvância.

O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,9994$, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado (Brasil, 2003). Os dados de precisão (DPR) e exatidão (E) do intervalo do método são apresentados na Tabela I.

TABELA I – Resultados da Linearidade por espectrofotometria para flavonóides foliares de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, utilizando-se Rutina como padrão.

Concentração Teórica (µg/mL)	C (n=3)	DP	DPR (%)	E (%)
6,0	6,051	0,1033	1,71	100,85
8,0	8,160	0,1790	2,19	102,00
10,0	9,957	0,2561	2,57	99,57
12,0	12,092	0,2151	1,78	100,77
16,0	15,842	0,3854	2,43	99,02
20,0	19,658	0,5023	2,56	98,29

C = Concentração média (µg/mL) de três determinações; DP = Desvio-padrão; DPR (%) = Desvio-padrão relativo (Precisão); E (%) = Exatidão.

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados pelas equações 1 e 2, foram 0,75 e 2,51 µg/mL, respectivamente. Com esses resultados, verificamos que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o padrão, sem sofrer alteração de fatores intrínsecos do equipamento.

A análise de variância ANOVA confirmou que o método proposto foi considerado linear e indica que não há falta de ajuste (ao nível de 95% de confiança) (Pimentel, Barros Neto, 2002), como pode ser visto na Tabela II.

TABELA II – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) e teste de ajuste linear ($P < 0,05$).

ANOVA					
Fonte	SQ	gL	MQ	F	F-crítico
Modelo	0,2684	1	0,2684	1625,90	4,4940
Residual	0,0026	16	0,0002	Curva Linear	
Falta de ajuste	0,0002	4	0,0000	0,2050	3,2592
Erro puro	0,0025	12	0,0002	Não há falta de ajuste	
Total	0,2710	17	0,0159		

Recuperação e Robustez

A recuperação que mede a eficiência do procedimento de extração do método proposto foi 98,36%, atestando este valor como aceitável (Brasil, 2003).

Os fatores da robustez (tempo de extração, estabilidade e diferentes fabricantes de solventes) foram avaliados em triplicata (Brasil, 2003) intrafatores (parâmetro individual) e interfatores (todos os parâmetros conjuntamente). Os resultados receberam tratamento estatístico pela análise de variância fator duplo e esta análise se encontra na Tabela III.

TABELA III – Análise de variância ANOVA fator único demonstrando que o método possui robustez.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,441228	5	0,488246	1,727314	0,202864	3,105875
Dentro dos grupos	3,39194	12	0,282662			
Total	5,833168	17				

O método mostrou que não há diferença estatística significativa ($P < 0,05$), já que encontrou valores de $F_{\text{calculado}}$ menores que os valores de $F_{\text{crítico}}$, demonstrando assim ser um método robusto em todos os fatores analisados.

Precisão e Exatidão

Os dados de repetibilidade, precisão intermediária (intra-corrida e inter-corridas), reprodutibilidade e exatidão do método encontram-se na Tabela IV.

TABELA IV – Resultados da repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade e exatidão do método espectrofotométrico para o doseamento dos flavonóides contidos nos extratos de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel.

Ensaio	Concentração Teórica (µg/mL)	n	C	DP	DPR(%)	E(%)
Repetibilidade	18,0	6	18,069	0,203	1,12%	100,38%
Precisão Intermediária	Analista 1	18,0	18,113	0,641	3,54%	100,63%
		18,0	18,087	0,573	3,17%	100,48%
	Analista 2	18,0	18,133	0,484	2,67%	100,74%
		18,0	18,060	0,647	3,58%	100,33%
Reprodutibilidade	18,0	6	18,990	0,083	0,44%	105,50%
	9,0	3	9,303	0,0957	1,03%	103,37%
Exatidão	18,0	3	17,465	0,0792	0,45%	97,03%
	27,0	3	25,843	0,0792	0,31%	95,71%

C = Concentração média (µg/mL) das n determinações; DP = Desvio-padrão;
DPR (%) = Desvio-padrão relativo (Precisão); E (%) = Exatidão

Nos ensaios de repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corridas) encontrou-se, respectivamente, 1,12% e 2,67-3,58%. Para a exatidão encontraram-se valores compreendidos entre 95,71-108,15%. A ANVISA regulamenta que os resultados da precisão não podem ultrapassar 5% e, para exatidão, não deve ser inferior a 95% (Brasil, 2003). Estes dados confirmam que o método de quantificação por espectrofotometria (no visível) proposto encontra-se em conformidade com a legislação vigente e apresenta confiabilidade dos resultados.

CONCLUSÃO

O método proposto apresenta alta especificidade a 420 nm para o extrato foliar de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel o que confere confiabilidade na quantificação de flavonóides. A linearidade confirma que o método é linear e possui alta sensibilidade de quantificação (LQ=2,51 µg/mL). É um método robusto para os fatores exigidos pela legislação vigente e encontra-se dentro do limite para a recuperação (98,36%). Os resultados de precisão e exatidão obtidos atestam confiabilidade necessária para o uso desta metodologia em laboratórios de controle de qualidade. O método de quantificação por espectrofotometria a 420 nm, mostrou-se preciso, exato e reprodutível, aliado a facilidade de execução.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) pelo apoio financeiro, a Profa. Dra. Miracy M. de Albuquerque do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NQCMC-UFPE) pelos resultados da especificidade, ao Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto do Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM-UFPE) pelas análises de reprodutibilidade.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.16, n.3, p.273-285, 2002a.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciência*, v.27, n.7, p.336-346, 2002b.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). *Acta Botanica Brasilica*, v.19, n.1, p.27-38, 2005.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). *Journal of Arid Environments*, v.62, p.127-142, 2005

ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*, v.95, p.229-233. 2004.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*, v.25, n.5, p.856-865, 2002.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – *Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos*. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132. Acesso em: 05 de janeiro 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução R.D.C. n °48, de 16 de março de 2004 – Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230#>. Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

BRASIL, Legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (Visalegis-ANVISA) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>. Acesso em: 14 de janeiro 2007.

FUENTES, O.; ARANCIBIA-AVILA, P.; ALARCÓN, J. Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. *Fitoterapia*, v.75, p.527-532, 2004.

HAYER, N. J. Desenvolvimento, purificação e caracterização de IgG anti lectina de folha de *Bauhinia monandra*. 2002. 95p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ICH, International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 1996. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 05 de janeiro 2007.

MELO, J. G.; NASCIMENTO, V. T.; AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v.14, n. 2, p.11-120, 2004.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

SILVA, R. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, São Paulo, v.25, n.3, p.449-454, 2002.

5. Artigo II:

Análise da pluviosidade e do efeito de borda
sobre os níveis de flavonóides em *Bauhinia
cheilantha* (Bong.) Steudel

5. ARTIGO 2

ARTIGO 2 A SER SUBMETIDO A:

Revista: Revista Brasileira de Farmacognosia

Autores: Peixoto Sobrinho, T.J.S.; Cardoso, K.C.M.; Gomes, T.L.B.; Albuquerque, U.P.; Amorim, E.L.C.

Título: Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os níveis de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel

Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os níveis de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel

Tadeu J. S. Peixoto Sobrinho¹, Késsio C. M. Cardoso¹, Tiago L. B. Gomes¹,
Ulysses P. Albuquerque² e Elba L. C. Amorim^{1†}

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Depto. de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil

² Laboratório de Etnobotânica Aplicada, Depto. de Biologia, Área de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

RESUMO: Este estudo avaliou a influência do efeito de borda e da pluviosidade sobre a produção de flavonóides em indivíduos de *B. cheilantha* em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Foi utilizada metodologia analítica por complexação com cloreto de alumínio para quantificar a concentração de flavonóides contidos nos extratos foliares de *B. cheilantha*, por meio de espectrofotometria no visível. De forma geral, o efeito de borda afeta a produção de flavonóides, entretanto, não foi possível correlacionar a produção de flavonóides e a pluviosidade, demonstrando que a espécie avaliada utiliza outra estratégia como resposta às pressões ambientais.

Unitermos: Caatinga, pata-de-vaca, pluviosidade, ecologia química

ABSTRACT: “Analysis of rainfall and edge-effects on flavonoid levels in *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel”. The present study evaluated the influence of the edge-effect and rainfall on flavonoid content in individuals of *B. cheilantha* in an area of caatinga vegetation in Pernambuco State, northeastern Brazil. The analytical methodology used aluminum chloride binding to quantify flavonoid concentrations by visible light spectrophotometry in leaf extracts of *B. cheilantha*. In general, forest edges influenced flavonoid production, but it was not possible to relate production with rainfall levels. These results demonstrate that this species uses various strategies to respond to environmental variables.

Keywords: Caatinga, pata de vaca, rainfall, chemical ecology

[†] E-mail: elba@ufpe.br, Tel. + 55-81-21268511

INTRODUÇÃO

Diversos fatores ambientais, como sazonalidade, ritmo circadiano, radiação, temperatura, altitude e umidade podem modificar o metabolismo secundário vegetal, interferindo quantitativamente e/ou qualitativamente na produção de compostos (Gobbo-Neto *et al.*, 2007). Em situações de estresse (hídrico ou oxidativo, por exemplo) o vegetal pode modificar sua rota biossintética e produzir substâncias de defesa como respostas às mudanças de seu habitat (Dicke, Hilker, 2002; Winkel-Shirley Winkel-Shirley, 2002).

As variações sazonais como foto-período, intensidade luminosa e temperatura podem alterar significativamente os níveis de vários grupos de substâncias fenólicas, principalmente flavonóides, quando monitoradas em diferentes estações do ano (Yao *et al.*, 2005). Por exemplo, diferenças significativas foram observadas no conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides totais de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) em função da estação do ano e da condição climática em cinco regiões do Paquistão, em que áreas mais frias apresentaram níveis mais elevados dessa classe quando comparadas às regiões quentes, e os efeitos da sazonalidade para fenóis totais foram mais acentuados que para os flavonóides (Iqbal, Bhanger, 2006).

Duas espécies de samambaia, *Pteridium caudatum* (L.) Maxon e *P. arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (Dennstaedtiaceae), foram o alvo de uma pesquisa sobre a influência da fenologia e a altitude em relação ao conteúdo de compostos fenólicos, percebendo-se que houve um aumento progressivo com o desenvolvimento foliar em ambos (Alonso-Amelot *et al.*, 2004). Contudo, há uma razão desigual entre a produção de compostos fenólicos de baixo peso molecular (BPM) e alto peso molecular (APM), verificando que a síntese e acumulação dos níveis de compostos fenólicos de BPM independem da altitude, contrapondo os de APM que se correlacionaram positivamente com o aumento da altitude para as duas espécies (Alonso-Amelot *et al.*, 2004).

Outro fator ambiental que pode interferir na síntese de metabólitos secundários é a fragmentação florestal, formando áreas de transição denominadas bordas, que causam profundos impactos sobre os processos ecológicos, tornando-as vulneráveis à invasão de espécies exóticas e herbívoros, além de provocar alterações microclimáticas que exercem influência sobre o balanço energético da microrregião (Debinski, Holt, 1999; Laurance, Yensen, 1991; Murcia, 1995; Saunders *et al.*, 1991).

Deste modo, áreas fragmentadas com indivíduos localizados na borda e no interior de remanescentes florestais podem apresentar comportamento diferenciado em relação à

produção de metabólitos secundários, como resposta às diferentes pressões ambientais. Estas mudanças, no entanto, não são permanentes e evoluem com o tempo à medida que a borda se fecha devido ao crescimento da vegetação (Périco *et al.*, 2005).

No Brasil, há grande interesse em estudos relacionados à ecologia química, principalmente com vistas à identificação de aleloquímicos para a indústria de herbicidas e inseticidas, entretanto, poucos estudos focalizam a ecologia química de plantas medicinais, principalmente do bioma Caatinga. Monteiro *et al.* (2006) estudando os níveis de taninos em *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. (Anacardiaceae) e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Mimosaceae) observaram que a síntese de substâncias tanantes possui forte relação com a sazonalidade da Caatinga e, estas espécies, demonstram diferentes estratégias adaptativas frente a períodos de seca e chuva.

Bauhinia cheilantha (Bong.) Steudel (Caesalpiniaceae) foi escolhida por ser uma espécie nativa da Caatinga que possui forte pressão extrativista, apresentar elevada densidade na área de estudo (Alcoforado-Filho *et al.*, 2003) e possuir diversos usos na medicina tradicional (Agra *et al.*, 2007a,b; Albuquerque, 2006; Albuquerque *et al.*, 2007a,b).

Um estudo dedicado a avaliar a relação entre os níveis de flavonóides de *B. cheilantha* e fatores ambientais (efeito de borda e pluviosidade), fornecerão informações científicas essenciais para a entendimento da ecologia química de plantas da Caatinga, uma vez que há poucos estudos que dão ênfase a esta área e proporcionar às indústrias farmacêuticas o procedimento técnico para a realização eficiente do controle de qualidade, trazendo estabilidade, constância e eficácia dos produtos comercializados.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O trabalho foi desenvolvido no remanescente de vegetação caducifólia espinhosa (Caatinga) com cerca de 20 hectares dentro da Estação Climatológica da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), à nordeste de Caruaru e a aproximadamente 150 km de Recife, situada na mesorregião do Agreste pernambucano (Fig. 1). Segundo Alcoforado-Filho *et al.* (2003), este fragmento abriga cerca de 100 espécies representantes de árvores, arbustos, subarbustos, cipós e ervas distribuídas em 41 famílias, sendo os mais conspicuos, Euphorbiaceae, Mimosaceae e Fabaceae.

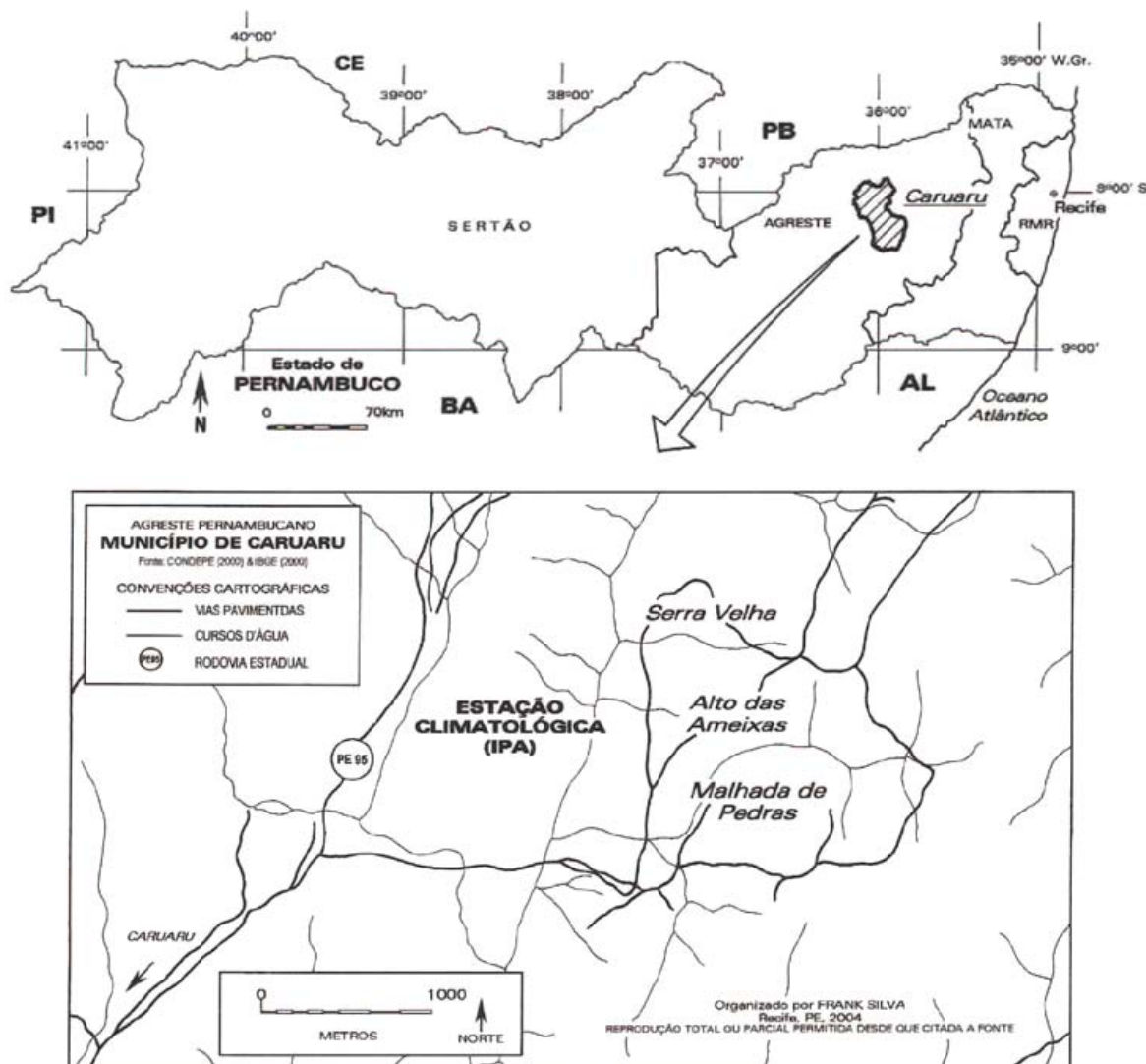


Figura 1 – Localização geográfica da Estação Climatológica da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) no município de Caruaru, agreste de Pernambuco, Brasil ($08^{\circ}14'18,2''S$ $35^{\circ}54'57,1''$). (Fonte: Monteiro *et al.*, 2006)

A área estudada possui solo podzólico amarelo, eutrófico, abrupto e textura franco-arenosa, a temperatura média anual varia entre $19-23^{\circ}C$, a precipitação média é abaixo de 700 mm/ano e encontra-se a 537 m de altitude ($08^{\circ}14'18,2''S$ e $35^{\circ}54'57,1''$) (Alcoforado-Filho *et al.*, 2003). A partir dos dados pluviométricos obtidos na Estação Climatológica do IPA, foi considerada estação seca o período entre os meses de outubro a março que apresentou chuvas dispersas, enquanto que entre os meses de abril e setembro/2006 a precipitação total foi de 450,3 mm.

Coleta de material vegetal

Para monitorar o teor de flavonóides, foram formados grupos de dez indivíduos de *B. cheilantha*: Grupo I – formado por indivíduos selecionados dentro das parcelas previamente demarcadas, perfazendo área total de 1,0 hectare (Araújo, 1998); Grupo II – formado por indivíduos selecionados na borda do fragmento, com distância máxima de 10 metros da margem. Os critérios estabelecidos para coleta do material vegetal foram: folhas inteiras, localizadas nas extremidades dos ramos e mesmo estágio de desenvolvimento. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos de papel, identificadas e levadas ao laboratório para subsequente análise, sendo este monitoramento realizado entre os dias 16 e 26 de cada mês.

No mesmo período, as amostras coletadas foram identificadas pelo Prof. Dr. Ulysses P. de Albuquerque do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e o material testemunho encontra-se incorporado ao Herbário Prof. Vasconcelos Sobrinho do Departamento de Botânica, na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Procedimentos experimentais

Preparação dos extratos

As amostras vegetais coletadas em campo foram armazenadas em sacos de papel e transportadas ao laboratório, no qual passaram pelo processo de secagem em estufa durante três dias a 50°C, pulverizadas em triturador industrial e analisadas quantitativamente.

Os extratos foram preparados em erlenmeyers contendo 500 mg das amostras pulverizadas e aquecidos com 25 mL de metanol (99,5% v/v) em placa de aquecimento a temperatura de 60°C durante 30 minutos. Os extratos foram filtrados em papel-filtro quantitativo Whatman e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL. O resíduo do material foi lavado com 25 mL de metanol (99,5% v/v) e novamente filtrado para o mesmo balão, que foi aferido com o mesmo solvente. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Quantificação do conteúdo flavônico

Seguiu-se a metodologia descrita por Silva *et al.* (2005). Do extrato preparado foi pipetada e transferida uma alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 25 mL, ao qual foram

adicionados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL do reagente piridina (solução metanólica a 20% v/v) e 2,5 mL do reagente cloreto de alumínio (solução metanólica a 5% p/v), sendo o volume do balão completado com água destilada. Após intervalo de 30 minutos em repouso à temperatura ambiente, as leituras foram realizadas a 420 nm em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Os resultados foram expressos em teor (p/p) da matéria seca. Utilizou-se rotina em metanol (99,5% v/v) como padrão (0,5 mg/mL) para construir a curva de calibração utilizando-se seis determinações (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 µg/mL).

Análise estatística

Para avaliar a normalidade dos dados foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov (Ayres *et al.*, 2005). Foi utilizada ANOVA um critério para comparar, individualmente, as diferenças nos teores de flavonóides intra-grupo (Grupo I e Grupo II) durante os meses de coleta e para confrontar os resultados inter-grupo (Grupo I versus Grupo II), complementando-se o estudo, quando necessário, com o teste de Tukey para comparar as diferenças entre as médias. A correlação de Pearson foi empregada para avaliar se os níveis de flavonóides dos Grupos I (interior) e II (borda) oscilavam concomitantemente ou separadamente e relacionar estes com a influência pluviométrica sobre a síntese de flavonóides. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa BioEstat 4.0 (Ayres *et al.*, 2005).

RESULTADOS

O teste Kolmogorov-Smirnov não encontrou valores unilaterais e bilaterais significativos, indicando que os dados possuem distribuição normal.

Foi observado que durante o monitoramento mensal, os níveis de flavonóides de *B. cheilantha* variaram intra-grupo, sendo observadas diferenças estatísticas no Grupo I ($F=16.435$, $p<0.0001$) e no Grupo II ($F=9.878$, $p<0.0001$). Através da análise de variância realizada entre os Grupos I e II, pode-se confirmar que os indivíduos localizados à borda do fragmento concentraram mais flavonóides do que os do interior da mata ($F=11.244$; $p<0.0001$). Porém, este padrão não ocorreu no mês de julho/2006, quando o teor de flavonóides do Grupo I foi mais elevado. O coeficiente de Pearson apontou correlação positiva entre os grupos ($r=0.8391$, $p=0.0367$).

Os níveis de flavonóides foliares de *B. cheilantha* do Grupo I correlacionaram-se negativamente com a precipitação acumulada de 30 dias ($r = -0.2589$, $p = 0.620$), o que também foi observado com o Grupo II para 30 dias ($r = -0.1605$; $p = 0.761$). Contudo, não ficou evidente a relação existente entre a pluviosidade e a produção de flavonóides. Os resultados podem ser visualizados na Tabela I e na Figura 2.

TABELA I – Média mensal seguida de erro-padrão dos níveis de flavonóides de dez indivíduos de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel coletados no interior (Grupo I) e borda (Grupo II) na área de estudo em Caruaru, PE – Brasil.

Mês	Teor de flavonóides (p/p)	
	Grupo I (±EP)	Grupo II (±EP)
Abril	2,117±0,301 ac	2,213±0,396 ac
Maio	1,641±0,835 a	2,291±1,018 ac
Junho	3,334±0,505 b	3,557±0,856 b
Julho	2,244±0,392 ac	1,839±1,077 c
Agosto	2,974±0,292 bd	3,640±0,412 b
Setembro	2,479±0,280 cd	2,991±0,425 ab

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

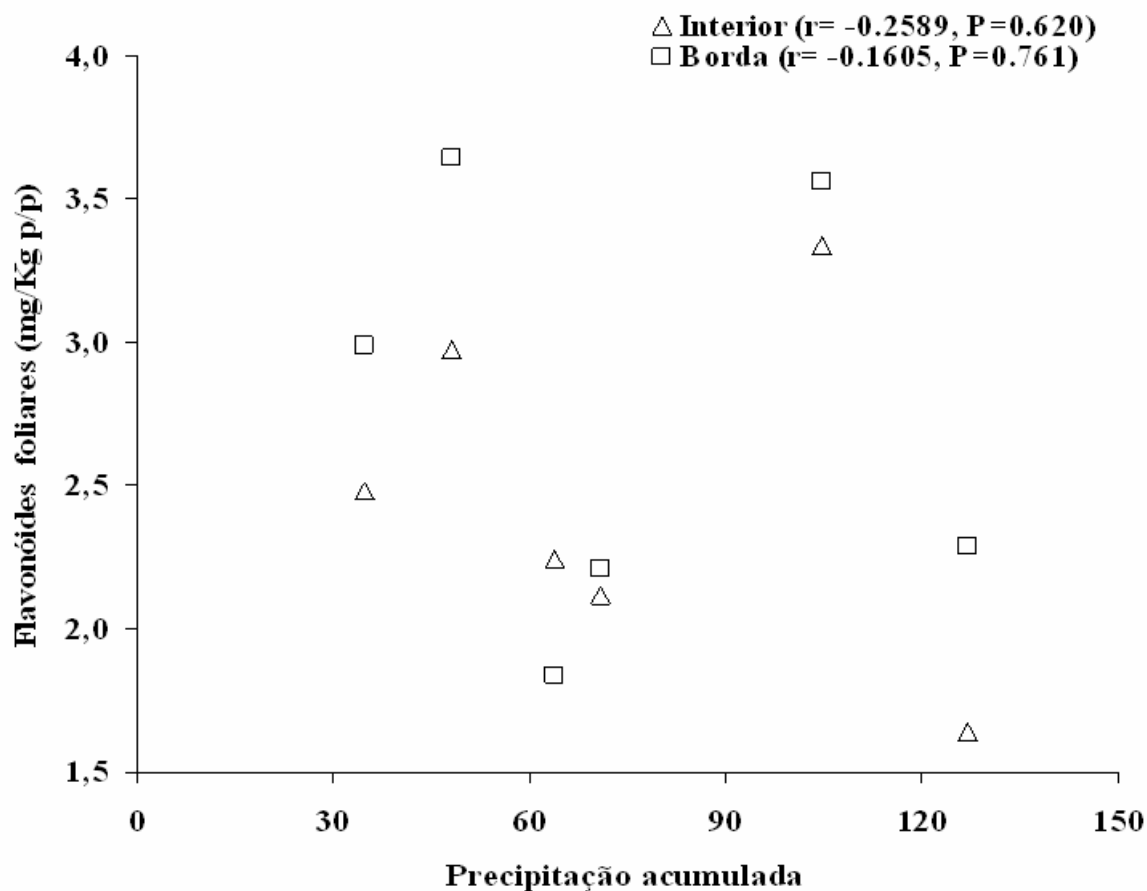


FIGURA 2 - Correlação entre teor de flavonóides (mg/Kg) foliares de *Bauhinia cheilantha* (Bong) Steudel em relação a pluviosidade em um fragmento de mata de Caatinga no município de Caruaru/PE, região Nordeste do Brasil.

DISCUSSÃO

O efeito de borda (Debinski, Holt, 1999; Laurance, Yensen, 1991; Murcia, 1995; Saunders *et al.*, 1991) parece explicar o comportamento apresentado por indivíduos de *B. cheilantha* localizados na borda (Grupo II) em comparação com os do interior da mata (Grupo I), em função da produção de flavonóides, onde os indivíduos do grupo II exibiram concentrações mais elevadas destes compostos. No entanto, esta influência não foi observada no mês de julho/2006, quando o Grupo I apresentou níveis mais elevados de compostos flavônicos.

Embora este fenômeno possa explicar os resultados encontrados, fatores intrínsecos e extrínsecos podem interferir na produção de flavonóides. Por exemplo, indivíduos localizados na borda recebem maior incidência luminosa causando modificações fisiológicas nas folhas, o

que pode atrair insetos herbívoros e estes, atrair pássaros (Barbosa *et al.*, 2005; Murcia, 1995). Assim, o efeito de borda em função da radiação e ataque de herbívoros, pode desencadear uma série de respostas quantitativas e/ou qualitativas (Dicke, Hilker, 2003), como a produção de flavonóides, que fornecem proteção a herbivoria e radiação ultravioleta (Amaral *et al.*, 2004), podendo ser estes os fatores que influenciam a síntese deste grupo em indivíduos de *B. cheilantha*.

Foi observado que o processo de herbivoria promove diversificação na produção de substâncias de defesa, como flavonas, flavonóis e flavanonas em folhas atacadas de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl (Fabaceae), sugerindo que o vegetal produz defesas mais eficientes ao ataque do herbívoro (Oliveira *et al.*, 2006). Confirmando estes resultados, Soares *et al.* (2000), verificaram que folhas saudáveis e folhas atacadas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae), apresentavam perfis flavônicos distintos, mostrando que as amostras herbivoradas possuíam maior diferenciação estrutural, indicando resposta qualitativa.

A produção de flavonóides de *B. cheilantha* não parece estar relacionada com a pluviosidade, embora para outras espécies vegetais seja observada esta relação. Por exemplo, para amostras de *Cecropia glaziovii* Snethl. (Cecropiaceae) coletadas em três regiões de Minas Gerais/Brasil os níveis de flavonóides em folhas jovens e maduras foram mais elevados na estiagem quando comparados com o período chuvoso (Luengas-Caicedo *et al.*, 2007). Estudo realizado com *Baccharis trimera* Less. (Asteraceae) mostrou que os níveis de flavonóides das amostras coletadas no verão diferiram estatisticamente das demais, representando aumento médio de 72% das amostras coletadas no inverno e 80% da primavera (Borella *et al.*, 2001).

Solar *et al.* (2006) observaram que ao longo das estações pode haver diferenças no teor de substâncias fenólicas em *Juglans regia* L. (Juglandaceae), verificando um aumento progressivo no conteúdo de flavonóides com o início da estiagem, enquanto que para alguns ácidos fenólicos (vanílico, sirínico, elágico e clorogênico) foi o oposto, decrescendo os níveis com a estiagem.

Sosa *et al.* (2005) estudando dois grupos de *Cistus ladanifer* L. (Cistaceae) provenientes de duas regiões da Espanha, com condições climáticas diferentes, observaram que em folhas maduras, as quantidades de flavonóides quadruplicaram entre o inverno e o verão no Grupo I (região com menor pluviosidade), enquanto que no Grupo II (região com maior pluviosidade) esse aumento foi três vezes maior, com diferenças significativas entre os grupos. Neste mesmo estudo, foi observado que para as folhas senescentes, os teores de

flavonóides foram superiores aos encontrados nas folhas maduras, em relação à massa do exudato, do outono a primavera (Sosa *et al.*, 2005).

A sazonalidade climática parece ser um importante fator também para taninos, como foi verificado por Monteiro *et al.* (2006) com duas espécies típicas do bioma Caatinga. Os autores observaram que cascas e folhas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Mimosaceae) e *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. (Anacardiaceae), concentravam mais compostos tanantes nos períodos de estiagem, verificando também que as cascas de *A. colubrina* possuíam maiores teores do que as folhas durante a estação chuvosa, enquanto que *M. urundeuva* exibiu níveis mais elevados nas suas folhas, em comparação com suas cascas, durante a estação chuvosa (Monteiro *et al.*, 2006).

Este trabalho gerou contribuições essenciais para a compreensão da ecologia química de plantas da Caatinga, uma vez que há poucas pesquisas relacionadas à importância deste ecossistema sobre a produção de metabólitos secundário, em especial flavonóides. As diferenças nos teores de flavonóides observadas, entre indivíduos localizados no interior e borda da mata, podem fornecer parâmetros para a busca com mais segurança da matéria-prima vegetal, melhorando a qualidade dos produtos comercializados e diminuindo a pressão extrativista.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária e aos funcionários da Estação Climatológica de Caruaru pelo apoio logístico e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) pela concessão de bolsa de pesquisa do primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa Filho JM 2007a. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Agra, M.F.; Baracho, G.S.; Nurit, K.; Basílio, I.J.L.D.; Coelho, V.P.M. 2007b. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol* 111: 383-395.
- Albuquerque UP 2006. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed* 2(30): 1-10.

Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, Amorim ELC 2007a. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 110: 76-91.

Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP 2007b. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114: 325-354.

Alcoforado-Filho FG, Sampaio EVSB, Rodal MJN 2003 Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa arbórea em Caruaru, Pernambuco. *Acta Bot Bras* 17(2): 287-303.

Alonso-Amelot ME, Oliveros A, Calcagno-Pisarelli MP 2004 Phenolics and condensed tannins in relation to altitude in neotropical *Pteridium* spp. A field study in the Venezuelan Andes. *Biochem Syst Ecol* 32: 969-981.

Amaral JS, Seabra RM, Andrade PB, Valentão P, Pereira JA, Ferreres, F 2004. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chem* 88: 373-379.

Araújo EL 1998. *Aspectos da dinâmica populacional de duas espécies em floresta tropical seca (caatinga), Nordeste do Brasil*. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas.

Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos SA 2005. *BioEstat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém: Sociedade Civil/Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá.

Barbosa VLS, Leal IR, Iannuzzi L, Almeida-Cortez J 2005. Distribution Pattern of Herbivorous Insects in a Remnant of Brazilian Atlantic Forest. *Neotrop Entomol* 34(5): 701-711.

Borella JC, Fontoura A, Menezes Jr A, França SC 2001. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) - Carqueja. *Rev Bras Plant Med* 4: 99-102.

Debinski DM, Holt RD 2000. A survey and overview of habitat fragmentation experiments. *Conserv Biol* 14(4): 342-355.

Dicke M, Hilker M 2003. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic Appl Ecol* 4: 3-14.

Gobbo-Neto L, Lopes NP 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30(2): 374-381.

Iannuzzi L, Maia ACD, Nobre CEB, Suzuki DK, Muniz FJA 2003. Padrões locais de diversidade de Coleoptera (Insecta) em vegetação de Caatinga. In: Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC (orgs). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife, Editora Universitária da UFPE, p.367-389.

Iqbal S, Bhanger MI 2006. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *J Food Compos Anal* 19: 544-551.

Laurance WF, Yensen E 1991. Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. *Biol Conserv* 55(1): 77-92.

Luengas-Cacedoa PE, Braga FC, Brandão GC, Oliveira AB 2007. Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* sneth. leaves from native and cultivated specimens. *Z. Naturforsch.* 62c: 701-709.

- Maia ACD, Iannuzzi L, Nobre CEB, Albuquerque CMR 2003. Padrões locais de diversidade de Cerambycidae (Insecta, Coleoptera) em vegetação de Caatinga. In: Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC (orgs). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife, Editora Universitária da UFPE, p.391-433.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Neto EMFL, Araújo EL, Albuquerque MM, Amorim ELC 2006. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Rev Bras Farmacogn* 16(3): 338-344.
- Murcia C 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Tree* 10(2): 58-62.
- Oliveira DC, Christiano JCS, Soares GLG, Isaias RMS 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev Bras Bot* 29(4): 657-667.
- Périco E, Cemin G, Lima DFB, Rempel C 2005. Efeitos da fragmentação de habitats sobre comunidades animais: utilização de sistemas de informação geográfica e de métricas de paisagem para seleção de áreas adequadas a testes. *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Goiânia INPE: 2339-2346.
- Pinheiro F, Diniz IR, Coelho D, Bandeira MPS 2002. Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian Cerrado. *Austral Ecol* 27: 132-136.
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR 1991. Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: a Review. *Conserv Biol* 5: 18-32.
- Silva CCA, Miranda ÉM, Oliveira ÍG, Alvarenga JR, Chaves MA, Oliveira PCP 2005. Desenvolvimento de fitoderivados oriundos da espécie *Dimorphandra mollis*. *Rev Iniciação Científica* 3: 225-234.
- Soares GLG, Isaias RMS, Gonçalves SJMR, Christiano JCS 2000. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). *Rev Bras Zoociências* 2(1): 103-133.
- Solar A, Colaric M, Usenik V, Stampar F 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci* 170: 453-461.
- Sosa T, Alías JC, Escudero JC, Chaves N 2005. Interpopulational variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudate. *Biochem Syst Ecol* 33: 353-364.
- Winkel-Shirley B 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Plant Biol* 5: 218-223.
- Yao L, Caffin N, D'Arcy B, Jiang Y, Shi J, Singanusong R, Liu X, Datta N, Kakuda Y, Xu Y 2005. Seasonal Variations of Phenolic Compounds in Australia-Grown Tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem* 53: 6477-6483.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

A partir do levantamento realizado, podemos observar que *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel é uma espécie amplamente usada na medicina popular e desperta interesse científico e econômico. Estudos realizados com plantas do gênero em diversos países confirmam suas atividades e respaldam o uso popular. O elevado uso terapêutico estimula a indústria farmacêutica a produzir medicamentos fitoterápicos, sendo necessários estudos voltados para o controle de qualidade dos produtos comercializados.

A constância na produção de substâncias ativas presentes nas plantas variam de acordo com fatores ambientais como altitude, pluviosidade e temperatura, e laboratoriais como estabilização, extração e métodos analíticos. Estes fatores associados podem interferir na qualidade dos produtos e, por consequência, na ação farmacológica.

A validação da metodologia analítica para quantificação dos flavonóides presentes em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steudel foi avaliada com base na Resolução RE N°. 899 de 29 de maio de 2003 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e apresentou-se em conformidade com os parâmetros estabelecidos, demonstrando ser um método simples, rápido e de baixo custo, sendo uma alternativa viável para ser utilizada em laboratórios de controle de qualidade, já que a espécie não consta em farmacopéias ou monografias oficiais.

Verificamos que as diferenças nos teores de flavonóides entre indivíduos localizados no interior e borda da mata fornecem parâmetros que orientem a indústria a procurar com mais segurança, a matéria-prima vegetal melhorando a qualidade dos produtos extraídos garantindo a segurança e eficácia dos fitoterápicos produzidos.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007a.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.383-395, 2007b.
- 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**, v.46, p.1-6, 1995.
- ALBUQUERQUE, U.P. **Folhas Sagradas: as plantas litúrgicas e medicinais nos cultos afro-brasileiros**. Recife: Ed. Universitária UFPE, 1997. 195 p.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.16, n.3, p.273-285, 2002a.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v.27, n.7, p.336-346, 2002b.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C; SILVA, A.C.O. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botanica Brasílica**, v.19, n.1, p.27-38, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.76-91, 2007a.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325-354, 2007b.
- ARAÚJO FILHO, J.A.; CARVALHO, F.C.; SILVA, N.L. Fenología y valor nutritivo de follajes de algunas especies forrajeras de la Caatinga. **Agroforestería en las Américas**, v.9, n.33, p.33-37, 2002.
- ARGOLO, A.C.C.; SANT’ANA, A.E.G.; PLETSCH, M.; COELHO, C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v.95, p.229-233, 2004.
- BARBOSA, V.S.; LEAL, I.R.; IANNUZZI, L.; ALMEIDA-CORTEZ, J. Distribution Pattern of Herbivorous Insects in a Remnant of Brazilian Atlantic Forest. **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.701-711, 2005.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – **Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos**. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132. Acesso em: 05 de janeiro 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução R.D.C. n °48, de 16 de março de 2004 – **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230#>. Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

CHACHA, M.; BOJASE-MOLETA, G.; MAJINDA, R.R.T. Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. **Phytochemistry**, v.66, p.99-104, 2005.

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.239-243, 2004.

COTTIGLIA, F.; LOY, G.; GARAU, D.; FLORIS, C.; CASU, M.; POMPEI, R.; BONSIGNORE, L. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. **Phytomedicine**, v.8, n.4, p.302-305, 2001.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.343-356, 2005.

DAJAS, F.; RIVERA-MEGRET, F.; BLASINA, F.; ARREDONDO, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; COSTA, G.; ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; HEIZEN, H.; FERREIRA, M.; MORQUIO, A. Neuroprotection by flavonoids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.1613-1620, 2003.

DEBINSKI, D.M.; HOLT, R.D. A survey and overview of habitat fragmentation experiments. **Conservation Biology**, v.14, n.4, p.342-355, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). **Biochemical Systematics and Ecology** v.32, p.747-753, 2004.

FUENTES, O.; ARANCIBIA-AVILA, P.; ALARCÓN, J. Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. **Fitoterapia**, v.75, p.527-532, 2004.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; PRESSER, D.; ATTIAS, J.; HAYEK, T.; AVIRAM, M. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure. **Nutrition**, v.18, p.268-273, 2002.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.21, n.1, p.86-96, 2001.

GLÄBER, G.; GRAEFE, E.U.; STRUCK, F.; VEIT, M.; GEBHARDT, R. Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. **Phytomedicine**, v.9, p.33-40, 2002.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B.; PAGOTTO, C.L.A.C.; ZOCHER, D.H.T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.3, n.2, p.97-102, 1998.

GUIMARÃES-BEELLEN, P.M.; BERCHIELLI, T.T.; BEELEN, R.; MEDEIROS, A.N. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. **Small Ruminant Research**, v.61, p.35-44, 2006.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; KUMAR, T.S. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.25, n.8, p.070-1076, 2004.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; KAKOTI, B.B.; SELVEN, V.T. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.267-273, 2005.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoids in research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-204, 2000.

HAYER, N. J. **Desenvolvimento, purificação e caracterização de IgG anti lectina de folha de *Bauhinia monandra***. 2002. 95p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

IANNUZZI, L.; MAIA, A.C.D.; NOBRE, C.E.B.; SUZUKI, D.K.; MUNIZ, F.J.A. Padrões locais de diversidade de *Coleoptera* (Insecta) em vegetação de Caatinga. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (eds). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Editora Universitária da UFPE, p.367-389, 2003.

JUNG, C-H.; SEOG, H-M.; CHOI, I-W.; PARK, M-W.; CHO, H-Y. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. **LWT**, v.39, p.266-274, 2006.

KUMAR, R.S.; SIVAKUMAR, T.; SUNDERAM, R.S.; GUPTA, M.; MAZUMDAR, U.K.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; SARAVANAN, S.; KUMAR, M.S.; MURUGESH, K.; KUMAR, K.A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.7, p.1015-1024, 2005.

KUO, Y-H.; YEH, M-H.; HUANG, S-L. A novel 6-Butyl-3-Hydroxyflvanone from heartwood of *Bauhinia purpurea*. **Phytochemistry**, v.49, n.8, p.2529-2530, 1998.

LAURANCE, W.F.; YENSEN, E Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. **Biology Conservation**, v.55, n.1, p.77-92, 1991.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.199-206, 2005.

MAIA, A.C.D.; IANNUZZI, L.; NOBRE, C.E.B.; ALBUQUERQUE, C.M.R. Padrões locais de diversidade de *Cerambycidae* (Insecta, Coleoptera) em vegetação de Caatinga. In: LEAL,

I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (eds). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Editora Universitária da UFPE, p.391-433, 2003.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, n.66, p.2399-2407, 2005.

MARTINI, N.D.; KATERERE, D.R.P.; ELOFF, J.N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.207-212, 2004.

MELO, J.G.; NASCIMENTO, V.T.; AMORIM, E.L.C.; ANDRADE LIMA, C.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.111-120, 2004.

MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; PEREIRA FILHO, N.; FROTA, A.R.; ELY, P.B.; ZETTLER, C.G.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N.P. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.3, p.232-237, 2003.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; NETO, E.M.F.L.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; AMORIM, E.L.C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.338-344, 2006.

MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. **Tree**, v.10, n.2, p.58-62, 1995

PINHEIRO, F.; DINIZ, I.R.; COELHO, D.; BANDEIRA, M.P.S. Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian Cerrado. **Austral Ecology**, v.27, p.132-136, 2002.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA JUNIOR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia monandra* (Leguminosae). **Química Nova**, v.26, n.4, p.466-469, 2003.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; AGRA, M. F.; SOUSA, M. F. V., BARBOSA-FILHO, J. M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, n.3, p.179-184, 2002.

RAMADAN, M.F.; SHARANABASAPPA, G.; SEETHARAM, Y.N.; SESHAGIRI, M.; MOERSEL, J.T. Characterization of fatty acids and bioactive compounds of kachnar (*Bauhinia purpurea* L.) seed oil. **Food Chemistry**, v.98, p.359-368, 2006.

REDDY, M.V.B.; REDDY, M.K.; GUNASEKAR, D.; CAUX, C.; BODO, B. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. **Phytochemistry**, v.64, p.879-882, 2003.

SALA, A.; RECIO, M.C.; SCHINELLA, G.R.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J.L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **European Journal of Pharmacology**, v.461, p.53-61, 2003.

SAUNDERS, D.A.; HOBBS, R.J.; MARGULES, C.R.; Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: a Review. **Conservation Biology**, v.5, p.18-32, 1991.

SILVA, R.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, n.3, p.449-454, 2002.

SILVA, F.R.M.B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.33-37, 2002.

SOLAR, A.; COLARIC, M.; USENIK, V.; STAMPAR, F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Science**, v.170, p.453-461, 2006.

SOSA, T.; ALÍAS, J.C.; ESCUDERO, J.C.; CHAVES, N. Interpopulational variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudate. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.353-364, 2005.

SÜZGEÇ, S.; MERİÇLİ, A.H.; HOUGHTON, P.J.; ÇUBUKÇU, B. Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. **Fitoterapia**, v.76, p.269-272, 2005.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales**. 2ª edição. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, 1994. 300p.

VIANA, E.P.; SANTA-ROSA, R.S.; ALMEIDA, S.S.M.S.; SANTOS, L.S. Constituents of the stem bark of *Bauhinia guianensis*. **Fitoterapia**, v.70, p.111-112, 1999.

YADAVA, R.N.; TRIPATHI, P. A novel flavone glycoside from the stem of *Bauhinia purpurea*. **Fitoterapia**, v.71, p.88-90, 2000.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição, rev. e amp. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cap. 23, p. 577-614. 2004.