



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

JARBAS LIMA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÕES BOTÂNICA E QUÍMICA DE *Bauhinia pulchella* Benth.
(FABACEAE) E SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO**

Recife,
2024

JARBAS LIMA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÕES BOTÂNICA E QUÍMICA DE *Bauhinia pulchella* Benth.
(FABACEAE) E SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação de produtos naturais e compostos bioativos.

Orientadora:

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Pernambuco

Co-orientador:

Dr. Raphael de Oliveira Rodrigues

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Universidade Federal do Ceará

Recife,
2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Carvalho, Jarbas Lima de.

Caracterizações botânica e química de *Bauhinia pulchella* Benth. (Fabaceae) e seu potencial antimicrobiano e anti-inflamatório / Jarbas Lima de Carvalho. - Recife, 2024.
140f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Karina Perrelli Randau.

Coorientação: Raphael de Oliveira Rodrigues.

1. *Bauhinia pulchella*; 2. Histoquímica; 3. Esteroides; 4. Terpenoides; 5. 3,7-diidroxí-3-fenil-4-cromanona. I. Randau, Karina Perrelli. II. Rodrigues, Raphael de Oliveira. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

JARBAS LIMA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÕES BOTÂNICA E QUÍMICA DE *Bauhinia pulchella* Benth.
(FABACEAE) E SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação de produtos naturais e compostos bioativos.

Aprovada em: 04/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Cledson dos Santos Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Rafaela Damasceno Sá
Centro Universitário da Vitória de Santo Antão – UNIVISA

Dra. Hilania Valéria Dodou Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dra. Natália Ferreira de Oliveira
Perícia Forense do Estado do Ceará - PEFOCE

*A minha mãe, Maria Cleuce por acreditar em
mim.
A minha esposa, Klenny Ellen por acreditar no
impossível.
E o impossível aconteceu.*

AGRADECIMENTOS

À professora Karina por ter me acolhido dentro da UFPE e acreditar que este trabalho seria possível e aos colegas de laboratório da UFPE, principalmente ao Cledson, por ter auxiliado durante os experimentos na parte da botânica;

Ao colega Horlando Carlota que desde o meu mestrado em 2012 me acompanha e auxilia nas aventuras da Química de Produtos Naturais.

Ao Dr. Raphael por ter se aventurado na co-orientação deste trabalho e colaborado com os experimentos imunológicos na UFC.

À Dra. Valéria que orientou nos experimentos da Microbiologia indicando caminhos a seguir para que esta tese tenha criado corpo.

Ao professor Leonardo Félix, por ter me recebido na UFPB com as exsiccatas em um período de pandemia e auxiliado na identificação da espécie deste trabalho.

Ao professor Said Gonçalves, por estar sempre à disposição e fazer do laboratório de farmacotécnica da UFC uma segunda casa.

Às professoras Nirla Romero, Francisca Barros e Gilvandete Maria, elas que me trataram como filho desde que entrei na UFC em 2008 e até me ajudaram a me tornar Doutor, meu muito obrigado.

A minha família, em especial a minha querida mãe, Maria Cleuce, que dedicou a vida em prol dos seus filhos e sempre acreditando que a educação era o melhor caminho para nos tornarmos “gente”.

A minha esposa, Klenny Ellen, que sempre me disse que eu era capaz de tudo aquilo que me submeter a fazer, uma pessoa que não mede esforços em apoiar e garantir um ambiente com amor e felicidade para conseguirmos obter o que quisermos. Esse trabalho é nosso!

À banca, (Cledson, Hilania, Karina, Natália e Rafaela), que dedicou o seu tempo para ler e colaborar com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE pelo alicerce para a finalização desta tese.

RESUMO

As plantas do gênero *Bauhinia* comumente conhecidas por pata-de-vaca, apresenta na medicina popular características anti-inflamatórias e antimicrobianas e, com os adventos das pesquisas laboratoriais, pode-se evidenciar demais atividades: larvicida, citotóxica, anti-helmíntica e antioxidante. Todavia, este gênero apresenta uma variedade de espécies com similaridade morfológica, bem como o potencial farmacológico apresentado, sendo necessário a realização de estudos dos caules e das folhas para a caracterização anatômica e histoquímica. É nesse sentido que esta pesquisa se debruça em analisar *Bauhinia pulchella* com a microscopia e com a histoquímica das folhas e do caule e avançar nas pesquisas de potenciais antimicrobianos e anti-inflamatório das frações do extrato etanólico do caule da referida espécie. Para tanto, foram utilizados métodos usuais de microscopia contendo secções transversais do caule, pecíolo, lâmina foliar e paradermicos da lâmina foliar de *B. pulchella*, além de testes histoquímicos a fim de localizar os metabólitos na lâmina foliar e do caule, por meio de secções transversais. Nos estudos anatômicos foi possível diferenciar das outras espécies a nervura central com contorno plano-convexo, 1-2 camadas de colênquima e tricomas tectores, sendo essas as características que a difere de outras espécies do gênero *Bauhinia*. Alcaloides, compostos fenólicos, compostos lipofílicos, lignina, triterpenos, esteroides e taninos foram observados na espécie através da histoquímica. Para a obtenção dos metabólitos secundários presentes no caule, foi realizado a produção do extrato etanólico (EECBP) para o posterior fracionamento cromatográfico (FEECBP) e a determinação da taraxerona e sitosterona na fração (J-1) e γ -sitosterol; estigmasterol e 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona na fração (J-2) através da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM). Avaliar citotoxicidade após a exposição das frações pelo método MTT e investigação da atividade imunomodulatória, foi utilizado modelo *in vitro* com cultura celular de macrófagos murinos, RAW 264.7, estimulados com LPS e tratados com diferentes concentrações de FEECBP para a determinação das concentrações de óxido nítrico (NO) e das citocinas TNF- α e TGF- β , as quais formam moduladas pelas frações J-1 e J-2. Foram testadas as frações para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Letal Mínima (CLM) e se possuem ação sinérgica ou aditiva frente ao uso concomitante com antibióticos pelo método *checkerboard* nos ensaios antimicrobianos. Foram observadas as menores CIM para *P. aeruginosa* ATCC 10226 (0,078 mg/mL), *S. choleraesuis* ATCC 14028 (0,156 mg/mL) gênero *Candida* e *S. epidermidis* ATCC 12228 (0,312 mg/mL) e a CLM contra cepas de *P. aeruginosa* ATCC 10226 (0,078 mg/mL), gênero *Candida* (0,312 mg/mL) e *S. aureus* ATCC 25923 (0,312 mg/mL). Foi observado sinergismo potencial na escala de 16x com a associação de FEECBP e os antibióticos cefalexina, norfloxacino, gentamicina, polimixina contra *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. choleraesuis* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 10536 e *P. aeruginosa* ATCC 10226. Com base em tudo o que foi discutido, é possível notar que a espécie *B. pulchella* representa uma promissora área de estudo para pesquisas anti-inflamatórias e antimicrobianas. Além disso, há um grande potencial para investigar sua caracterização anatômica e histoquímica em todo o gênero, e esse trabalho já contribuiu de maneira inédita para essa área de conhecimento.

Palavras-chave: *Bauhinia pulchella*. Histoquímica. Propriedade antimicrobiana. Citotoxicidade. Esteroides. Terpenoides. 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona.

ABSTRACT

Plants of the *Bauhinia* genus, commonly known as pata-de-vaca, have anti-inflammatory and antimicrobial properties in folk medicine. With the advent of laboratory research, other activities have been demonstrated: larvicidal, cytotoxic, anthelmintic and antioxidant. However, this genus has a variety of species with morphological similarity, as well as the pharmacological potential presented, requiring studies of the stems and leaves for anatomical and histochemical characterization. It is in this sense that this research focuses on analyzing *Bauhinia pulchella* with microscopy and histochemistry of the leaves and stem and advancing research on the antimicrobial and anti-inflammatory potential of the fractions of the ethanolic extract of the stem of this species. For this purpose, usual microscopy methods were used, containing cross sections of the stem, petiole, leaf blade and paradermal parts of the leaf blade of *B. pulchella*, in addition to histochemical tests in order to locate the metabolites in the leaf blade and stem, through cross sections. In the anatomical studies, it was possible to differentiate from other species the central vein with plano-convex contour, 1-2 layers of collenchyma and tector trichomes, which are the characteristics that differentiate it from other species of the genus *Bauhinia*. Alkaloids, phenolic compounds, lipophilic compounds, lignin, triterpenes, steroids and tannins were observed in the species through histochemistry. To obtain the secondary metabolites present in the stem, the ethanolic extract (EECBP) was produced for subsequent chromatographic fractionation (FEECBP) and the determination of taraxerone and sitosterone in fraction (J-1) and γ -sitosterol; stigmasterol and 3,7-dihydroxy-3-phenyl-4-chromanone in fraction (J-2) through gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS). To evaluate cytotoxicity after exposure of the fractions by the MTT method and investigate the immunomodulatory activity, an in vitro model with cell culture of murine macrophages, RAW 264.7, stimulated with LPS and treated with different concentrations of FEECBP was used to determine the concentrations of nitric oxide (NO) and the cytokines TNF- α and TGF- β , which were modulated by fractions J-1 and J-2. The fractions were tested to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Lethal Concentration (MLC) and whether they have synergistic or additive action when used concomitantly with antibiotics by the *checkerboard* method in antimicrobial assays. The lowest MICs were observed for *P. aeruginosa* ATCC 10226 (0.078 mg/mL), *S. choleraesuis* ATCC 14028 (0.156 mg/mL) *Candida* genus and *S. epidermidis* ATCC 12228 (0.312 mg/mL) and MLC against strains of *P. aeruginosa* ATCC 10226 (0.078 mg/mL), *Candida* genus (0.312 mg/mL) and *S. aureus* ATCC 25923 (0.312 mg/mL). Potential synergism on a 16x scale was observed with the association of FEECBP and the antibiotics cephalexin, norfloxacin, gentamicin, and polymyxin against *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. choleraesuis* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 10536, and *P. aeruginosa* ATCC 10226. Based on all that was discussed, it is possible to note that the species *B. pulchella* represents a promising area of study for anti-inflammatory and antimicrobial research. In addition, there is great potential to investigate its anatomical and histochemical characterization throughout the genus, and this work has already contributed in an unprecedented way to this area of knowledge.

Keywords: *Bauhinia pulchella*. Histochemistry. Antimicrobial property. Cytotoxicity. Steroides. Terpenoids. 3,7-dihydroxy-3-phenyl-4-chromanone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Similaridade morfológica das folhas em diferentes espécies vegetais	26
Figura 2 - Partes aéreas de <i>B. pulchella</i>	28
Figura 3 - Principais vias de produção dos metabólitos secundários	29
Figura 4 - Biossíntese dos terpenoides	30
Figura 5 – Biossíntese dos esteroides	31
Figura 6 – Estrutura base dos flavonoides e biossíntese da flavanona e isoflavanona....	33
Figura 7 – Estrutura base das penicilinas	61
Figura 8 – Esquematização do teste de viabilidade celular	66
Figura 9 – Esquematização sobre a produção dos mediadores inflamatórios	67
Figura 10 – Esquematização para a determinação da CIM	70
Figura 11 – Esquematização para determinação da CLM.....	71
Figura 12 – Esquematização do método <i>checkerboard</i>	72
Figura 13 – Secção transversal do caule de <i>B. pulchella</i>	74
Figura 14 – Secção transversal do pecíolo de <i>B. pulchella</i>	75
Figura 15 – Secções paradérmicas e transversais da lâmina foliar de <i>B. pulchella</i>	77
Figura 16 – Histoquímica da lâmina foliar de <i>B. pulchella</i>	79
Figura 17 – Histoquímica do caule de <i>B. pulchella</i>	80
Figura 18 – Estrutura química da molécula de taraxerona (J-1).....	83
Figura 19 – Cromatograma de J-1 e o espectro de massas para a taraxerona	84
Figura 20 – Estrutura química da molécula de sitosterona (J-1)	85
Figura 21 – Cromatograma de J-1 e o espectro de massas para a sitosterona.....	86
Figura 22 – Estrutura química da molécula de γ -sitosterol (J-2).....	87
Figura 23 – Cromatograma de J-2 e o espectro de massas para o γ -sitosterol	88
Figura 24 – Estrutura química da molécula de estigmasterol (J-2)	89
Figura 25 – Cromatograma de J-2 e o espectro de massas para o estigmasterol.....	90
Figura 26 – Estrutura química da molécula de 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona (J-2).91	
Figura 27 – Cromatograma de J-2 e o espectro de massas para o 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona	92
Figura 28 – Citotoxicidade de J-1 em células RAW 264.7 pelo método do MTT.....	93
Figura 29 – Citotoxicidade de J-2 em células RAW 264.7 pelo método do MTT.....	94
Figura 30 – Determinação de óxido nítrico em células RAW 264.7 na presença de J-1 95	
Figura 31 – Determinação de óxido nítrico em células RAW 264.7 na presença de J-2 95	

Figura 32 – Determinação de TGF- β em células RAW 264.7 na presença de J-1.....	96
Figura 33 – Determinação de TGF- β em células RAW 264.7 na presença de J-2.....	97
Figura 34 – Determinação de TNF- α em células RAW 264.7 na presença de J-1.....	98
Figura 35 – Determinação de TNF- α em células RAW 264.7 na presença de J-2.....	98
Figura 36 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1 sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	100
Figura 37 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-2 sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	101
Figura 38 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-3 sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	102
Figura 39 - Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10226	105
Figura 40 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3 e J-4 sobre cepas de <i>S.</i> <i>cholerasuis</i> ATCC 14028	106
Figura 41 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1 e J-2 sobre cepas de <i>E. coli</i> ATCC 10536	107
Figura 42 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	110
Figura 43 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	111
Figura 44 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	112
Figura 45 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para <i>S. aureus</i> ATCC 25923	115
Figura 46 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	116
Figura 47 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para <i>E. coli</i> ATCC 10536	117
Figura 48 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10226	117
Figura 49 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	118
Figura 50 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para <i>S. cholerasuis</i> ATCC 14028	118

Figura 51 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-2 para <i>S. cholerasuis</i> ATCC 14028 e <i>E. coli</i> ATCC 10536.....	120
Figura 52 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-2 para <i>S. aureus</i> ATCC 25923; <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 e <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.....	121
Figura 53 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-3 para <i>S. aureus</i> ATCC 25923; <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 e <i>S. cholerasuis</i> ATCC 14028.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura dos metabólitos secundários isolados do gênero <i>Bauhinia</i>	34
Tabela 2 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do EECBP.....	81
Tabela 3 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico do EECBP.....	81
Tabela 4 – Avaliação das CIM e CLM das frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas do gênero <i>Candida</i>	99
Tabela 5 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10226	103
Tabela 6 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	103
Tabela 7 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>E. coli</i> ATCC 10536	104
Tabela 8 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	108
Tabela 9 - Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	109
Tabela 10 - Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	109
Tabela 11 – Efeito modulador da fração J-1 sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico	114
Tabela 12 – Efeito modulador da fração J-2 sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico	119
Tabela 13 – Efeito modulador da fração J-3 sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico	122

LISTA DE ABREVIATURAS

[O]	Oxidação
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
AMP	Ampicilina
ANFO	Anfotericina
Anvisa	Agência nacional de vigilância sanitária
ATB	Antibiótico
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosina trifosfato
AWaRe	<i>Access-Watch-Reserve</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE	Ceará
CFX	Cefalexina
CG	Cromatógrafo gasoso
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLM	Concentração letal mínima
cm	Centímetros
co	Colênquima
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima a
ct	Cutícula
CuO	Óxido de cobre
cv	Cilindro vascular

DIM	Difosfato de dimetilalila
DIP	Difosfato de isopentenila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EECBP	Extrato etanólico do caule de <i>B. pulchella</i>
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EM	Espectrômetro de massas
ep	Epiderme
esc	Esclerênquima
est	Estômato
eV	Elétron-volt
fa	Feixe acessório
FAA50	Formaldeído-ácido acético-álcool etílico
FEECBP	Frações do extrato etanólico do caule de <i>B. pulchella</i>
fl	Floema
FLU	Fluconazol
fv	Feixe vascular
g	Grama
GENT	Gentamicina
h	Hora
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alto desempenho
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IE	Impacto de elétrons
IFN- γ	Interferon- γ
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4

IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IN	Instrução normativa
J-1	Fração-1
J-2	Fração-2
J-3	Fração-3
J-4	Fração-4
J-5	Fração-5
kg	Quilograma
km	Quilômetro
L	Altura
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
m	Metro
m/z	Massa/carga
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2h-tetrazólio
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOR	Norfloxacino
°C	Grau celsius
φ	Diâmetro
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Phosphate-buffered saline
pc	Parênquima cortical
pe	Parênquima esponjoso

pf	Parênquima fundamental
pm	Parênquima medular
POLIMIX	Polimixina
pp	Parênquima paliçádico
Rename	Relação nacional de medicamentos
RenisUS	Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao sistema único de saúde
RNA	Ácido ribonucleico
SISGEN	Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado
su	Súber
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TLRs	Receptores toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
tt	Tricoma tector
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
Vei	Veículo
xl	Xilema

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	23
3.1.1 Gênero <i>Bauhinia</i> (L.).....	23
3.1.2 Espécie <i>Bauhinia pulchella</i> Benth.	25
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	29
3.2.1 Classes de metabólitos secundários encontrados em <i>Bauhinia pulchella</i> Benth.	29
3.2.1.1 Triterpenos.....	29
3.2.1.2 Esteroides	31
3.2.1.3 Flavonoides.....	32
3.2.2 Levantamento bibliográfico dos metabólitos secundários presentes no gênero <i>Bauhinia</i>	34
3.3 USO POTENCIAL DOS VEGETAIS DO GÊNERO <i>Bauhinia</i> E ETNOFARMACOLOGIA.....	56
3.3.1 Potenciais uso do gênero <i>Bauhinia</i>	56
3.3.1.1 Desenvolvimento de tecnologias	56
3.3.1.2 Etnofarmacologia e potencial farmacológico	57
3.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	59
3.4.1 Processo fisiológico da inflamação	59
3.4.2 Atividade antimicrobiana e resistência aos antibióticos	60
4 METODOLOGIA.....	63
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E CADASTRO NO SISGEN.....	63

4.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA	63
4.3 TESTE HISTOQUÍMICOS.....	64
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE (EECBP) DE <i>Bauhinia pulchella</i>	64
4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	64
4.6 CROMATÓGRAFO GASOSO ACOPLADO A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG/EM).....	65
4.7 TESTE <i>IN VITRO</i> COM MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	66
4.8 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	66
4.9 AVALIAÇÃO DAS FEECBP SOBRE CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS POR LPS	67
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO	67
4.11 NÍVEIS DAS CITOCINAS TNF- α E TGF- β	68
4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FEECBP.....	68
4.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	69
4.14 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM)	70
4.15 ATIVIDADE MODULADORA DAS FRAÇÕES SOBRE ANTIBIÓTICOS DE USO CLÍNICO.....	71
4.15.1 Método <i>checkerboard</i>	71
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE <i>Bauhinia pulchella</i> Benth.	74
5.1.1 Caracterização anatômica	74
5.1.2 Testes histoquímicos.....	79
5.2 ESTUDO DOS CONSTITUINTES FIXOS DE <i>Bauhinia pulchella</i>	80
5.2.1 Obtenção do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pulchella</i> (EECBP).....	80
5.2.2 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pulchella</i> (EECBP).....	81

5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE J-1 E J-2.....	82
5.3.1 Composição química de J-1	82
5.3.2 Composição química de J-2	87
5.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	93
5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	94
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS APÓS TRATAMENTO COM J-1 E J-2	95
5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FEECBP	99
5.7.1 Concentrações inibitórias e letais mínimas (CIM e CLM) da FEECBP sobre leveduras.....	99
5.7.2 Concentrações inibitórias e letais mínimas (CIM e CLM) sobre bactérias Gram negativo.....	103
5.7.3 Concentrações inibitórias e letais mínimas (CIM e CLM) sobre bactérias Gram positivo.....	108
5.7.4 Avaliação do efeito modulador das FEECBP sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico	113
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	124
REFERÊNCIAS	126
APÊNDICE A – ARTIGO NA BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY.....	139
APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA CHEMISTRY & BIODIVERSITY	140

1 INTRODUÇÃO

O potencial do Brasil para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir das plantas é devido a biodiversidade presente no país que, possui em torno de 20% do patrimônio genético do planeta concentrada nessa região do globo terrestre. O processo de disseminação das culturas e o êxodo das populações favoreceram as trocas de informações entre diversos povos. De tal forma, a etnofarmacologia foi expandida e agregada a diversas culturas, possibilitando a ampliação de formas de uso, assim como o investimento em pesquisas a respeito da grande variedade de plantas medicinais para fins terapêuticos (Brasil, 2012; Thompson; Pascalicchio, 2012). As plantas medicinais são definidas conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 69/14 (Brasil, 2014) como sendo uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos e, diante dessa importância, foi aprovada o Programa Nacional de Plantas Medicinais pela Portaria Interministerial nº 2960/08, com um dos propósitos de ampliar o uso e o acesso às plantas medicinais e promover a pesquisa e o desenvolvimento nessa temática (Brasil, 2008).

As pesquisas nessa seara se expandiram e se desenvolveram, possibilitando novas descobertas e estudos, os quais culminaram em testes científicos e, conseqüentemente, em produtos acabados que abastecem o mercado e suprem a demanda da população, os denominados fitoterápicos. A conceituação da referida categoria foi definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por meio da Instrução Normativa (IN) nº 130 de 2022 e se refere a um

[...] produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (Brasil, 2022a, p. 2).

A expansão da indústria dos fitoterápicos vem alcançando altos índices de desenvolvimento em todo o globo, tornando-se, portanto, uma valiosa possibilidade de crescimento a nível nacional. No cenário brasileiro, temos uma dinâmica inversamente proporcional, pois, apesar de possuímos elevado potencial científico de pesquisas no ramo da fitoterapia, temos uma acentuada retração no desenvolvimento e em investimentos no mercado, que só atinge a cifra de US\$ 550 milhões em 2015 (Alves, 2013; Carvalho *et al.* 2018). O reflexo dessa situação pode ser constatado com uma drástica redução da representação das empresas brasileiras nessa área, atingindo um montante de apenas 15% entre os anos de 2009

e 2015. Tal situação, segundo Hasenclever *et al.* (2017), é devida a uma ausência de políticas públicas que tenham caráter incentivador para que grandes indústrias se debruçam em todo o arsenal contido na flora brasileira.

Outro fator que impossibilita o real e o devido crescimento do setor fitoterápico e, conseqüentemente, o desenvolvimento de medicamentos que possam chegar até o consumidor final é o elevado custo, além das grandes exigências para os seus registros, que vão desde as pesquisas de bioprospecção até os testes pré-clínicos e clínicos. Fato que acentua o desinteresse de produção, principalmente das indústrias de pequeno porte (Brito; Rodrigues, 2015). Todavia, Ethur *et al.* (2011) afirma que a expectativa de novas descobertas de moléculas importantes na terapêutica de diversas enfermidades se torna um inerente fator que colabora e favorece a continuidade das pesquisas.

Além dessas possibilidades, os estudos de plantas medicinais também proporcionam outra importante finalidade, a qual, segundo os autores Barreiro e Bolzani (2009), se dá na capacidade de utilizar suas substâncias como protótipo para a síntese de substâncias análogas mais potentes, seletivas e seguras, tal como podemos observar nas xantinas, sildenafil e teofilina, que são utilizadas para disfunção erétil e ação broncodilatadora, respectivamente.

No extenso rol de plantas medicinais com características farmacológicas diversas, como vimos anteriormente, temos uma ampla diversidade em espécies do mesmo gênero, tal como podemos observar no gênero *Bauhinia* (L.). Dentre as espécies, temos *Bauhinia forficata* Link., que através da decocção e infusão das suas folhas se obtém um chá que auxilia no tratamento da *diabetes mellitus* tipo 2. Tal finalidade é decorrente da presença de canferol-3,7-di-O-ramnosídeo na sua composição, que também auxilia como indicador químico da planta (Oliveira; Souza, 2022; Pepato *et al.* 2002). Já *Bauhinia scandens* L., por meio do uso do extrato proveniente do seu caule, é capaz de atuar no manejo de infecções microbianas e como antidiarreico (Islam *et al.* 2022). Enquanto que *Bauhinia pulchella* Benth., objeto desta pesquisa, atua no tratamento da dor e inflamação, especificamente na terapêutica da periodontite, através dos estudos mais recentes sobre a alteração molecular do fisetinidol, um flavonoide natural obtido do fracionamento do extrato etanólico do caule (Pinto, 2019).

A comprovação de tais ativos e ações, através de pesquisas, fez com que o uso dessas plantas medicinais se tornasse uma porta para a criação de uma política pública de saúde, a qual já se trata de uma realidade que pode ser observada na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), onde podemos ter acesso a uma lista básica de produtos a serem adquiridos para suprir necessidades em saúde. Nessa lista existem espécies vegetais

padronizadas com o nome científico, nome popular, indicação e ação, formas de apresentação do fitoterápico, como também concentração/composição.

Na mesma perspectiva, o Ministério da Saúde também elaborou uma relação com plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde, denominada de ReniSUS, a qual foi criada em 2009 e contabiliza 71 espécies vegetais com o propósito de orientar pesquisas e estudos nessa área. Dentro das espécies presentes na ReniSUS, o gênero *Bauhinia* foi contemplado as *Bauhinia affinis* Vogel., *B. forficata* e *Bauhinia variegata* Linn. (Brasil, 2009).

Diante do exposto, percebe-se a necessidade dos estudos com vegetais do gênero *Bauhinia*, tanto pela sua caracterização botânica, devido à formação de dados inéditos na literatura referentes à microscopia e à histoquímica, auxiliando na diferenciação da *B. pulchella* de outras espécies vegetais; quanto pelo seu potencial químico e farmacológico a ser analisado, uma vez que possui diversas abordagens, seja na etnofarmacologia, nos ensaios laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e no arsenal diversificado de metabólitos secundários, que são moléculas importantes para o uso terapêutico e industrial, tais como os alcaloides, flavonoides, triterpenos e esteroides.

Por isso, o estudo de *B. pulchella* foi objeto desta tese, que busca o aprimoramento das técnicas instrumentais para a obtenção de resultados únicos para a comunidade científica e colaborar para o fortalecimento dos programas que envolvam plantas medicinais e o Sistema Único de Saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar anatômica e histoquimicamente as folhas e caule de *B. pulchella* e avaliar suas atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características anatômicas e histoquímicas que divergem a *B. pulchella* das demais espécies do gênero;
- Produzir extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (EECBP) e o seu respectivo fracionamento cromatográfico;
- Elucidar quimicamente as frações por cromatógrafo gasoso acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM);
- Estabelecer as faixas de citotoxicidade das frações trabalhadas pelo método de viabilidade celular em brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT);
- Estimar a atividade anti-inflamatória das FEECBP pela quantificação das citocinas TNF- α , TGF- β e NO;
- Avaliar atividade antimicrobiana das FEECBP através dos métodos das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Letais Mínimas (CLM);
- Classificar o efeito modulador das FEECBP com os antibióticos pelo método *checkerboard*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

3.1.1 Gênero *Bauhinia* (L.)

Classificadas botanicamente como sendo Angiospermas, Eudicotiledôneas, Eudicotiledôneas Core, Rosídeas, Fabídeas; e pertencentes à ordem Fabales e à família Fabaceae (Souza; Lorenzi, 2012); as plantas do gênero *Bauhinia* são apenas um exemplo da subfamília Cercidoideae, a qual corresponde a maior família em número de espécies no Brasil. A origem do seu nome advém de uma metáfora à irmandade fraterna dos irmãos Jean e Gaspard Bauhin, que deram o seu nome para as plantas com folhas bilobuladas do gênero (Wang, 2014).

Tais plantas são consideradas uma subfamília monofilética de acordo com estudos filogenéticos (Tozzi *et al.* 2016) e podem se apresentar em forma de ervas, arbustos, árvores ou até mesmo lianas; com desenvolvimento perenes ou anuais e com grandes espécies vegetando em florestas ou herbáceas encontradas em campos (Polhill; Raven; Stirton, 1981). Em sua diversidade, caracterizam-se por possuir folhas compostas e alternas, com flores pentâmeras, períginas ou hipóginas, geralmente bissexuadas e simetria variada, flores e o fruto típico é o legume (Cronquist, 1981; Souza; Lorenzi, 2005; Stevens, 2006).

Por possuir uma gama de exemplares, as plantas da família Fabaceae possuem distribuição ampla em centros de biodiversidade em diferentes tipos de habitat com clima, solo e topografia variados (Wojciechowski, 2003; Wojciechowski; Lavin; Sanderson, 2004), compondo um importante grupo de plantas e representando a maior parte da diversidade florística da região Nordeste do Brasil e do Domínio da Caatinga (BFG, 2015).

Convergindo com as características da sua família, o gênero *Bauhinia* apresenta predominância no Nordeste brasileiro, mas o seu primeiro centro de diversificação do gênero provavelmente se deu no continente asiático (Meng *et al.* 2014). Ainda de acordo com Meng *et al.* (2014), a sua migração até a chegada no continente americano provavelmente se deu por rotas entre ilhas vulcânicas durante o resfriamento terrestre no período Paleocênico da Era Cenozoica gerando um grande intercâmbio biótico americano entre a Eurásia e a América, o qual pode ser inferido através dos estudos filogenéticos moleculares.

A fim aferir a ancestralidade do gênero, estudos e trabalhos estão sendo desenvolvidos para avaliar tanto macroscopicamente quanto microscopicamente os fósseis foliares vegetais para auxiliar na diferenciação evolutiva das espécies, como podemos perceber através dos

estudos sobre *Bauhinia larsenii* sp.; *Bauhinia cheniae* sp. e *Bauhinia ningmingensis* sp. (Wang *et al.* 2014).

Demais partes da planta também são analisadas para melhor caracterizá-las e diferenciá-las, como é o caso do estudo morfológico da superfície das sementes, sua pelagem e formato regular são utilizados para a caracterização das espécies de *Bauhinia purpurea* Linn. e *B. variegata*, utilizando microscopia eletrônica de varredura (Ullah *et al.* 2019). Esses padrões estruturais morfológicos das sementes e da micromorfologia auxiliam na classificação, na evolução e no potencial frutífero das angiospermas (Dahlgren, 1980).

A caracterização das estruturas polínicas e a sua variação morfológica com microscopia eletrônica de varredura também vem sendo utilizados em prol do árduo trabalho de identificação desse grupo. Podemos verificar essa importância com a análise do pólen não especializado de algumas espécies, como é o caso de *Bauhinia petersiana* Bolle, *Bauhinia bohniana* L. Chen. e *Bauhinia galpinii* N.E.Br., que apresentam estrutura prolato a esferoidal, microreticulado ou enrugado; enquanto que *Bauhinia phoenicea* B. Heyne ex Wight & Arn. e *Bauhinia pottsii* G. Don. apresentam pólen tétrades; já a *Bauhinia taitensis* Taub. e *Bauhinia tomentosa* possuem 4-6 pólenes colpados; *Bauhinia seminarioi* Harms ex Eggers. e *Bauhinia picta* Kunth. possuem espinhos a partir suas aberturas porosas (Banks; Forest; Lewis, 2013).

No que se refere às folhas também pode-se verificar algumas distinções entre as espécies de *Bauhinia* que podem caracterizá-las e torná-las únicas dentro do gênero. No caso de *Bauhinia unguolata* L., temos uma lâmina de contorno elíptico moderadamente bilobulada com pecíolo pulvinado e margem não dentada; com venação primária actinódroma basal com 7-9 veias basais com a presença de veias secundárias. Parte inferior de seio estreito com estômatos paracíticos orientados aleatoriamente (Lin *et al.* 2015).

As folhas de *Bauhinia curvula* Benth., por sua vez, apresenta uma lâmina foliar anfiestomática com predominância na região adaxial (Rezende; Cardoso; Vannuci, 1994), sendo bilobuladas com 2,0 a 7,0 cm de comprimento e 1,5 a 6,0 cm de largura e os ápices variam de obtusos a agudos, tendo nove nervuras primárias; com venação do tipo acródoma com nervura primária retilínea e as laterais em curva.

Enquanto que as folhas de *Bauhinia holophylla* (Bongard) Steudel. apresentam uma epiderme tanto abaxial como adaxial pouco cutinizada, com tricomas do tipo tectores formados por 3-8 células cônicas e com ápice afilada intumescida, como também glandulares com maior abundância na porção inferior. Possuem também células epidérmicas de diferentes tamanhos, poliédricas e com raros estômatos na porção adaxial. Já na porção abaxial, apresenta maior abundância de estômatos e tricomas de diferentes tamanhos (Salatino, 1976).

B. forficata apresenta dois folíolos fundidos, peciolados, com dois pulvinos nas extremidades de cada pecíolo, além de uma lâmina foliar bifoliada e simétrica. A venação é do tipo actinódromo, onde cada folíolo possui cinco nervuras primárias, as quais se conectam com as nervuras secundárias. Já sua face adaxial é desprovida de tricomas, diferente da sua porção abaxial que apresenta tricomas tectores alongados, unisseriados, com variação de número celular de uma a seis células de diversos tamanhos. No que tange a presença de estômatos, na face adaxial é praticamente inexistente, tendo sua pequena presença próximo às nervuras, com características anomocíticas e com número celular ao redor de 2-7. Na porção abaxial, temos estômatos praticamente presentes em toda a sua extensão, sendo do tipo anomocítico (Lusa; Bona, 2009).

B. variegata apresenta dois folíolos fundidos e peciolados, com dois pulvinos nas extremidades de cada pecíolo, bilobulado e simétrico. A sua venação é do tipo actinódromo, onde cada folíolo possui seis nervuras primárias, que são conectadas com as nervuras secundárias. A sua face adaxial da epiderme possui células poliédricas de tamanhos variáveis e estômatos anomocíticos com células circundantes de número variável. Já na região abaxial, existem células poliédricas, com um número mais acentuado de estômatos que na porção adaxial, mas com o mesmo padrão de formato (Lusa; Bona, 2009).

Diante do que pudemos observar, as nervuras das folhas do gênero *Bauhinia* possuem um dimensionamento particular do tipo palmatínervea e dois pulvinos característicos, enquanto que a venação padrão é do tipo actinódromo, sendo, portanto, uma importante ferramenta para a diferenciação de algumas espécies desse gênero (Vaz; Tozzi, 2003).

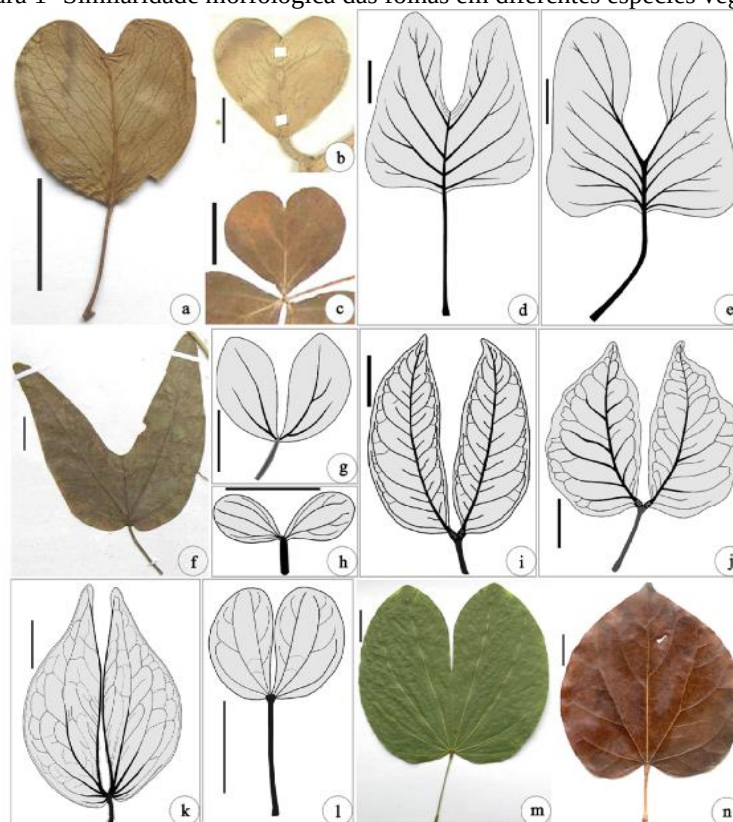
3.1.2 Espécie *Bauhinia pulchella* Benth.

Dentre as espécies do gênero, *B. pulchella* é nativa do Brasil e é mais facilmente encontrada nas regiões fitogeográficas da Amazônia, da Caatinga e do Cerrado. Devido a essa alta incidência, ganhou alcunhas populares e passou a ser conhecida como catingueira, miroro, mororo, mororo-de-bode, pata-de-cabra, pata-de-bode e pata-de-vaca (Queiroz, 2009; Aguiar; Barros, 2012). Isso se deve, pois, de acordo com Van der Pijl (1952), as folhas de *Bauhinia* se caracterizam em três tipos básicos: unifoliar, bilobulado e bifoliado. E é o formato das folhas, do pecíolo pulvinado e da venação acrômica que favorecem o seu registro fóssil (Lin *et al.* 2015) e uma melhor identificação entre as espécies.

A nova denominação pela população diz respeito às estruturas físicas da referida planta, já que sugerem a presença de uma folha fendida no meio, formando dois lobos ou

folíolos, que a assemelham a uma pata de bovino ou caprino, característica morfológica essa similar aos representantes do gênero *Bauhinia* (Lorenzi; Matos, 2002; Lusa; Bona, 2009). Esse é um dos fatores que podem gerar entraves nas identificações das espécies e, conseqüentemente, ao uso medicinal inadequado, ocasionando possíveis intoxicações. Tal problemática pode ser melhor visualizada na figura 1, onde podemos perceber a similaridade morfológica de variadas espécies e até de gêneros distintos, o que ocasiona um aumento na possibilidade de confusão por parte da população na identificação e, conseqüentemente, no seu uso indevido.

Figura 1- Similaridade morfológica das folhas em diferentes espécies vegetais

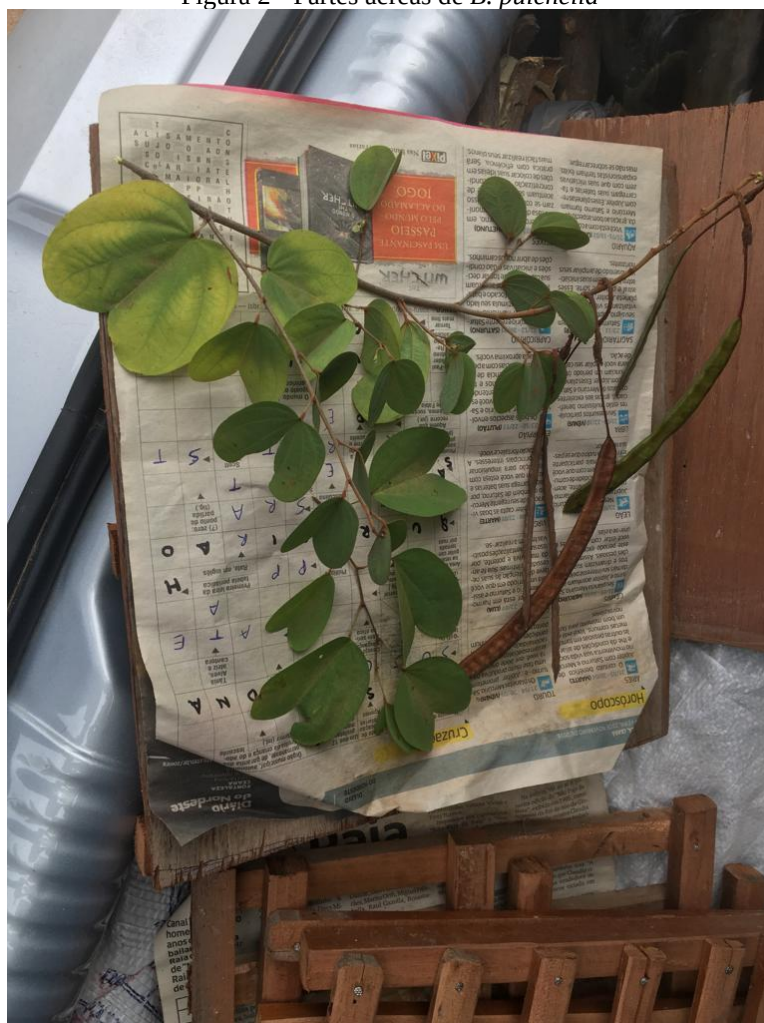


Fonte: Wang (2014).

Na figura acima, é possível notar que existem outros táxons que apresentam características similares e que podem ser observadas nas seguintes espécies: (a) *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br; (b) *Hoya kerrii* Craib.; (c) *Oxalis corymbosa* (DC.) Lourteig.; (d) *Liriodendrites bradacii* K.R Johnson.; (e) *Liriophyllum kansense* Dilcher et P.R. Crane.; (f) *Passiflora cupiformis* Masters.; (g) *Zygophyllum fabago* L.; (h) *Brenierea insignis* Humbert.; (i) *Hymenaea courbaril* L.; (j) *Guibourtia coleosperma* (Benth.) J. Leonard.; (k) *Aphanocalyx richardsiae* (J. Léonard) Wieringa.; (l) *Bauhinia didyma* L.; (m) *B. variegata* L.; (n) *Cercis chinensis* Bunge. (Wang et al. 2014). Tal similitude acaba por muitas vezes dificultando a determinação da espécie vegetal.

No que se refere à espécie *B. pulchella* (figura 2), segundo os autores Vaz e Tozzi (2003), trata-se de uma

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

Figura 2 - Partes aéreas de *B. pulchella*

Fonte: própria (2020).

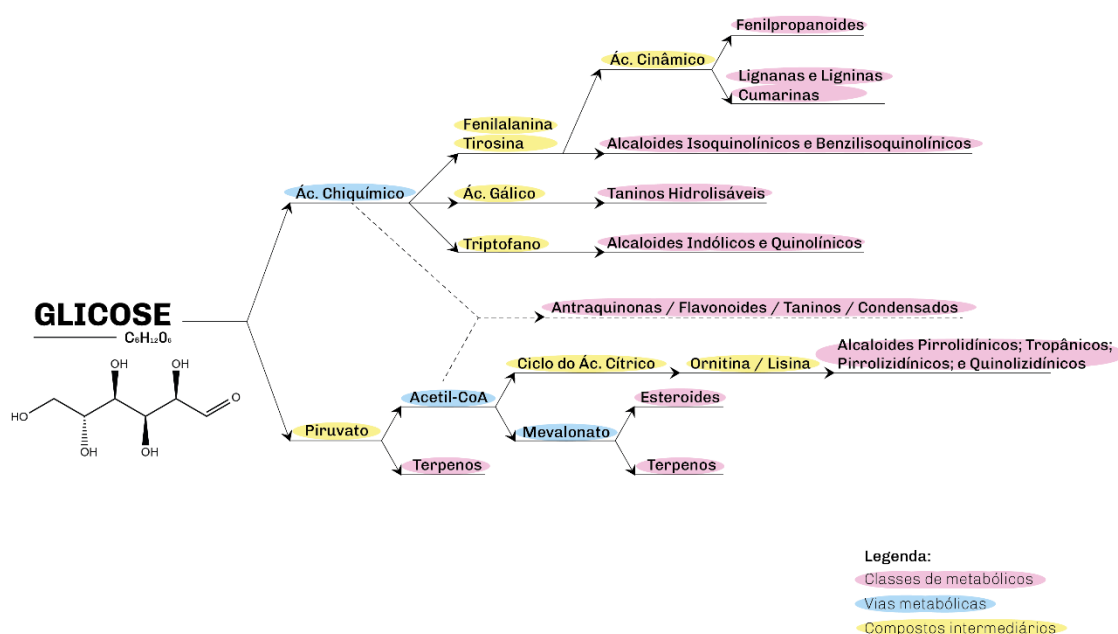
Nesse sentido, a avaliação histológica é essencial. A sua importância se refere, principalmente no que concerne ao entendimento de um padrão que favorece a identificação do gênero; assim como no processo de distinção entre as espécies que possuem estruturas macroscópicas bastante semelhantes. Essa última característica pode gerar uma dificuldade de elucidação da espécie vegetal pelos cientistas, mas que se configura como uma mudança de paradigma, desta pesquisa, na caracterização de *B. pulchella*, uma vez que inexistem trabalhos específicos para a sua identificação e caracterização individualizada, no que tange na análise anatômica e histoquímica do caule e da folha.

3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

3.2.1 Classes de metabólitos secundários encontrados em *Bauhinia pulchella* Benth.

As espécies deste gênero apresentam terpenos, alcaloides e principalmente flavonoides em suas composições químicas, os quais são produzidas por diversas vias metabólicas (Mevalonato; Acetil-CoA e do Ácido Chiquímico, respectivamente), partindo de um precursor: a glicose, conforme podemos observar na figura 3 (Sousa *et al.* 2016; Carvalho *et al.* 2018; Monteiro *et al.* 2021).

Figura 3 - Principais vias de produção dos metabólitos secundários



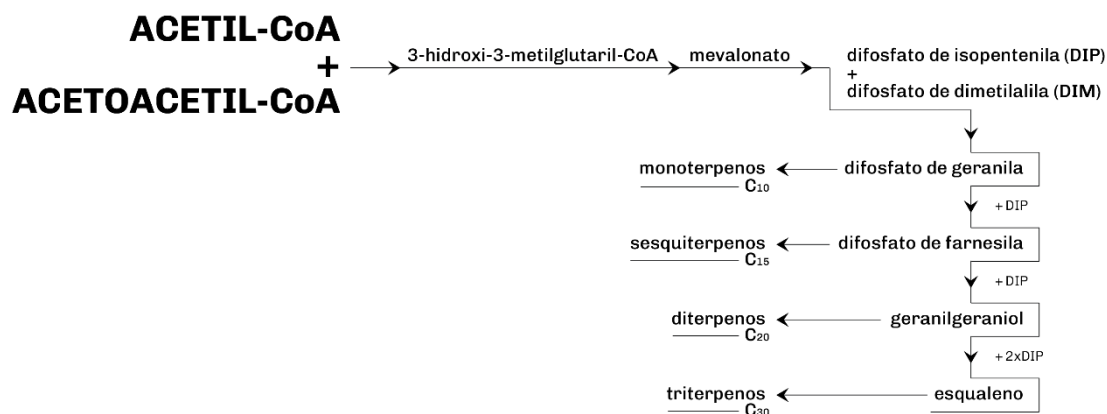
Fonte – própria (2024).

3.2.1.1 Triterpenos

Os triterpenos fazem parte da classe dos terpenos, que tem como estrutura base duas unidades de isoprenos (monoterpeno), caracterizado pela presença de 10 carbonos na sua molécula. Diante disso, percebe-se que para a formação dos triterpenos é necessário, pelo menos, 06 unidades isoprenoides (C_{30}) (Pine, 1987). A partir do Acetil Coenzima A, que é produzido por meio da glicose, são sintetizados o difosfato de isopentenila (DIP) e o difosfato de dimetilalila (DIM), que são os precursores dos monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}) e triterpenos (C_{30}), conforme apresentado na figura 4. Tal estrutura rendeu a

Leopold Ruzicka o prêmio Nobel de química em 1939, por ter relacionado a sua estrutura a precursores biológicos (Pine, 1987).

Figura 4 - Biossíntese dos terpenoides



Fonte – própria (2024).

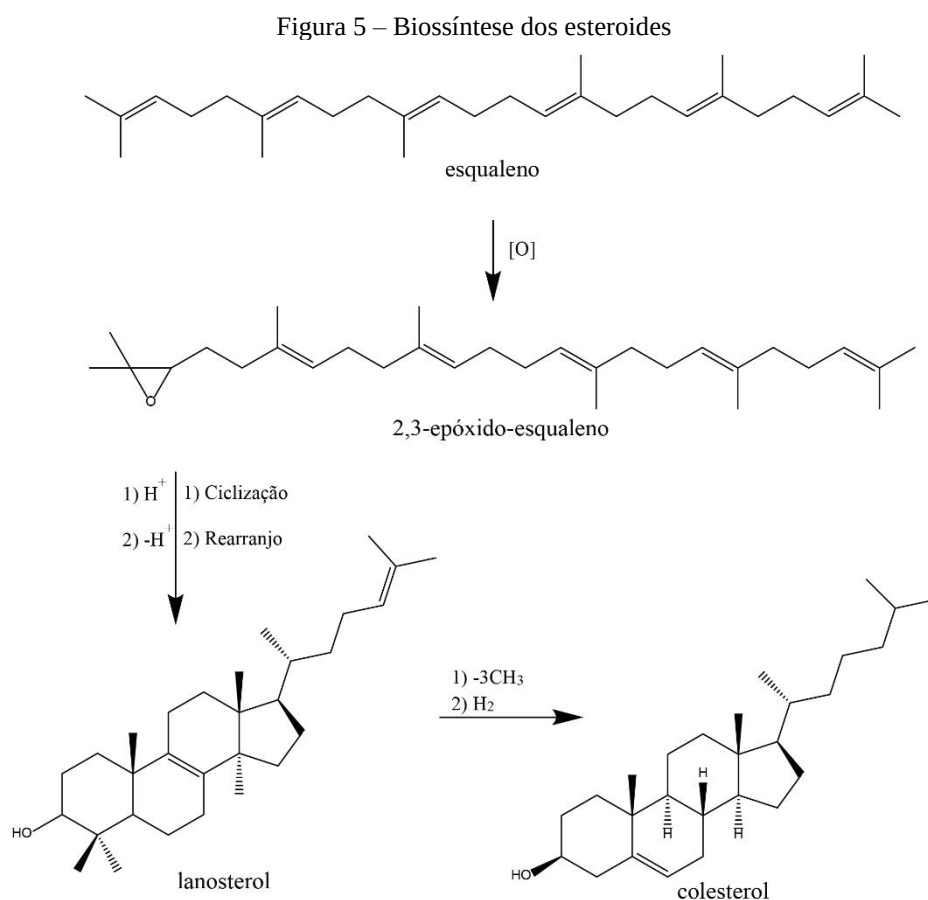
Sousa (2016), através do isolamento e elucidação estrutural dos constituintes do caule e da raiz de *B. unglata*, obteve os seguintes metabólitos secundários e suas respectivas classes química: terpenoides (taraxerol; taraxerona; glutinol e ácido betulínico).

Carvalho (2014) conseguiu obter a avaliação dos constituintes presentes nas folhas de *B. pulchella*, a qual é rica em α -pineno; óxido de cariofileno e β -pineno (que são terpenoides presentes nos óleos essenciais). No mesmo trabalho, foi relatado a presença de triterpenos (taraxerona e β -amirenona). Enquanto que Gois (2014) obteve, a partir de *Bauhinia acuruana* Moric., os seguintes constituintes: os sesquiterpenos $1\beta,6\alpha$ -diidroxi-4-(14)-eudesmeno e aromadendrano- $4\beta,10\alpha$ -diol. Já Silva (2018) isolou de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. e elucidou a presença tanto do taraxerol como do 9,19-ciclolano-24-en-3-ona, comumente conhecido como cicloarterona, um triterpeno com a capacidade quimiopreventiva para o câncer e indutor de apoptose (Kikuchi *et al.* 2014).

3.2.1.2 Esteroides

A classe dos esteroides pode ser considerada uma das mais importantes dos produtos naturais, pois está distribuída tanto nos animais como também nos vegetais, envolvido na formação dos ácidos biliares e hormônios sexuais, sendo seus principais exemplos: colesterol nos animais, estigmasterol e a digitoxina nos vegetais (Pine, 1987). Heinrich Wieland e Adolf Windaus relacionaram a relação estrutural entre o colesterol e os ácidos biliares, com isso, conseguiram o prêmio Nobel de Química em 1927 e 1928 (Pine, 1987).

O esqualeno (triterpeno), o qual é produto da biossíntese dos terpenoides, como vimos na figura 4, é um dos precursores esteroidais que é convertido em 2,3-epóxido-esqualeno e, posteriormente, em lanosterol; sendo, por fim, transformado em colesterol após a eliminação de três grupos metilas, alteração da posição da dupla ligação na cadeia cíclica e uma hidrogenação dos carbonos da cadeia alifática conforme pode ser observado na figura 5 (Pine, 1987).



Fonte: própria (2024).

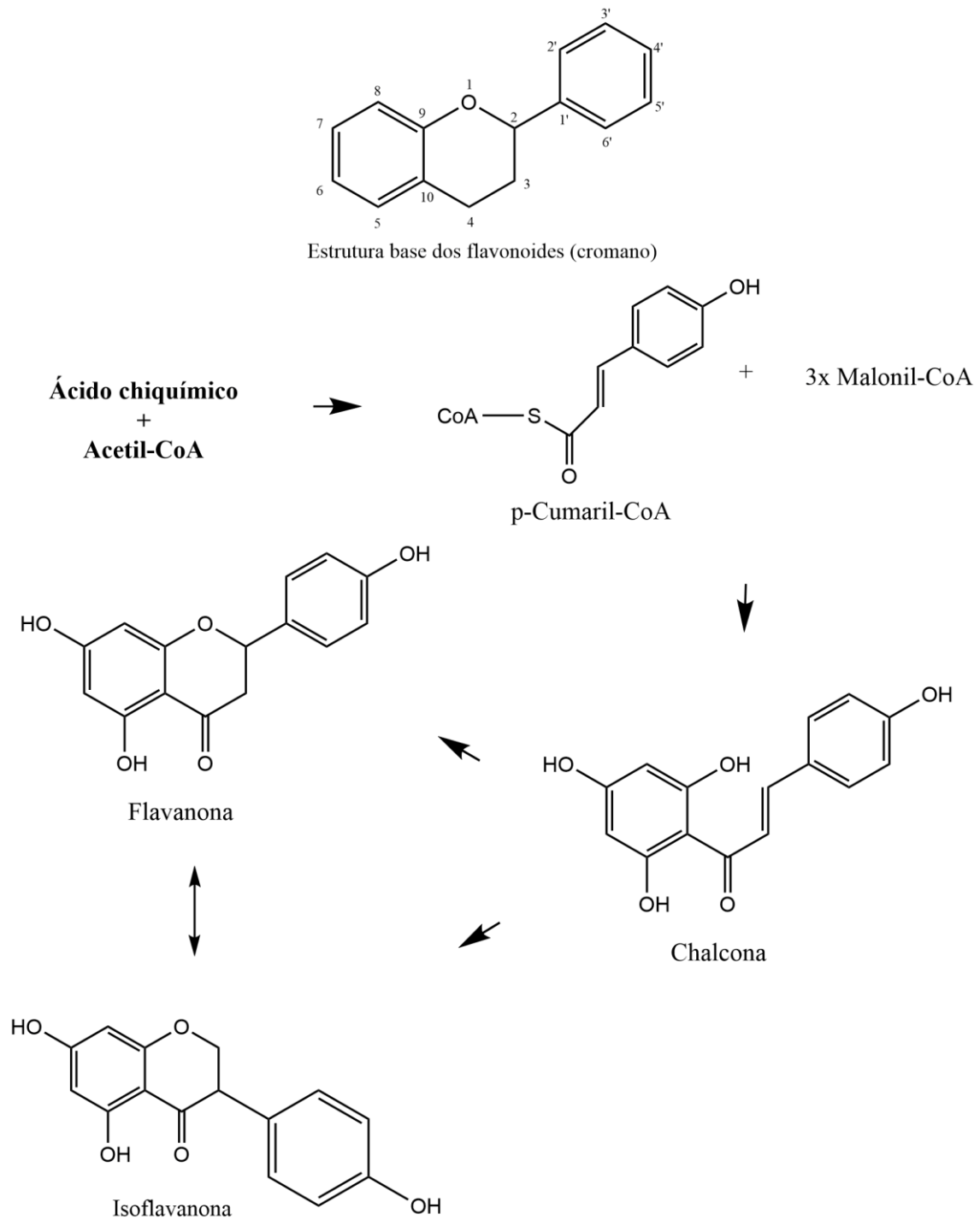
Sousa (2016) e Carvalho (2014) isolaram os esteroides sitosterol e estigmasterol de *B. unguolata* e *B. pulchella*, respectivamente. Já Gois (2014) elucidou a presença dos esteroides sitosterol glicosilado e estigmasterol na espécie *B. acuruana*.

3.2.1.3 Flavonoides

Os flavonoides apresentam em sua composição grupos fenólicos que garantem um aumento da sua hidrossolubilidade quando ligados a açúcares (glicosídeos). Sua estrutura base é um anel cromano ligado com um segundo anel na posição 2, 3 ou 4 presente na figura 6 (Simões *et al.* 2003). A biossíntese consiste do intermediário tio-éster *p*-cumaril-CoA que por ciclização forma a chalcona que por vias enzimáticas promove o fechamento do anel central, gerando a flavanona ou a isoflavanona (figura 6) (Simões *et al.* 2003).

Dentro do levantamento bibliográfico, contido na tabela 1 do tópico a seguir, é perceptível que essa classe de metabólitos secundários é a mais prevalente nos estudos das espécies do gênero *Bauhinia*.

Figura 6 – Estrutura base dos flavonoides e biossíntese da flavanona e isoflavanona



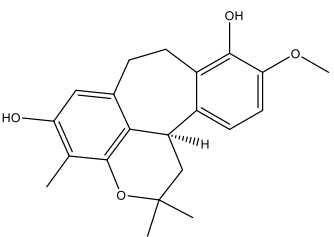
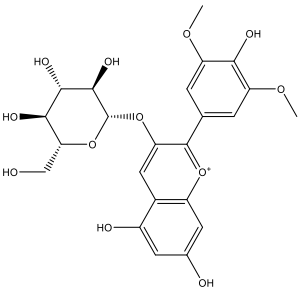
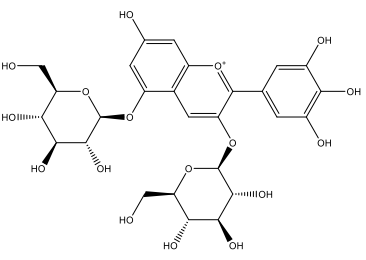
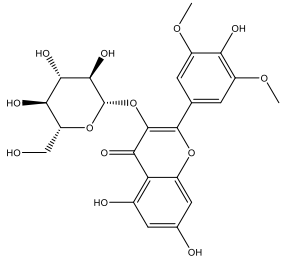
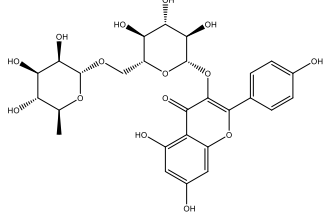
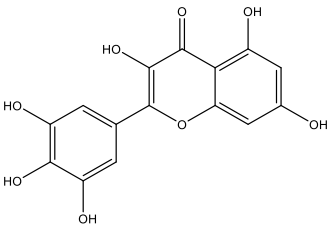
3.2.2 Levantamento bibliográfico dos metabólitos secundários presentes no gênero *Bauhinia*

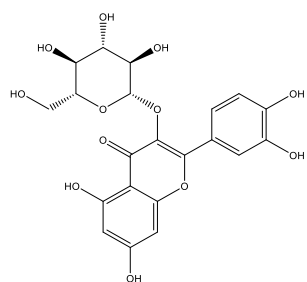
Com o intuito de aprimorar o conhecimento sobre quais constituintes estão sendo obtidos de vegetais do gênero *Bauhinia* na atualidade, além de conhecer quais as classes dos metabólitos secundários isolados para o desenvolvimento de um banco de dados, foi realizado uma pesquisa bibliográfica pela plataforma do SciFinder ® para tal catalogação.

O período determinado para a pesquisa foi entre os anos de 2022 a 2024, revelando como classes de metabólitos majoritários na sua composição os esteroides, terpenoides e flavonoides.

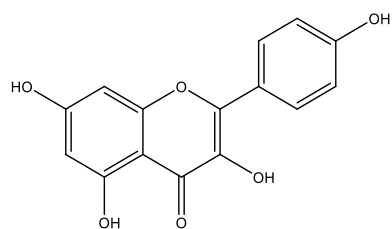
A tabela a seguir apresenta quais os metabólitos secundários e suas referências bibliográficas.

Tabela 1 – Estrutura dos metabólitos secundários isolados do gênero *Bauhinia*

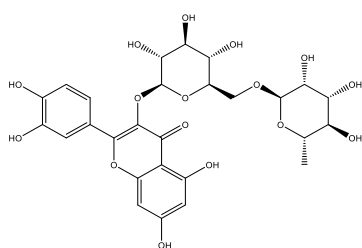
 1 Gudavalli <i>et al.</i> (2024)	 2 Sreevidya <i>et al.</i> (2024)
 3 Sreevidya <i>et al.</i> (2024)	 4 Sreevidya <i>et al.</i> (2024)
 5 Sreevidya <i>et al.</i> (2024)	 6 Sreevidya <i>et al.</i> (2024)



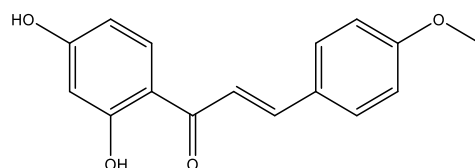
7

Sreevidya *et al.* (2024)

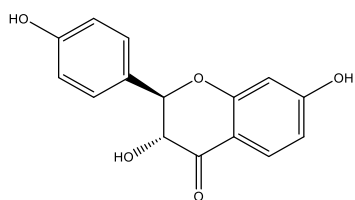
8

Sreevidya *et al.* (2024)

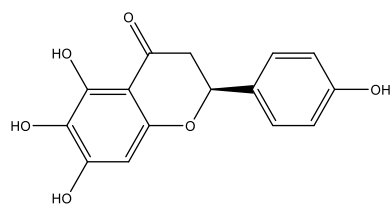
9

Sreevidya *et al.* (2024)

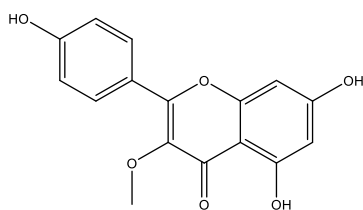
10

Zhang *et al.* (2024)

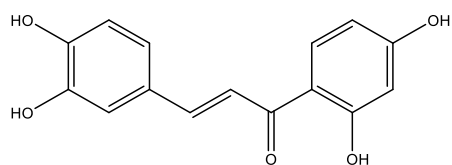
11

Zhang *et al.* (2024)

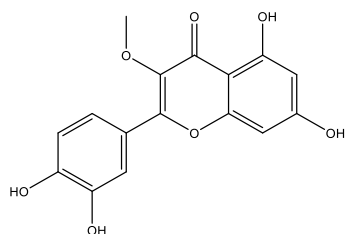
12

Zhang *et al.* (2024)

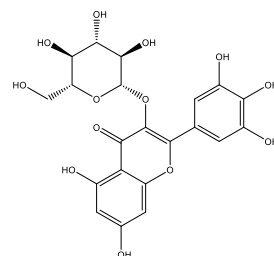
13

Zhang *et al.* (2024)

14

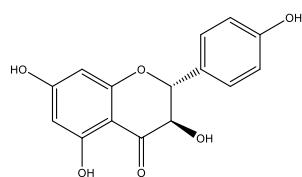
Zhang *et al.* (2024)

15

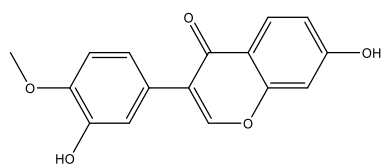
Zhang *et al.* (2024)

16

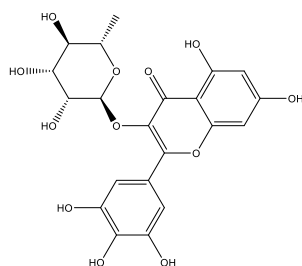
Zhang *et al.* (2024)



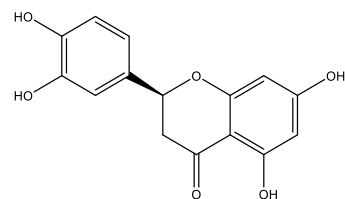
17
Zhang *et al.* (2024)



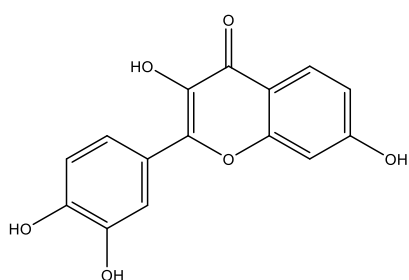
18
Zhang *et al.* (2024)



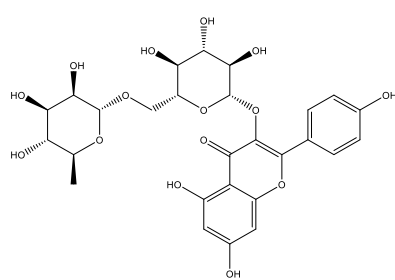
19
Zhang *et al.* (2024)



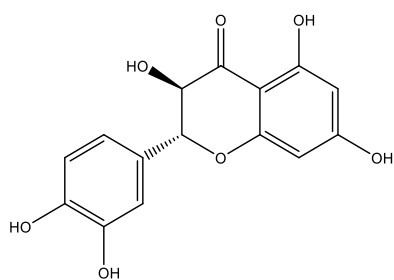
20
Zhang *et al.* (2024)



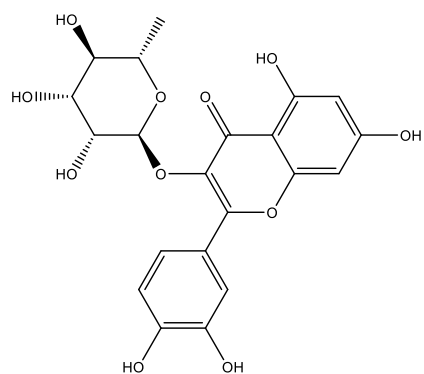
21
Zhang *et al.* (2024)



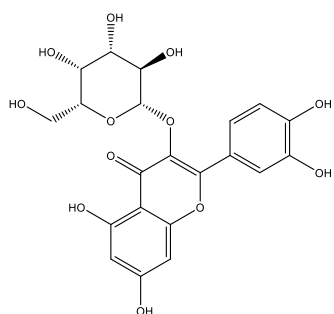
22
Zhang *et al.* (2024)



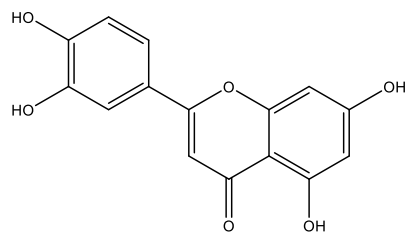
23
Zhang *et al.* (2024)



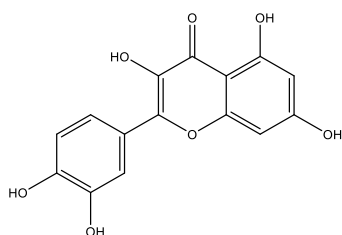
24
Zhang *et al.* (2024)



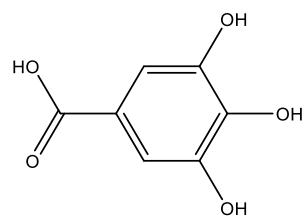
25
Zhang *et al.* (2024)



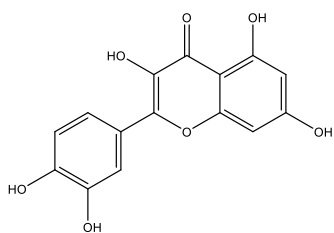
26
Zhang *et al.* (2024)



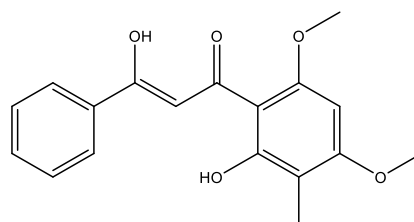
27
Zhang *et al.* (2024)



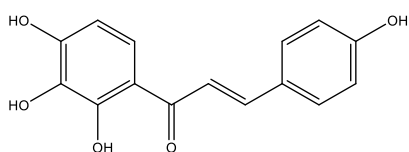
28
Nilesh *et al.* (2024)



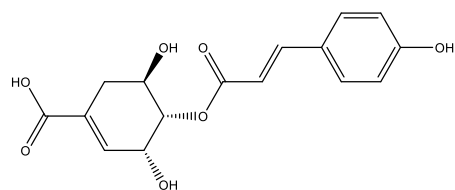
29
Nilesh *et al.* (2024)



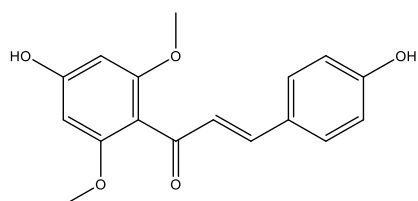
30
Eawsakul *et al.* (2023)



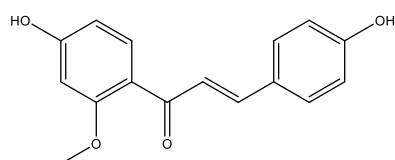
31
Eawsakul *et al.* (2023)



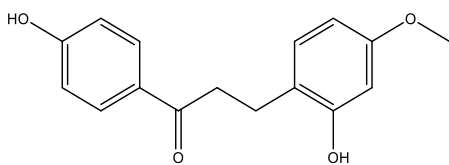
32
Eawsakul *et al.* (2023)



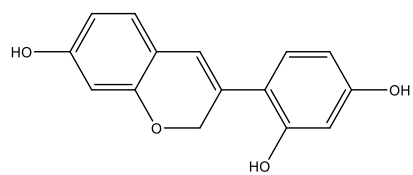
33
Eawsakul *et al.* (2023)



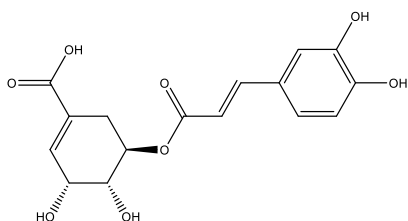
34
Eawsakul *et al.* (2023)



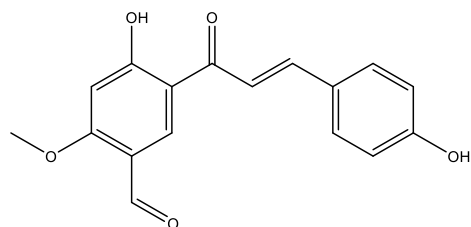
35
Eawsakul *et al.* (2023)



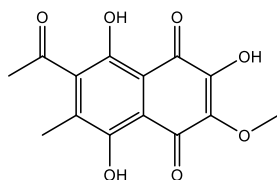
36
Eawsakul *et al.* (2023)



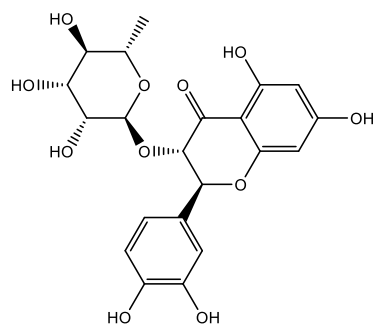
37
Eawsakul *et al.* (2023)



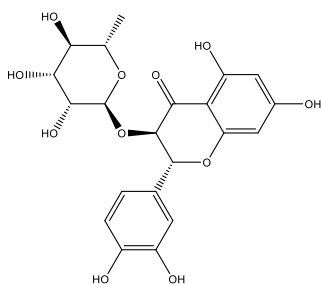
38
Eawsakul *et al.* (2023)



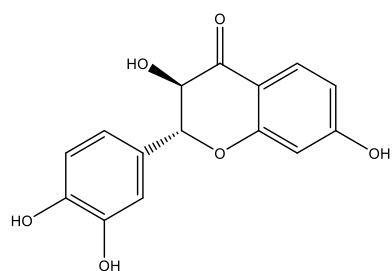
39
Eawsakul *et al.* (2023)



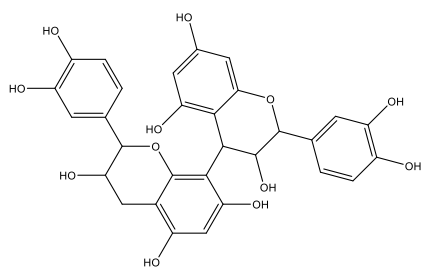
40
Eawsakul *et al.* (2023)



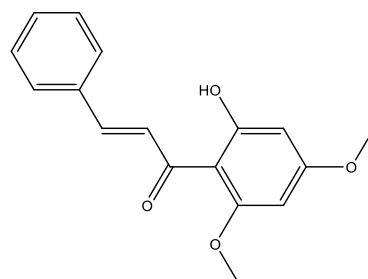
41
Eawsakul *et al.* (2023)



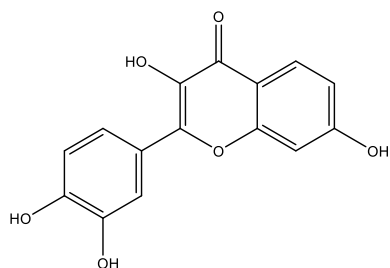
42
Eawsakul *et al.* (2023)



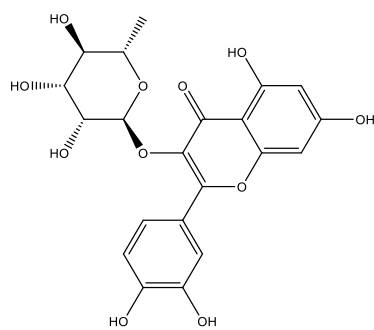
43
Eawsakul *et al.* (2023)



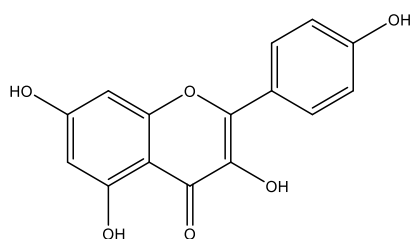
44
Eawsakul *et al.* (2023)



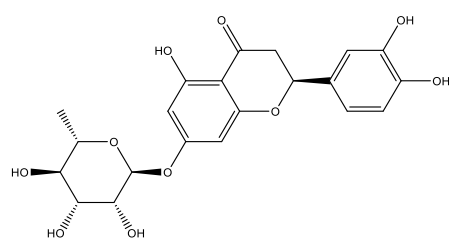
45
Eawsakul *et al.* (2023)



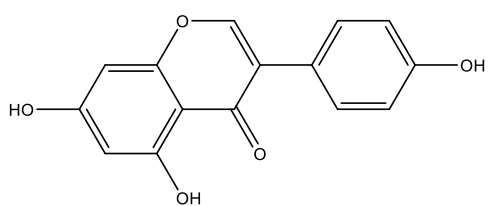
46
Eawsakul *et al.* (2023)



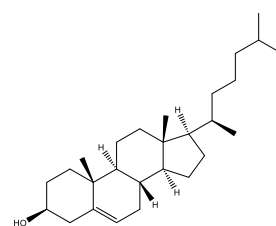
47
Eawsakul *et al.* (2023)



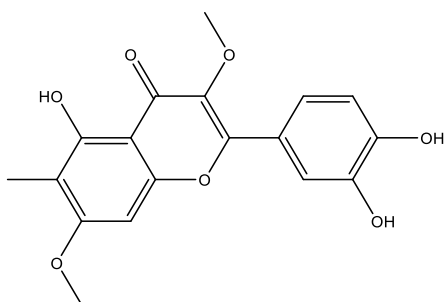
48
Eawsakul *et al.* (2023)



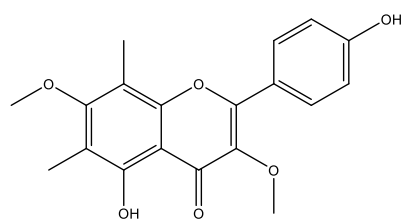
49
Eawsakul *et al.* (2023)



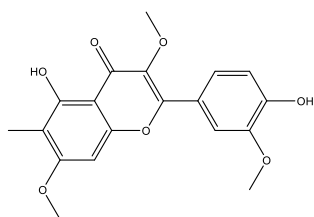
50
Eawsakul *et al.* (2023)



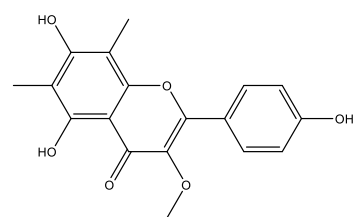
51
Matieta *et al.* (2023)



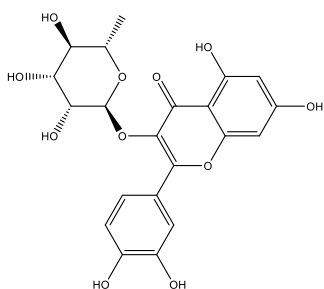
52
Matieta *et al.* (2023)



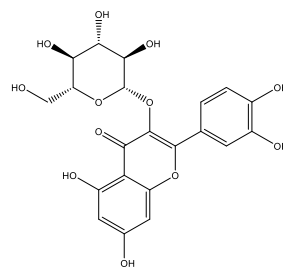
53
Matieta *et al.* (2023)



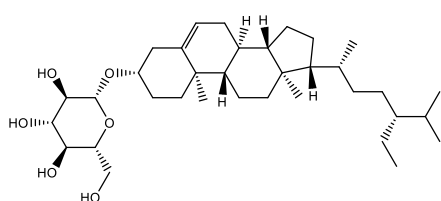
54
Matieta *et al.* (2023)



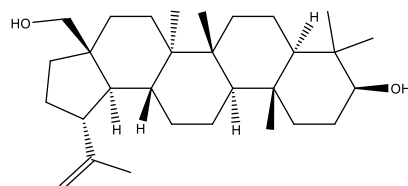
55
Matieta *et al.* (2023)



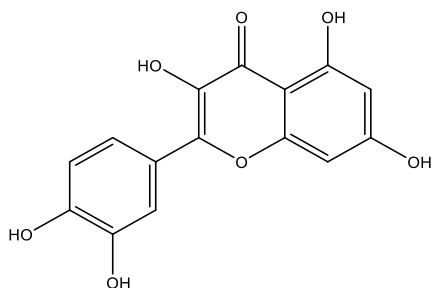
56
Matieta *et al.* (2023)



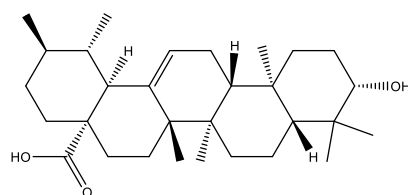
57
Matieta *et al.* (2023)



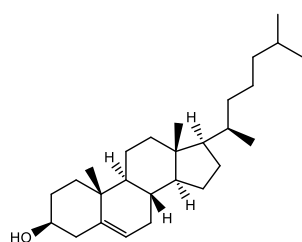
58
Matieta *et al.* (2023)



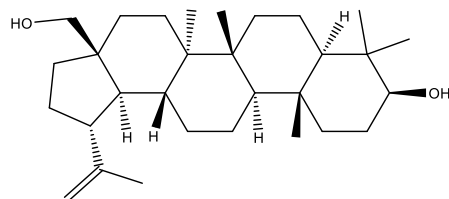
59
Matieta *et al.* (2023)



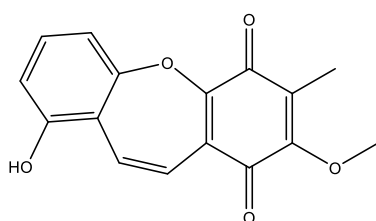
60
Matieta *et al.* (2023)



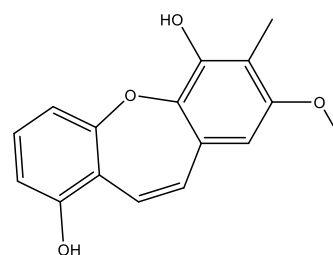
61
Matieta *et al.* (2023)



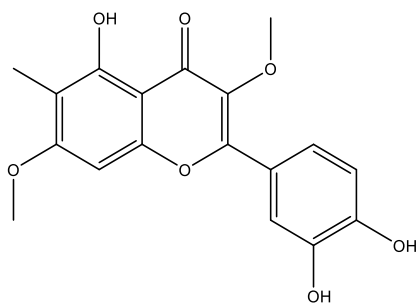
62
Kamal *et al.* (2023)



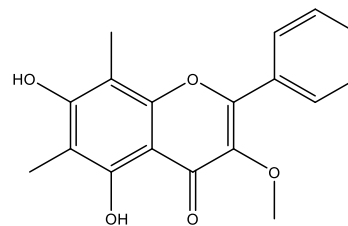
63
Souza *et al.* (2023)



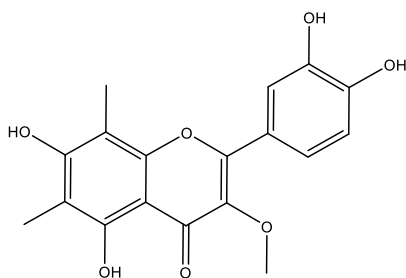
64
Souza *et al.* (2023)



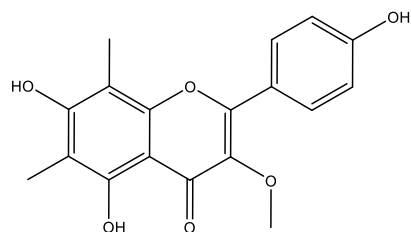
65
Nouemsi *et al.* (2023)



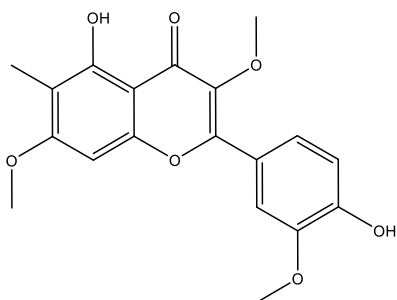
66
Nouemsi *et al.* (2023)



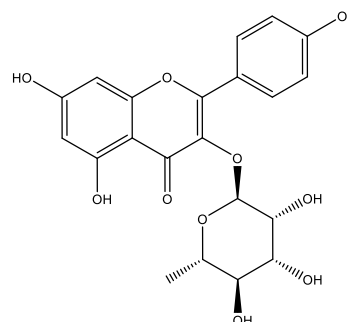
67
Nouemsi *et al.* (2023)



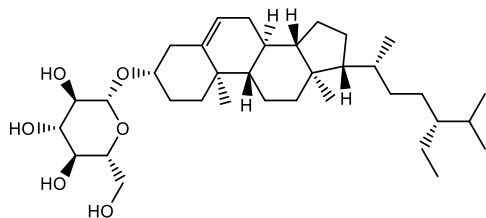
68
Nouemsi *et al.* (2023)



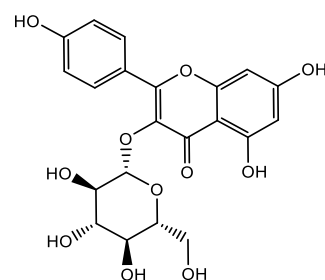
69
Nouemsi *et al.* (2023)



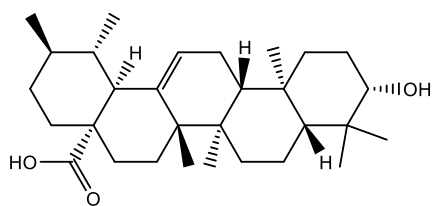
70
Nouemsi *et al.* (2023)



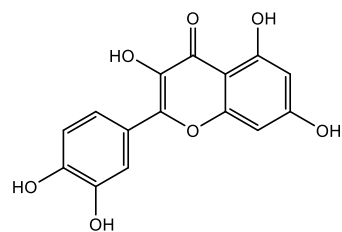
71
Nouemsi *et al.* (2023)



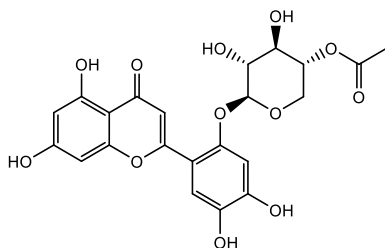
72
Nouemsi *et al.* (2023)



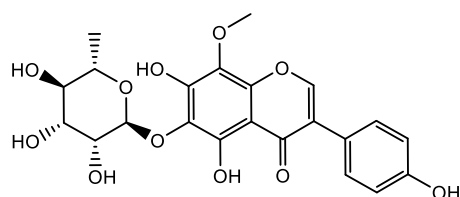
73

Nouemsi *et al.* (2023)

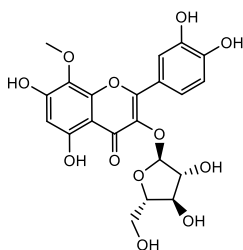
74

Nouemsi *et al.* (2023)

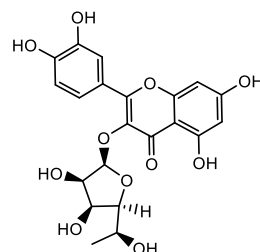
75

De souza *et al.* (2023)

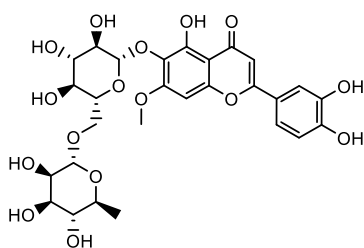
76

De souza *et al.* (2023)

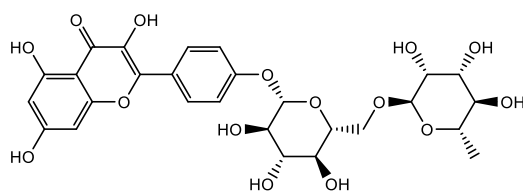
77

De souza *et al.* (2023)

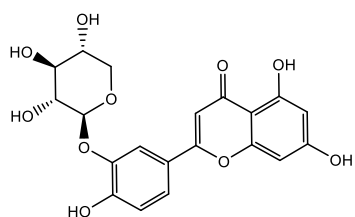
78

De souza *et al.* (2023)

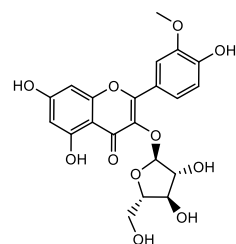
79

De souza *et al.* (2023)

80

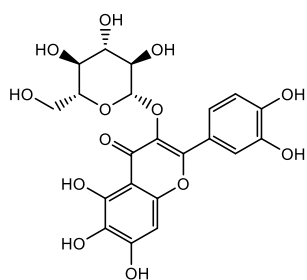
De souza *et al.* (2023)

81

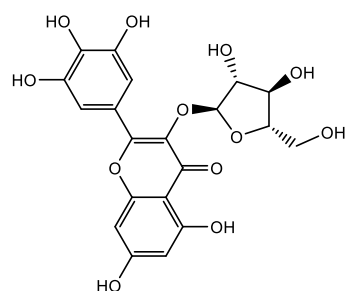
De souza *et al.* (2023)

82

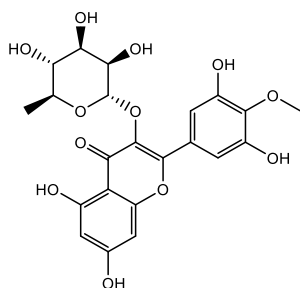
De souza *et al.* (2023)



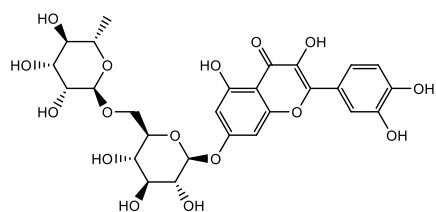
83

De souza *et al.* (2023)

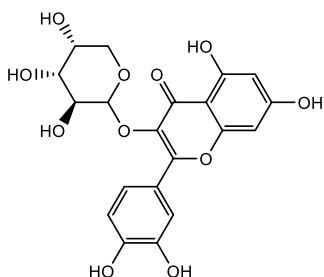
84

De souza *et al.* (2023)

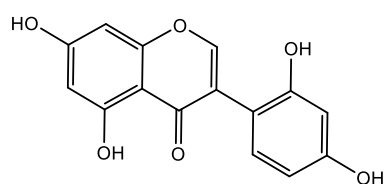
85

De souza *et al.* (2023)

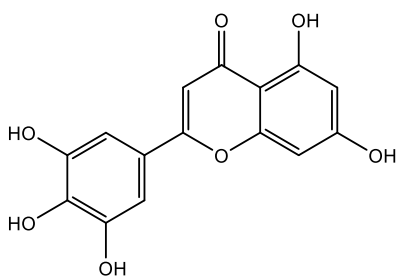
86

De souza *et al.* (2023)

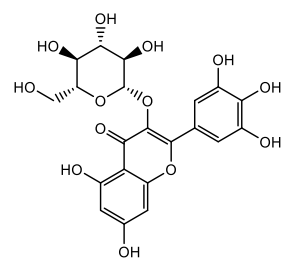
87

De souza *et al.* (2023)

88

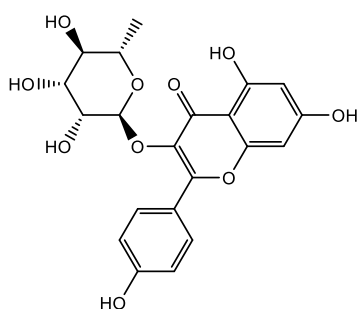
De souza *et al.* (2023)

89

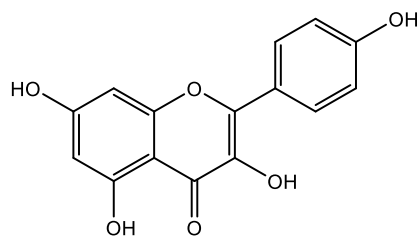
De souza *et al.* (2023)

90

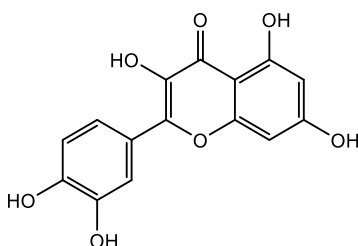
De souza *et al.* (2023)



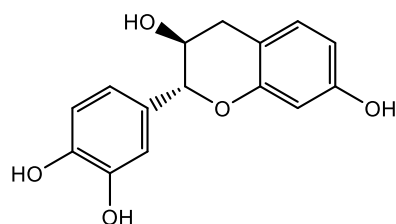
91
De souza *et al.* (2023)



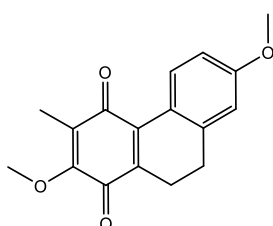
92
De souza *et al.* (2023)



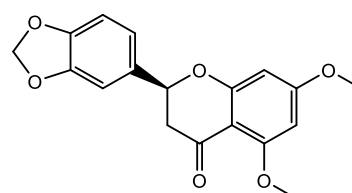
93
De souza *et al.* (2023)



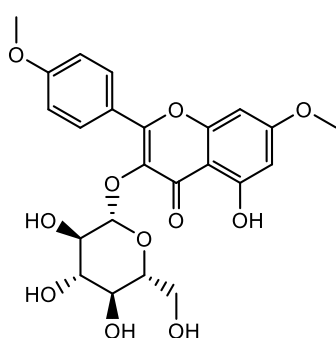
94
Da silva *et al.* (2023)



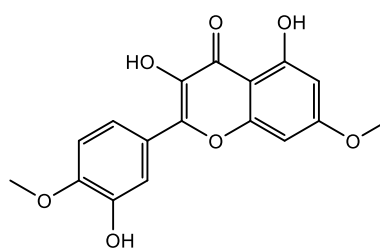
95
Suganya *et al.* (2023)



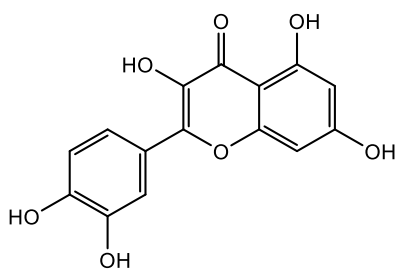
96
Suganya *et al.* (2023)



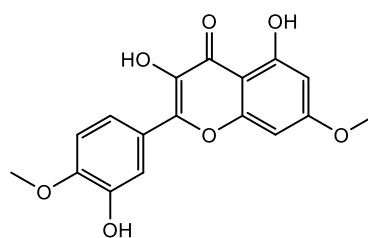
97
Suganya *et al.* (2023)



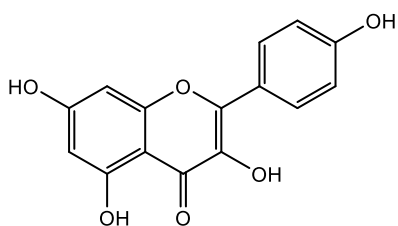
98
Suganya *et al.* (2023)



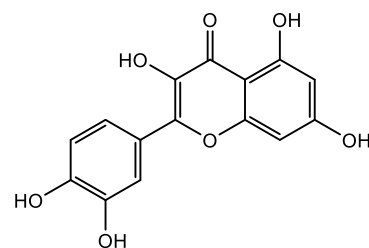
99
Suganya *et al.* (2023)



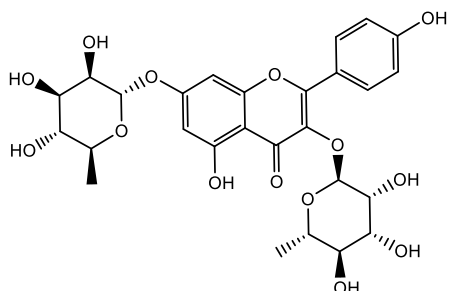
100
Tatipamula *et al.* (2023)



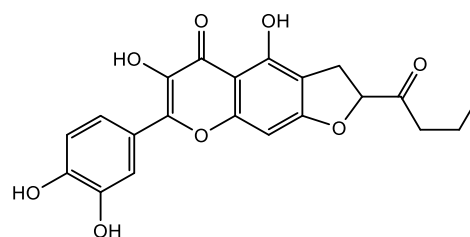
101
Tatipamula *et al.* (2023)



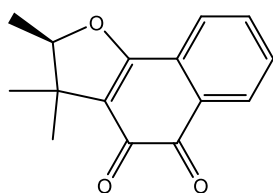
102
Tatipamula *et al.* (2023)



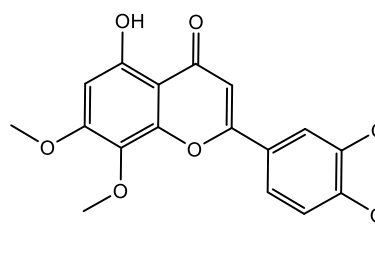
103
Gasparini *et al.* (2023)



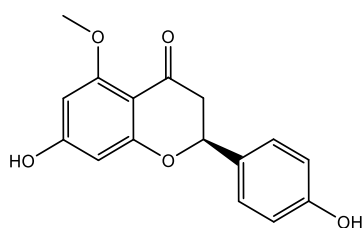
104
Zakaria *et al.* (2023)



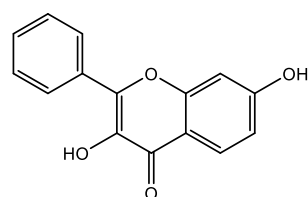
105
Zakaria *et al.* (2023)



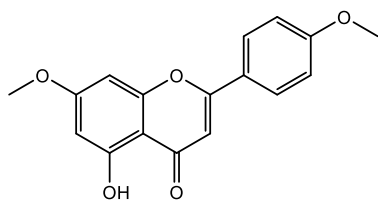
106
Zakaria *et al.* (2023)



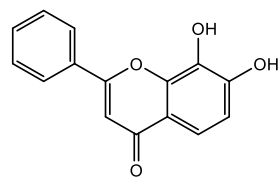
107
Zakaria *et al.* (2023)



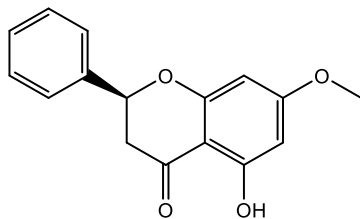
108
Zakaria *et al.* (2023)



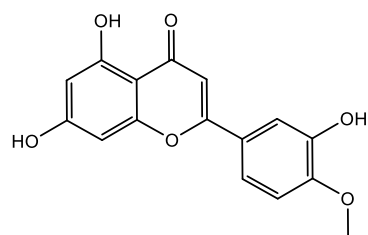
109
Zakaria et al. (2023)



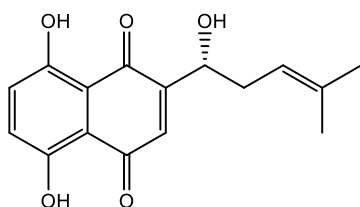
110
Zakaria et al. (2023)



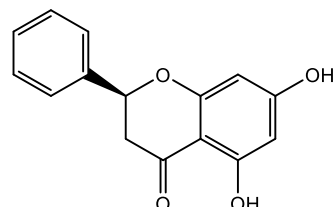
111
Zakaria et al. (2023)



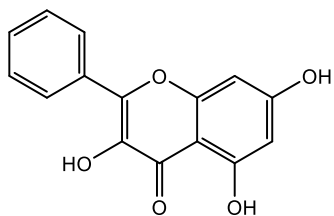
112
Zakaria et al. (2023)



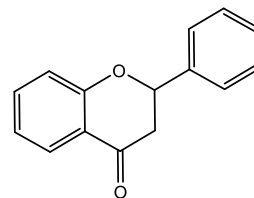
113
Zakaria et al. (2023)



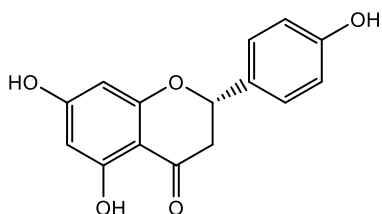
114
Zakaria et al. (2023)



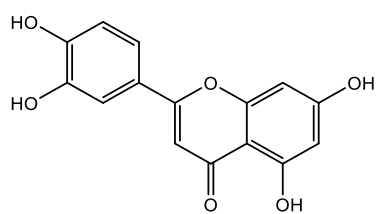
115
Zakaria et al. (2023)



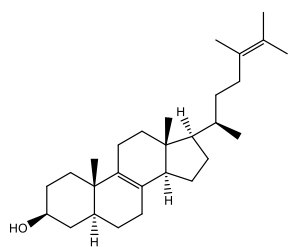
116
Zakaria et al. (2023)



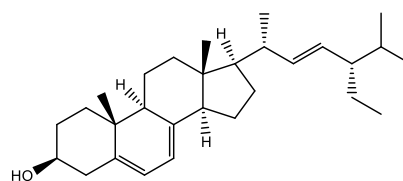
117
Zakaria et al. (2023)



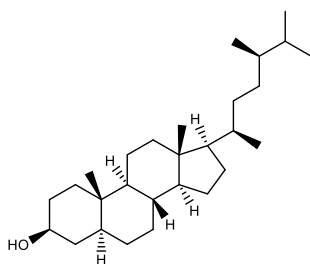
118
Zakaria et al. (2023)



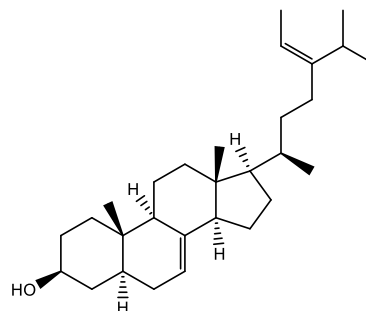
119
Grygier *et al.* (2023)



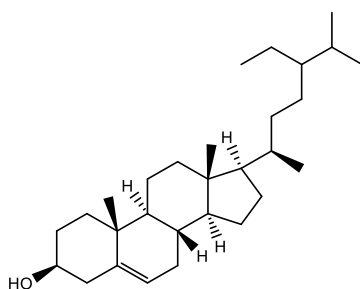
120
Grygier *et al.* (2023)



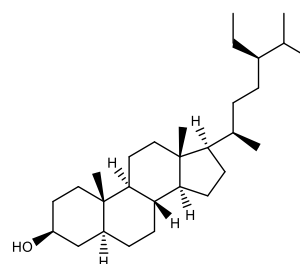
121
Grygier *et al.* (2023)



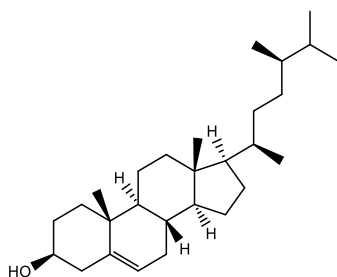
122
Grygier *et al.* (2023)



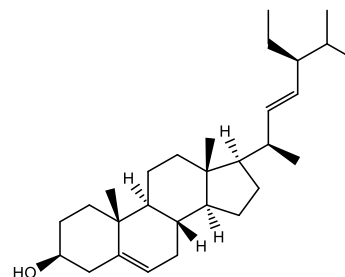
123
Grygier *et al.* (2023)



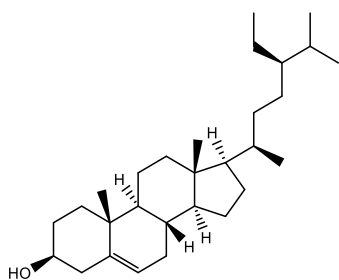
124
Grygier *et al.* (2023)



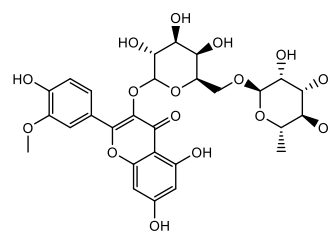
125
Grygier *et al.* (2023)



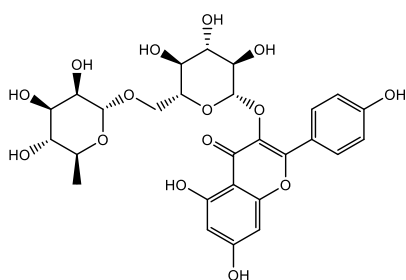
126
Grygier *et al.* (2023)



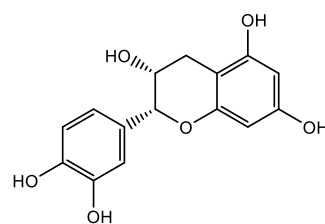
127
Grygier *et al.* (2023)



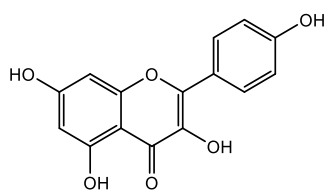
128
De souza *et al.* (2022)



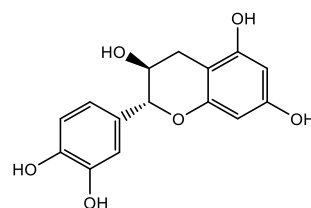
129
De souza *et al.* (2022)



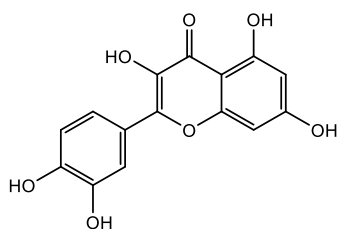
130
Bakshi; Nitika; Nagpal, (2022)



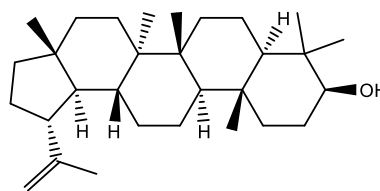
131
Bakshi; Nitika; Nagpal, (2022)



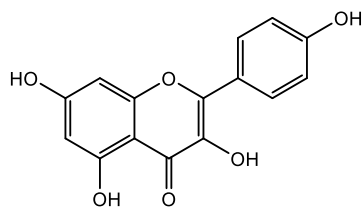
132
Bakshi; Nitika; Nagpal, (2022)



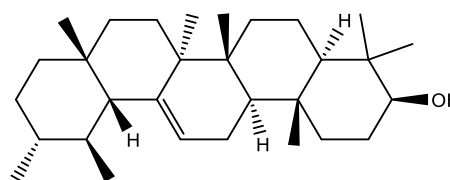
133
Bakshi; Nitika; Nagpal, (2022)



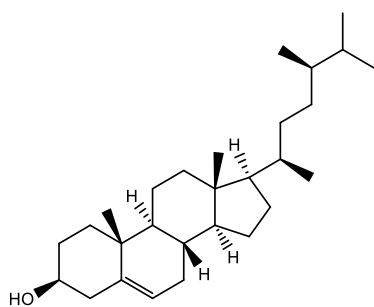
134
Nakkala; Laddha. (2022)



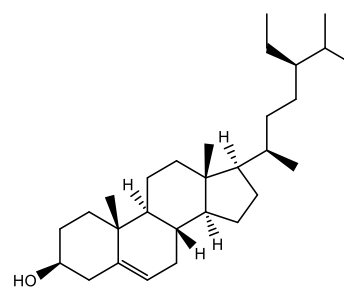
135
Nakkala; Laddha. (2022)



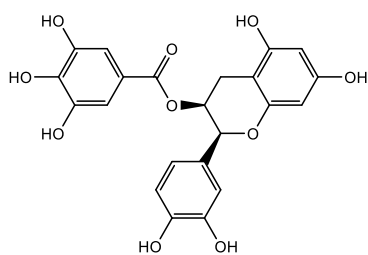
136
Grygier *et al.* (2022)



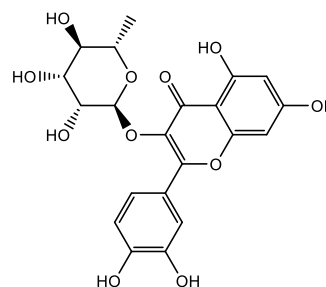
137
Grygier *et al.* (2022)



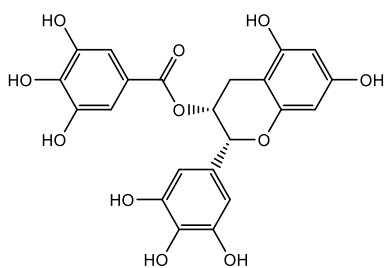
138
Grygier *et al.* (2022)



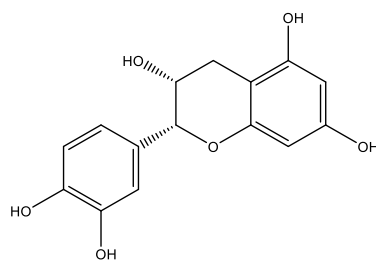
139
Huang *et al.* (2022)



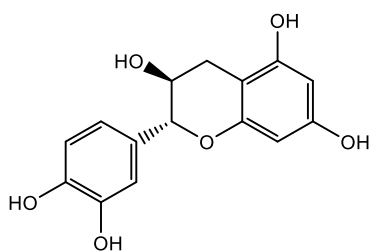
140
Huang *et al.* (2022)



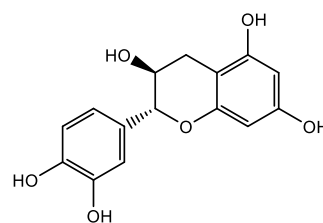
141
Huang *et al.* (2022)



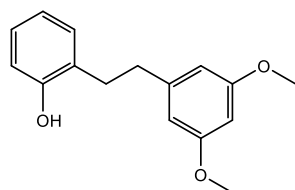
142
Huang *et al.* (2022)



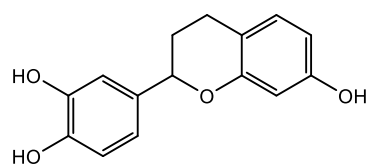
143
Huang *et al.* (2022)



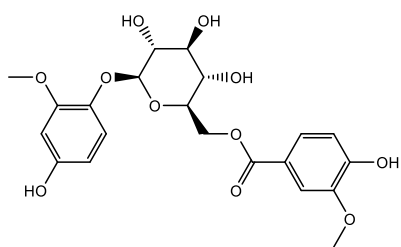
144
Sharma *et al.* (2022a)



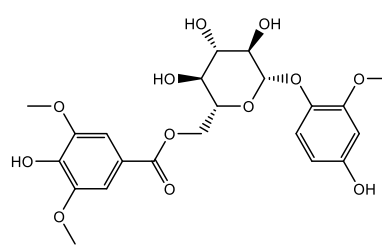
145
Monteiro *et al.* (2022)



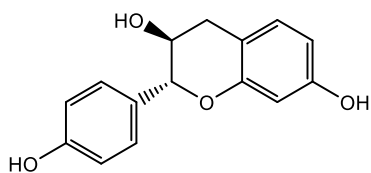
146
Monteiro *et al.* (2022)



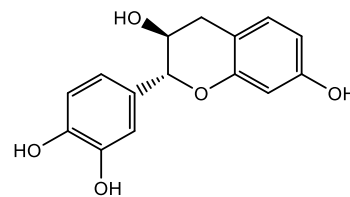
147
Monteiro *et al.* (2022)



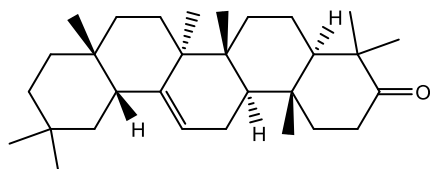
148
Monteiro *et al.* (2022)



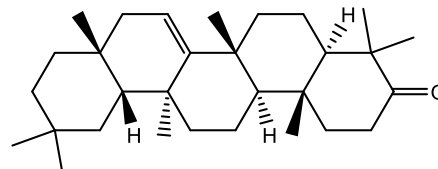
149
Monteiro *et al.* (2022)



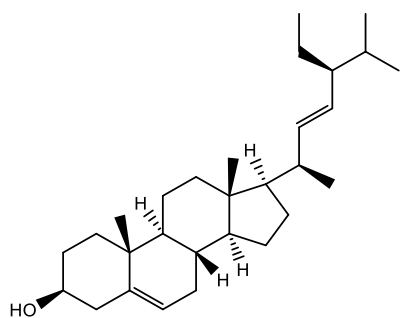
150
Monteiro *et al.* (2022)



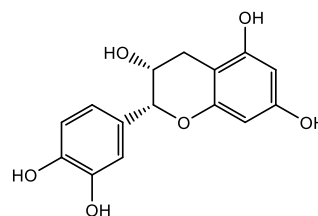
151
Monteiro *et al.* (2022)



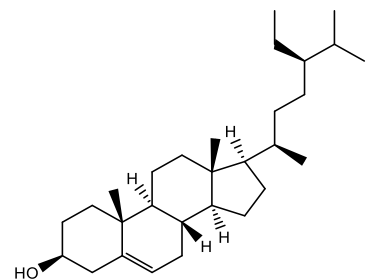
152
Monteiro *et al.* (2022)



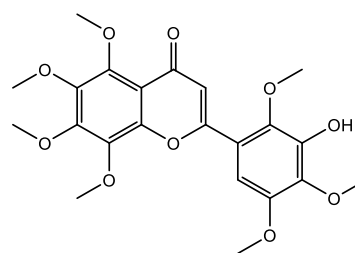
153
Monteiro *et al.* (2022)



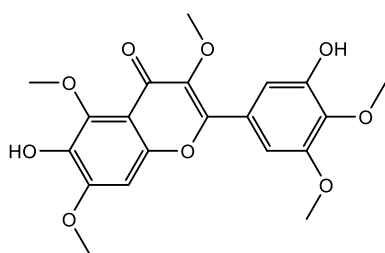
154
Monteiro *et al.* (2022)



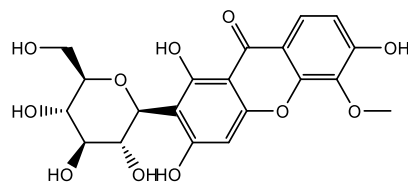
155
Monteiro *et al.* (2022)



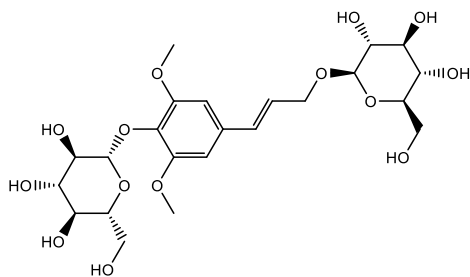
156
Praparatana *et al.* (2022)



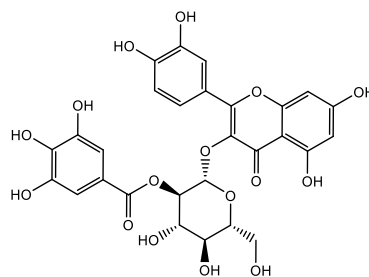
157
Praparatana *et al.* (2022)



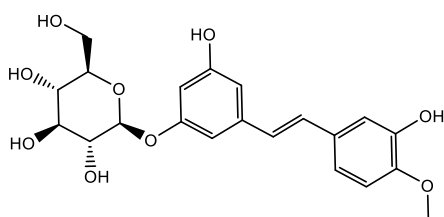
158
Praparatana *et al.* (2022)



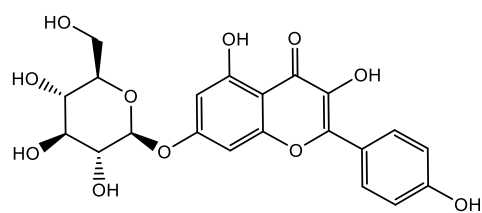
159
Praparatana *et al.* (2022)



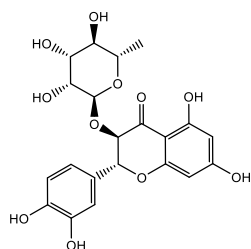
160
Praparatana *et al.* (2022)



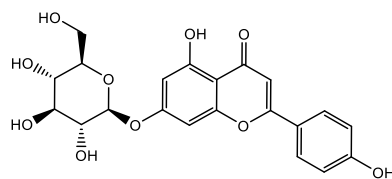
161
Praparatana *et al.* (2022)



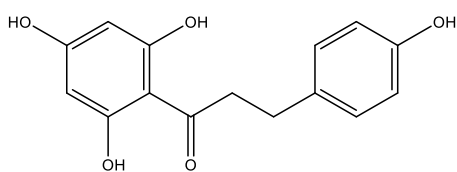
162
Praparatana *et al.* (2022)



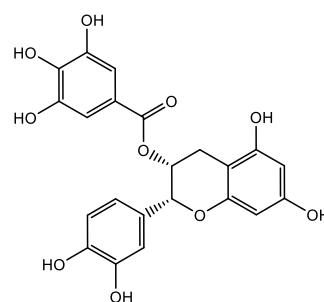
163
Praparatana *et al.* (2022)



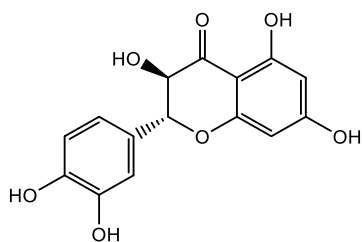
164
Praparatana *et al.* (2022)



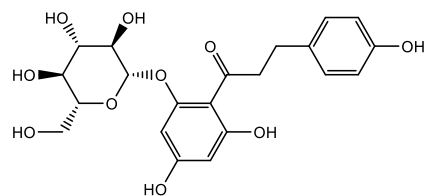
165
Praparatana *et al.* (2022)



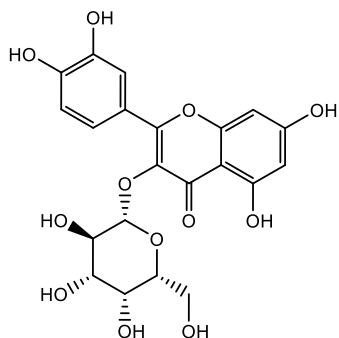
166
Praparatana *et al.* (2022)



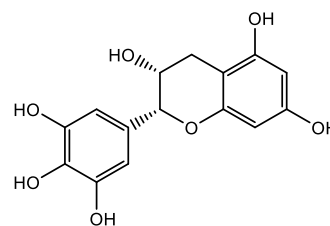
167
Praparatana *et al.* (2022)



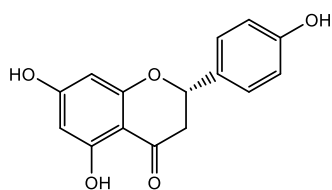
168
Praparatana *et al.* (2022)



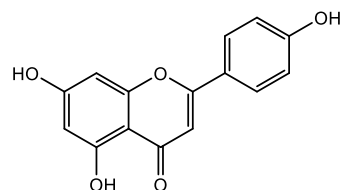
169
Praparatana *et al.* (2022)



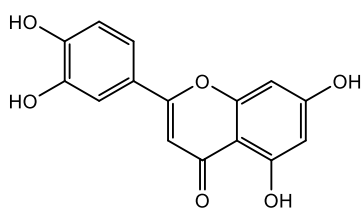
170
Praparatana *et al.* (2022)



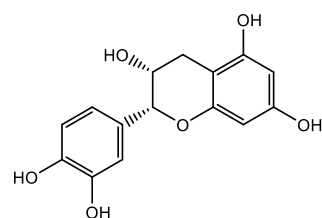
171
Praparatana *et al.* (2022)



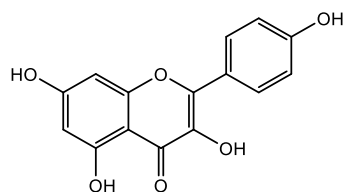
172
Praparatana *et al.* (2022)



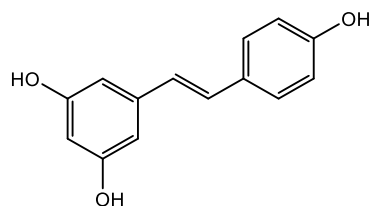
173
Praparatana *et al.* (2022)



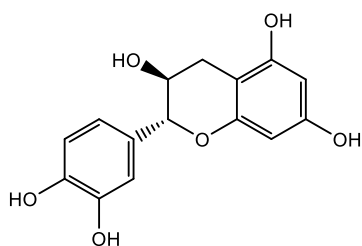
174
Praparatana *et al.* (2022)



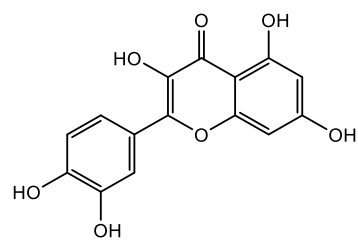
175
Praparatana *et al.* (2022)



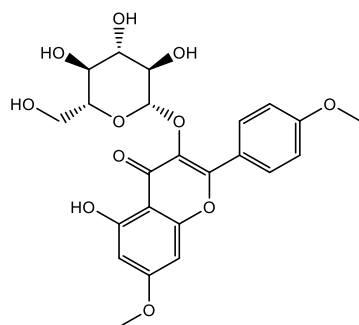
176
Praparatana *et al.* (2022)



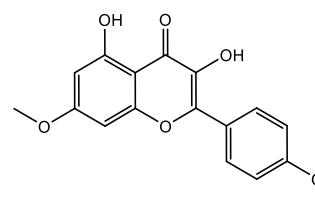
177
Praparatana *et al.* (2022)



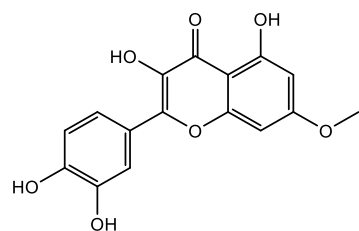
178
Praparatana *et al.* (2022)



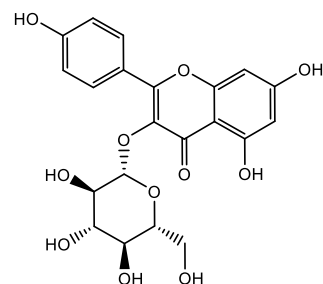
179
Reddy, (2022)



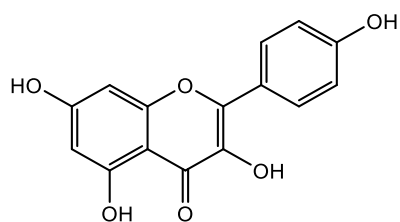
180
Reddy, (2022)



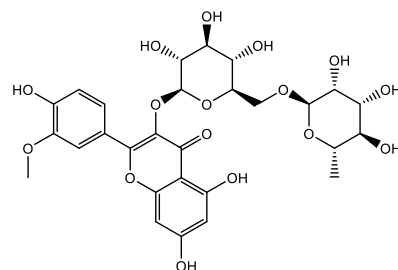
181
Reddy, (2022)



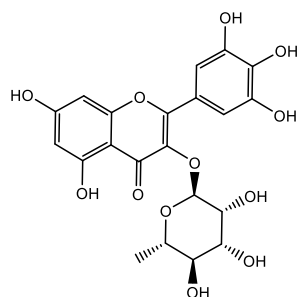
182
Reddy, (2022)



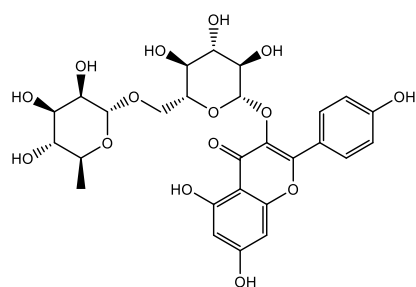
183
Reddy, (2022)



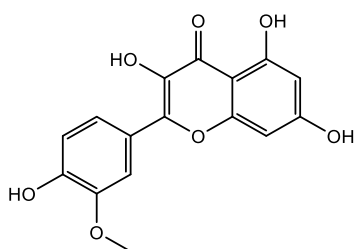
184
Jung *et al.* (2022)



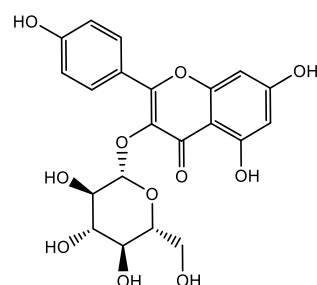
185
Jung et al. (2022)



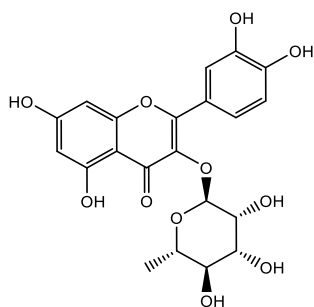
186
Jung et al. (2022)



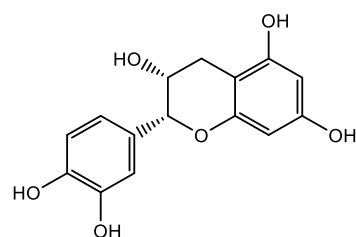
187
Jung et al. (2022)



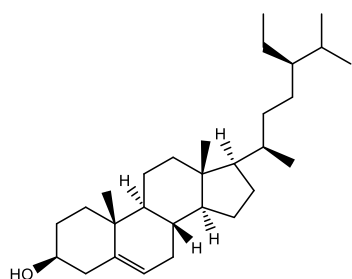
188
Jung et al. (2022)



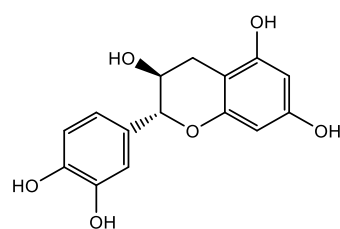
189
Jung et al. (2022)



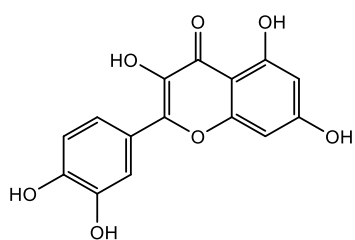
190
Jung et al. (2022)



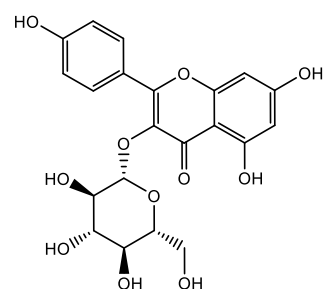
191
Aguiar et al. (2022)



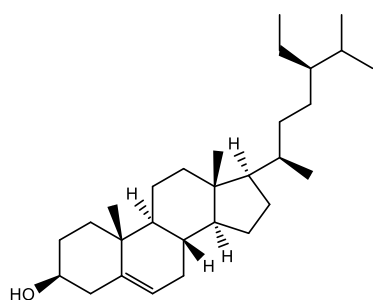
192
Aguiar et al. (2022)



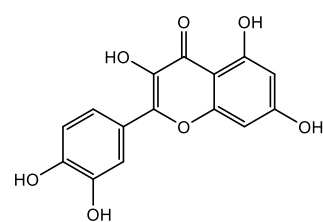
193
Aguar *et al.* (2022)



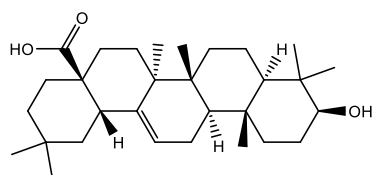
194
Sireeshaa; Neelima e Vinuthaa, (2022)



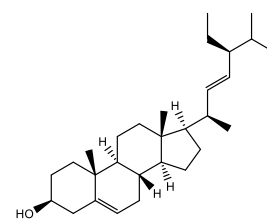
195
Sireeshaa; Neelima e Vinuthaa, (2022)



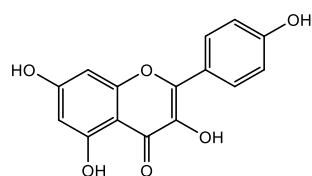
196
Sireeshaa; Neelima e Vinuthaa, (2022)



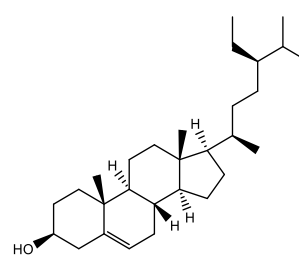
197
Venmathi Maran *et al.* (2022)



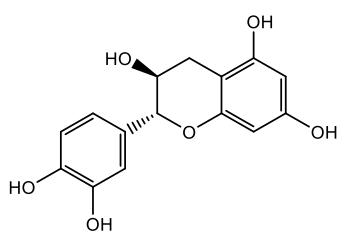
198
Venmathi Maran *et al.* (2022)



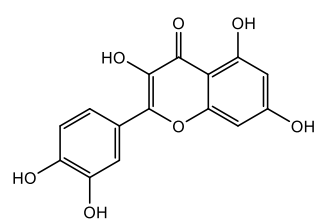
199
Venmathi Maran *et al.* (2022)



200
Venmathi Maran *et al.* (2022)



201
Venmathi Maran *et al.* (2022)



202
Venmathi Maran *et al.* (2022)

3.3 USO POTENCIAL DOS VEGETAIS DO GÊNERO *Bauhinia* E ETNOFARMACOLOGIA

3.3.1 Potenciais uso do gênero *Bauhinia*

3.3.1.1 Desenvolvimento de tecnologias

A utilização do gênero *Bauhinia* não se limita às suas propriedades farmacológicas, podendo ser inserida e utilizada em variadas áreas, tais como no controle de nutrientes do solo com *Bauhinia brachycarpa* Wall., conforme Long *et al.* (2023) relatou. Já Dewangan e Mallick (2022) utilizaram a produção de biodiesel originada de *B. variegata* e avaliou o potencial desse combustível e os compostos gerados a partir da sua combustão.

Outros usos também podem ser verificados nos estudos de Chandraker *et al.* (2022), que trabalhou com nanopartículas de prata fabricados a partir de extrato aquoso das folhas de *B. variegata*, pela capacidade de detecção de diversos metais pesados no material obtido, como é o caso do mercúrio. Bakshi, Sharma e Nagpal (2022), por sua vez, observaram que o extrato metanólico de *B. variegata* possuía diferentes polifenóis, como o ácido gálico; catequina; ácido clorogênico; epicatequina; ácido cumarínico quercetina; e kaempferol. Pessoa (2018) relacionou o potencial antioxidante e antidiabético do referido gênero à presença de polifenóis.

Nakkala e Laddha (2022), nas suas pesquisas, utilizaram *Bauhinia acuminata* L. e padronizaram o método para a detecção de lupeol a partir da fração metanólica das folhas por cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC), sugerindo que tais metabólitos possam servir como marcadores quimiotaxonômicos do gênero. Os autores Sharma *et al.* (2022b) propuseram a utilização das folhas de *Bauhinia racemosa* Lam. como superfície para eletrodeposição de óxido de cobre (CuO), com o propósito de gerar meios de catálise por imersão.

Grygier *et al.* (2022) quiseram observar vegetais da família Fabaceae e o seu potencial para a indústria na aplicação de produtos à base de óleo vegetal e, nesse estudo, foi constatado a presença de ácido graxos de cadeia longa saturados e insaturados, carotenoides e fitoesteroides nas sementes de *B. purpurea*, os quais são classes de substâncias com alto potencial de uso farmacêutico.

3.3.1.2 Etnofarmacologia e potencial farmacológico

O uso das plantas para fins terapêuticos tem sua origem mais remota nas antigas civilizações chinesa e indiana, onde se era utilizado diversas plantas com características medicinais como meio curativo de doenças. Esse tratamento de enfermidades advém do conhecimento etnofarmacológico, que instaura a pedra fundante nos estudos e no desenvolvimento tecnológico que propiciam um avanço e um melhor manejo de atuação na área, a qual é promissora para a descoberta de novos medicamentos (Brasil, 2012).

A atividade terapêutica de preparações de plantas medicinais é atribuída a diversos fitoquímicos (metabólitos secundários), como fenólicos, terpenoides, esteroides ou alcaloides (Ahmed, 2012). No caso específico da planta objeto desta pesquisa, temos que, na medicina popular, as folhas e o caule de *B. pulchella* são usadas na forma de chá para o tratamento de diabetes (Aguiar; Barros, 2012). Tendo em vista, principalmente, que os principais metabólitos ativos de plantas que possuem atividade antidiabética são: polissacarídeos, proteínas, esteroides, terpenoides, alcaloides, flavonoides e óleos (Abdel-Hassan; Abdel-Barry; Mohammeda, 2000; Cechinel-Filho, 2009).

Demais espécies do gênero também apresenta essa propriedade já evidenciada em estudos anteriores, como é o caso das pesquisas de Lino *et al.* (2004), os quais utilizaram extratos etanólicos e hexânicos de *B. forficata*, em um modelo experimental com indução de diabetes em ratos, e constatou que o uso desses extratos foi capaz de diminuir níveis de glicose, colesterol total e triglicérides.

Podemos, todavia, abranger a área de aplicação e/ou atuação do gênero em atividades antimicrobianas, aumentando o potencial medicinal de *Bauhinia*. Tal como foi evidenciado por Da Silva e Cechinel-Filho (2002), que confirmaram atividade antibacteriana das espécies *B. forficata* e *Bauhinia microstachya* (Raddi) J.F.Macbr. ao inativarem cepas de *E. coli* e *S. aureus*. Outros estudos envolvendo *B. forficata* demonstram que a sua atividade também se refere às cepas fúngicas, como *Candida albicans* (Alves *et al.* 2017). Já *Bauhinia splendens* Kunth. foi ativa contra bactérias Gram positiva, como por exemplo, *S. aureus* e *Streptococcus* sp. (Savi *et al.* 1996), enquanto que *B. forficata* demonstrou o potencial antifúngico contra *Microsporum canis* e *Trychophyton mentagrophytes*.

Essa atuação de *Bauhinia* também se estende à ações anti-inflamatórias. Estudos como os de Sosa *et al.* (2002) corroboram para isso, principalmente, ao analisarem que os ácidos triterpênicos presentes nas folhas de *Bauhinia tarapotensis* Benth. foram capazes de produzir tal ação com potência similar à indometacina. Outro estudo que pode ser enquadrado nessa

perspectiva é o de Pinto (2019), que desenvolveu uma transesterificação utilizando ácido palmítico e um flavonoide, o qual foi isolado por Carvalho (2014) e proveniente de *B. pulchella*, o fisetinidol. Nesse estudo foi produzido o palmitato de fisetinidol, o qual teve capacidade de reduzir a perda óssea alveolar, em ensaio pré-clínico, em ratas, através da redução dos marcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-8) e dos níveis da expressão do RNAm de IL-1 β e IL-6. Os trabalhos de Pessoa (2018); Rodrigues *et al.* (2019) e Rodrigues *et al.* (2020) relataram a ação anti-inflamatória e antioxidante das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato etanólico de *B. unguolata*; enquanto que os estudos de Negi *et al.* (2012) e Kanchanasin *et al.* (2020) evidenciaram atividades antimicrobianas em *B. purpurea* e *B. variegata*, respectivamente.

São também relatadas na literatura atividades antitumoral, atividade larvícida contra *Aedes aegypti*, antipirética, antioxidante e antimalárica para espécies deste gênero (Cechinel-Filho, 2009; Sousa *et al.* 2016; Lopes *et al.* 2016; Carvalho *et al.* 2018; Silva, 2018).

3.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

3.4.1 Processo fisiológico da inflamação

Dentro das principais atividades farmacológicas inerentes às plantas do gênero *Bauhinia*, a anti-inflamatória foi uma das estudadas nesta pesquisa. Tendo em vista que a resposta imunológica, desenvolvida por infecções e lesões teciduais, é capaz de gerar um processo inflamatório que, por fim, promove a homeostase do organismo. Nesse sentido, o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, aumento da migração dos leucócitos para a região afetada, liberação de mediadores químicos inflamatórios, desgranulação celular estão envolvidos no mecanismo desse processo (Abbas; Litchman; Pillai, 2015).

Em um primeiro momento, o reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que não estão presentes na célula do organismo hospedeiro, são reconhecidas pelo sistema imune inato via receptores *Toll-Like* (TLRs) dos macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas. Essa ativação induz a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como as (IL-12; TNF- α ; IL-6), que favorecem a ativação de forma exponencial de mais células de defesa, a fim de proporcionar um combate mais efetivo a lesão tecidual ou agentes exógenos existentes (Abbas; Litchman; Pillai, 2015).

Os macrófagos, por sua vez, têm a finalidade de reconhecer os PAMPs e fagocitar os patógenos, como também produzir mediadores químicos inflamatórios e radicais livres; além de poderem ser ativados por duas vias: seja por M1 induzido – pela presença de lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana das bactérias Gram-negativas ou por mediadores químicos como o IFN- γ – ou pela M2 – pela presença de IL-4; IL-13 ou IL-10 do meio circulante (Abbas; Litchman; Pillai, 2015).

A via de ativação M1, induzida por LPS, é ativada pela presença dos receptores *Toll-Like* 4 (TLR-4) e é capaz de induzir a produção de TNF- α ; IL-1 β ; IL-6 e radicais livres de óxido nítrico (NO) (Abbas; Litchman; Pillai, 2015). Nesse sentido, estudos envolvendo a utilização de LPS para promover ensaios *in vitro* estão sendo objeto de estudos de pesquisadores que usam produtos naturais, a fim de procurar desenvolver novos medicamentos (Rodrigues, *et al.* 2019).

Existem alguns medicamentos no mercado, como os glicocorticoides, que agem em receptores nucleares capaz de alterar a transcrição de genes envolvidos na produção no processo inflamatório como a prednisona e a betametasona, as quais possuem analogia estrutural com os esteroides endógenos como o cortisol, favorecendo sua ação no mesmo sítio de ação (Katzung, 2017).

3.4.2 Atividade antimicrobiana e resistência aos antibióticos

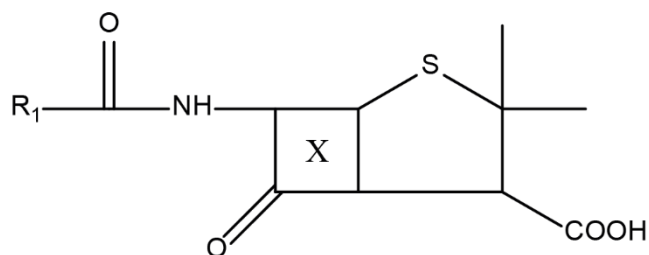
Um dos principais avanços da medicina do século XX foi a descoberta dos antibióticos, uma vez que as mortes por infecções bacterianas eram bastante elevadas (Buchalla; Waldman; Laurenti, 2003). Com o uso indiscriminado, a eficácia terapêutica vem diminuindo devido a mecanismos de defesa que os próprios microrganismos desenvolvem, gerando cepas cada vez mais resistentes e, conseqüentemente, perdendo o arsenal terapêutico (Bell; Pereira; Pita, 2015).

O uso racional de medicamentos e a adoção de uma padronização de utilização conforme a infecção vem sendo uma das formas de controlar o uso indiscriminado desses medicamentos. Por esse motivo que, como vimos anteriormente, o Ministério da Saúde adotou um mecanismo de padronização, a Rename (Brasil, 2022b), que se refere a uma lista que define três tipos de agentes antimicrobianos como o uso entre infecções mais comuns e até as mais graves, levando o nome de *AWaRe* (*Access-Watch-Reserve*), onde

No grupo 1 (“acesso”), estão medicamentos descritos como de primeira ou segunda linha na escolha de tratamentos para infecções comuns, apresentando a característica de serem amplamente acessíveis. No grupo 2 (“alerta”), estão aqueles medicamentos destinados apenas a um grupo específico de pacientes com doenças e síndromes bem definidas, devendo sua utilização ser monitorada continuamente. Já no grupo 3 (“reservado”), estão aqueles antibióticos que devem ser utilizados como último recurso para tratar infecções bacterianas resistentes a múltiplos medicamentos (Brasil, 2022b, p. 24).

Os antibióticos se dividem quanto a sua estrutura molecular, característica molecular e locais de ação. A classe dos β -lactâmicos – que tem como os representantes principais as penicilinas; as cefalosporinas; os carbapenéns e os monobactâmicos – tem em comum a estrutura do anel β -lactâmico conforme ilustrado na figura 7.

Figura 7 – Estrutura base das penicilinas



Penicilina

X - Anel β -lactâmico

Fonte: própria (2024).

Esses antibióticos têm a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, por interferir na transpeptidação da parede celular bacteriana, ou seja, impedindo a ligação dos constituintes N-acetilglicosamina com o ácido N-acilmurâmico, sendo, portanto, responsável pela morte celular por ruptura da parede celular. A resistência contra essa classe de medicamentos se deve a fatores como: inativação molecular pela enzima β -lactamase; penetração reduzida pelo fármaco e seu efluxo (Katzung, 2017).

Os glicopeptídeos, que apresentam como maior exemplar a vancomicina que é produzida a partir de *Streptococcus orientalis* e *Amycolatopsis orientalis*, têm como mecanismo de ação o impedimento da síntese da parede celular bacteriana, por se ligar ao peptideoglicano em crescimento, o que ocasiona o efeito antibacteriano. Os mecanismos de resistência são os mesmos para os β -lactâmicos (Rang *et al.* 2012).

Os aminoglicosídeos e as tetraciclinas inibem a síntese protéica bacteriana por se ligarem à subunidade ribossomal 30S, impedindo a ligação do RNA_t, já os macrolídeos e o cloranfenicol têm a capacidade de impedir a mesma síntese por se ligarem à subunidade ribossomal 50S, impedindo a formação da ligação peptídica entre aminoácidos. Os mecanismos de resistência descritos são: influxo comprometido/efluxo aumentado; proteção ribossomal e inativação enzimática (Katzung, 2017).

Um dos mais recentes antibióticos sintéticos produzidos e que é considerado como medicamento reservado, conforme a classificação *AWaRe* da Rename, é a linezolida, a qual é prescrita para casos onde não existem mais outras alternativas terapêuticas, ou seja, para casos onde a resistência bacteriana atingiu todas as classes existentes (Brasil, 2022b). Linezolida é o único medicamento da classe das Oxazolidinonas capaz de inibir a síntese proteica por se ligar a unidade 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, um sítio exclusivo dessa classe que

resulta em ausência de resistência como ocorre em outras classes de antibióticos (Katzung, 2017).

Devido ao potencial farmacológico e industrial das espécies do gênero *Bauhinia*, as frações obtidas a partir do extrato etanólico do caule foram realizados ensaios para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a Concentração Letal Mínima (CLM) e avaliação moduladora com outros antibióticos.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E CADASTRO NO SISGEN

De acordo com técnicas de herbário padrão (Bridson; Forman, 2010), espécimes arbustivas adultas de *B. pulchella* foram coletados na cidade de São Benedito – Ceará, na rodovia estadual CE-321, km 59, coordenada geográfica 4°4'54''S, 40°50'21''O. A exsicata nº 29.463 foi depositada no Herbário Jaime Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no Campus de Areia, e identificado pelo Professor Dr. Leonardo Pessoa Felix. O cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi realizado tendo como código de cadastro: AF7F878.

4.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA

Para a caracterização anatômica, o material foi fixado em FAA50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) (Johansen, 1940). Secções transversais de caule, pecíolo e lâmina foliar foram obtidas à mão livre, usando lâminas de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte.

Para a lâmina foliar também foram realizadas secções paradérmicas, nas faces adaxial e abaxial. Em seguida, as secções foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio (50%) para descoloração (Kraus; Arduin, 1997).

Após lavagem em água destilada, as secções transversais foram coradas segundo técnica descrita por Bukatsch (1972), com Safranina e azul de Astra; as secções paradérmicas foram coradas com azul de metileno (Krauter, 1985). Posteriormente, todas as secções foram montadas em lâminas semipermanentes, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (Johansen, 1940; Sass, 1951).

Para a análise das lâminas foi utilizado microscópio óptico de luz e de polarização (Leica DM750M), acoplado com câmera digital (Leica ICC50W), através da qual foram obtidas imagens processadas em software (LAS EZ).

4.3 TESTE HISTOQUÍMICOS

Testes histoquímicos foram realizados em secções transversais de lâminas foliares e do caule frescos, obtidas pelo mesmo método usado para a caracterização anatômica. Os seguintes reagentes foram utilizados para indicar a presença dos seguintes metabólitos: dicromato de potássio (10%) para compostos fenólicos (Johansen, 1940); dragendorff para alcaloides (Yoder; Mahlberg, 1976); vanilina clorídrica para taninos (Mace; Howell, 1974); sudan III para compostos lipofílicos (Sass, 1951); tricloreto de antimônio para triterpenos e esteroides (Mace; Bell; Stipanovic, 1974); lugol para amido (Johansen, 1940); floroglucinol para lignina (Johansen, 1940) e ácido clorídrico (10%) para estabelecer a natureza dos cristais (Jensen, 1962).

Controles sem adição de reagentes foram realizados em paralelo aos testes histoquímicos. As lâminas semipermanentes foram preparadas contendo secções transversais (Johansen, 1940; Sass, 1951). A análise foi conduzida em imagens, usando microscópio óptico de luz (Leica DM750M), acoplado com câmera digital (Leica ICC50W) e processadas em software (LAS EZ).

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE (EECBP) DE *Bauhinia pulchella*

O caule após secagem e trituração foi submetido a um processo de extração por maceração, durante 48 horas. Os extratos foram filtrados e diminuídos o volume por destilação sob pressão reduzida, sendo o processo extrativo repetido durante 2 semanas, obtendo-se o extrato etanólico (EECBP).

4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

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

As revelações das substâncias nas cromatoplas analíticas foram realizadas através da exposição das mesmas à irradiação ultravioleta (UV), em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpada modelo VL-4 LC da Vilber Loumart e/ou por imersão em

solução de vanilina ($C_8H_8O_3$) 5g/100 mL de ácido perclórico ($HClO_4$) 0,75 M/100 mL de etanol, seguido de aquecimento em soprador térmico HL-500, da Steinell, à aproximadamente 150 °C, durante alguns segundos.

Foram utilizados solventes de qualidade PA, da Synth[®] ou da Vetec[®], tais como hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, de forma isocrática ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. A remoção dos solventes dos extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório da Büchi Rotavapor *Waterbath* modelo B-480 e R-114, sob pressão reduzida. As frações obtidas de EECBP (FEECBP) foram denominadas em J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5.

4.6 CROMATÓGRAFO GASOSO ACOPLADO A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG/EM)

A identificação dos principais constituintes químicos das frações obtidas do extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (FEECBP) foi realizada em cromatógrafo CG-EM, da Agilent[®], modelo 7890A, e um espectrômetro de massas da Agilent[®] 5975C inert XL MSD, com o detector quadrupolo equipado com um sistema de autoinjeter e coluna capilar de sílica fundida da Rtx[®]-5MS Restek (5%-difenil-95%-dimetil polisiloxano) – com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm, onde o gás de arraste é o hélio num fluxo de 1,2 mL/min. O volume de injeção de 0,5 µL foi utilizado no modo *Splitless*, com uma razão de divisão de 1:2. A temperatura do forno foi programada para manter 150 °C por 0,6 minutos, e ter um aumento progressivo de 5 °C por minuto, até atingir 300 °C, em um tempo de 40,6 minutos de análise.

Os dados de EM foram adquiridos no modo de varredura completa (m/z de 40-550), a uma velocidade de varredura de 0,3 scans por segundo, usando a ionização de elétrons (IE) de 70 eV. A temperatura do injeter e da fonte de íons foi de 250 °C.

Os dados obtidos foram comparados com a biblioteca da National Institute of Standards and Technology – 2017 (NIST, 2017) e dados obtidos por colaboradores que isolaram e elucidaram suas estruturas.

4.7 TESTE *IN VITRO* COM MACRÓFAGOS RAW 264.7

Células RAW 264.7, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brazil), foram utilizadas para avaliar os efeitos anti-inflamatórios *in vitro* FEECBP.

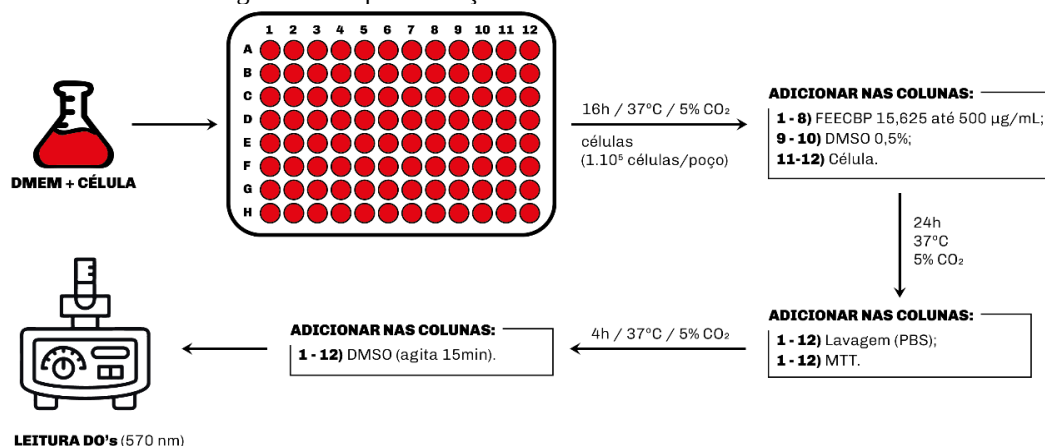
As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular contendo meio Eagle modificado por Dubecco, com glicose, (DMEM) (Gibco®, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (previamente inativado por aquecimento), e gentamicina a 5 µg/mL e mantidas em atmosfera úmida em estufa a 37°C e 5% de CO₂ (Rodrigues, *et al.* 2019).

4.8 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

As células de macrófagos RAW 264.7 foram semeadas em placas com 96 poços incubadas em estufa, a 37 °C e 5% CO₂, por 16 h na concentração de 1×10^5 células/poço. Cada região da placa foi tratada com 06 diferentes concentrações de FEECBP (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL), incubadas por 24 h e o sobrenadante, após o tratamento, foi removido e as células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS.

O meio DMEM, contendo o brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Sigma, EUA) na concentração de 500 µg/mL, foi adicionado em cada poço por um período de 4 h em 37° C e CO₂ a 5%, sendo o sobrenadante descartado e adicionado 100 µL de DMSO (Sigma, EUA) em cada um dos poços. Tal sistema foi submetido a agitação por 15 minutos e a viabilidade celular foi avaliada a partir da formação do sal de formazan, sob análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 570 nm (figura 8) (Rodrigues, *et al.* 2019).

Figura 8 – Esquematização do teste de viabilidade celular

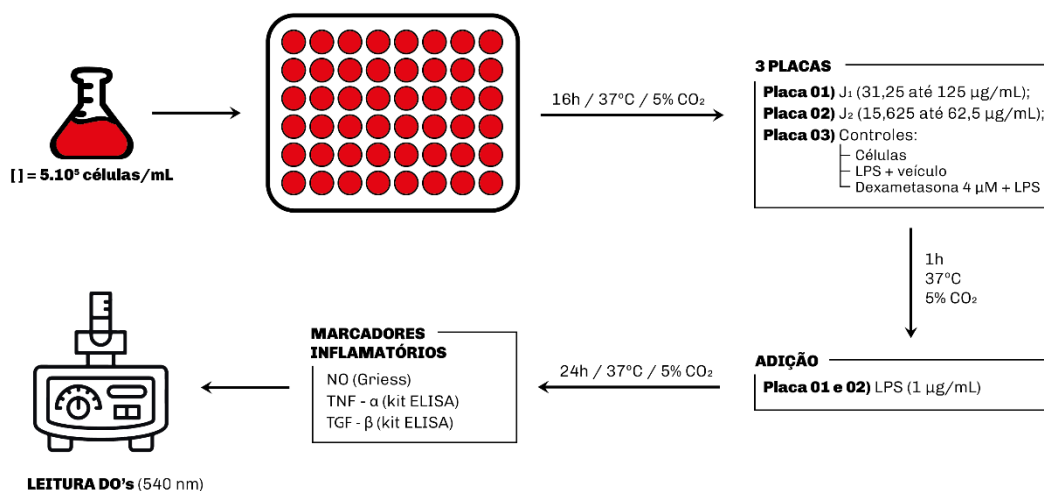


Fonte: própria (2024).

4.9 AVALIAÇÃO DAS FEECBP SOBRE CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS POR LPS

O plaqueamento com as células RAW 264.7 foi feito na concentração de 5×10^5 células/mL, em placas com 48 poços, em um sistema úmido em 37°C sob 5% de CO₂, durante 16 h. Após decorrer a incubação, as células foram pré-tratadas com as frações nas seguintes concentrações: 15,625 até 500 µg/mL, ou com os controles: DMSO 0,5% ou Dexametasona 4 µM durante 1 h, para estimulação por LPS, na concentração de 1 µg/mL por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi coletado para análise dos marcadores inflamatórios (figura 9) (Rodrigues, *et al.* 2019).

Figura 9 – Esquematisação sobre a produção dos mediadores inflamatórios



Fonte: própria (2024).

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO

A partir dos macrófagos trabalhados no item 7.7, sobre o teste de viabilidade celular, a dosagem de nitrito está relacionada à atividade desse tipo celular, que passa por estímulo com LPS e o seu sobrenadante é utilizado na Reação de Griess. Ao utilizar um volume de 100 µL do sobrenadante celular, com 150 µL do reagente de Griess, que é constituído por 1% de ácido sulfanílico em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de naftil-1-N-etilenodiamina, percebeu-se a mudança de coloração para a tonalidade cor-de-rosa, que é indicativo da presença de NO.

O uso de nitrito de sódio (Sigma, USA), em diferentes concentrações, é determinante para a produção da curva padrão e condiciona para a determinação de nitrito no sobrenadante

da cultura, em diferentes concentrações das FEECBP (15,625 até 500 µg/mL). Todo esse processo é realizado antes da estimulação celular com LPS (Rodrigues, *et al.* 2019).

4.11 NÍVEIS DAS CITOCINAS TNF- α E TGF- β

Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante da cultura foi coletada para a quantificação dos níveis de TNF- α e de TGF- β , utilizando o método imunoenzimático em fase sólida (ELISA) do tipo sanduíche, de acordo com as recomendações do fabricante (Novex®, Invitrogen, USA) (Rodrigues, *et al.* 2019).

4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FEECBP

Os ensaios referentes ao estudo da atividade antimicrobiana em questão foram realizados no Laboratório de Controle Microbiológico, da Universidade Federal do Ceará. Todos os ensaios foram realizados em triplicata; e os seguintes grupos foram testados: grupo controle de crescimento (meio de cultura + microrganismo); grupo controle de esterilidade (somente meio de cultura ou diluente); grupo controle de turvação (meio de cultura + frações); grupo teste tratado com as frações (meio de cultura + microrganismo + frações J-1 até J-5) e grupo teste tratado com antimicrobianos de referência de diferentes classes terapêuticas. O diluente utilizado para solubilização das frações foi o Tween 80 0,5%, e para a solubilização das drogas padrão foi utilizado água ou DMSO 1%, conforme solubilidade do fármaco.

Os microrganismos de referência testados foram: *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida krusei* ATCC 6258; *Candida parapsilosis* ATCC 22019; *Escherichia coli* ATCC 10536; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10226. Para testes com bactérias e leveduras foram utilizados os meios de cultura caldo BHI e caldo Sabouraud, e a temperatura de incubação de 37°C e 35°C, respectivamente.

Para padronização dos microrganismos, as cepas em estoque foram repicadas nos seus respectivos meios de cultura e incubadas *overnight*. Após esse período, alíquotas das culturas foram transferidas para salina 0,85% estéril até obter turvação equivalente a escala 0,5 de MacFarland, que corresponde a cerca de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL e $1,0 \times 10^6$ UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente. As suspensões microbianas foram diluídas para obter cerca de 10^6 UFC/mL e 10^4 UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente (CLSI, 2024; CLSI, 2017). Essa suspensão microbiana final foi utilizada para realização dos testes.

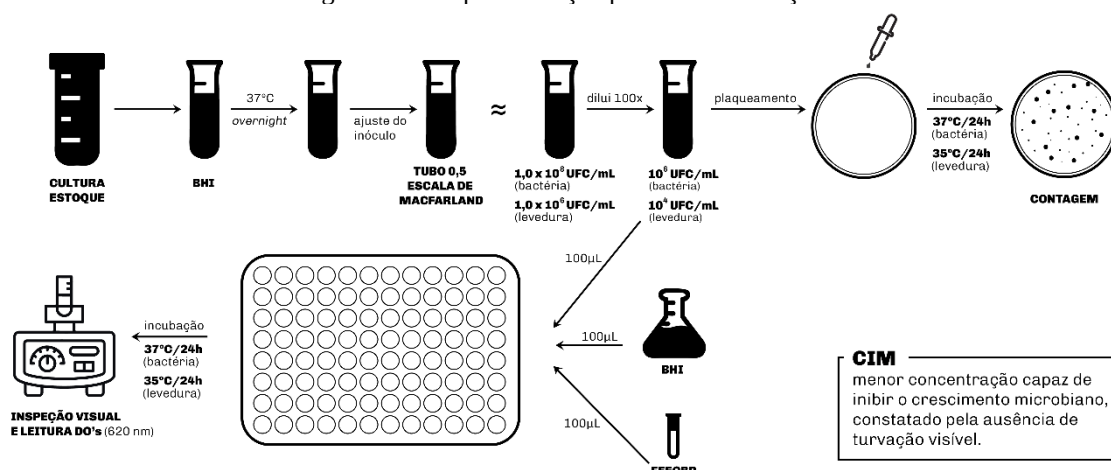
4.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM consiste na menor concentração da substância capaz de impedir o crescimento microbiano (CLSI, 2024), para isso, utilizam-se diluições seriadas dos constituintes a serem analisados em um microambiente com cepas pré-selecionadas, utilizando o método de microdiluição em caldo de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) em microplacas de 96 poços, conforme as Normas M7, Vol. 44, N° 10 para bactérias (CLSI, 2024) e a M27, Vol. 37, N° 13 para leveduras (CLSI, 2017).

Cada cepa foi ativada sob incubação a 37° C para bactérias e 35°C para leveduras por 18h, em caldo BHI. Após esse período, ocorre a necessidade de padronização da densidade celular em solução salina 0,85% estéril, de modo que seja compatível com a escala de MacFarland 0,5 (em torno de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e $1,0 \times 10^6$ UFC/mL para leveduras). Tal suspensão foi diluída em caldo BHI ou Sabouraud até atingir a concentração em torno de 10^6 UFC/mL e 10^4 UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente. Essa suspensão microbiana final foi utilizada para realização dos testes.

No primeiro poço das microplacas foram adicionados 100 µL de caldo BHI e 100 µL das FEECBP na concentração inicial de 5mg/mL. Foi realizada diluição seriada até a concentração de até 0,0039 mg/mL. Após isso, foi adicionado 100 µL da suspensão microbiana padronizada (10^6 UFC/mL e 10^4 UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente) em todos os poços. As microplacas foram incubadas em estufa *overnight*, na temperatura de 37°C para bactérias e 35°C para leveduras. Após tal incubação, foi realizada inspeção visual do crescimento microbiano para a determinação da CIM, além de leitura das determinações ópticas (DO's), com o auxílio do leitor de placas (Asys UVM 340, Biochrom, USA) no comprimento de onda de 620 nm (figura 10).

Figura 10 – Esquematisação para a determinação da CIM



Fonte: própria (2024).

Foram utilizados métodos de controle para a observação de possíveis interferentes na leitura, sendo esses: meio de cultura com as frações (controle de turvação); meio de cultura e suspensão microbiana (controle de crescimento) e o controle contendo apenas meio de cultura.

A contagem de colônias em placas em *Ágar Plate-Count* (Romeiro, 2007) serviu para a determinação da população microbiana presente no inóculo inicial e utilizada para a determinação Concentração Letal Mínima (CLM) (Baron; Peterson; Finegold, 1994).

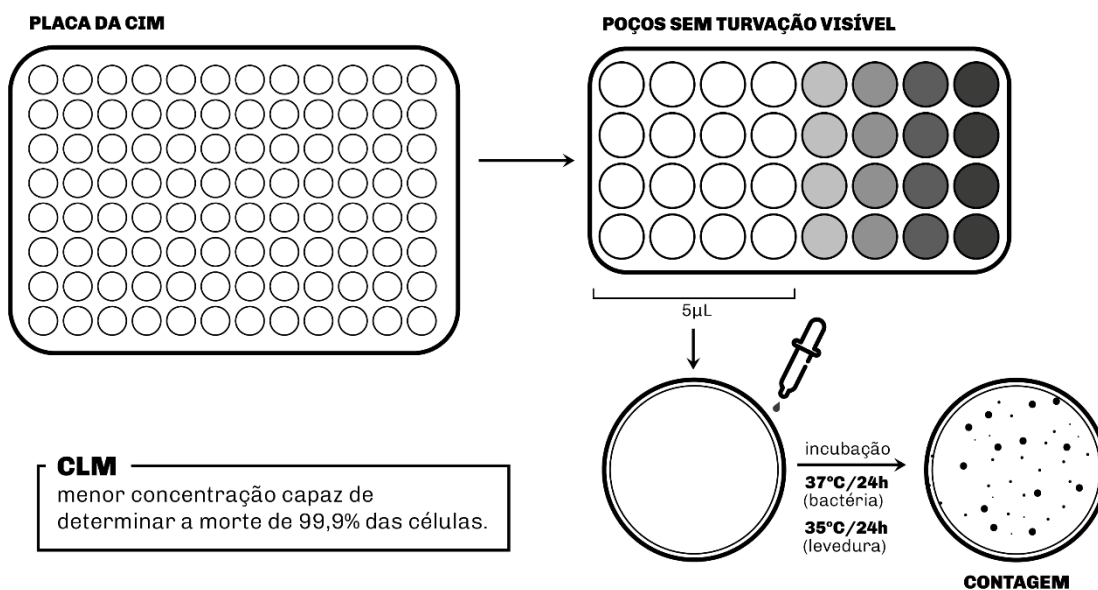
Foi considerada a CIM que, na menor concentração das FEECBP analisadas, tiveram a capacidade de impedir o crescimento microbiano avaliado através da inexistência de turvação visível nos poços.

4.14 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÍNIMA (CLM)

O teste da CLM, que tem por finalidade determinar qual a menor concentração possível das FEECBP, é capaz de matar as cepas testadas e foi determinada conforme recomendado por Baron, Peterson e Finegold (1994). Para isso, nos poços onde não apresentaram crescimento visível das microplacas do teste de CIM, foram retiradas alíquotas de 5 µL e adicionadas em placas contendo *água Plate-Count*, pela técnica da microgota (Romeiro, 2007).

Em seguida, o material foi submetido a aquecimento em estufa a 37°C para bactérias e 35°C para leveduras *overnight*, para, posteriormente, realizar a contagem de crescimento microbiano nas placas. A concentração de cada fração capaz de reduzir o crescimento microbiano em até 99,9% foi considerada a CLM em comparação ao inóculo inicial (Baron; Peterson; Finegold, 1994), conforme podemos verificar na figura 11.

Figura 11 – Esquematização para determinação da CLM



Fonte: própria (2024).

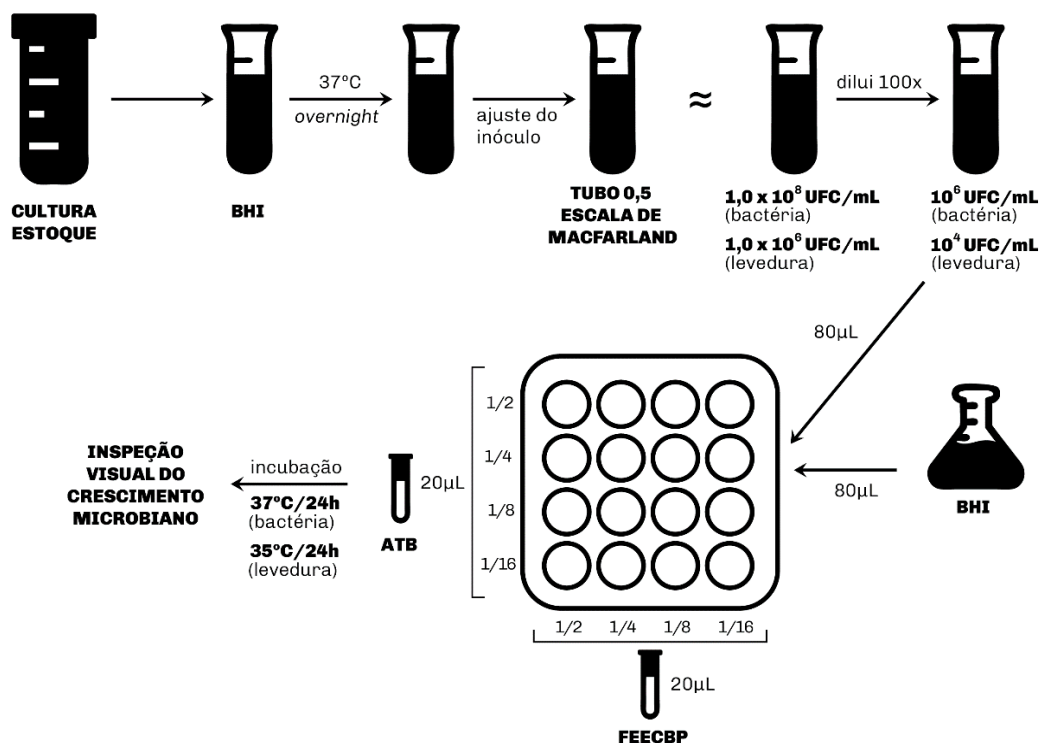
4.15 ATIVIDADE MODULADORA DAS FRAÇÕES SOBRE ANTIBIÓTICOS DE USO CLÍNICO

4.15.1 Método *checkerboard*

O teste *checkerboard* é capaz de determinar se as frações obtidas, a partir do fracionamento cromatográfico de EECBP (FEECBP), podem modular as ações de diferentes antimicrobianos (ATB) existentes no mercado farmacêutico, com a proposta de possíveis ações sinérgicas ou aditivas, configurando-se na justificativa do uso desse método (Cleeland; Squires, 1991).

Foram adicionados aos poços das microplacas 80 µL da suspensão microbiana, conforme descrito no item 7.13 (Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM), 80 µL de caldo BHI, 20 µL das FEECBP e 20 µL dos antibióticos.

Também foram realizadas diluições seriadas tanto dos antibióticos como das FEECBP, nas seguintes proporções: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16. A avaliação da turvação decorrente do crescimento microbiano ocorreu após a incubação das microplacas *overnight*, a 37°C para bactérias e 35°C para leveduras por inspeção visual do crescimento microbiano (figura 12).

Figura 12 – Esquematização do método *checkerboard*

Fonte: própria (2024).

A avaliação do efeito modulador é através do cálculo dos Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), descritos pelos autores Shin e Lin (2004):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{(\text{FEECBP})} + \text{CIF}_{(\text{ATB})} = [\text{FEECBP}]/\text{CIM}_{(\text{FEECBP})} + [\text{ATB}]/\text{CIM}_{(\text{ATB})}$$

Onde, [FEECBP] e [ATB] são as menores concentrações das FEECBP e do ATB, respectivamente, na associação, com atividade antimicrobiana. Já $\text{CIM}_{(\text{FEECBP})}$ e $\text{CIM}_{(\text{ATB})}$ são as concentrações inibitórias mínimas e isoladas de FEECBP e do ATB, respectivamente. Por fim, temos $\text{CIF}_{(\text{FEECBP})}$ e $\text{CIF}_{(\text{ATB})}$, que são as Concentrações Inibitórias Fracionadas de FEECBP e ATB, respectivamente.

O Índice de CIF (ICIF) foi ação sinérgica para valores $\leq 0,5$ e, para ação aditiva ou indiferente os valores de $> 0,5$ e $< 1,0$. Por fim, os valores $\geq 1,0$ são antagonistas (Eucast, 2003).

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata, com a determinação dos resultados através da Média $\pm$ Erro Padrão da Média. Todos os grupos controles foram comparados pela análise de variância (ANOVA), em seguida, foi realizado o pós-teste de Tukey. O programa estatístico utilizado para a projeção dos gráficos e resultados foi o *GraphPad Prism 6*.

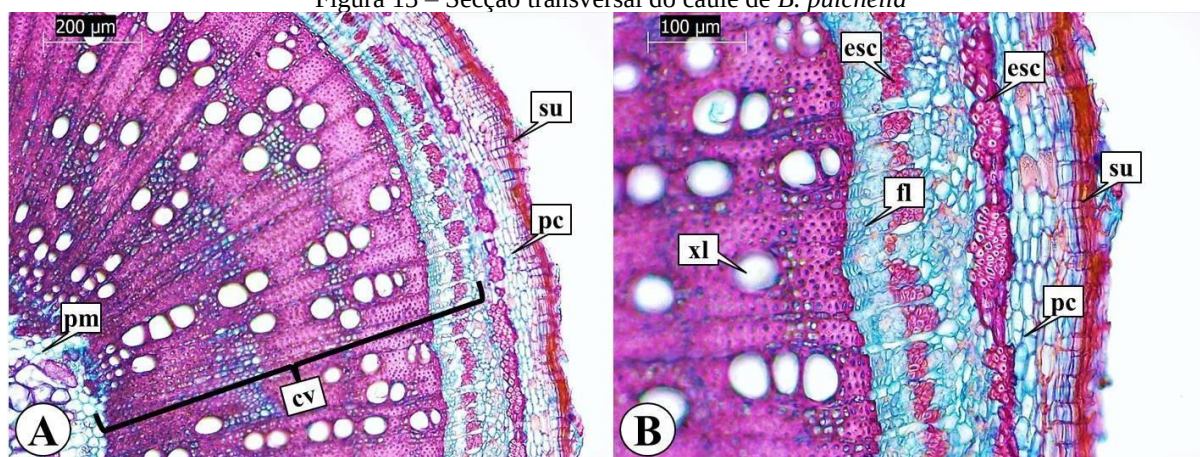
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE *Bauhinia pulchella* Benth.

5.1.1 Caracterização anatômica

A partir do seccionamento transversal do caule de *B. pulchella*, em crescimento secundário, observou-se contorno cilíndrico, apresentando súber composto de 7-8 camadas de células achatadas, em formato oblongo, as quais são seguidas por 5-6 camadas de parênquima cortical (figuras 13A e 13B). O esclerênquima foi observado em distribuição de forma descontínua no caule, especificamente, ao redor do cilindro vascular (figura 13B), o qual é colateral fechado (figuras 13A e 13B). Na região central observou-se parênquima medular (figura 13A).

Figura 13 – Secção transversal do caule de *B. pulchella*



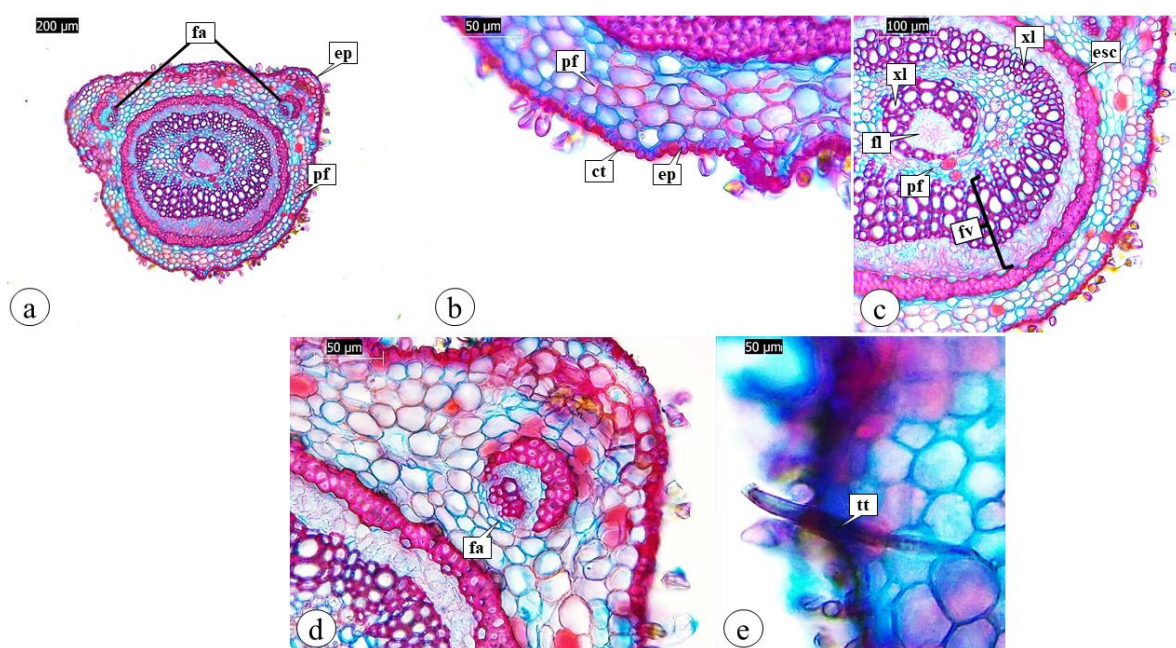
A: caule em crescimento secundário; B: detalhes do esclerênquima, floema, parênquima cortical, súber e xilema.
cv: cilindro vascular; esc: esclerênquima; fl: floema; pc: parênquima cortical; pm: parênquima medular; su: súber; xl: xilema.

Fonte: própria (2022).

Duarte e Debur (2003) descreveram o caule de *B. microstachya* com formato achatado, ligeiramente alargado na porção central, com periderme com células tabulares constituindo o súber. Adjacente a ele, foi descrito células parenquimáticas e uma bainha esclerenquimática envolvendo o sistema vascular. Na região central foi observado a medula formando quatro pólos, que se assemelhavam a uma cruz com células parenquimáticas, de paredes espessas, onde foram observados idioblastos contendo cristais frequentemente prismáticos e, raramente, assumem a forma de drusas. Em *B. pulchella* não foram observados cristais.

Já no que se refere ao seccionamento transversal do pecíolo, observou-se o contorno do plano convexo do pecíolo com suas proeminências na região adaxial (figura 14A). A epiderme é unisseriada (figuras 14A e 14B), recoberta por cutícula espessa (figura 14B). Adjacente à epiderme, percebeu-se o parênquima fundamental composto por 5-6 camadas de células (figura 14A e 14B). Verificou-se também que o tecido esclerenquimático circundando todo o feixe vascular (figura 14C). Foi visualizado um grande feixe vascular concêntrico anficrival, circundando um pequeno feixe concêntrico anfivasal (figura 14C) e sendo flanqueados adaxialmente, por dois feixes acessórios colaterais (figura 14A e 14D). Notou-se tricomas tectores em toda epiderme do pecíolo (figura 14E).

Figura 14 – Secção transversal do pecíolo de *B. pulchella*



A: aspecto geral do pecíolo; B: detalhes da epiderme, cutícula e parênquima fundamental; C: detalhe do feixe vascular e esclerênquima; D: detalhe do feixe vascular acessório; E: detalhe do tricoma tector. ct: cutícula; ep: epiderme; esc: esclerênquima; fa: feixe acessório; fl: floema; fv: feixe vascular; pf: parênquima fundamental; tt: tricoma tector; xl: xilema.

Fonte: própria (2022).

Duarte e Debur (2003) descreveram o pecíolo de *B. microstachya* com contorno semicircular e levemente achatado na face adaxial, apresentando epiderme uniestratificada. Em seguida, descreveram 4-6 camadas de parênquima fundamental e, na região central, observaram feixe vascular do tipo anficrival, com bainha esclerenquimática envolvendo todo o sistema vascular. Os autores não descreveram para *B. microstachya* feixes acessórios, característica que difere do presente estudo.

Ferreira *et al.* (2003), analisando os caracteres de *Bauhinia blakeana* Dunn., descreveram o pecíolo com contorno plano-convexo com duas saliências, epiderme uniestratificada revestida por uma cutícula estriada, seguida por 3-4 camadas de colênquima, com cristais dos tipos prisma e drusa. O parênquima fundamental está formado por 6-7 camadas de células e o tecido esclerenquimático descontínuo envolve a região vascular. Os autores ainda descrevem para *B. blakeana* 8-10 feixes vasculares, desses 1 a 2 colaterais em cada saliência e os demais bicolaterais, situados na região central.

Além disso, foram observados tricomas tectores uni e pluricelulares, notando-se ainda raros tricomas glandulares. Lusa e Bona (2009) descreveram, para *B. forficata*, pecíolo com forma elíptica que apresentam duas projeções laterais. Na face adaxial, a epiderme unisseriada é recoberta por cutícula fina. Internamente à epiderme, ocorre uma faixa descontínua de colênquima, seguida de parênquima cortical e uma extensa bainha de fibras, que envolve o cilindro vascular com feixe vascular colateral.

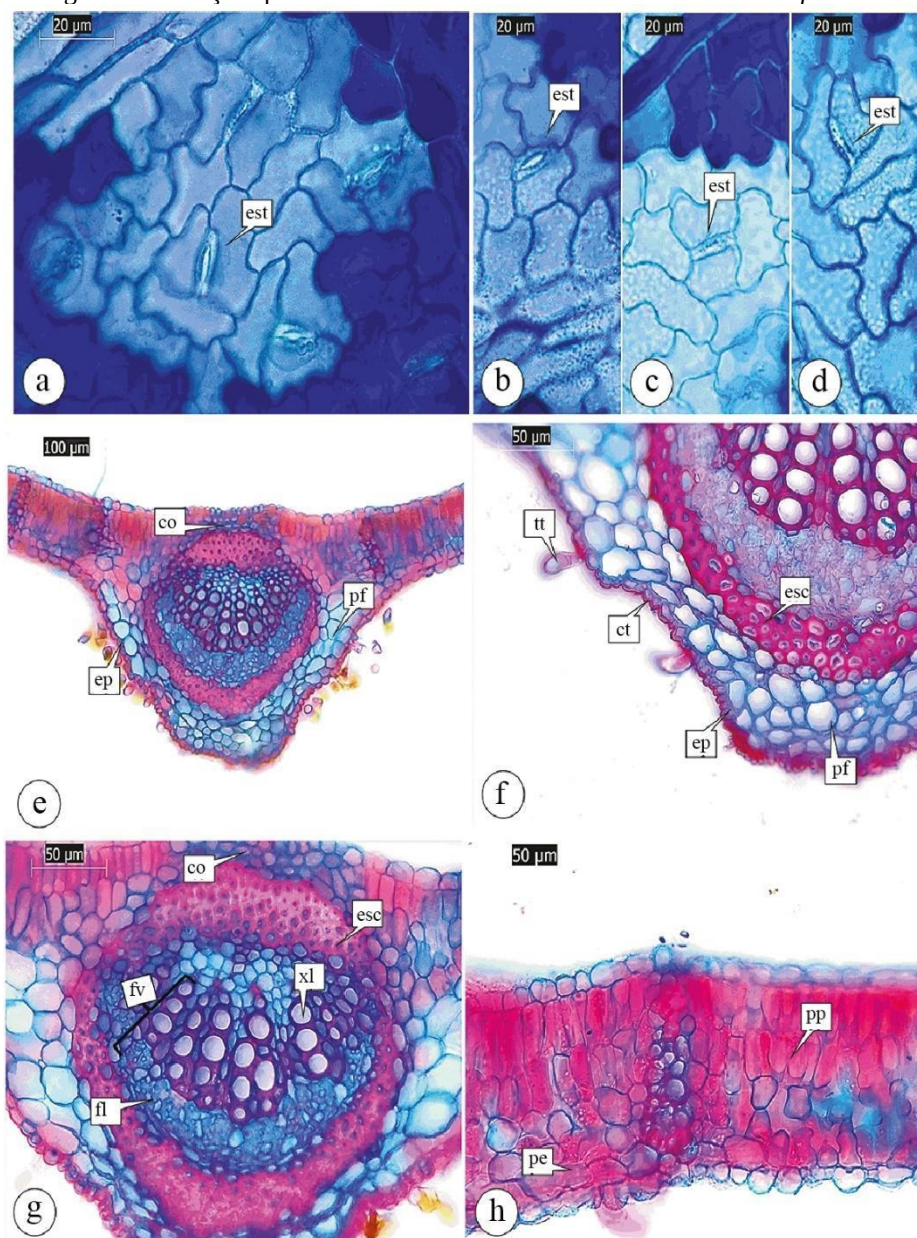
Elbanna *et al.* (2016) descreveram, para *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott., pecíolo com contorno circular, epiderme recoberta por cutícula lisa, seguida por 7-9 camadas de colênquima, feixe vascular colateral aberto e observaram a presença de tricomas não glandulares e cristais do tipo prisma detectados em todas as camadas do pecíolo e na medula pode ter aglomerados.

Nas secções paradérmicas, a lâmina foliar de *B. pulchella* apresentou células epidérmicas com paredes levemente sinuosas, tanto na face adaxial (figura 15A) quanto na face abaxial (figuras 15B, 15C e 15D). A lâmina foliar foi classificada como anfiestomática, com estômatos anisocíticos e tetracíticos na face adaxial (figura 15A), e estômatos anisocíticos, tetracítico e anomocítico na face abaxial (figuras 15B, 15C e 15D).

A nervura central exibiu um contorno plano-convexo (figura 15E). A epiderme é unisseriada (figuras 15E e 15F) e recoberta por cutícula fina (figura 15F). A nervura central é composta por 1-2 camadas de colênquima na face adaxial (figuras 15E e 15G) e o parênquima fundamental preenche toda a nervura (figuras 15E e 15F). O feixe vascular é do tipo colateral (figura 15G). Contornando todo o feixe vascular, observou-se tecidos esclerenquimáticos (figura 15F e 15G). Tricomas tectores encontraram-se distribuídos na lâmina foliar com predominância na nervura central (figura 15F).

O mesofilo é dorsiventral, composto por 2-3 camadas de parênquima paliádico e 1-3 camadas de parênquima esponjoso (figura 15H).

Figura 15 – Secções paradérmicas e transversais da lâmina foliar de *B. pulchella*



A: face adaxial; B-D: face abaxial. E-H: aspecto geral e detalhes da lâmina foliar; F: aspecto geral do mesófilo; H: detalhes do mesófilo. co: colênquima; ct: cutícula; ep: epiderme; esc: esclerênquima; est: estômato; fl: floema; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; pf: parênquima fundamental; pp: parênquima paliçádico; tt: tricoma tector; xl: xilema.

Fonte: própria (2022).

Pereira *et al.* (2018) descreveram os caracteres anatômicos de *B. cheilantha*, de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Steud. e de *B. unguolata*; e observaram que, nas espécies *B. cheilantha*, *B. pentandra* e *B. unguolata*, as paredes epidérmicas são retas a levemente curvadas na face adaxial, já na face abaxial de *B. cheilantha* e *B. pentandra* as paredes são sinuosas, e em *B. unguolata* as paredes são curvas e um tanto papilosas. Além disso, os autores descreveram as espécies de *Bauhinia* com folhas anfiestomáticas com estômatos anomocíticos e anisocíticos,

em ambas as superfícies. Estômatos do tipo paracítico também foram observados nas superfícies de *B. pentandra* e *B. unguolata*.

Antunes, Pereira e Leitão (2021) descreveram, para a espécie *Bauhinia monandra* Kurz., paredes celulares sinuosas a retas na face adaxial e retas na abaxial, classificando a lâmina foliar como anfiestomática, com estômatos paracíticos e anomocíticos na face abaxial, já na face adaxial, os estômatos são escassos. Lusa e Bona (2009) observaram, em *B. forficata*, face adaxial com paredes ligeiramente curvas e face abaxial com paredes anticlinais mais retas e foram observados estômatos anomocíticos em ambas as faces.

Duarte e Debur (2003) descreveram, para lâmina foliar de *B. microstachya*, contorno biconvexo com proeminência na face abaxial. A epiderme é unisseriada com colênquima se interrompendo, sendo substituída pelo parênquima fundamental, onde se encontra mergulhado um feixe vascular colateral envolto por bainha esclerenquimática.

As espécies *B. cheilantha*, *B. pentandra* e *B. unguolata* apresentaram epiderme unisseriada e papilosa, com cutícula espessa em *B. cheilantha* e *B. unguolata*, mas cutícula fina em *B. pentandra*. A nervura central das espécies é plano-convexa, com feixes vasculares colaterais delimitados por duas fitas de esclerênquima, com bainha cristalífera e córtex colenquimatoso com idioblastos drusíferos esparsos. A porção mediana da nervura central de *B. cheilantha* tem um feixe vascular central em forma de arco, em forma de “V” em *B. pentandra* e em forma de “U” em *B. unguolata* (Pereira *et al.* 2018).

Antunes, Pereira e Leitão (2021), descreveram para *B. monandra* epiderme unisseriada, adjacente à epiderme abaxial foi observada duas camadas de colênquima, 5-6 feixes vasculares colaterais, interconectados por uma faixa de parênquima e circundados por uma espessa capa adjacente ao floema, a qual é constituída por fibras septadas, além de descreverem para a espécie cristais do tipo drusa no parênquima.

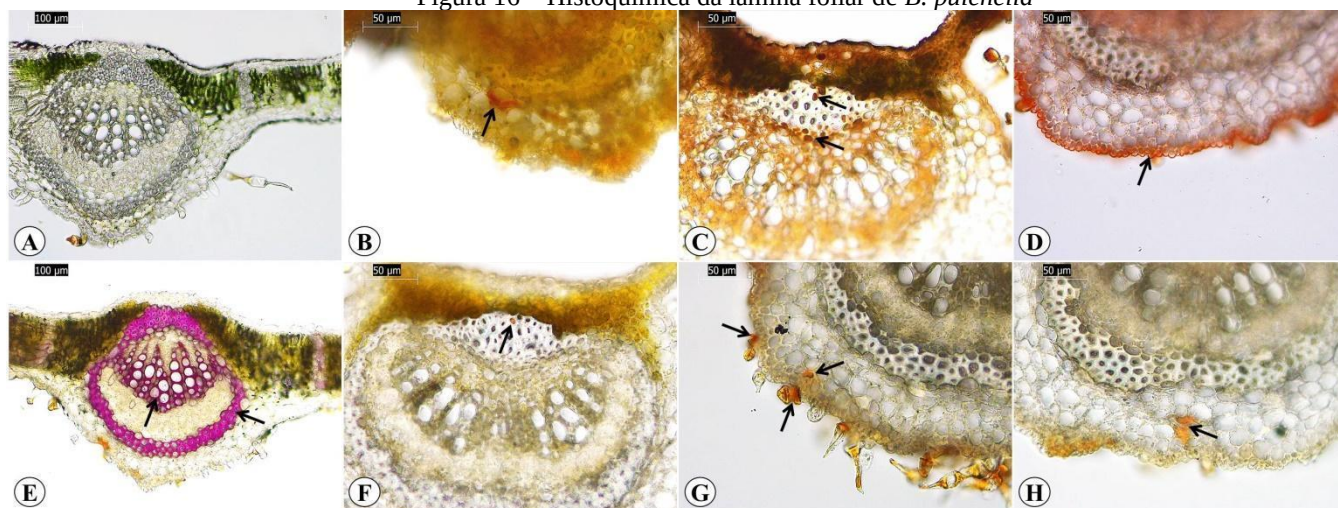
Ferreira *et al.* (2003) descreveram para *B. blakeana* mesofilo dorsiventral com 3-4 camadas de parênquima paliçádico e 4-5 camadas de parênquima esponjoso, com grandes espaços intercelulares. O mesofilo de *B. unguolata* é dorsiventral em seção transversal, com uma camada de parênquima paliçádico, já em *B. cheilantha* e *B. pentandra* observaram-se duas camadas do mesmo parênquima, com idioblastos drusíferos sendo frequentemente visualizados. O parênquima esponjoso apresentou 2-4 camadas em *B. cheilantha* e *B. pentandra*, com pequenos espaços intercelulares. Em *B. unguolata* o parênquima esponjoso apresentou 4-5 camadas, com grandes espaços intercelulares. Idioblastos de cristais prismáticos foram observados nos sistemas vasculares de feixes secundários, principalmente em *B. pentandra* (Pereira *et al.* 2018).

Antunes, Pereira e Leitão (2021) descreveram para a espécie *B. monandra* mesofilo dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliádico e cerca de duas camadas de parênquima esponjoso, além disso, os autores observaram a presença de cristais do tipo drusa no mesofilo.

5.1.2 Testes histoquímicos

A figura 16 exibe a lâmina foliar em secções transversais, submetidas à caracterização histoquímica. Na figura 16A é apresentada a lâmina foliar sem adição de nenhum reagente. Alcaloides foram evidenciados no parênquima fundamental (figura 16B) e compostos fenólicos tanto no esclerênquima quanto no parênquima fundamental (figura 16C). Na cutícula foi observada a presença de compostos lipofílicos (figura 16D). Já a figura 16E evidencia a presença de lignina observada no esclerênquima e no feixe vascular da nervura central, destacada no xilema. Triterpenos e esteroides foram evidenciados no esclerênquima (figura 16F), no parênquima fundamental e no tricoma (figura 16G). No parênquima fundamental também foi observado aglomerados de taninos (figura 16H). Os testes para amido foram negativos.

Figura 16 – Histoquímica da lâmina foliar de *B. pulchella*



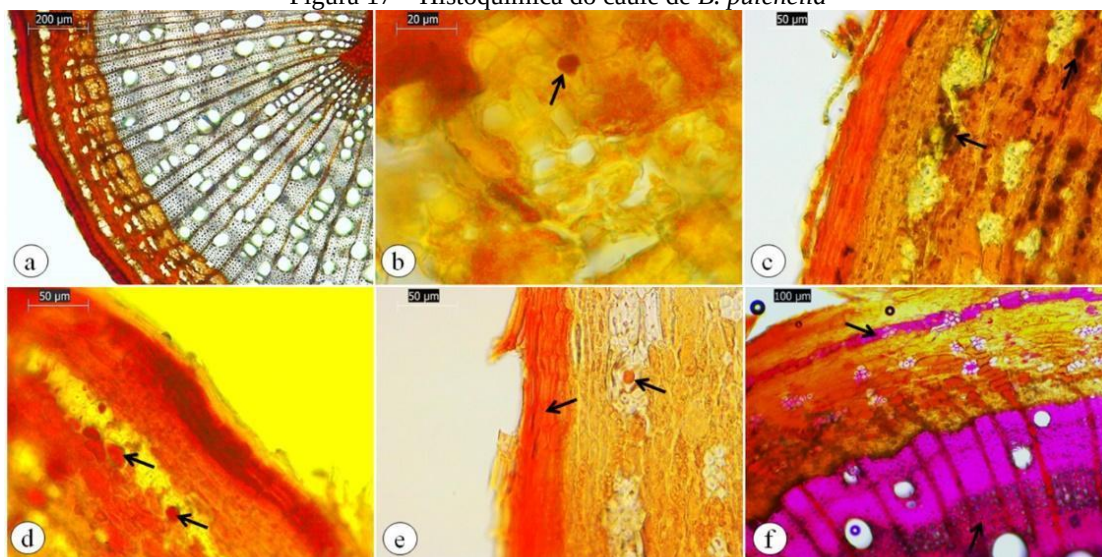
A: Controle; B: Dragendorff; C: Dicromato de potássio; D: Sudan III;
E: Floroglucinol; F-G: Tricloreto de antimônio; H: Vanilina clorídrica.

Fonte: própria (2022).

A figura 17 mostra a haste do caule em cortes transversais submetidos à caracterização histoquímica. A figura 17A exibe o caule sem nenhum reagente. Alcaloides (figura 17B), amido (figura 17C) e compostos fenólicos (figura 17D) foram evidenciados no parênquima cortical.

No súber e no parênquima foram observados compostos lipofílicos (figura 17E). A figura 17F mostra a lignina observada no esclerênquima e no xilema. Os testes para taninos, triterpenos e esteroides foram negativos. Monteiro *et al.* (2021), utilizando cromatografia em coluna Sephadex LH-20 e HPLC semipreparativa, identificaram triterpenoides, esteroides, flavonoides e compostos fenólicos no caule da espécie *B. pulchella*, corroborando, em parte, com os achados no presente estudo.

Figura 17 – Histoquímica do caule de *B. pulchella*



A: Controle; B: Dragendorff; C: Solução de Iodo; D: Dicromato de potássio; E: Sudan III;
F: Floroglucinol.

Fonte: própria (2023).

5.2 ESTUDO DOS CONSTITUINTES FIXOS DE *Bauhinia pulchella*

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

O caule, após secagem e trituração, gerou 4,0 kg de material vegetal que foi submetido à extração com etanol, por maceração, durante 48 horas, sendo o processo extrativo repetido durante 2 semanas. Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados por destilação sob pressão reduzida, resultando na obtenção de 188 g de extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (EECBP), totalizando um rendimento de 4,7%.

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

Uma alíquota do EECBP, de 145 g, foi submetida a uma coluna filtrante ($L = 14,0$ cm e $\phi = 10,0$ cm), utilizando 350 g de gel de sílica. Foram utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, como eluentes. As frações obtidas tiveram seus solventes removidos sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resultado do referido fracionamento está mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do EECBP

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1-3 (J-1)	Hexano	800
4-7 (J-2)	Diclorometano	1600
8-10 (J-3)	Acetato de etila	1500
11-12(J-4)	Acetato de etila/Metanol (50:50)	900
13-15(J-5)	Metanol	1000

Fonte: própria (2023).

Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações obtidas pelo mesmo solvente foram separadas em 5 frações que são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico do EECBP

FRAÇÃO	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
1-3 (J-1)	1,056	0,73
4-7 (J-2)	3,547	2,45
8-10 (J-3)	5,047	3,48
11-12 (J-4)	12,850	8,86
13-15 (J-5)	54,058	37,28
TOTAL	76,558	52,8

Fonte: própria (2023).

As frações de EECBP foram os objetos de estudo para os testes imunológicos, microbiológicos e de caracterização química deste trabalho, sendo denominadas FEECBP.

5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE J-1 E J-2

O estudo realizado da composição química de J-1 e J-2, que foram provenientes do extrato etanólico do caule de *B. pulchella* (EECBP), foi realizado por cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM) por análise qualitativa. Os cromatogramas para a fração J-1 podem ser visualizados nas figuras 19 e 21; já os da J-2, nas figuras 23, 25 e 27.

5.3.1 Composição química de J-1

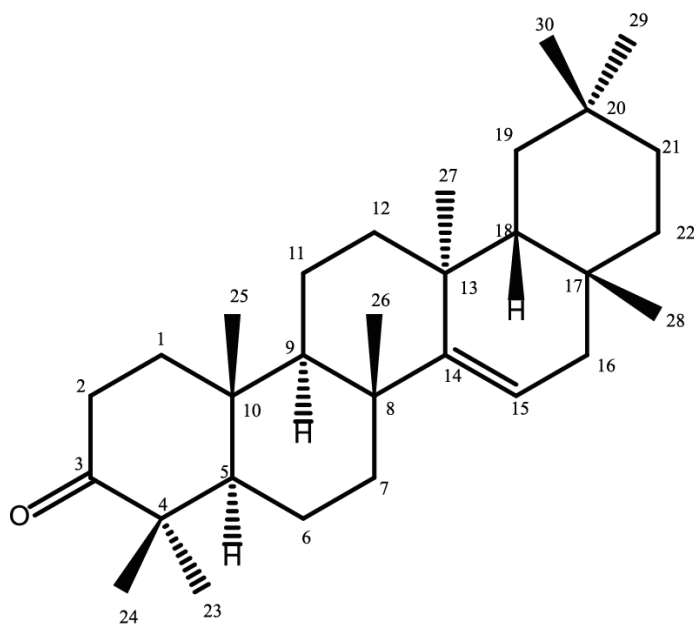
5.3.1.1 Taraxerona

A taraxerona faz parte da classe de metabólitos secundários chamada de terpenos, os quais são produzidos a partir do ácido mevalônico ou do piruvato presentes nas plantas (Simões *et al.* 2003). Essa classe tem como característica química sua alta lipossolubilidade, devido a presença de seis unidades de isoprenos, com um total de 30 átomos de carbono, conforme pode ser observado na figura 18.

A partir do espectro de massas (figura 19) foi obtido o pico do íon molecular m/z igual a 424 daltons, compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O$. O sinal cromatográfico pertencente à taraxerona, com o tempo de retenção de 30,72 minutos apresentou sinais em m/z 300, 285, 204, 189 e 133, os quais são os seus produtos da fragmentação, como podem ser observados nas figuras 18 e 19. Tal componente químico já foi isolado anteriormente de *B. unguolata* (Sousa, 2016).

A friedelina, que é um terpenoide, é capaz de diminuir ou inibir o crescimento de patógenos, apresentando uma CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$, frente a diferentes tipos de cepas do gênero *Mycobacterium*. O ácido betulínico apresentou um CIM de 400 $\mu\text{g/mL}$, frente *Mycobacterium tuberculosis*, que favorece na hipótese que afirma que essa classe de metabólitos é excelente precursora para produção de medicamentos, no que tange a atividade antimicrobiana (Silva *et al.* 2020).

Figura 18 – Estrutura química da molécula de taraxerona (J-1)



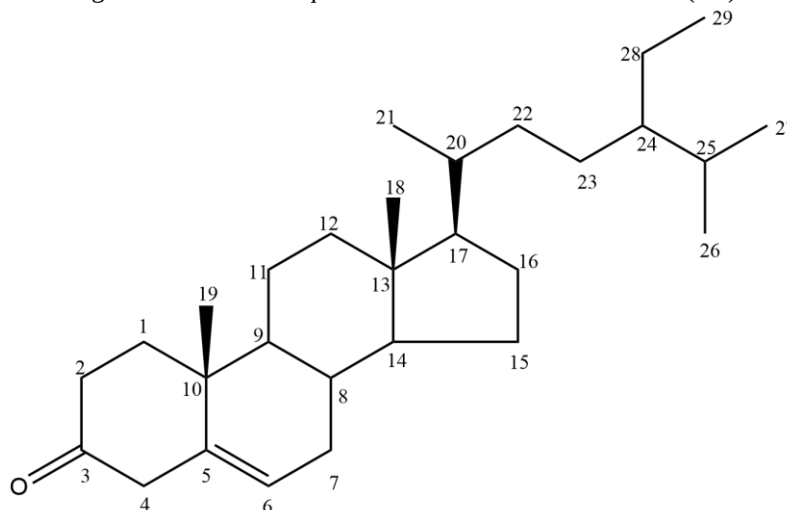
Fonte: própria (2024).

5.3.1.2 Sitosterona

A sitosterona faz parte da classe de metabólitos secundários, chamados de Esteroides, os quais são produzidos a partir da Acetil-CoA, que é precursora do ácido mevalônico que produz os esteroides (Simões *et al.* 2003). Essa classe tem como característica química sua alta lipossolubilidade, devido a presença de 29 carbonos em sua composição molecular, como pode ser observado na figura 20.

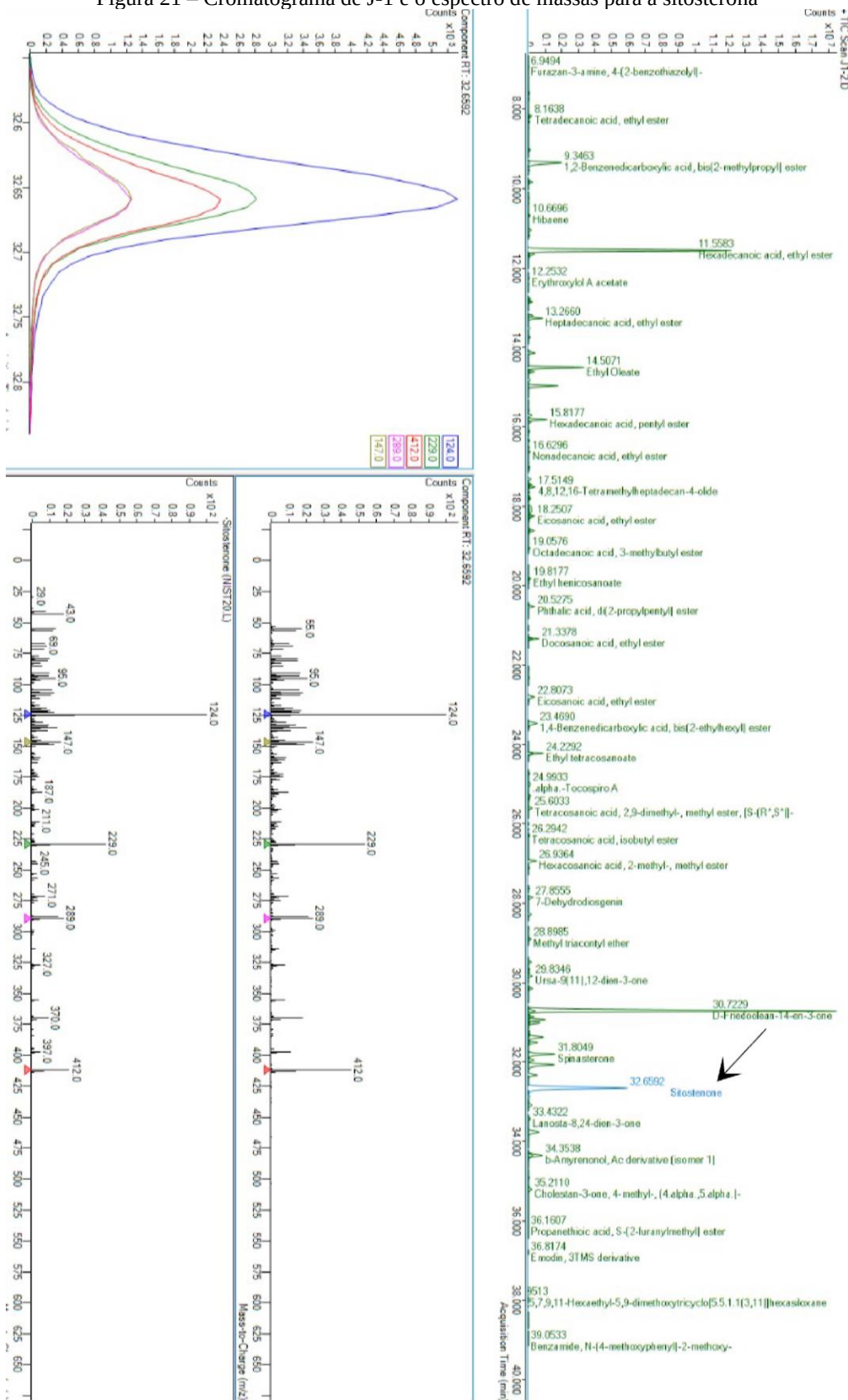
A partir do espectro de massas (figura 21) foi obtido o pico do íon molecular m/z igual a 412 daltons, compatível com a fórmula molecular de $C_{29}H_{48}O$. O sinal cromatográfico pertencente à sistoterona, com o tempo de retenção de 32,65 minutos apresentou os sinais m/z 289, 229, 147 e 124, os quais são os seus produtos de fragmentação, compatíveis com os mesmos dados obtidos pelos autores (Manoharam; Benny; Yang, 2005).

Figura 20 – Estrutura química da molécula de sitosterona (J-1)



Fonte: adaptado de Manoharam; Benny; Yang, 2005.

Figura 21 – Cromatograma de J-1 e o espectro de massas para a sitosterona



Fonte: própria (2024).

5.3.2 Composição química de J-2

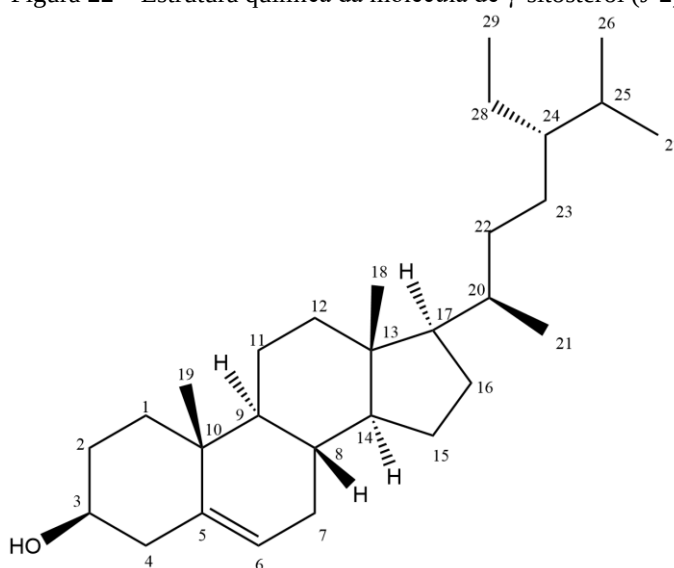
5.3.2.1 γ -sitosterol

O γ -sitosterol faz parte da classe de metabólitos secundários chamados de Esteroides, os quais são produzidos a partir da Acetil-CoA, que é precursora do ácido mevalônico que produz os esteroides (Simões *et al.* 2003). Essa classe tem como característica química a sua alta lipossolubilidade, devido a presença de 29 carbonos em sua composição molecular, como pode ser observado na figura 22.

A partir do espectro de massas (figura 23) foi obtido o pico do íon molecular m/z igual a 414 daltons, compatível com a fórmula molecular de $C_{29}H_{50}O$. O sinal cromatográfico pertencente ao γ -sitosterol, com o tempo de retenção de 30,94 minutos apresentou os sinais m/z 396, 329, 303, 213, os quais são os seus produtos de fragmentação, que são compatíveis com os dados obtidos pelos autores (Balamurugan; Duraipandiyar; Ignacimuthu, 2011). Tal constituinte já foi isolado anteriormente em diferentes espécies de *Bauhinia* (Da Silva *et al.* 2000).

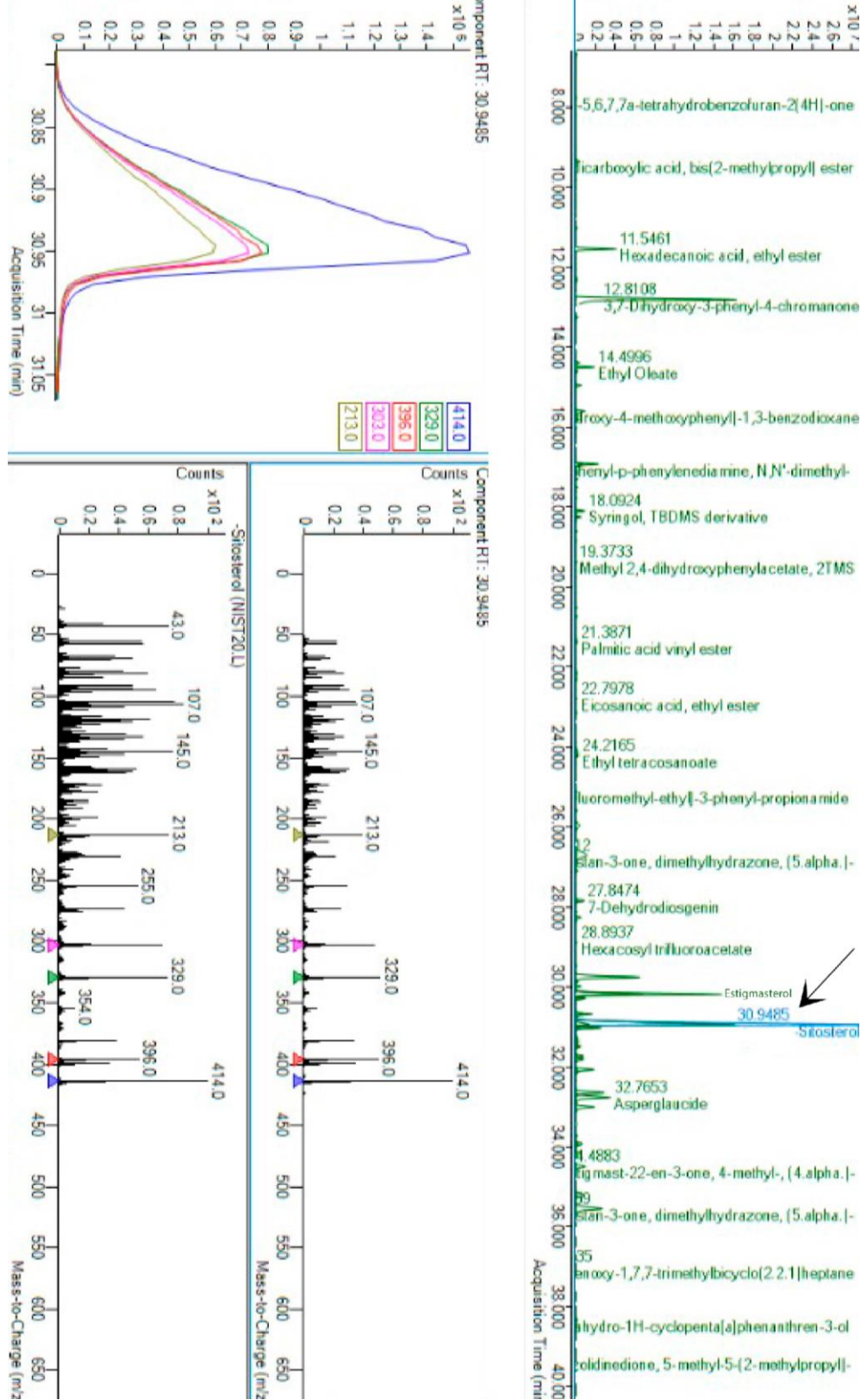
O γ -sitosterol é bastante conhecido por suas atividades antidiabéticas, devido sua capacidade de diminuir índices glicêmicos em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (Balamurugan; Duraipandiyar; Ignacimuthu, 2011), assim como induzir respostas anti-inflamatórias (Bouic; Lamprecht, 1999).

Figura 22 – Estrutura química da molécula de γ -sitosterol (J-2)



Fonte: própria (2024).

Figura 23 – Cromatograma de J-2 e o espectro de massas para o γ -sitosterol



Fonte: própria (2024).

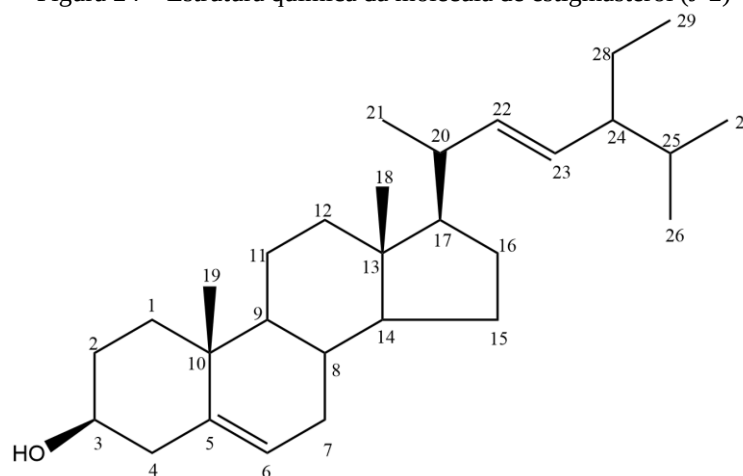
5.3.2.2 Estigmasterol

O estigmasterol faz parte da classe de metabólitos secundários chamados de Esteroides, os quais são produzidos a partir da Acetil-CoA, que é precursora do ácido mevalônico, que produz os esteroides (Simões *et al.* 2003). Essa classe tem como característica química sua alta lipossolubilidade devido a presença de 29 carbonos em sua composição molecular como pode ser observado na figura 24.

A partir do espectro de massas (figura 25) foi obtido o pico do íon molecular m/z igual a 412 daltons, compatível com a fórmula molecular de $C_{29}H_{48}O$. O sinal cromatográfico pertencente ao estigmasterol, com o tempo de retenção de 30,18 minutos, apresentou os sinais m/z 271, 255, 83 e 55, os quais são os seus produtos de fragmentação. Tal constituinte já foi isolado anteriormente em diferentes espécies de *Bauhinia* (Sousa, 2016; Góis, 2014). A sua diferenciação molecular, frente ao γ -sitosterol, é por apresentar uma insaturação entre os carbonos 22 e 23, por isso, difere em 2 daltons entre as moléculas, decorrente da diminuição de 2 átomos de hidrogênio em sua composição.

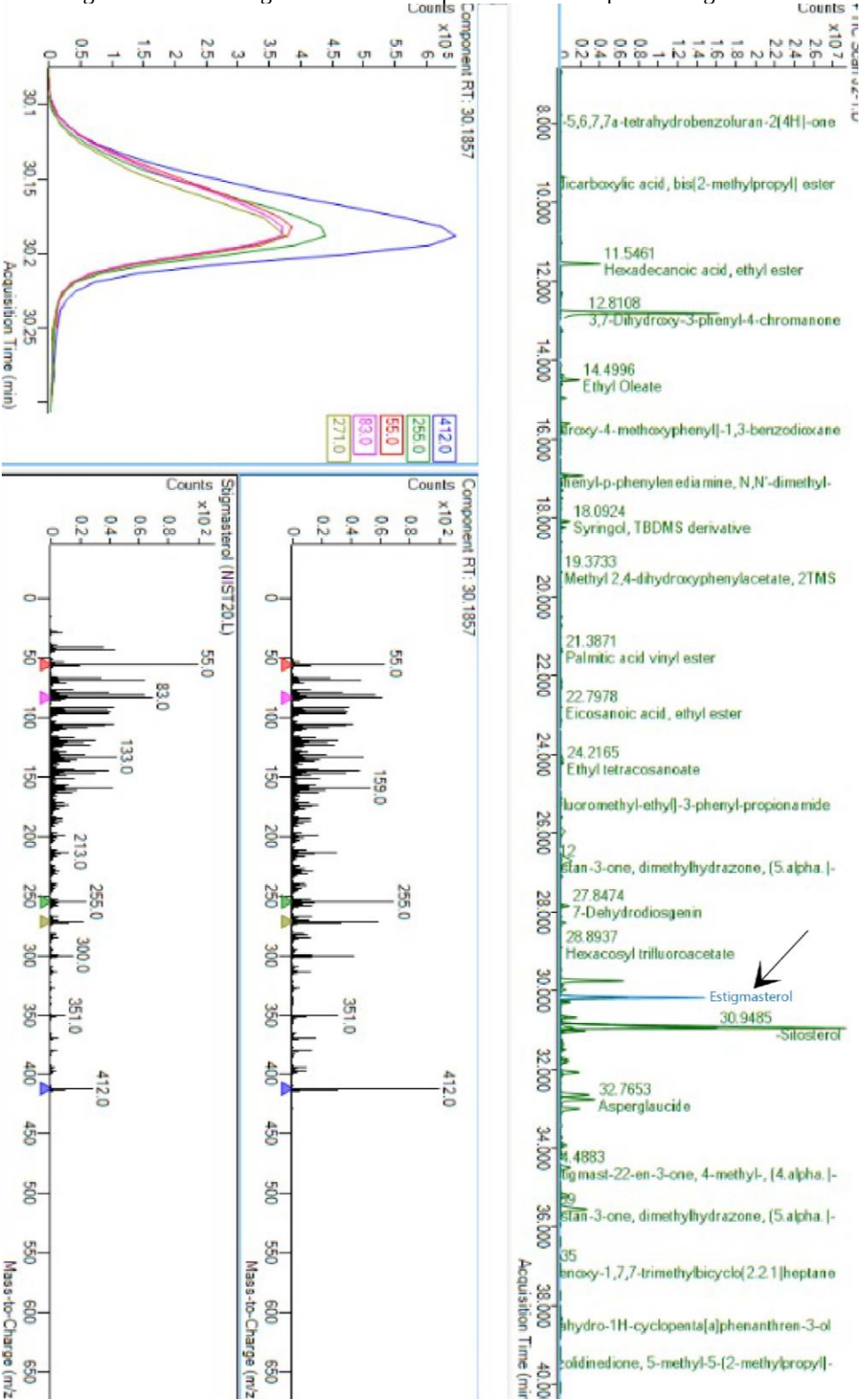
O estigmasterol é bastante conhecido por suas atividades anti-inflamatórias e sedativas (Morgan *et al.* 2021), mas possui atividades antimicrobianas, conforme apresentado por (Alawode *et al.* 2021; Faruque *et al.* 2019).

Figura 24 – Estrutura química da molécula de estigmasterol (J-2)



Fonte: própria (2024).

Figura 25 – Cromatograma de J-2 e o espectro de massas para o estigmasterol



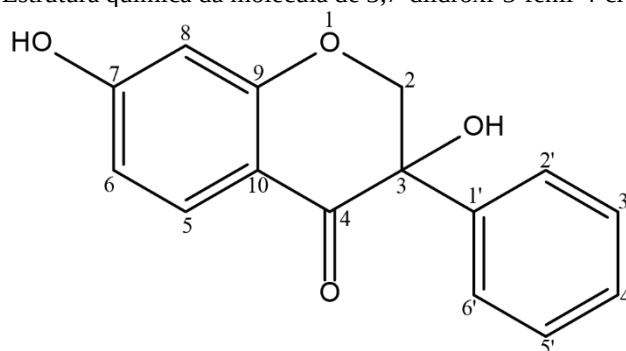
Fonte: própria (2024).

5.3.2.3 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona

O 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona faz parte da classe de metabólitos secundários chamados de flavonoides, os quais são produzidos a partir do ácido chiquímico e da Acetil-CoA (Simões *et al.* 2003), tendo sua molécula base característico da subclasse das isoflavanonas (Won; Shin; Han, 2008). Essa classe tem como característica química a sua baixa lipossolubilidade, devido aos grupamentos hidroxila em sua estrutura e uma menor quantidade de carbonos em sua composição (15 carbonos), que pode ser observado na figura 26.

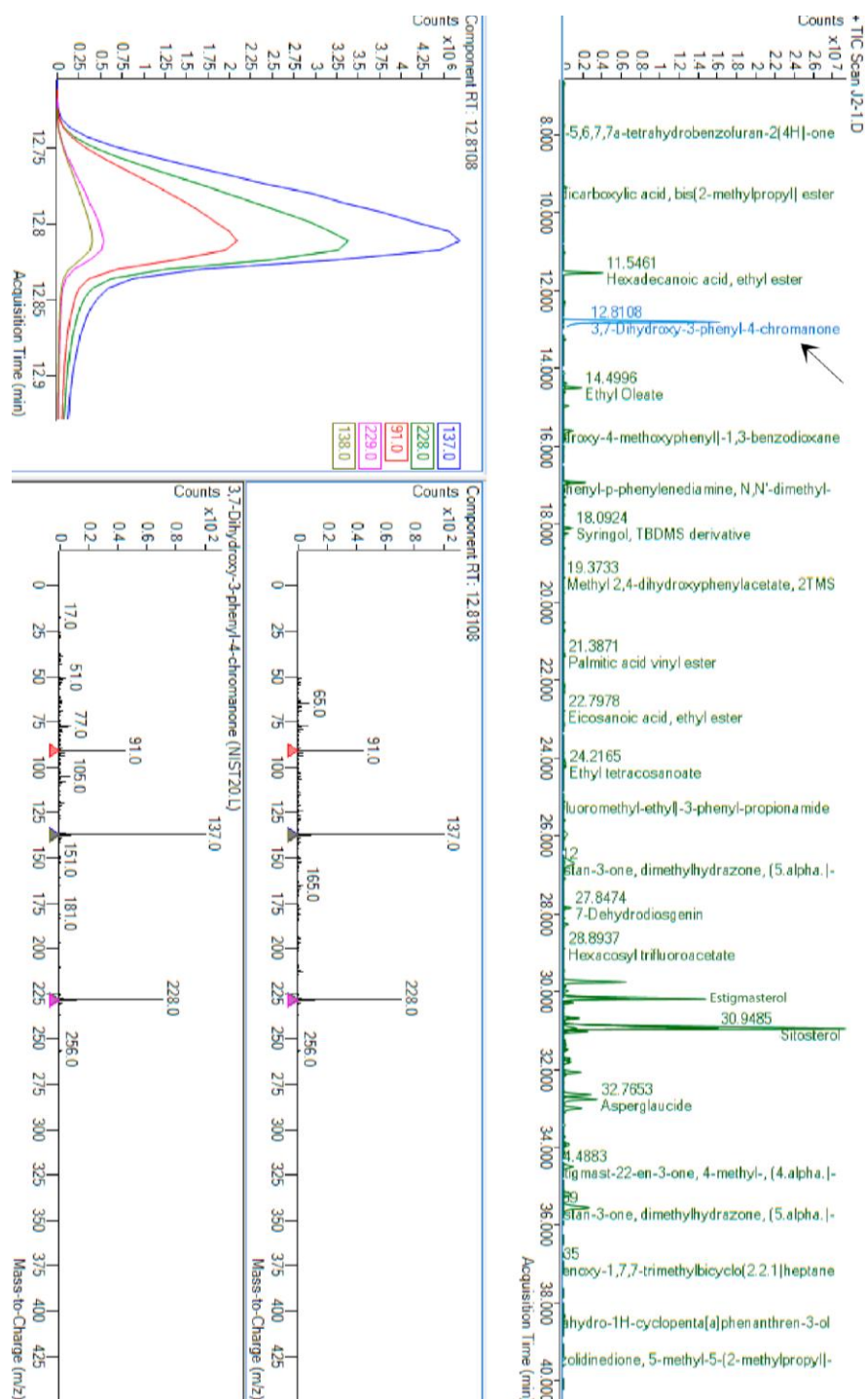
A partir do espectro de massas (figura 27) foi obtido o pico do íon molecular m/z igual a 256 daltons, compatível com a fórmula molecular de $C_{15}H_{12}O_4$. O sinal cromatográfico pertencente ao 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona, com o tempo de retenção de 12,81 minutos, apresentou os sinais m/z 228, 137 e 91, os quais são os seus produtos de fragmentação. Tal constituinte, até o momento, não havia sido relatado no gênero *Bauhinia*, sendo, portanto, inédita a sua identificação em todas as suas espécies. O 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona já foi obtido nas espécies *Pinus wallichiana* A.B.Jacks. (Joshi; Rai; Kumar, 2016) e em *Melissa officinalis* L. (Rezaei; Jafarirad; Kosari-Nasab, 2019).

Figura 26 – Estrutura química da molécula de 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona (J-2)



Fonte: adaptado de Rezaei; Jafarirad; Kosari-Nasab (2019).

Figura 27 – Cromatograma de J-2 e o espectro de massas para o 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona



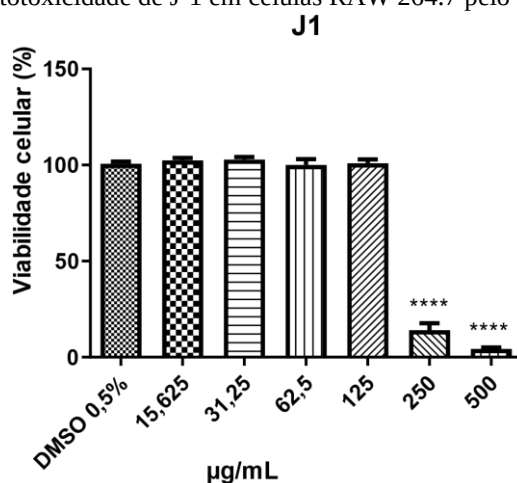
Fonte: própria (2024).

5.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Com o intuito de se determinar a citotoxicidade de FEECBP contra macrófagos RAW 264.7, foi utilizado o método do MTT. Observou-se, com isso, que, na figura 28, a fração J-1 não reduziu a viabilidade celular de forma significativa entre 125 e 15,625 $\mu\text{g/mL}$; como também, na figura 29, a J-2 não reduziu a viabilidade celular de forma significativa entre 62,5 e 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Dessa maneira, foram definidas as seguintes faixas de trabalho para os ensaios anti-inflamatórios: J-1(125 e 15,625 $\mu\text{g/mL}$) e J-2(62,5 e 15,625 $\mu\text{g/mL}$). Não foi possível realizar o ensaio para as frações J-3; J-4 e J-5 por terem baixa solubilidade no veículo utilizado (DMSO 0,5%).

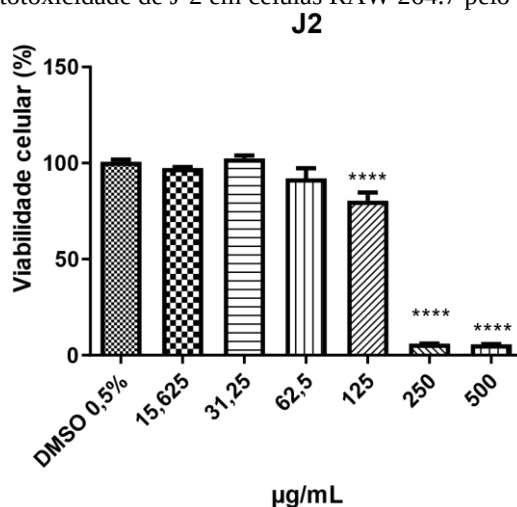
Figura 28 – Citotoxicidade de J-1 em células RAW 264.7 pelo método do MTT



Valores de **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle DMSO 0,5% (ANOVA com pós-teste de Tukey).

Fonte: própria (2024).

Figura 29 – Citotoxicidade de J-2 em células RAW 264.7 pelo método do MTT



Valores de **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle DMSO 0,5% (ANOVA com pós-teste de Tukey).

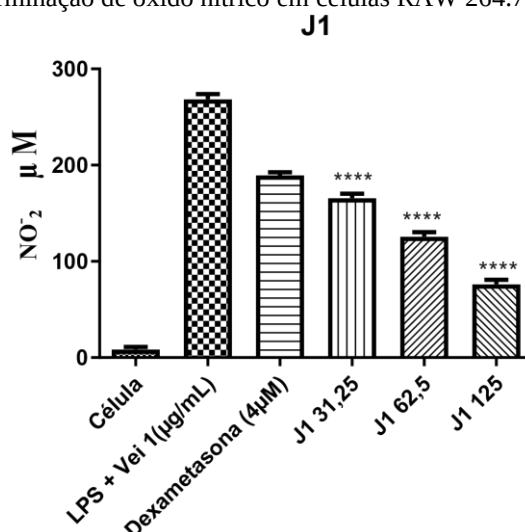
Fonte: própria (2024).

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O uso de J-1 (nas concentrações de 125; 62,5; 31,25 µg/mL) e de J-2 (nas concentrações de 62,5; 31,25 e 15,625 µg/mL) em células de macrófagos do tipo RAW 264.7, que foram previamente estimuladas com LPS 1 µg/mL, durante um período de incubação de 24h, gerou um sobrenadante celular que foi submetido ao teste de determinação de óxido nítrico. Foi possível determinar uma redução significativa nos níveis de NO, presentes no sobrenadante da cultura celular tratados com as frações J-1 e J-2, em todas as faixas de concentração trabalhadas, quando comparados estatisticamente aos grupos não tratados e estimulados com LPS (figuras 30 e 31).

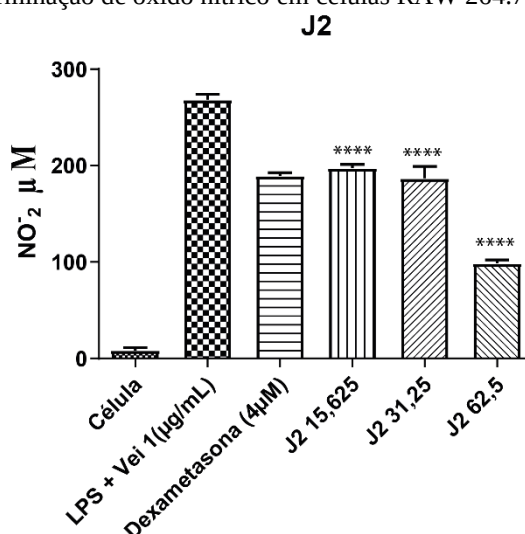
Estudos de Rodrigues *et al.* (2019) evidenciaram a diminuição dos níveis de NO em fração de *B. unguolata* (FABU), rica em flavonoides (liquiritigenina, guibourtinidol e fisetinidol). Essa situação pode ser correlacionada a uma maior diminuição dos níveis de NO celular, quando as células foram expostas à fração J-2, em comparação a J-1, devido ao fato daquela possuir em sua composição uma isoflavanona (3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona). Raso *et al.* (2001), por sua vez, trazem em seus estudos que os flavonoides agem na modulação de COX-2 e inibição da NO-sintase como mecanismos de ação desses metabólitos secundários. Todavia, a ação sinérgica entre essas diferentes classes químicas, presentes nas frações estudadas, não pode ser descartada.

Figura 30 – Determinação de óxido nítrico em células RAW 264.7 na presença de J-1



Legenda: LPS – lipopolissacarídeo; Vei – Veículo (DMSO 0,5%)
 Valores de ****p < 0,0001 quando comparados com o grupo controle LPS + Vei (ANOVA com pós-teste de Tukey).
 Fonte: própria (2024).

Figura 31 – Determinação de óxido nítrico em células RAW 264.7 na presença de J-2



Legenda: LPS – lipopolissacarídeo; Vei – Veículo (DMSO 0,5%)
 Valores de ****p < 0,0001 quando comparados com o grupo controle LPS + Vei (ANOVA com pós-teste de Tukey).
 Fonte: própria (2024).

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS APÓS TRATAMENTO COM J-1 E J-2

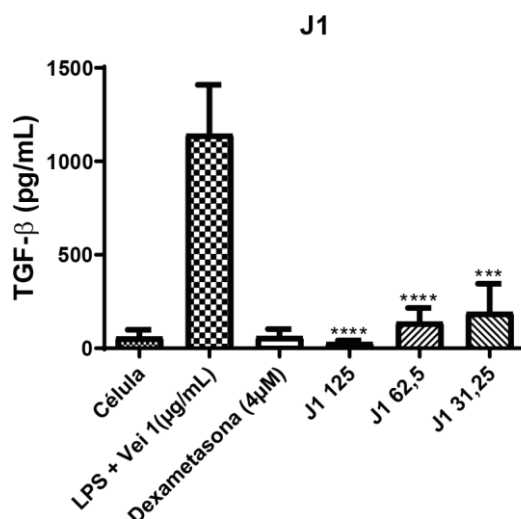
Conforme observado nas figuras 32 e 33, as concentrações de TGF- β foram aumentadas no processo de sensibilização celular com o LPS, quando comparados com o grupo controle sem tratamento. As diferentes concentrações, tanto de J-1 (125; 62,5; 31,25 $\mu\text{g/mL}$) como de J-2 (62,5; 31,25 e 15,625 $\mu\text{g/mL}$), foram capazes de diminuir os níveis da citocina quando comparados aos grupos não tratados e estimulados com LPS, sugerindo que tais frações

apresentaram atividade imunomodulatória significativa no estudo (figuras 32 e 33). Tais dados obtidos vão de encontro à pesquisa de Rodrigues *et al.* (2019), já que essa não obteve redução significativa de TGF- β , quando células foram estimuladas por LPS e expostas à fração rica em flavonoides de *B. unguolata* (FABU).

Sob outra perspectiva, os autores Murugesan *et al.* (2020), ao fazerem uso de um extrato metanólico de *Piper betle* L., conseguiram obter um resultado com uma composição majoritária de constituintes lipofílicos, como o eugenol e o β -sitosterol, e, com isso, obtiveram uma diminuição da concentração dessa citocina em células com artrite reumatoide.

Estudos com terpenoides em ratos demonstraram a regulação de TGF- β (Zhao *et al.* 2022). Dessa forma, conseguimos obter uma correlação entre as principais classes que tem ação imunomoduladora para TGF- β que são os esteroides e os terpenoides.

Figura 32 – Determinação de TGF- β em células RAW 264.7 na presença de J-1

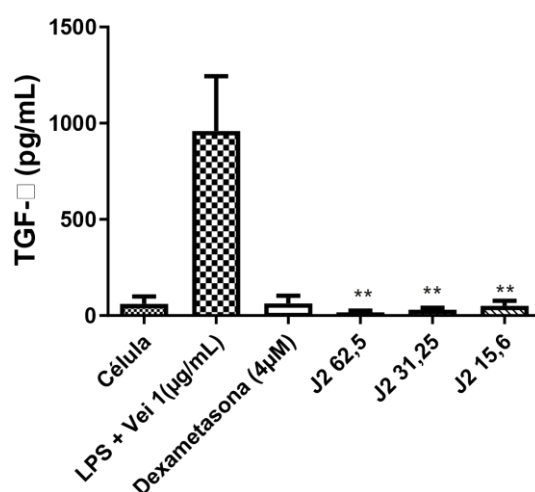


Legenda: LPS – lipopolissacarídeo; Vei – Veículo (DMSO 0,5%)

Valores de *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados com o grupo controle LPS + Vei (ANOVA com pós-teste de Tukey).

Fonte: própria (2024).

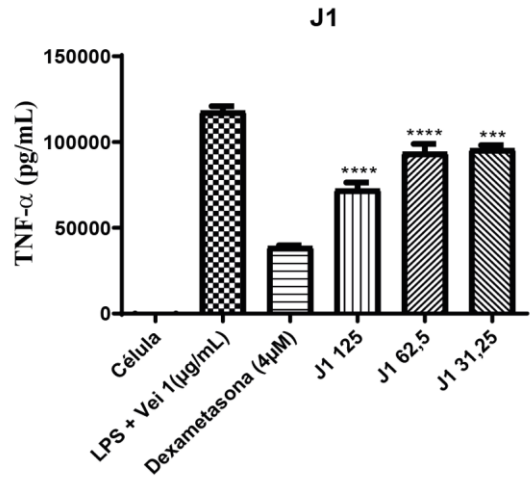
Figura 33 – Determinação de TGF- β em células RAW 264.7 na presença de J-2



Legenda: LPS – lipopolissacarídeo; Vei – Veículo (DMSO 0,5%)
 Valores de **p < 0,01 quando comparados com o grupo controle LPS + Vei
 (ANOVA com pós-teste de Tukey).
 Fonte: própria (2024).

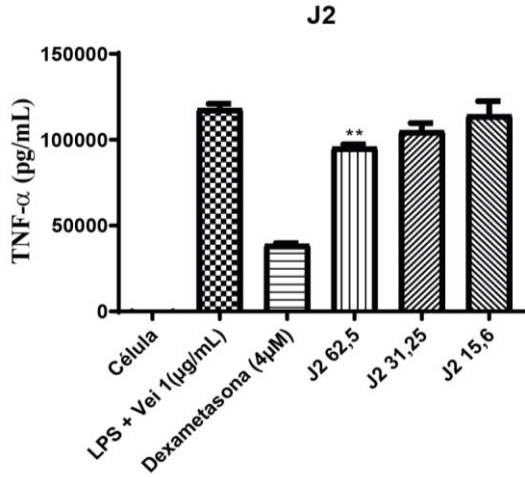
Conforme observado nas figuras 34 e 35, as concentrações de TNF- α foram aumentadas no processo de sensibilização celular com o LPS quando comparados com o grupo controle sem tratamento. As diferentes concentrações tanto de J-1 (125; 62,5; 31,25 μ g/mL) como de J-2 (62,5 μ g/mL) foram capazes de diminuir os níveis da citocina quando comparados aos grupos não tratados e estimulados com LPS. Pesquisadores (Murugesan *et al.* 2020) observaram que o extrato metanólico de *Piper betle*, contendo majoritariamente terpenos e esteroides na sua composição, foi capaz de reduzir níveis de TNF- α . Em contraponto, Rodrigues *et al.* (2019) não obteve redução significativa dos níveis de TNF- α a partir da exposição de células estimuladas por frente à fração rica em flavonoides de *B. unguolata* (FABU), sugerindo que as frações J-1 e J-2, com predominância de constituintes lipofílicos (terpenos e esteroides) possuem atividade imunomodulatória significativa conforme apresentado nesta tese.

Figura 34 – Determinação de TNF-α em células RAW 264.7 na presença de J-1



Legenda: LPS – lipopolissacarídeo; Vei – Veículo (DMSO 0,5%)
Valores de ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 quando comparados com o grupo controle LPS + Vei (ANOVA com pós-teste de Tukey).
Fonte: própria (2024).

Figura 35 – Determinação de TNF-α em células RAW 264.7 na presença de J-2



Legenda: LPS – lipopolissacarídeo; Vei – Veículo (DMSO 0,5%)
Valores de **p < 0,01 quando comparados com o grupo controle LPS + Vei (ANOVA com pós-teste de Tukey).
Fonte: própria (2024).

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FEECBP

5.7.1 Concentrações inibitórias e letais mínimas (CIM e CLM) da FEECBP sobre leveduras

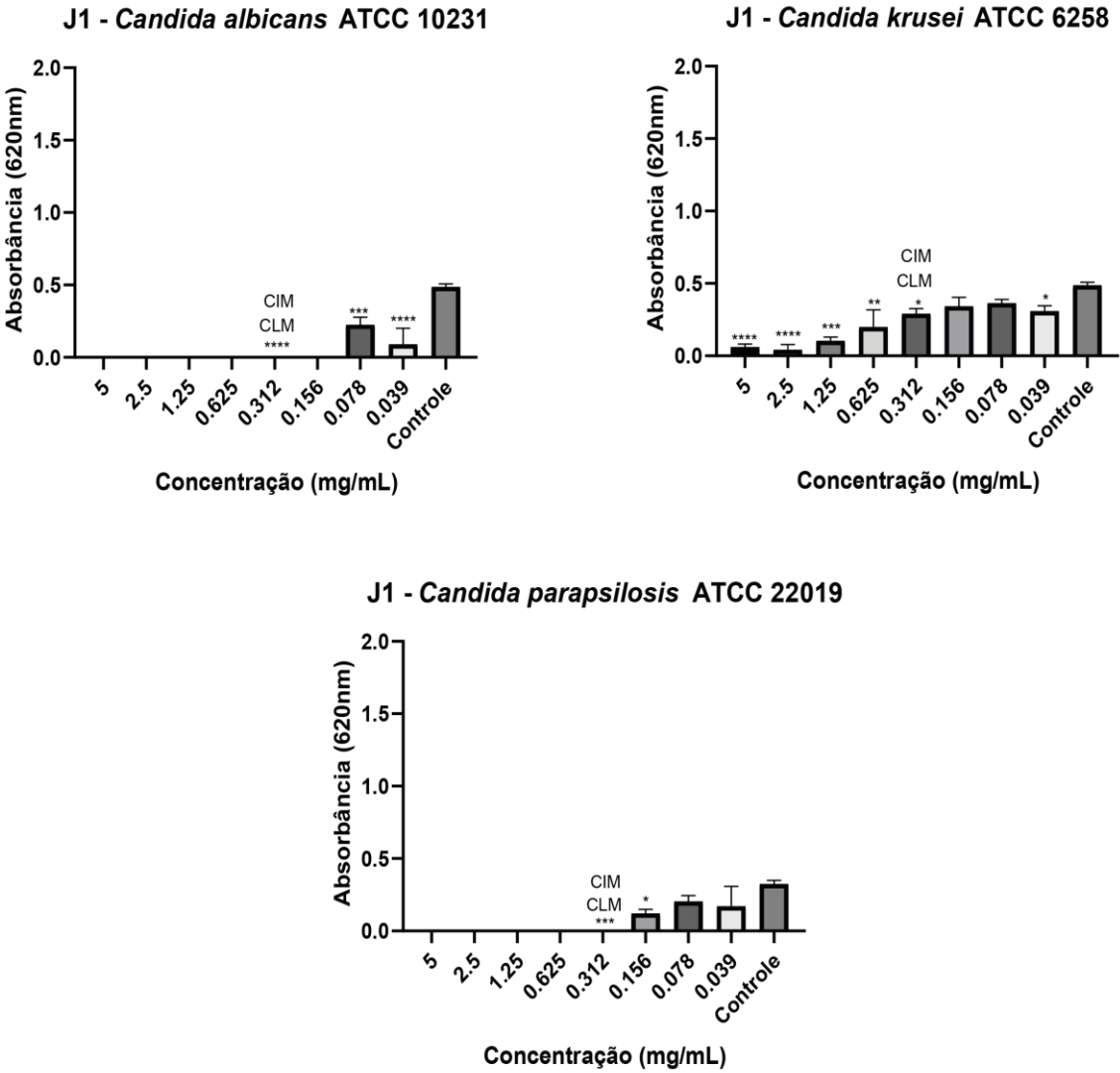
As frações J-1 e J-2 apresentaram ótima atividade antimicrobiana sobre cepas do gênero *Candida* (*C. albicans*; *C. krusei* e *C. parapsilosis*), com o CIM e o CLM de 0,312 mg/mL para ambos, conforme apresentadas na tabela 4 e nas figuras 36, 37 e 38.

Tabela 4 – Avaliação das CIM e CLM das frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas do gênero *Candida*

FRAÇÕES	CEPAS	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
J-1	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,312	0,312
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,312	0,312
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,312	0,312
J-2	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,312	0,312
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,312	0,312
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,312	0,312
J-3	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2,5	2,5
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2,5	5
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2,5	2,5
J-4	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	-
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-
J-5	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	-
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-

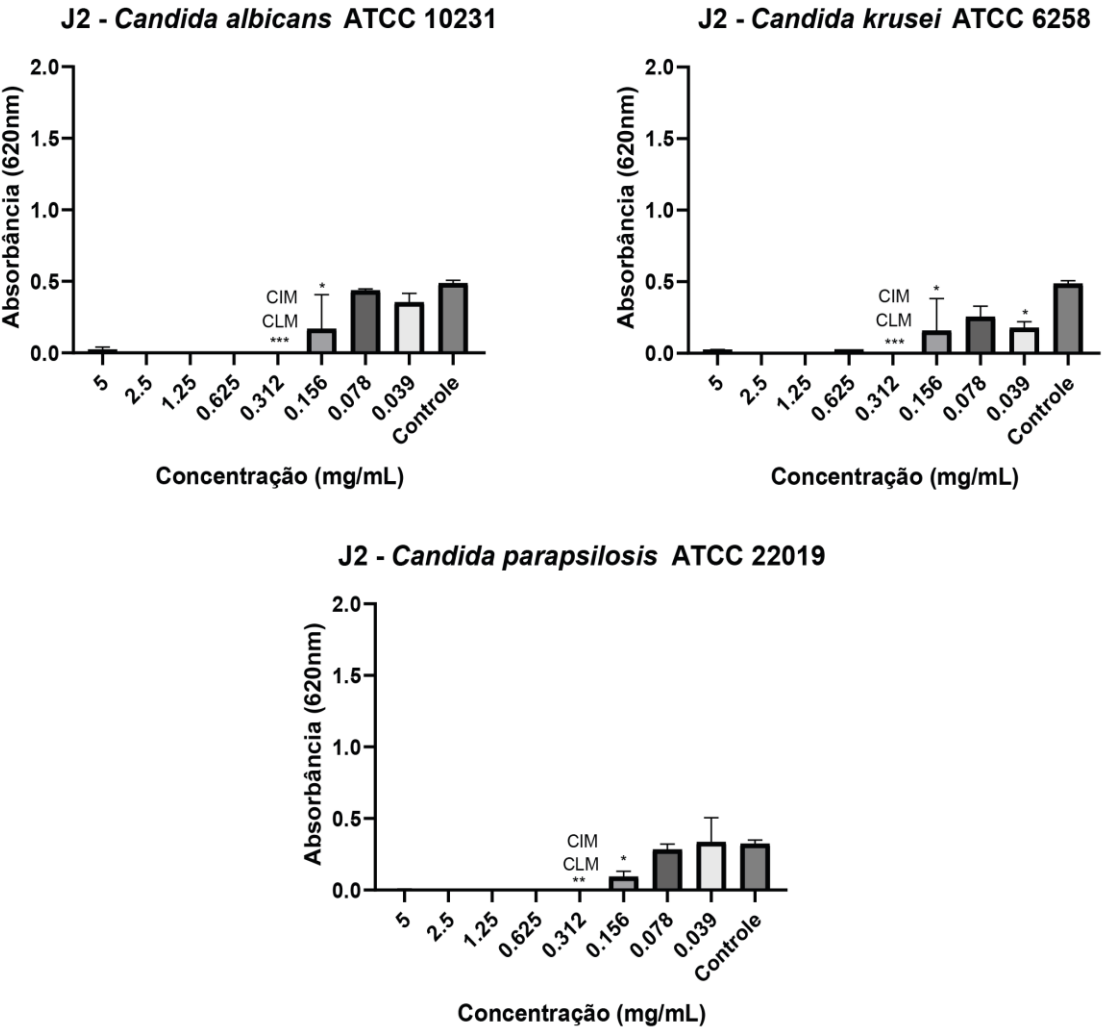
Fonte: própria (2024).

Figura 36 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1 sobre cepas do gênero *Candida*



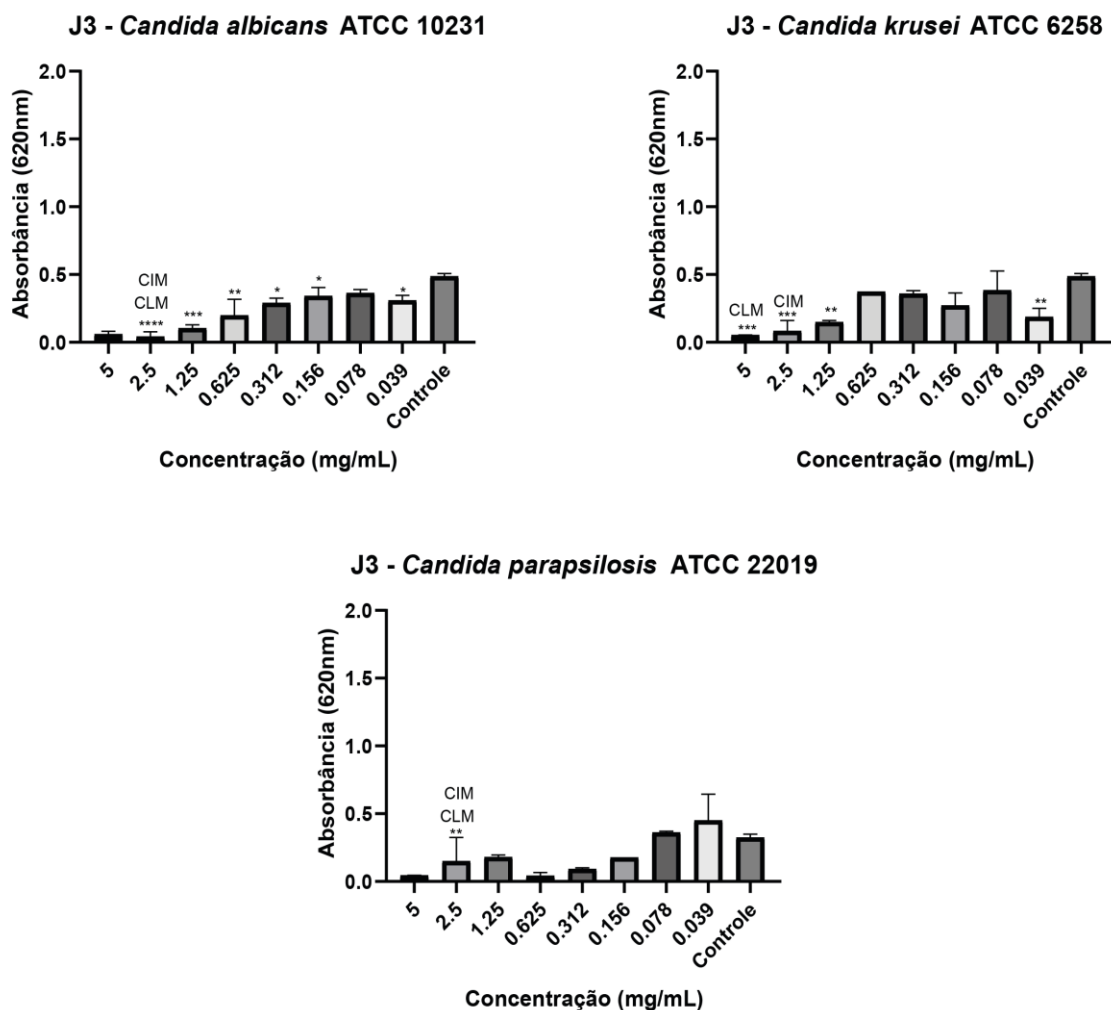
Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ quando comparados ao controle.
Fonte: própria (2024).

Figura 37 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-2 sobre cepas do gênero *Candida*



Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados ao controle.
Fonte: própria (2024).

Figura 38 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-3 sobre cepas do gênero *Candida*



Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparados ao controle.

Fonte: própria (2024).

A partir da inspeção visual do crescimento microbiano em meio de cultura contendo as frações e as cepas (*C. albicans* ATCC 10231; *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019), foi possível a determinação do CIM. Conforme analisado, as características dos constituintes majoritários das frações J-1 e J-2, pode-se perceber que eles pertencem à classe dos terpenos e dos esteroides, as quais possuem características lipofílicas.

Os autores Trombeta *et al.* (2005) relacionaram que constituintes hidrofóbicos, como os terpenos, possuem ação antimicrobiana devido a sua estrutura e função de adesão nas membranas celulares e, como resultado, na alteração da permeabilidade da membrana e do processo de transporte iônico. Já os pesquisadores Toscan *et al.* (2010), por sua vez, observaram em seus estudos a inibição da respiração celular em espécies do gênero *Candida* e, tais levantamentos corroboram com os resultados obtidos.

5.7.2 Concentrações inibitórias e letais mínimas (CIM e CLM) sobre bactérias Gram negativo

A fração J-1 apresentou uma boa atividade antimicrobiana com potencial bacteriostático e bactericida em baixas concentrações sobre cepas de *P. aeruginosa* ATCC 10226, *S. cholerae* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 10536, conforme observado pelos CIM e CLM. Já a fração J-2 teve excelente atividade antimicrobiana com potencial bacteriostático e bactericida em baixas concentrações, principalmente contra *P. aeruginosa* ATCC 10226 e *S. cholerae* ATCC 14028. Os resultados de CIM e CLM podem ser observados nas tabelas 5, 6 e 7 e nas figuras 39, 40 e 41.

Tabela 5 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *P. aeruginosa* ATCC 10226

FRAÇÕES	CEPAS	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
J-1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10226	0,625	0,625
J-2		0,078	0,078
J-3		2,5	2,5
J-4		5,0	-
J-5		5,0	-

Fonte: própria (2024).

Tabela 6 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *S. cholerae* ATCC 14028

FRAÇÕES	CEPAS	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
J-1	<i>S. cholerae</i> ATCC 14028	0,625	2,5
J-2		0,156	1,25
J-3		1,25	5,0
J-4		5,0	-
J-5		-	-

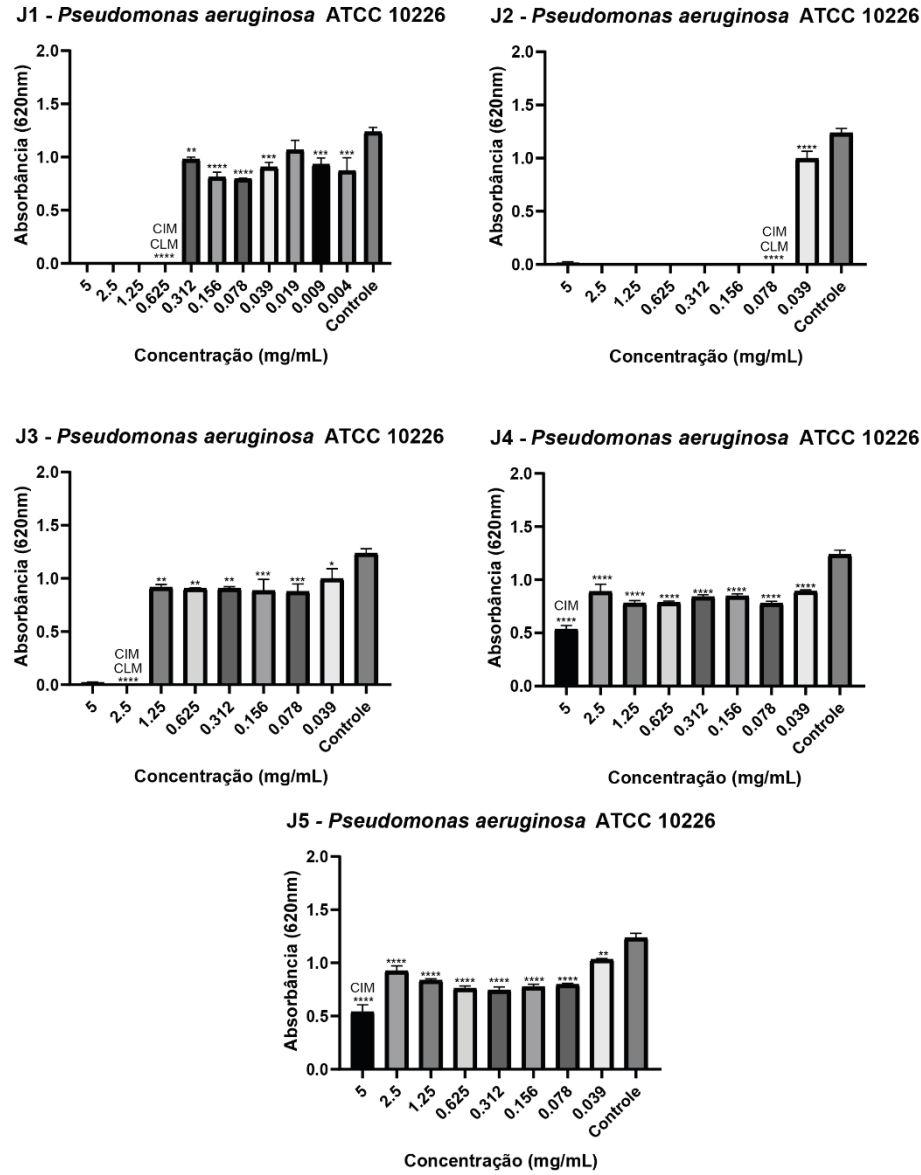
Fonte: própria (2024).

Tabela 7 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *E. coli* ATCC 10536

FRAÇÕES	CEPAS	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
J-1	<i>E. coli</i> ATCC 10536	1,25	2,5
J-2		5,0	-
J-3		-	-
J-4		-	-
J-5		-	-

Fonte: própria (2024).

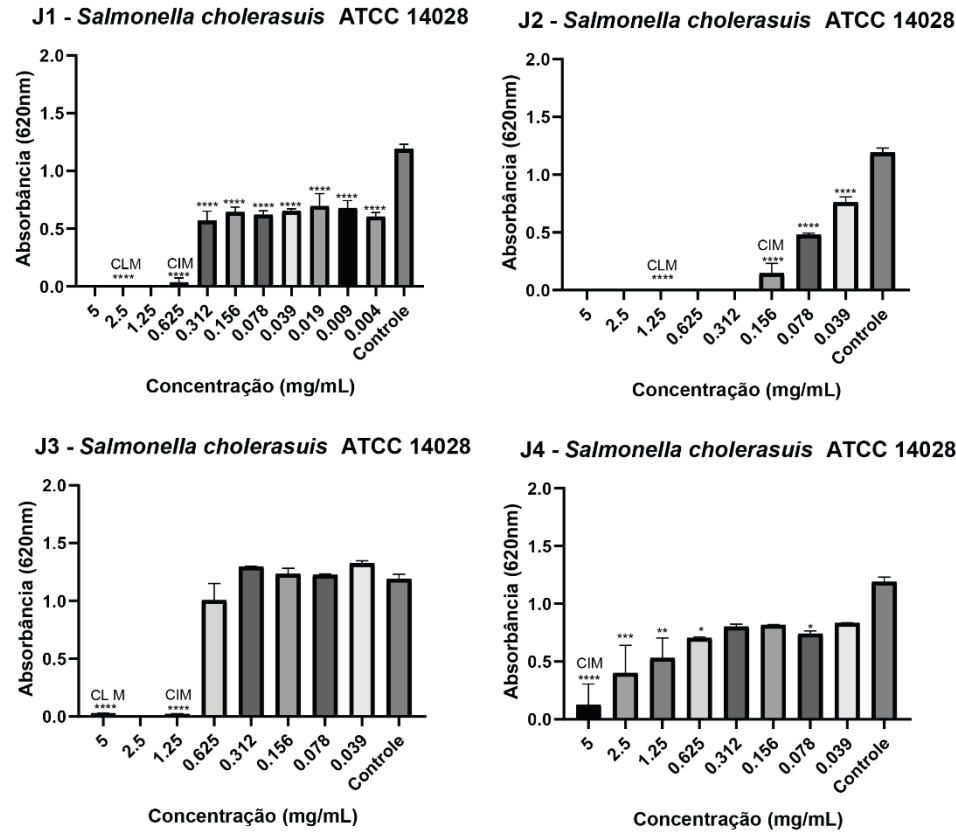
Figura 39 - Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *P. aeruginosa* ATCC 10226



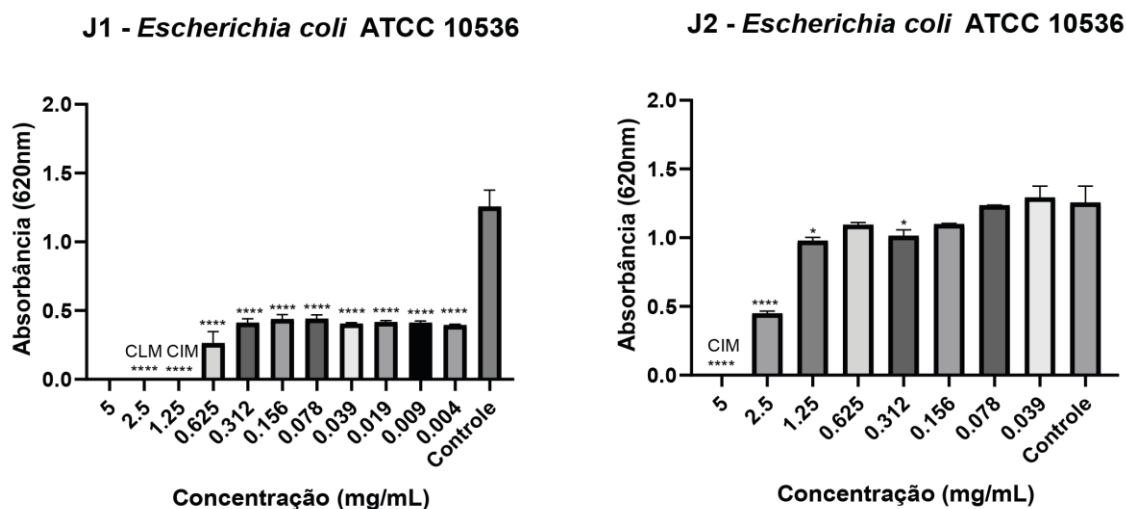
Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de ****p < 0,0001 quando comparados ao controle.

Fonte: própria (2024).

Figura 40 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3 e J-4 sobre cepas de *S. cholerasuis* ATCC 14028



Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de **** $p < 0,0001$ quando comparados ao controle.
Fonte: própria (2024).

Figura 41 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1 e J-2 sobre cepas de *E. coli* ATCC 10536

Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de ****p < 0,0001 quando comparados ao controle.

Fonte: própria (2024).

A partir da inspeção visual do crescimento microbiano em meio de cultura contendo as frações e as bactérias Gram negativo (*P. aeruginosa* ATCC 10226; *S. choleraesuis* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 10536), foi possível a determinação do CIM.

Nos estudos de Gustafson *et al.* (1998) foram observados que bactérias Gram negativo, quando em contato com substâncias lipofílicas, como os terpenos, sofriam perda do material celular devido à solubilização da membrana com características lipídicas e à coagulação dos seus constituintes citoplasmáticos. Já os estudos de Cox *et al.* (2000) observaram que os terpenos favoreciam na perda de íons potássio e na inibição da respiração celular e, devido a isso, promove a sua ação bactericida, corroborando com os dados presentes nesta tese.

Os resultados encontrados para J-2 sobre cepas de *P. aeruginosa* ATCC 10226 favorecem no maior empenho para o desenvolvimento de pesquisas nessa temática, uma vez que esse microrganismo apresenta elevada incidência de resistência, mas, nos ensaios de CIM e CLM, obteve um efeito bacteriostático e bactericida elevado. Algumas explicações para esse fenômeno podem ser elencadas, como por exemplo, a necessidade de um meio com moléculas hidrofílicas capazes de interagir por interações do tipo dipolo-dipolo, com proteínas e carboidratos de membrana que favorecem a inserção dos constituintes apolares com maior atividade antimicrobiana (Saad; Muller; Lobstein, 2013).

A fração J-2 apresenta na sua composição tanto moléculas apolares como o estigmasterol e γ -sitosterol e moléculas polares, como a isoflavanona, a 3,7-diidrox-3-fenil-4-cromanona, onde tal combinação pode ter favorecido nesse excelente resultado. Grupos polares

como álcoois (-OH) ligados a moléculas altamente lipofílicas, como o estigmasterol e o γ -sitosterol, podem interagir com os grupos polares de membrana, como também funcionar como doadores de próton, influenciando no pH intracelular e promovendo sua ação antimicrobiana (Kalemba; Kunicka, 2003).

5.7.3 Concentrações inibitórias e letais mínimas (CIM e CLM) sobre bactérias Gram positivo

A fração J-1 apresentou boa atividade antimicrobiana sobre cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, conforme observado no CIM e no CLM. Já a fração J-2 teve excelente atividade antimicrobiana com potencial bacteriostático e bactericida em baixas concentrações, principalmente sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923, conforme apresentado no CIM e no CLM. J-3, por sua vez, apresentou moderada atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 12228, com potencial bacteriostático e bactericida em baixas concentrações, conforme apresentado no CIM e no CLM. Todos os dados podem ser observados nas tabelas 8, 9 e 10 e nas figuras 42, 43 e 44.

Tabela 8 – Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *S. aureus* ATCC 6538

FRAÇÕES	CEPAS	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
J-1	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	2,5	2,5
J-2		1,25	1,25
J-3		1,25	1,25
J-4		-	-
J-5		-	-

Fonte: própria (2024).

Tabela 9 - Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923

FRAÇÕES	CEPAS	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
J-1	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,625	0,625
J-2		0,312	0,312
J-3		1,25	1,25
J-4		5,0	5,0
J-5		-	-

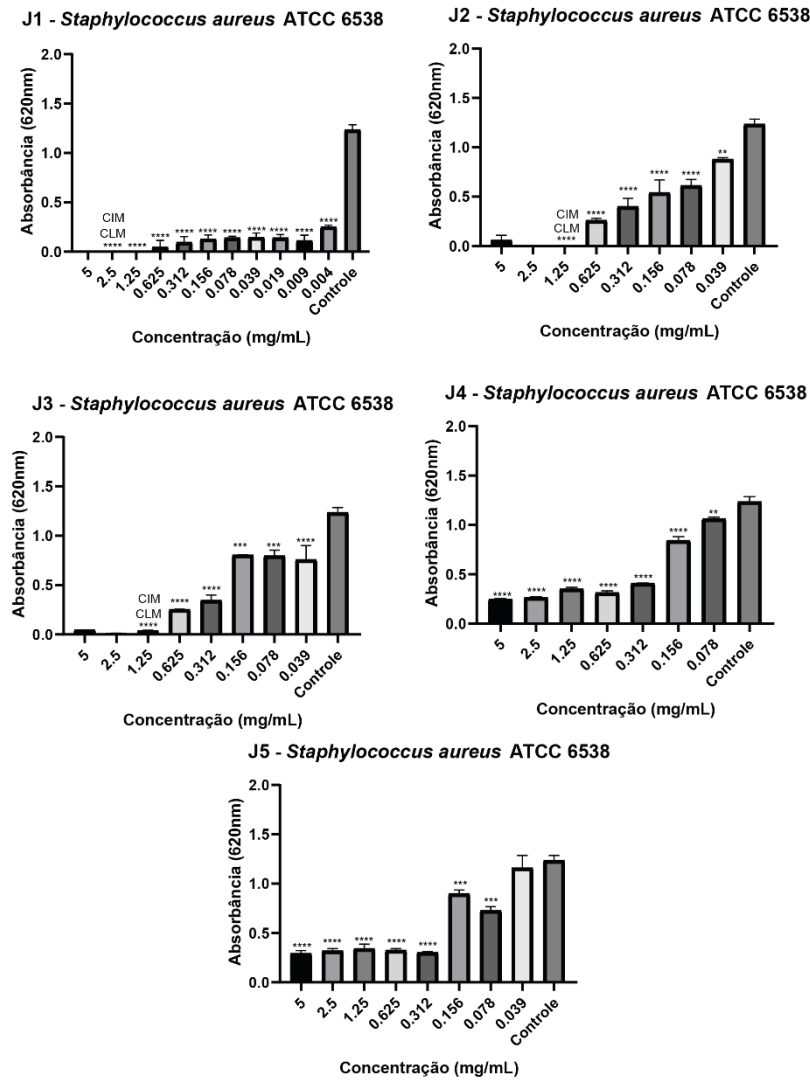
Fonte: própria (2024).

Tabela 10 - Avaliação das CIM e CLM para as frações J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228

FRAÇÕES	CEPAS	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
J-1	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,312	1,25
J-2		0,625	0,625
J-3		1,25	1,25
J-4		2,5	5,0
J-5		5,0	5,0

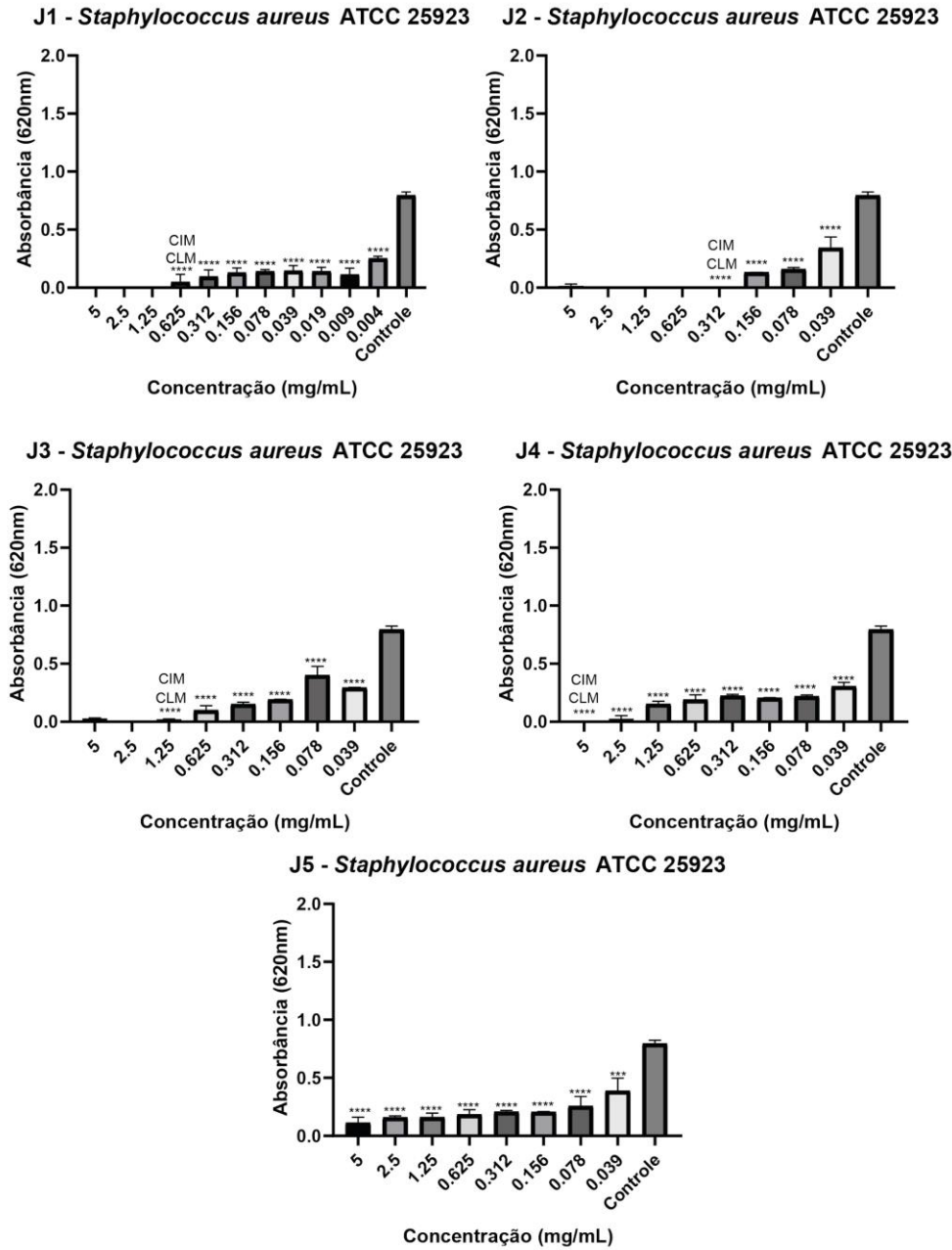
Fonte: própria (2024).

Figura 42 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *S. aureus* ATCC 6538



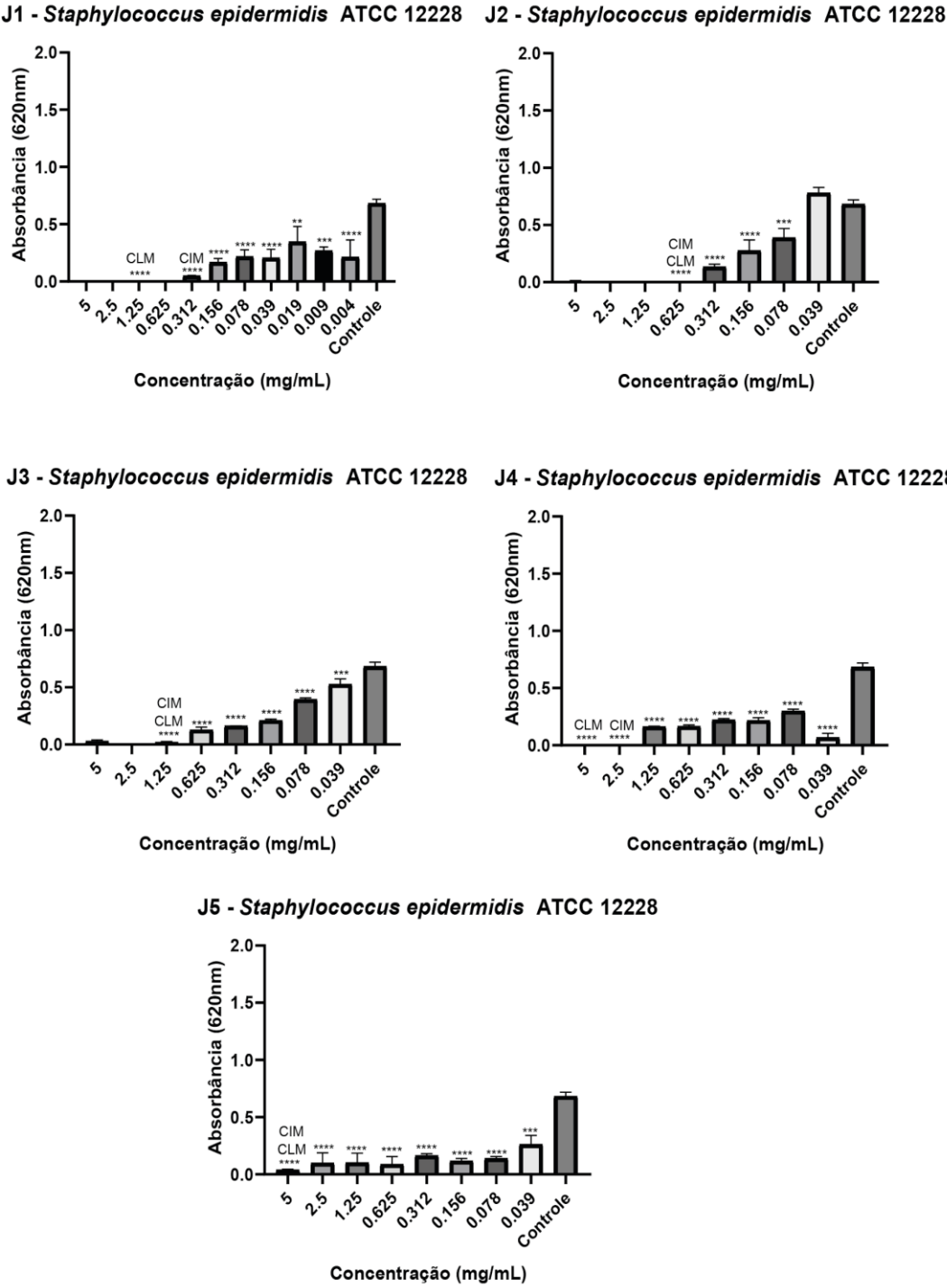
Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de ****p < 0,0001 quando comparados ao controle.
Fonte: própria (2024).

Figura 43 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923



Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de **** $p < 0,0001$ quando comparados ao controle.
Fonte: própria (2024).

Figura 44 – Avaliação da atividade antimicrobiana de J-1; J-2; J-3; J-4 e J-5 sobre cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228



Controle: meio de cultura + microrganismo. Análise realizada por ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de ****p < 0,0001 quando comparados ao controle.
Fonte: própria (2024).

A partir da inspeção visual do crescimento microbiano, em meio de cultura contendo as frações e as bactérias Gram positivo (*S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228), foi possível a determinação do CIM. Os diferentes resultados encontrados para a mesma espécie, ao se utilizar da mesma fração, como no caso das CIM e CLM de J-1 e J-2 sobre *S. aureus* 6538 e 25923, podem ser atribuídos à resistência que cada linhagem adquiriu de forma particular (Dos santos *et al.* 2007).

Pode-se perceber que, quando comparados os resultados entre microrganismos Gram negativo e Gram positivo, este teve uma maior susceptibilidade quando expostos a J-1 e J-2. Mangena e Muyima (1999) observaram que bactérias Gram positiva são mais sensíveis, após serem expostas em meios ricos em terpenos, quando comparados às bactérias Gram negativo, tal fato pode ser observado pelo dimensionamento do cromatograma de J-1, o qual apresenta um sinal para a taraxerona mais acentuado que os seus demais constituintes, como também de J-2.

A simplicidade estrutural da parede celular bacteriana das Gram positivo pode explicar a diferença de sensibilidade, uma vez que as substâncias testadas têm uma maior facilidade de penetração nas suas células (Dos santos *et al.* 2007).

5.7.4 Avaliação do efeito modulador das FEECBP sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico

Os ensaios de avaliação do efeito modulador foram realizados com as frações J1, J2 e J3, pois apresentaram melhores efeitos antimicrobiano nos ensaios anteriormente realizados na determinação da CIM. Foram selecionadas cepas sobre as quais as frações apresentaram maior eficácia, priorizando-se uma espécie de cada gênero.

Para a fração J-1, foram testadas diferentes cepas (*S. aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* ATCC 12228; *S. choleraesuis* ATCC 14028; *E. coli* ATCC 10536; *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *P. aeruginosa* ATCC 10226) e foram constatadas 14 associações sinérgicas (S) (87,5%). Dentre esses, alguns foram capazes de diminuir, em até 16 vezes, a CIM de 4 ATB's (Cefalexina - CFX; Norfloxacin - NOR; Gentamicina - GENT e Polimixina - POLIMIX) sobre diferentes cepas (*S. aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* ATCC 12228; *S. choleraesuis* ATCC 14028; *E. coli* ATCC 10536; *P. aeruginosa* ATCC 10226). Também foram observadas 2 associações aditivas (A) (12,5%), que podem ser observados na tabela 11 e nas figuras 45 a 50.

Tabela 11 – Efeito modulador da fração J-1 sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico

CEPAS	ATB	[ATB]	CIM ATB	CIF J-1	CIF ATB	ICIF	EFEITO
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CFX	1,56	25	0,062	0,062	0,125	S(16x)
	AMP	1,56	6,25	0,250	0,250	0,499	S(4x)
	NOR	0,39	6,25	0,062	0,062	0,125	S(16x)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	CFX	0,39	6,25	0,250	0,062	0,312	S(16x)
	AMP	3,125	12,5	0,125	0,250	0,375	S(4x)
	NOR	0,781	3,125	0,125	0,250	0,375	S(4x)
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	CFX	3,125	12,5	0,062	0,250	0,312	S(4x)
	GENT	0,781	12,5	0,250	0,062	0,312	S(16x)
	NOR	0,195	0,78	0,250	0,250	0,500	S(4x)
<i>E. coli</i> ATCC 10536	CFX	1,56	25	0,062	0,062	0,125	S(16x)
	GENT	0,39	6,25	0,062	0,062	0,125	S(16x)
	NOR	0,097	0,78	0,125	0,124	0,249	S(8x)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10226	GENT	0,195	1,56	0,250	0,125	0,375	S(8x)
	POLIMIX	0,097	1,56	0,250	0,062	0,312	S(16x)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	ANFO	1,56	3,12	0,500	0,500	1,000	A(2x)
	FLU	25	50	0,500	0,500	1,000	A(2x)

CIM ATB: CIM dos antibióticos isolados (µg/mL); [ATB]: CIM dos antibióticos na associação (µg/mL);

CIF J-1 = [J-1]/CIM J-1; CIF ATB = [ATB]/CIM ATB; ICIF = CIF J-1 + CIF ATB;

ICIF ≤ 0,5 = Sinergismo(S); ICIF > 0,5 e < 1,0 = Aditivo(A) ou indiferente;

ICIF ≥ 1,0 = Antagonismo (ANT) (Eucast, 2003).

Fonte: própria (2024).

Figura 45 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para *S. aureus* ATCC 25923

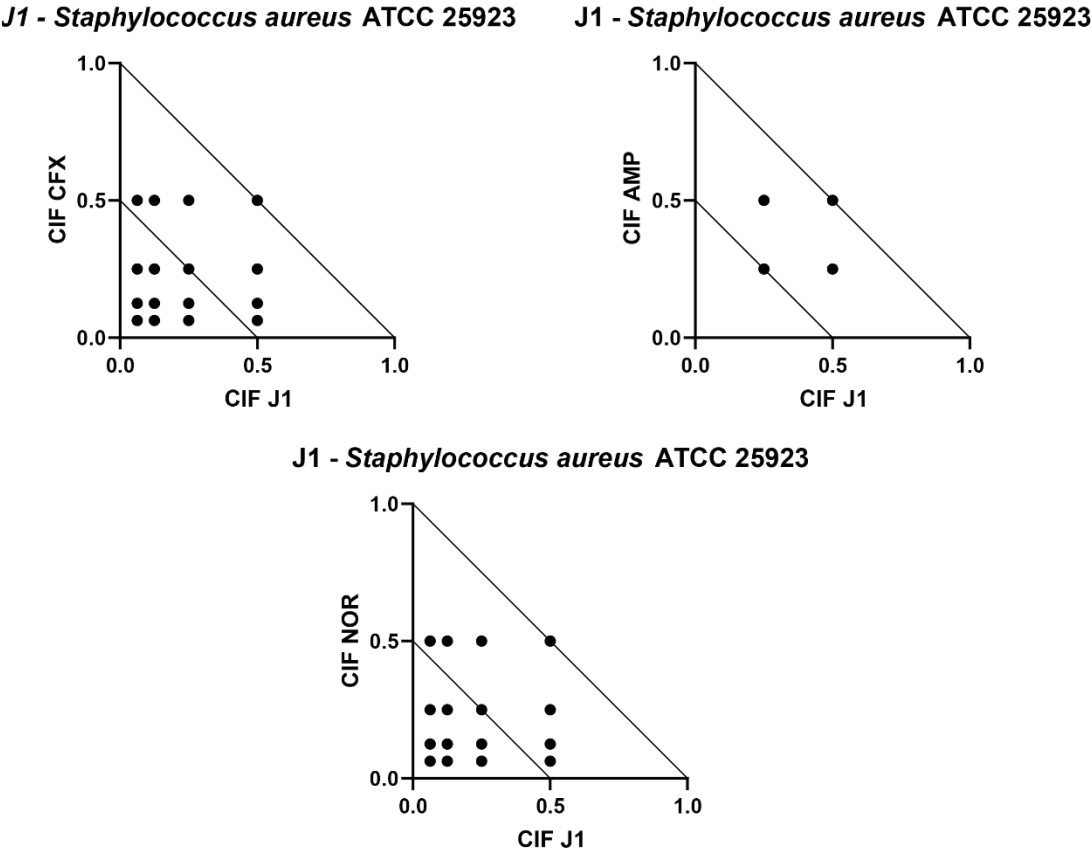
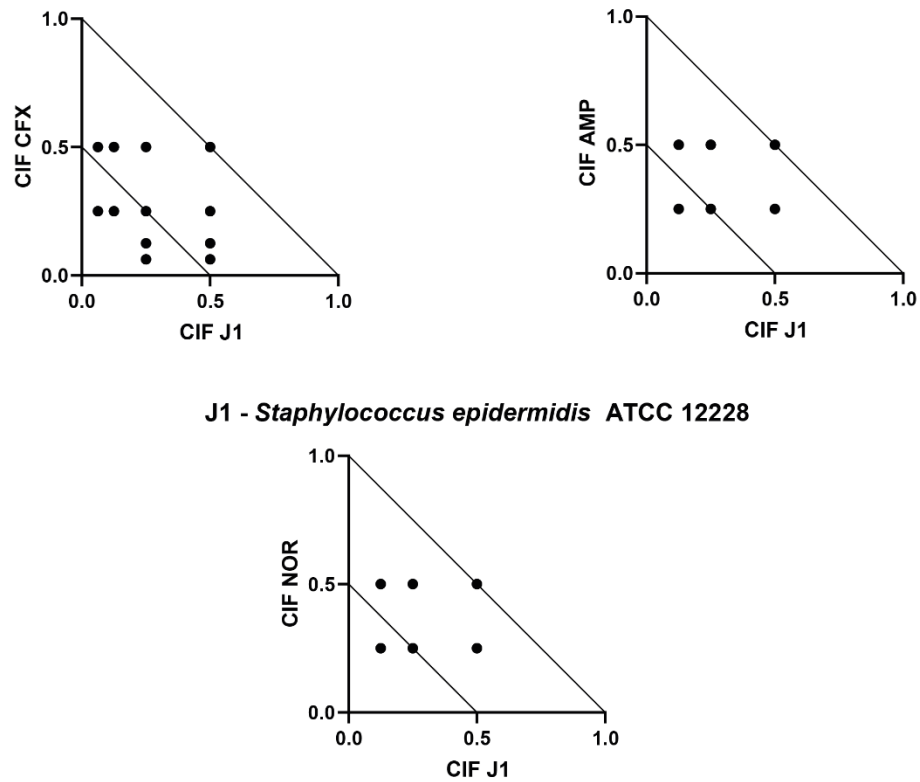
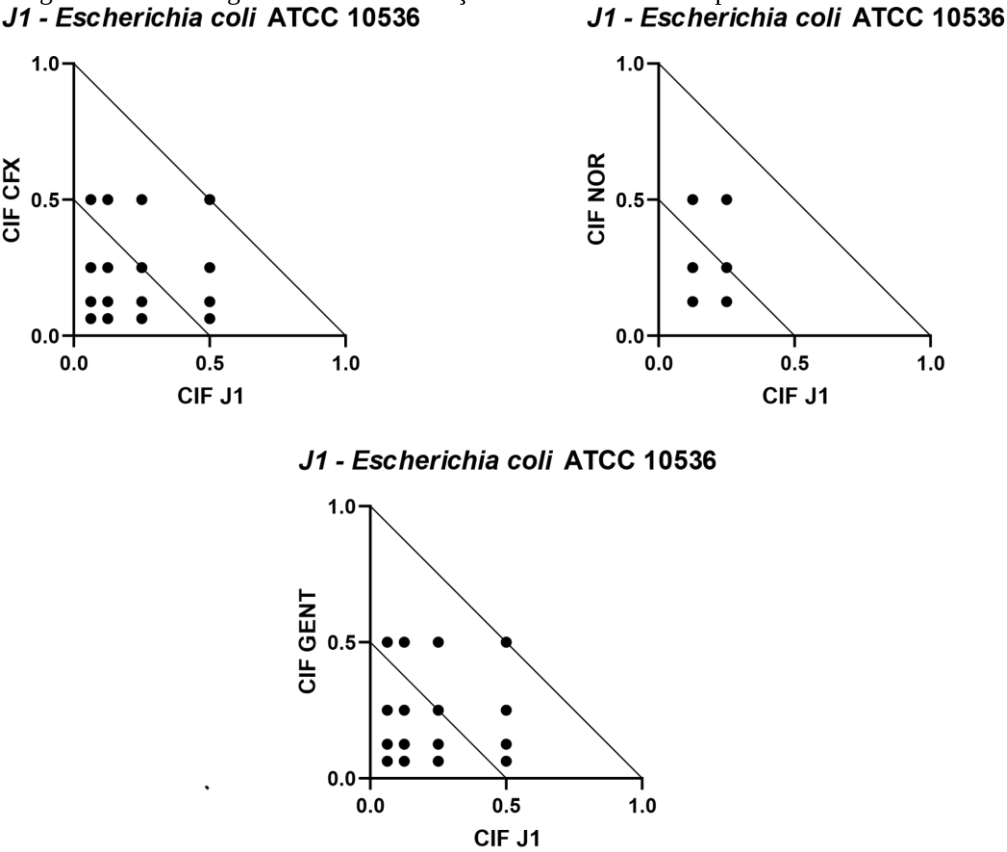


Figura 46 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para *S. epidermidis* ATCC 12228
J1 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 J1 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228



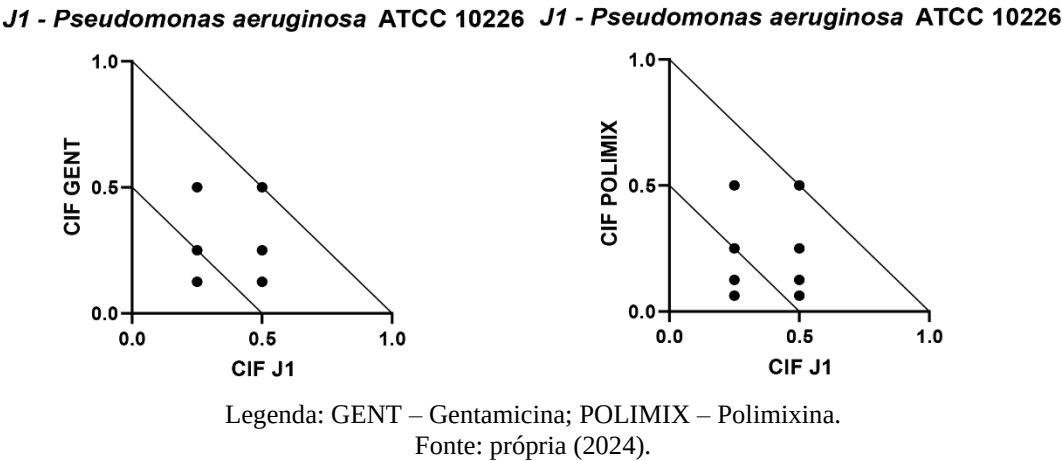
Legenda: CFX – Cefalexina; AMP – Ampicilina; NOR – Norfloxacino.
Fonte: própria (2024).

Figura 47 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para *E. coli* ATCC 10536



Legenda: CFX – Cefalexina; NOR – Norfloxacin; GENT – Gentamicina.
Fonte: própria (2024).

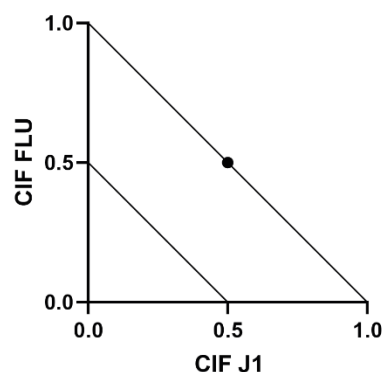
Figura 48 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para *P. aeruginosa* ATCC 10226



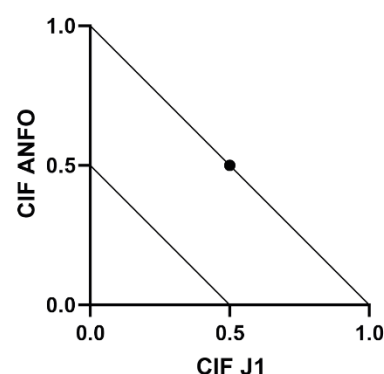
Legenda: GENT – Gentamicina; POLIMIX – Polimixina.
Fonte: própria (2024).

Figura 49 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para *C. parapsilosis* ATCC 22019

J1 - *Candida parapsilosis* ATCC 22019



J1 - *Candida parapsilosis* ATCC 22019

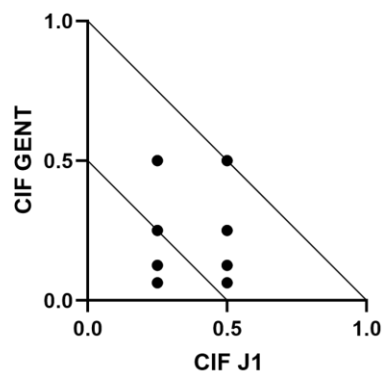


Legenda: FLU – Fluconazol; ANFO – Anfotericina.

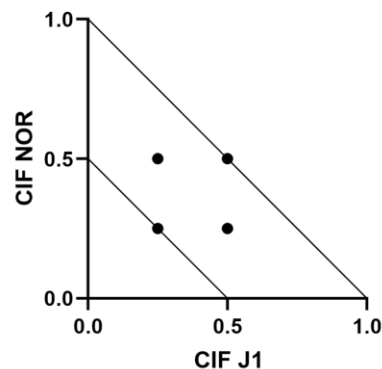
Fonte: própria (2024).

Figura 50 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-1 para *S. cholerasuis* ATCC 14028

J1 - *Salmonella cholerasuis* ATCC 14028



J1 - *Salmonella cholerasuis* ATCC 14028



Legenda: GENT – Gentamicina; NOR – Norfloxacino.

Fonte: própria (2024).

Para a fração de J-2, foram testadas diferentes cepas (*S. aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* ATCC 12228; *S. cholerasuis* ATCC 14028; *E. coli* ATCC 10536 e *C. parapsilosis* ATCC 22019) e foram constatadas 10 associações sinérgicos(S) (76,9%). Dentre esses, alguns foram capazes de diminuir, em até 16 vezes, a CIM de 2 ATB's (Cefalexina e Gentamicina) sobre diferentes cepas (*E. coli* ATCC 10536 e *S. aureus* ATCC 25923). Também foram observadas 3 associações aditivas(A) (23,1%), que podem ser observados na tabela 12 e nas figuras 51 e 52.

Tabela 12 – Efeito modulador da fração J-2 sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico

CEPAS	ATB	[ATB]	CIM ATB	CIF J-2	CIF ATB	ICIF	EFEITO
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CFX	1,56	25	0,063	0,062	0,125	S(16x)
	AMP	1,56	6,25	0,500	0,250	0,750	A(4x)
	NOR	1,56	6,25	0,250	0,250	0,500	S(4x)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	CFX	0,781	6,25	0,125	0,125	0,250	S(8x)
	AMP	3,125	12,5	0,125	0,250	0,375	S(4x)
	NOR	0,781	3,125	0,125	0,250	0,375	S(4x)
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	CFX	3,125	12,5	0,062	0,250	0,312	S(4x)
	GENT	0,781	12,5	0,250	0,062	0,312	S(16x)
<i>E. coli</i> ATCC 10536	CFX	1,56	25	0,062	0,062	0,125	S(16x)
	GENT	0,39	6,25	0,062	0,062	0,125	S(16x)
	NOR	0,097	0,78	0,062	0,124	0,187	S(8x)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	ANFO	0,39	3,12	0,500	0,125	0,625	A(8x)
	FLU	12,5	50	0,500	0,250	0,750	A(4x)

CIM ATB: CIM dos antibióticos isolados (µg/mL); [ATB]: CIM dos antibióticos na associação (µg/mL);

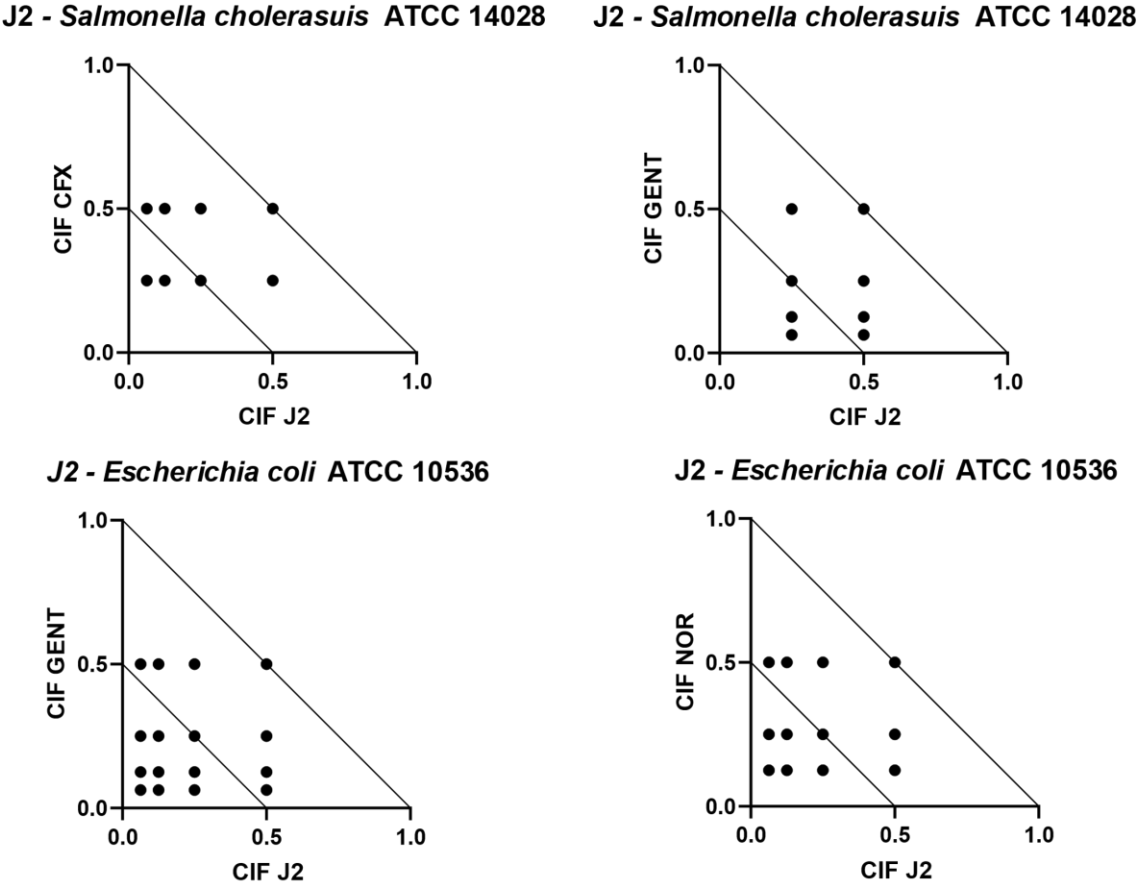
CIF J-2 = [J-2]/CIM J-2; CIF ATB = [ATB]/CIM ATB; ICIF = CIF J-2 + CIF ATB;

ICIF ≤ 0,5 = Sinergismo(S); ICIF > 0,5 e < 1,0 = Aditivo(A) ou indiferente;

ICIF ≥ 1,0 = Antagonismo (ANT) (Eucast, 2003).

Fonte: própria (2024).

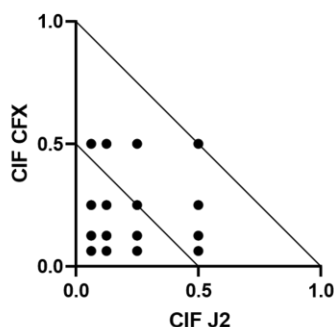
Figura 51 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-2 para *S. cholerasuis* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 10536



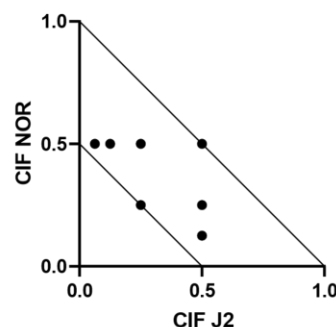
Legenda: CFX – Cefalexina; GENT – Gentamicina; NOR – Norfloxacino.
Fonte: própria (2024).

Figura 52 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-2 para *S. aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* ATCC 12228 e *C. parapsilosis* ATCC 22019

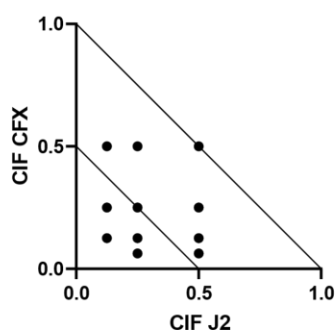
J2 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



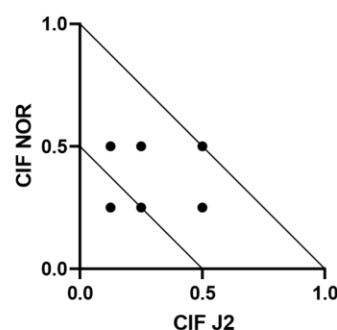
J2 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



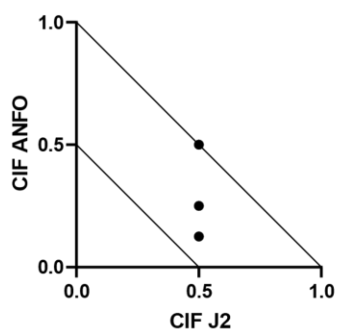
J2 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228



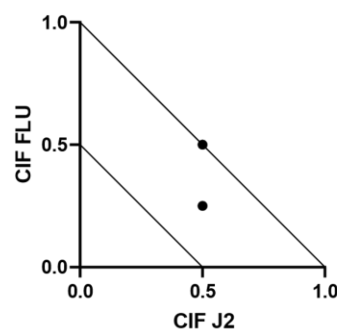
J2 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228



J2 - *Candida parapsilosis* ATCC 22019



J2 - *Candida parapsilosis* ATCC 22019



Legenda: CFX – Cefalexina; NOR – Norfloxacin; ANFO – Anfotericina; FLU – Fluconazol.

Fonte: própria (2024).

Para a fração de J-3, foram testadas diferentes cepas (*S. aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* ATCC 12228; *S. cholerasuis* ATCC 14028; *C. parapsilosis* ATCC 22019; *C. albicans* ATCC 10231; *C. krusei* ATCC 6258 e *P. aeruginosa* ATCC 10226) sendo constatadas 5 associações sinérgicas(S) (35,7%). Dentre esses, alguns capazes de diminuir, em até 16 vezes, a CIM de 1 ATB (Cefalexina) em diferentes cepas (*S. aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. cholerasuis* ATCC 14028); e 8 associações aditivas(A) (64,3%), que podem ser observadas na tabela 13 e na figura 53.

Tabela 13 – Efeito modulador da fração J-3 sobre a ação de antimicrobianos de uso clínico

CEPAS	ATB	[ATB]	CIM ATB	CIF J-3	CIF ATB	ICIF ATB	EFEITO
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CFX	1,56	25	0,062	0,062	0,125	S(16x)
	AMP	-	-	-	-	-	-
	NOR	3,125	6,25	0,062	0,500	0,562	A(2x)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	CFX	1,56	6,25	0,062	0,250	0,312	S(4x)
	AMP	3,125	12,5	0,500	0,250	0,750	A(8x)
	NOR	0,39	3,125	0,500	0,125	0,625	A(8x)
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	CFX	3,125	12,5	0,125	0,250	0,375	S(4x)
	GENT	3,125	12,5	0,250	0,250	0,500	S(4x)
	NOR	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i> ATCC 10536	ANFO	0,195	3,12	0,500	0,063	0,563	A(16x)
	FLU	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10226	GENT	-	-	-	-	-	-
	POLIMIX	0,39	1,56	0,250	0,250	0,500	S(4x)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	ANFO	0,39	6,25	0,500	0,063	0,563	A(16x)
	FLU	3,125	50	0,500	0,063	0,563	A(16x)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	ANFO	0,195	3,12	0,500	0,063	0,563	A(16x)
	FLU	3,125	50	0,500	0,063	0,563	A(16x)

CIM ATB: CIM dos antibióticos isolados (µg/mL); [ATB]: CIM dos antibióticos na associação (µg/mL);

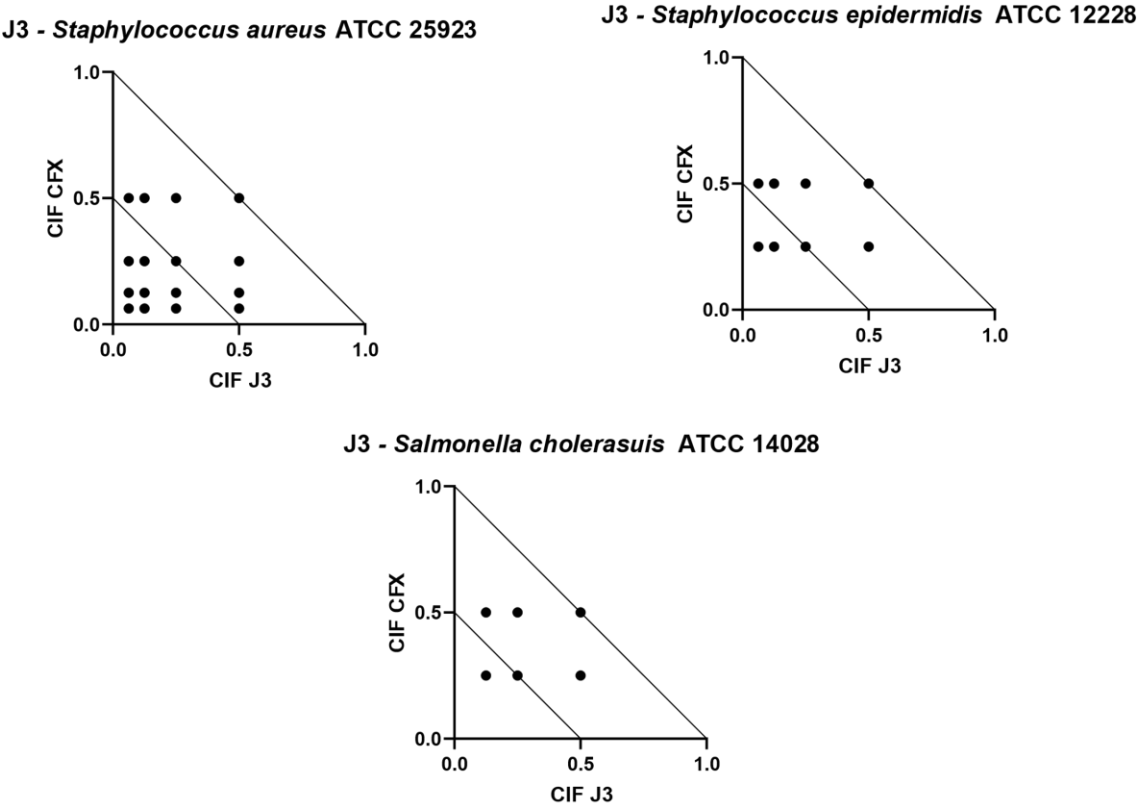
CIF J-3 = [J-3]/CIM J-3; CIF ATB = [ATB]/CIM ATB; ICIF = CIF J-3 + CIF ATB;

ICIF ≤ 0,5 = Sinergismo(S); ICIF > 0,5 e < 1,0 = Aditivo(A) ou indiferente;

ICIF ≥ 1,0 = Antagonismo (ANT) (Eucast, 2003).

Fonte: própria (2024).

Figura 53 – Isobologramas com a correlação CIF ATB x CIF J-3 para *S. aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. cholerasuis* ATCC 14028



Legenda: CFX – Cefalexina
Fonte: própria (2024).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou a identificação de parâmetros anatômicos e histoquímicos para a diagnose da espécie *B. pulchella*, uma vez que, diferentes representantes do gênero *Bauhinia* são recomendados no ReniSUS, devido ao seu potencial medicinal.

Na avaliação em microscopia de luz, houve a identificação e caracterização anatômica do caule, pecíolo e lâmina foliar, o que evidenciou características de diferenciação – tais como o formato do caule; a ausência de colênquima e a organização dos feixes vasculares no pecíolo; tipificação de estômatos; presença e ausência de tricomas glandulares e não-glandulares na lâmina foliar; ausência de cristais prismáticos ou drusas tanto no caule como no pecíolo e na lâmina foliar – que se configuram como sendo achados essenciais, que corroboram com os dados registrados na literatura sobre a espécie estudada.

Através da análise histoquímica, evidenciou-se alcaloides, compostos fenólicos, compostos lipofílicos e lignina na espécie. Com isso, esse estudo contribuiu para padronização farmacobotânica da espécie *B. pulchella*, a fim de evidenciar e corroborar com o já descrito para o gênero *Bauhinia* na literatura científica e auxiliar na diferenciação das espécies através da anatomia, uma vez que, características morfológicas externas se assemelham como, por exemplo, a lâmina foliar.

Na fração J-1 de FEECBP, foram evidenciados como constituintes majoritários através de CG-EM: taraxerona e sitosterona e em J-2 γ -sitosterol; estigmasterol e 3,7-diidroxi-3-fenil-4-cromanona.

No teste MTT foi possível definir a faixa de trabalho para os ensaios anti-inflamatórios e microbiológicos, que foram: J-1 (125; 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$) e J-2 (62,5; 31,25 e 15,625 $\mu\text{g/mL}$). Houve redução significativa nos níveis de óxido nítrico, TNF- α e TGF- β para ambas as frações.

A fração J-1 teve melhores resultados bacteriostáticos contra cepas do gênero *Candida* e *S. epidermidis* ATCC 12228 e bactericidas contra cepas do gênero *Candida*. Já J-2 teve melhores resultados bacteriostáticos contra *P. aeruginosa* ATCC 10226 e *S. choleraesuis* ATCC 14028 e bactericidas contra *P. aeruginosa* ATCC 10226, cepas do gênero *Candida* e *S. aureus* ATCC 25923.

Foi constatado efeito sinérgico com o aumento do potencial antimicrobiano em 16x para J-1, quando administrado concomitantemente com o uso de fármacos (Cefalexina; Norfloxacin; Gentamicina e Polimixina) em diferentes cepas (*S. aureus* ATCC 25923; *S.*

epidermidis ATCC 12228; *S. choleraesuis* ATCC 14028; *E. coli* ATCC 10536; *P. aeruginosa* ATCC 10226). Para J-2, o efeito sinérgico observado foi o aumento do potencial antimicrobiano em 16x quando administrado concomitantemente com o uso de fármacos (Cefalexina e Gentamicina) em diferentes cepas (*E. coli* ATCC 10536 e *S. aureus* ATCC 25923).

Não houve resultados expressivos para J-4 e J-5, devido a sua baixa solubilidade no veículo utilizado (Tween 80 0,5%). Por todo o exposto, pode-se perceber que a espécie *B. pulchella* possui uma fonte potencial de pesquisa nas áreas anti-inflamatórias e antimicrobiana, assim como possui um extenso trabalho a ser realizado na caracterização anatômica e histoquímica em todo o gênero e que tal trabalho colaborou nessa temática de forma inédita.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.J.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 536 p, 2015.
- ABDEL-HASSAN, I.A.; ABDEL-BARRY, J.A.; MOHAMMEDA, S.T. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 9, p. 325-330, 2000.
- AGUIAR, L.C.G.G.; BARROS, R.F.M. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 3, p. 419-434, 2012.
- AGUIAR, T.W.A.; BATISTA, J.J.; FERREIRA, S.A.O.; SAMPAIO, M.V.L.; PEREIRA, D.R.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; MELO, A.M.M.A.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; AIRES, A.L.; ARAÚJO, H.D.A.; COELHO, L.C.B.B. Effect of *Bauhinia monandra* Kurz Leaf Preparations on Embryonic Stages and Adult Snails of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Schistosoma mansoni* Cercariae and Toxicity in *Artemia salina*. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4993, 2022.
- AHMED, A.S.; ELGORASHI, E.E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J.N. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 826-839, 2012.
- ALAWODE, T.T.; LAJIDE, L.; OLALEYE, M.; OWOLABI, B. Stigmasterol and β -Sitosterol: Antimicrobial Compounds in the Leaves of *Icacina trichantha* identified by GC-MS. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 10, n. 80, 2021.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 450-513, 2013.
- ALVES, E.P.; LIMA, R.F.; DE ALMEIDA, C.M.; FREIRES, I.A.; ROSALEN, P.L.; RUIZ, A.L.T.G.; GRANVILLE-GARCIA, A.F.; GODOY, G.P.; PEREIRA, J.V.; COSTA, E.M.M.B. Antimicrobial and antiproliferative activity of *Bauhinia forficata* link and *Cnidocolus quercifolius* extracts commonly used in folk medicine. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 18, n. 8, p. 635-640, 2017.
- ANTUNES, M. N.; PEREIRA, F. R.; LEITÃO, C. A. E. Structural Characterization of the leaf of *Bauhinia monandra* Kurz (Fabaceae - Cercidoideae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, e21200618, 2021.
- BAKSHI, A.; SHARMA, N.; NAGPAL, A.K. Comparative evaluation of in vitro antioxidant and antidiabetic potential of five ethnomedicinal plant species from Punjab, India. **South African Journal of Botany**, v. 150, p. 478-487, 2022.
- BALAMURUGAN, R.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, n. (1-3), p. 410-418, 2011.

BANKS, H.; FOREST, F.; LEWIS, G. Palynological contribution to the systematics and taxonomy of *Bauhinia* s.l. (Leguminosae: Cercideae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 219–226, 2013.

BARON, E.J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**, St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 415 p, 1994.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BELL, V.; PEREIRA, A.L.; PITA, J.R. The reception of penicillin in Portugal during World War II: cooperation with Brazil and the United States of America. **Debater a Europa**, v. 13, p. 143-157, 2015.

BFG. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** v. 66, p. 1085-1113, 2015.

BOUIC, P.J.D.; LAMPRECHT, J.H. Plant sterol and sterolins: A review of their immune-modulating properties. **Alternative Medicine Review**, v. 4, p. 170-177, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009.

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

<http://www.medlearn.com.br/ministerio_saude/atencao_basica/cadernos_atencao_basica_31_praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_fitoterapia.pdf>. Acesso em: 20 jan 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 69, de 8 de dezembro de 2014**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3637364/RDC_69_2014_.pdf/4e1c3d6d-120f-4801-b06f-cff4b242bbd0. Acesso em: 01 ago 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Instrução Normativa nº 130, de 30 de março de 2022**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022a. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6415119/%281%29IN_130_2022_COMP.pdf/71bfb1dc-0114-41d5-9618-3de3ca7ba467. Acesso em: 01 jun 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022b.

BRIDSON, D.; FORMAN, L. **The Herbarium Handbook**. 3. ed. Royal Botanic Gardens, Kew, 346 p, 2010.

BRITO, S.C.D.; RODRIGUES, W. Avaliação do marco regulatório na produção de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista de Políticas Públicas**, v. 19, n. 2, p. 531-538, 2015.

BUCHALLA, C. M.; WALDMAN, E. A.; LAURENTI, R. A mortalidade por doenças infecciosas no início e no final do século XX no Município de São Paulo. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, n. 4, p. 335-344, 2003.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61 n. 8, p. 255, 1972.

CARVALHO, J. L. de. **Estudo químico e biológico de *Bauhinia pulchella* Benth.** (Mestrado em Química) Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2014.

CARVALHO, A.A.; DOS SANTOS, L.R.; DE FARIAS, R.R.S.; CHAVES, M.H.; FEITOSA, C.M.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; DE ARAÚJO, M.R.S.; FERREIRA, P.M.P.; PESSOA, C.O. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*, **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 405–411, 2018.

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

CHANDRAKER, S.K.; GHOSH, M.K.; PARSANT.; TIWARI, A.; GHORAI, T.K.; SHUKLA, R. Efficient sensing of heavy metals (Hg²⁺ and Fe³⁺) and hydrogen peroxide from *Bauhinia variegata* L. fabricated silver nanoparticles. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 146, p. 110173-110180, 2022.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.

CLSI, C.A.L.S.I. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**, 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA, 2017

CLSI, C.A.L.S.I. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 12 th ed. CLSI standard M07, v. 44, n. 10. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIC, S.G. The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 188-192, 2000

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Nova York: Columbia University Press, 1262 p, 1981.

DA SILVA, K. L.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; & CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 5–6, p. 478–480, 2000.

DA SILVA, K.L.; CECHINEL-FILHO, V. (2002). Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

DA SILVA, H.C.; MONTEIRO, A.O.; ALMEIDA-NETO, F.W.Q.; MARINHO, E.M.; FERREIRA, M.K.A.; MENDES, F.R.S.; MARINHO, E.S.; MARINHO, M.M.; BEZERRA, L.L.; DA ROCHA, M.N.; DE MENEZES, J.E.S.A.; TEIXEIRA, A.M.R.; DA SILVA, A.W.; REBOUÇAS, E.L.; PINTO, F.C.L.; DOS SANTOS, H.S.; SANTIAGO, G.M.P. Hypoglycemic and hepatoprotective effects in adult zebrafish (*Danio rerio*) of fisetinidol isolated from *Bauhinia pentandra*: In vivo and in silico assays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 6, p. 2274–2288, 2023.

DAHLGREN, R. A revised system of classification of the angiosperms. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 80, n. 2, p. 91–124, 1980.

DE SOUZA, B.V.C.; SOUSA, M.M.; SATTLER, J.A.G.; SANTANA, A.C.S.G.V.; DE CARVALHO, R.B.F.; NETO, J.S.L.; BORGES, F.M.; NUMA, I.A.N.; RIBEIRO, A.B.; NUNES, L.C.C. Nanoencapsulation and bioaccessibility of polyphenols of aqueous extracts from *Bauhinia forficata* link. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, p. 100144, 2022.

DE SOUZA, A.J.B.; OCAMPOS, F.M.M.; PULGROSSI, R.C.; DOKKEDAL, A.L.; COLNAGO, L.A.; CECHIN, I.; SALDANHA, L.L. NMR-Based Metabolomics Reveals Effects of Water Stress in the Primary and Specialized Metabolisms of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae). **Metabolites**, v. 13, n. 3, p. 381, 2023.

DEWANGAN, A.; MALLICK, A. Multi-objective optimization of performance and emission characteristics of diesel engine fueled with *Bauhinia variegata* biodiesel using hybrid approach. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, p. 12395-12410, 2022.

DOS SANTOS, L. S.; SANTOS, D. O.; DE FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423. 2007.

DUARTE, M.R.; DEBUR, M.C. Caracteres morfo-anatômicos de folha e caule de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 7-15, 2003.

EAWSAKUL, K.; ONGTANASUP, T.; NGAMDOKMAI, N.; BUNLUEPUECH, K. Alpha-glucosidase inhibitory activities of astilbin contained in *Bauhinia strychnifolia* Craib. stems: an investigation by in silico and in vitro studies. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 1-15, 2023.

ELBANNA, A.H.; MAHROUS, EA-H.; KHALEEL, AE-S.; EL-ALFY, T.S. Morphological and anatomical features of *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott. grown in Egypt. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 12, p. 84-93, 2016.

ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí – RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 121-128, 2011.

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agentes by broth dilution. **Clinical Microbiology Journal**, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2003.

FARUQUE, M.O.; ANKHI, U.R.; KAMARUZZAMAN, M.; BARLOW, J.W.; ZHOU, B.; HAO, J.; YANG, X.; & HU, X. Chemical composition and antimicrobial activity of *Congea tomentosa*, an ethnomedicinal plant from Bangladesh. **Industrial Crops and Products**, v. 141, 111745, 2019.

FERREIRA, J. L. P.; VELASCO, E.; PAULA, A.E.S.; ARAÚJO, R.B.; PACHECO, J.M. Anatomia foliar de *Bauhinia blakeana* Dunn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13, suppl 1, p. 11-14, 2003.

GASPARINI, P.; GAROFOLO, I.C.; TELLES, M.M.; OYAMA, L.M.; VENEZA, V.M.; MOURA VEIGA, T.A.; FLOR SILVEIRA, V.L.; CAPERUTO, L.C. *Bauhinia forficata* link extract attenuates insulin resistance by preserving glucose uptake in gastrocnemius muscle. **Natural Product Research**, v. 37, n. 12, p. 2031–2036, 2023.

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

GRYGIER, A.; CHAKRADHARI, S.; RATUSZ, K.; RUDZIŃSKA, M.; PATEL, K. S.; LAZDIŃA, D.; GÓRNAŚ, P. Seven underutilized species of the Fabaceae family with high potential for industrial application as alternative sources of oil and lipophilic bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 186, 115251, 2022.

GRYGIER, A.; CHAKRADHARI, S.; RATUSZ, K.; RUDZIŃSKA, M.; PATEL, K.S.; LAZDIŃA, D.; SEGLIŃA, D.; GÓRNAŚ, P. Evaluation of Selected Medicinal, Timber and Ornamental Legume Species' Seed Oils as Sources of Bioactive Lipophilic Compounds. **Molecules**, v. 28, n. 10, p. 3994-4009, 2023.

GUDAVALLI, D.; PANDEY, K.; EDE, V.G.; SABLE, D.; GHAGARE, A.S.; KATE, A. S. Phytochemistry and pharmacological activities of five species of *Bauhinia* genus: A review. **Fitoterapia**, v. 174, 105830, 2024.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; WYLLIC, S.G.; WARMINGTON, J.R. Effects of tea tree oils on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 194-198, 1998.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C.R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

HUANG, M.; LI, ZI-XI.; CHEN, J.; CHEN, L.; LI, YUAN-YUAN. Extracts of *Bauhinia championii* Alleviate Acute Neuronal Injury After Ischemic Reperfusion by Improving Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Neuronal Apoptosis. **Current Medical Science**, v. 42, n. 3, p. 483–490, 2022.

ISLAM, M.M.; ALAM, R.; CHUNG, H.-J.; EMON, N.U.; FAZLUL KABIR, M.; RUDRA, S.; ALAM, S.; ULLAH, A.; HONG, S.-T.; AKTAR SAYEED, M. Chemical, Pharmacological and Computerized Molecular Analysis of Stem's Extracts of *Bauhinia scandens* L. Provide Insights into the Management of Diarrheal and Microbial Infections. **Nutrients**, v. 14, n. 2, p. 265, 2022.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry, principles and practice**. San Francisco: W.H Freeman and Company, 408 p, 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 523 p, 1940.

JOSHI, S.; RAI, N.; KUMAR, N. Gas chromatography-mass spectroscopy analysis of phytochemical constituents of methanolic extract of needles of *Pinus wallichiana*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 2, p. 55–57, 2016.

JUNG, E.P.; DE FREITAS, B.P.; KUNIGAMI, C.N.; MOREIRA, D.L.; DE FIGUEIREDO, N.G.; RIBEIRO, L.O.; MOREIRA, R.F.A. *Bauhinia forficata* Link Infusions: Chemical and Bioactivity of Volatile and Non-Volatile Fractions. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5415, 2022.

KALEMBA, D.A.A.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KAMAL, Y.; KHAN, T.; FATIMA, N.; SHAHZADI, I.; UL-HAQ, I.; ANAYA-EUGENIO, G. D.; ARELLANO, E.D.S.; BASHIR, K.; DE BLANCO, E.J.C. Assessment of Cytotoxic potential of newly isolated Betulinic triterpenes from the Bark of *Bauhinia variegata* Linn. (Caesalpiniaceae). **South African Journal of Botany**, v. 159, p. 419–424, 2023.

KANCHANASIN, P.; YUKI, M.; KUDO, T.; OHKUMA, M.; KUNCHAROEN, N.; PHONGSOPITANUN, W.; TANASUPAWAT, S. *Streptomyces bauhiniae* sp. Nov., isolated from tree bark of *Bauhinia variegata* Linn. in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 228–233, 2020.

KATZUNG, B. G.; (Org.). **Farmacologia básica e clínica**. 13 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 1202 p, 2017.

KIKUCHI, T.; ISHIIA, K.; OGIHARAA, E.; ZHANGA, J.; UKIYAA, M.; TOKUDAC, H.; IIDAD, T.; TANAKAB, R.; AKIHISA, T. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities, and anti-tumor-promoting effects of cyanogenated and oxygenated triterpenes. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 491-504, 2014.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico em métodos de morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 198 p, 1997.

KRAUTER, D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für Pflanzenschnitte. **Mikrokosmos**, v. 74, n. 8, p. 231–233, 1985.

- LIN, Y.; WONG, W.O.; SHI, G.; SHEN, S.; LI, Z. Bilobate leaves of *Bauhinia* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cercideae) from the middle Miocene of Fujian Province, southeastern China and their biogeographic implications Evolutionary developmental biology and morphology. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, 2015.
- LINO, C.D.; DIOGENES, J.P.L.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.P.G.; NETO, M.A.; ALVES, R.S.; DE QUEIROZ, M.G.R.; DE SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 125-127, 2004.
- LONG, H.; HUI, H.; WEIKAI, B.; BIN, H.; JIAN, L.; FANGLAN, L. Shifting soil nutrient stoichiometry with soil of variable rock fragment contents and different vegetation types. **Catena**, v. 220, Part. A, 106717, 2023.
- LOPES, S.G.; BARROS, L.B.G.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; COSTA JUNIOR, L.M. Effect of tanniniferous food from *Bauhinia pulchella* on pasture contamination with gastrointestinal nematodes from goats. **Parasites Vectors**, v. 9, n. 1, p. 102/1–102/7, 2016.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 542 p, 2002.
- LUSA, M.G.; BONA, C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 196-211, 2009.
- MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, n. 11, p. 2423-2426, 1974.
- MACE, M.E.; BELL, A.A.; STIPANOVIC, R.D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p. 10, p. 1297-1302, 1974.
- MANOHARAN, K.P.; BENNY, T.K.H.; YANG, D. Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2304–2308, 2005.
- MANGENA, T.; MUYIMA, N. Y. O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 291-296, 1999.
- MATIETA, V. Y.; MBAVENG, A.T.; NOUEMSI, G.R.S.; TANKEO, S.B.; KAMSU, G. T.; NAYIM, P.; LANNANG, A.M.; ÇELIK, İ.; EFFERTH, T.; KUETE, V. Cytotoxicity, acute and sub-chronic toxicities of the leaves of *Bauhinia thonningii* (Schumach.) Milne-Redh. (Caesalpinaceae). **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 1-20, 2023.
- MENG, H. H.; JACQUES, F. M. B.; SU, T.; HUANG, Y. J.; ZHANG, S.T.; MA, H. J.; ZHOU, Z.K. New Biogeographic insight into *Bauhinia* s.l. (Leguminosae): Integration from fossil records and molecular analyses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, 2014.

MONTEIRO, A. O.; CARVALHO, J. L.; DA SILVA, H. C.; NASCIMENTO, G. O.; SILVA, A. M. A.; TREVISAN, M. T. S.; SANTIAGO, G. M. P. *Bauhinia pulchella*: chemical constituents, antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities. **Natural Product Research**, v. 36, n. 6, p. 1–6, 2021.

MONTEIRO, A.O.; CARVALHO, J.L.; DA SILVA, H.C.; NASCIMENTO, G.O.; SILVA, A.M.A.; TREVISAN, M.T.S.; SANTIAGO, G.M.P. *Bauhinia pulchella*: chemical constituents, antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities. **Natural Product Research**, v. 36, n. 6, p. 1604–1609, 2022.

MORGAN, L.V.; PETRY, F.; SCATOLIN, M.; DE OLIVEIRA, P.V.; ALVES, B.O.; ZILLI, G.A.L.; VOLFE, C.R.B.; OLTRAMARI, A.R.; DE OLIVEIRA, D.; SCAPINELLO, J.; MULLER, L.G. Investigation of the anti-inflammatory effects of stigmasterol in mice: insight into its mechanism of action. **Behavioural Pharmacology**, v. 32, n. 8, p. 640–651, 2021.

MURUGESAN, S.; RAVICHANDRAN, D.; LAKSHAMANAN, D. K.; RAVICHANDRAN, G.; ARUMUGAM, V.; RAJU, K.; GEETHA, K.; THILAGAR, S. Evaluation of anti rheumatic activity of *Piper betle* L. (Betelvine) extract using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. **Bioorganic Chemistry**, v. 103, 104227, 2020.

NAKKALA, K.; LADDHA, K.S. Development of a validated high-performance thin-layer chromatography method for quantification of lupeol from different parts of *Bauhinia acuminata*. **Biomedical Chromatography**, v. 36, n. 10, e5448, 2022.

NEGI, B.S.; DAVE, B.P.; AGARWAL, Y.K. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bauhinia purpurea* Leaves Under In Vitro Conditions. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 360–365, 2012.

NILESH, G.; KONDALKAR, S.A.; ARYA, M.; BHARTHI, V.; PAUL, B.; OLIVEIRA, I.R.; SOUZA, T.F.M.P. Uso da *Bauhinia forficata* no tratamento da diabetes mellitus tipo 2. **Research Society and Development**, v. 11, n. 14, p. 1–9, 2022.

NOUEMSI, G.R.S.; JOUDA, J.B.; LEUTCHA, P.B.; MATIETA, V.Y.; TSAGUE TANKEU, V.F.; NGNOUZOUBA KUETE, J.R.; ÇELIK, İ.; KUETE, V.; SEWALD, N.; LANNANG, A.M. A new flavonol derivative and other compounds from the leaves of *Bauhinia thonningii* Schum with activity against multidrug-resistant bacteria. **Natural Product Research**, v. 37, n. 16, p. 2653–2661, 2023.

OLIVEIRA, I.R.; SOUZA, T.F.M.P. Uso da *Bauhinia forficata* no tratamento da diabetes mellitus tipo 2. **Society and Development Research**, v. 11, n. 14, e300111436252, 2022.

PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUNT, I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 191–197, 2002.

PEREIRA, L.B.S.; COSTA-SILVA, R.; FÉLEX, L.P.; AGRA, M.F. Leaf morphoanatomy of “mororó” (*Bauhinia* and *Schnella*, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 28, p. 383–392, 2018.

PESSOA, C.O. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*, **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 405–411, 2018.

PINE, S.H. **Organic chemistry**. 4 ed. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1187 p, 1987.

PINTO, I.S. **Eficácia de um flavonoide (fisetinidol) obtido do caule de *Bauhinia pulchella* e seu derivado semi-sintético (palmitato de fisetinidol) em um ensaio pré-clínico de periodontite em ratas**. 2019, Tese (Doutorado em Biotecnologia), Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará, Sobral.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. **Evolution and systematics of the leguminosae Part 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 425 p, 1981.

PRAPARATANA, R.; MALIYAM, P.; BARROWS, L.R.; PUTTARAK, P. Flavonoids and Phenols, the Potential Anti-Diabetic Compounds from *Bauhinia strychnifolia* Craib. **Stem. Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2393, 2022.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana (Brasil): Universidade Estadual de Feira de Santana, 443 p, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale. Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 808 p, 2012.

RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLOS, G.; PACILIO, M.; DI CARLOS, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sciences**, v. 68, p. 921-931, 2001.

REDDY, M. V. B. Isolation, characterization and structure elucidation of flavonoids from the root bark of *Bauhinia variegata* L. **Annals of Phytomedicine: An International Journal**, v. 11, n. 1, p. 673-679, 2022.

REZAEI, Z.; JAFARIRAD, S.; KOSARI-NASAB, M. Modulation of secondary metabolite profiles by biologically synthesized MgO/perlite nanocomposites in *Melissa officinalis* plant organ cultures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 380, 120878, 2019.

REZENDE, M.H.; CARDOSO, L.A.; VANNUCCI, A.L. Morfologia e anatomia foliar de *Bauhinia curvula* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 8, n. 1, p. 19-34, 1994.

RODRIGUES, R.O.; YAOCHITE, J.N.U.; BRAGA, M.A.; DE SOUSA, A.R.; SASAHARA, G.L.; FONSECA, S.G.C.; ARAÚJO, T.D.V.; SANTIAGO, G.M.P., DE SOUSA, L.M.; CARVALHO, J.L.; DO NASCIMENTO, F.B.S.A.; NOBRE, H.V.; NAGAO-DIAS, A.T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Bauhinia ungulata* L. (Fabaceae) on LPS-Stimulated RAW 264.7 cells. **Pharmacognosy Journal**, v. 11, n. 1, p. 37-42, 2019.

RODRIGUES, R.O.; YAOCHITE, J.N.U.; SASAHARA, G.L.; ALBUQUERQUE, A.A.; FONSECA, S.G.C.; ARAÚJO, T.D.V.; SANTIAGO, G.M.P.; DE SOUSA, L.M.; CARVALHO, J.L.; ALVES, A.P.N.N.; DE CARVALHO, P.G.; NAGAO-DIAS, A.T. Antioxidant, anti-inflammatory and healing potential of ethyl acetate fraction of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on in vitro and in vivo wound model. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 2845–2859, 2020.

ROMEIRO, R. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**: UFV Viçosa, 2007.

SAAD, N.Y.; MULLHER, C.D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.

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

SASS, J.E. **Botanical Microtechnique**. 2. ed. Ames: The Iowa State College Press, 244 p, 1951.

SAVI, A.O.S.; BREVIGLIERI, E.; BELLA CRUZ, A.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 44/45, p. 601-603, 1996.

SHARMA, K.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; PINAKIN, D.J.; BABBAR, N.; KAUR, J.; SHARMA, B.R. Process optimization for drying of *Bauhinia variegata* flowers: Effect of different pre-treatments on quality attributes. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 2, p. e16229, 2022a.

SHARMA, V.; PARIHAR, V.S.; ALI-LÖYTTY, H.; VIHINEN, J.; UKALE, D.; YIANNACOU, K.; LAHTONEN, K.; KELLOMÄKI, M.; SARIOLA, V. Fractal-like Hierarchical CuO Nano/Microstructures for Large-Surface-to-Volume-Ratio Dip Catalysts. **Applied Nano Materials**, v. 5, n. 10, p. 14591-14601, 2022b.

SHIN, S.; LIN, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of Applied Microbiology** v. 97, n. 6, p. 1289-96, 2004.

SILVA, A.M.A. **Investigação química e biológica de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud.** (Mestrado em Química) Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2018.

SILVA, F.C.O.; FERREIRA, M.K.A.; DA SILVA, A.W.; MATOS, M.G.C.; MAGALHÃES, F.E.A.; DA SILVA, P.T.; BANDEIRA, P.N.; DE MENEZES, J.E.S. A.; SANTOS, H.S. Bioactivities of plant-isolated triterpenes: A brief review. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, p. 234–247, 2020.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1102 p, 2003.

SIREESHAA, S.M.; NEELIMAA, K.; VINUTHAA, K. Multi-Targetted Molecular Docking Analysis of Selected Phytoconstituents of *Bauhinia acuminata*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 73, n. 2, p. 53–61. 2022.

SOSA, S.; BRACA, A.; ALTINIER, G.; DELLA LOGGIA, R.; MORELLI, I.; TUBARO, A. Tropical anti-inflammatory activity of *Bauhinia tarapotensis* leaves. **Phytomedicine**, v. 9, n. 7, p. 646–653, 2002.

SOUSA, L.M. **Estudo químico e avaliação biológica de *Phanera glabra* (Jacq.) Vaz & *Bauhinia unguolata* L. (FABACEAE)**. Tese (Doutorado em Química), Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SOUSA, L.M.; DE CARVALHO, J.L.; GOIS, R.W.S.; DA SILVA, H.C.; SANTIAGO, G.M.P.; LEMOS, T.L.G.; ARRIAGA, A.M.C.; ALVES, P.B.; DE MATOS, I.L.; MILITÃO, G.C.G.; DA SILVA, P.B.N. Chemical composition, larvicidal and cytotoxic activities of the essential oils from two *Bauhinia* species. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 3, p. 341–348, 2016.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 639 p, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 768 p, 2012.

SOUZA, S. M.; SOUZA, L.S.; SILVA, V.R.; SOARES, M.B.P.; BEZERRA, D.P.; GOIS, R.W.S.; SILVA, H.C.; SANTIAGO, G.M.P.; MILITAO, G.C.G. Natural Dibenzo-xepines, Pacharin and Bauhiniastatin-1, Isolated from *Bauhinia acuruana* Induce Apoptosis on Breast Cancer Cells via MCL-1 Protein Reduction. **Planta Medica**, v. 89, n. 3, p. 286–294, 2023.

SREEVIDYA, S.; YADAV, S.; SANWARIA, S.; KATRE, Y.; KOTASTHANE, A.; KUMAR, R.S.; SINGH, A.K.; SUSAN, M.A.B.H. Phyto-nano-MgO quantum dots by ultrasonic formulation for evaluation of toxin In-Vivo/Vitro/Silico sequels. **Chemical Engineering Journal**, v. 483, 149089, 2024.

STEVENS, P.F. Angiosperm phylogeny website. 2006. Disponível em link: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb>. Acesso em: 24 de jun 2024.

SUGANYA, S.; MURUGALAKSHMI, M.; SELVI, J.; RANI, P. Natural alkaloids as potential antimalarial drugs from *Bauhinia purpurea* leaves -an in-silico approach. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 14, n. 2, p. 740–747, 2023.

TATIPAMULA, V.B.; KILLARI, K.N.; HUY THUAN, N.; PRASANTH, D.S.N.B.K.; PANDA, S.P.; PASALA, P.K.; KETHA, A. Bioassay Guided Isolation of Anti-Inflammatory Compounds from *Bauhinia variegata* L.: A Key Ingredient in Herbo-Mineral Formulation, Gandmala Kandan Ras. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85. n. 1, p. 227-232, 2023.

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

TOSCAN, C.M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

TOZZI, A.M.G.A.; MELHEM, T.S.; FORERO, E.; FORTUNA-PEREZ, A.P.; WANDERLEY, M.G.L.; MARTINS, S.E.; ROMANINI, R.P.; PIRANI, J.R.; FIUZA DE MELO, M.M.R.; KIRIZAWA, M.; YANO, O.; CORDEIRO, I. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, v. 8, p. 22-83, 2016.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETTO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTIANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

ULLAH, F.; AHMAD, M.; ZAFAR, M.; JABEEN, A.; SULTANA, S.; GHANI, A.; LUQMAN, M.; NAZISH, M.; ALAM, F. Macromorphological and micromorphological seed features of selected taxa of Caesalpiniaceae using light and scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 82, n. 7, p. 1073–1082, 2019.

VAN DER PIJL, L. The leaf of *Bauhinia*. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 1, n. 2, p. 287–309, 1952.

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

VENMATHI MARAN, B.A.; IQBAL, M.; GANGADARAN, P.; AHN, B.-C.; RAO, P.V.; SHAH, M.D. Hepatoprotective Potential of Malaysian Medicinal Plants: A Review on Phytochemicals, Oxidative Stress, and Antioxidant Mechanisms. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1533, 2022.

WANG, Q.; SONG, Z.; CHEN, Y.; SHEN, S.; LI, Z. Leaves and fruits of *Bauhinia* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cercideae) from the Oligocene Ningming Formation of Guangxi, South China and their biogeographic implications. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, 2014.

WOJCIECHOWSKI, M.F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. **Advances in Legume Systematics**, v. 10, n. 3, p. 5-35, 2003.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M.J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846-1862, 2004.

WON, D.; SHIN, B. K.; HAN, J. (2008). Synthesis and the absolute configurations of isoflavanone enantiomers. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 17–19, 2008.

YODER, L.R.; MAHLBERG, P.G. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **American Journal of Botany**, v. 63, n. 9, p. 1167-1173, 1976.

ZAKARIA, Z.A.; SAHMAT, A.; HIZAMI AZMI, A.; ZAINOL, A.S.N.; OMAR, M.H.; BALAN, T.; ABDUL KADIR, A.; ABDULLAH, S.; AZIZAH, R.; SULISTYORINI, L. Liver protective effect of chloroform extract of *Bauhinia purpurea* leaves is attributed partly to its antioxidant action and the presence of flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 61, n. 1, p. 1152–1161, 2023.

ZHANG, X.P.; CHEN, H.J.; DENG, H.; GAO, C.X.; JIANG, X.X.; WANG, K. Flavonoids isolated from *Bauhinia brachycarpa* Wall and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 112, 149089, 2024.

ZHAO, H.; REN, S.; YANG, H.; TANG, S.; GUO, C.; LIU, M.; TAO, Q.; MING, T.; XU, H. *Peppermint* essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 154, 113559, 2022.

APÊNDICE A – ARTIGO NA BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY



ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Anatomical and histochemical characterization of stem and leaves of *Bauhinia pulchella* Benth. (Fabaceae)

Caracterização anatômica e histoquímica de caule e folhas de *Bauhinia pulchella* Benth. (Fabaceae)

J. L. Carvalho ^a, C. S. Magalhães ^b, R. O. Rodrigues ^c and K. P. Randau ^{ab*}

^a Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia, Recife, PE, Brasil

^b Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Laboratório de Farmacognosia, Recife, PE, Brasil

^c Universidade Federal do Ceará – UFC, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Imunologia, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Bauhinia pulchella Benth. (Fabaceae), is native to Brazil and popularly known as pata-de-bode. In folk medicine, it is used to treat diabetes. Pharmacological studies have demonstrated different properties, such as cytotoxic and antioxidant, and different chemical constituents, such as essential oil, triterpenoids, steroids, among others. In order to highlight the morphological differences of the species *B. pulchella* from the others of the genus, and its pharmacological potential, the present study aimed to carry out the anatomical and histochemical characterization of the stem and leaves of *B. pulchella*. Usual methods in plant anatomy were used in the preparation of semi-permanent slides containing cross sections of the stem, petiole and leaf blade and paradermal sections of the leaf blade for analysis in light microscopy and polarized light. Histochemical tests were also performed to localize the metabolites in the stem and leaf blade. The stem of *B. pulchella* has a cylindrical outline, the bark is composed of 7-8 layers of cells and discontinuously distributed sclerenchyma; petiole presents flat convex contour, prominences in the adaxial region, concentric amphicribral vascular bundle, surrounding a small concentric anfraval intramedullary bundle, adaxially two accessory bundles and tector trichomes; leaf blade with anisocytic and tetracytic stomata on the adaxial surface and anisocytic, tetracytic and anomocytic on the abaxial surface; and midrib with plain-convex outline, 1-2 layers of collenchyma and covering trichomes. Characteristics that differ from other species of the genus *Bauhinia*. Alkaloids, phenolic compounds, lipophilic compounds, lignin, triterpenes, steroids and tannins were observed in the species. The results are fundamental for the pharmacobotanical standardization of the studied species.

Keywords: *Bauhinia pulchella*, histochemical analysis, pharmacobotany.

Resumo

Bauhinia pulchella Benth. (Fabaceae), é nativa do Brasil e popularmente mais conhecida como pata-de-bode. Na medicina popular, é utilizada no tratamento de diabetes. Estudos farmacológicos demonstraram diferentes propriedades, como por exemplo, citotóxica e antioxidante, e diferentes constituintes químicos, como óleo essencial, triterpenoides, esteroides, entre outros. A fim de evidenciar as diferenças morfológicas da espécie *B. pulchella* das demais do gênero, e seu potencial farmacológico, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização anatômica e histoquímica do caule e das folhas de *B. pulchella*. Métodos usuais em anatomia vegetal foram utilizados na preparação de lâminas semipermanentes contendo seções transversais do caule, pecíolo e lâmina foliar e seções paradermicas da lâmina foliar para análises em microscopia óptica de luz e luz polarizada. Testes histoquímicos também foram realizados para localizar os metabólitos no caule e lâmina foliar. O caule de *B. pulchella* apresenta contorno cilíndrico, casca composta de 7-8 camadas de células e esclerênquima distribuído descontinuamente; pecíolo apresenta contorno plano convexo, proeminências na região adaxial, feixe vascular concêntrico anfrival, circundando pequeno feixe concêntrico anfrival intramedular, adaxialmente dois feixes acessórios e tricomas tectores; lâmina foliar com estômatos anisocíticos e tetracíticos na face adaxial e anisocíticos, tetracíticos e anomocíticos na face abaxial; e nervura central com contorno plano-convexo, 1-2 camadas de colênquima e tricomas tectores. Características que difere de outras espécies do gênero *Bauhinia*. Alcaloides, compostos fenólicos, compostos lipofílicos, lignina, triterpenos, esteroides e taninos foram observados na espécie. Os resultados são fundamentais para a padronização farmacobotânica da espécie estudada.

Palavras-chave: *Bauhinia pulchella*, análise histoquímica, farmacobotânica.

*e-mail: karina.prandau@ufpe.br

Received: April 3, 2023 – Accepted: September 29, 2023



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA CHEMISTRY & BIODIVERSITY

Submission Confirmation for In vitro antimicrobial and anti-inflammatory activity of fractions of the ethanolic extract of *Bauhinia pulchella* Benth.  

Chemistry and Biodiversity <em@editorialmanager.com>
para mim

sex., 13 de set., 13:32 (há 19 horas) ☆ ☺ ↶ ⋮

 Traduza para o português X

You are being carbon copied ('cc:'d') on an e-mail "To" "Jarbas Lima Carvalho" jarbas.carvalho@ufpe.br
CC: "Horlando Carlota da Silva" horlandocarlota@gmail.com, "Gilvandete Maria Pinheiro Santiago" gil@ufc.br, "Said Gonçalves da Cruz Fonseca" said@ufc.br, "João Felipe Pinheiro Rodrigues" joaofelipe.farmacia@gmail.com, "Pedro Igor de Oliveira Pereira" pedroigoroliveira@gmail.com, "Raphael de Oliveira Rodrigues" raphaelrodrigues@gmail.com, "Juliana Navarro Ueda Yachite" ueda.juliana@gmail.com, "Hilania Valéria Dodou Lima" valeriadodou@gmail.com, "Tiago Lima Sampaio" tiagosampaio91@gmail.com, "Karina Perrelli Randau" karina.randau@ufpe.br, "Jarbas Lima de Carvalho" jarbasldc@gmail.com

Dear Pharmacist carvalho,

Your submission of **Research Article** entitled "In vitro antimicrobial and anti-inflammatory activity of fractions of the ethanolic extract of *Bauhinia pulchella* Benth." has been received by Chemistry and Biodiversity

The submission number for your Research Article is cbdv202402295.

To check on the progress of your paper, please go to <https://www.editorialmanager.com/chembiodiv/> and log in as an Author using your username (Your username is: *****) and password. If you have forgotten your password, please use the "Send Access Credentials" option given on the login screen.

If the manuscript is accepted for publication, this author's affiliation will be used to determine eligibility for some open access funding (click [here](#) for details).

This journal offers a number of license options; information about this is available here:

<https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>

The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

This message has been sent to all named co-authors listed in the submission process to serve as notification of submission.

We will contact you again with the decision on this paper as soon as possible.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Chemistry and Biodiversity

Chem. Biodiversity

|

In vitro antimicrobial and anti-inflammatory activity of fractions of the ethanolic extract of *Bauhinia pulchella* Benth.

Jarbas Lima de Carvalho,^{*,[a]} Horlando Carlota da Silva,^[b] Gilvandete Maria Pinheiro Santiago,^[c]
Said Gonçalves da Cruz Fonseca,^[c] João Felipe Pinheiro Rodrigues,^[c] Pedro Igor de Oliveira Pereira,^[c]
Raphael de Oliveira Rodrigues,^[d] Juliana Navarro Ueda Yachite,^[d]
Hilania Valéria Dodou Lima,^[d] Tiago Lima Sampaio,^[d] and Karina Perrelli Randau,^[a]

^[a] J. L. de Carvalho, K. Perrelli Randau Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil, E-mail: jarbasldc@gmail.com

^[b] H. Carlota da Silva Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Campus do Pici, 60021-940, Fortaleza, Ceará, Brazil

^[c] G. M. Pinheiro Santiago, S. G da Cruz Fonseca, J. F. Pinheiro Rodrigues, P. I. de Oliveira Pereira Department of Pharmacy, Porangabussu Campus, 60430-370, Fortaleza, Ceará, Brazil

^[d] R. de Oliveira Rodrigues, J. N. Ueda Yachite, H. V. Dodou Lima, T. Lima Sampaio, Department of Clinical and Toxicological Analysis, 60430-37, Fortaleza, Ceará, Brazil