

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**UNIDADE DE DOURADOS**  
**CURSO DE QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *BAUHINIA***  
***UNGULATA***

**DAYANA CAROLINA TROMBINI**

**DOURADOS/MS**

**NOVEMBRO/2010**

---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**UNIDADE DE DOURADOS**  
**CURSO DE QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *BAUHINIA***  
***UNGULATA***

**Dayana Carolina Trombini**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciada em Química, pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Jonas da Silva Mota.

**DOURADOS/MS**

**NOVEMBRO/2010**

---

"Mais importante que adquirir uma  
grande sabedoria é a humildade  
na hora de transmiti-la."

(Anônimo)

Dedico este trabalho a Deus, por ter-me dado forças, nas horas mais difíceis, ajudando-me a não desistir.

Aos meus queridos pais Elizabeth Carolina da Silva, e Luiz Carlos Trombini, por trabalharem sacrificando seus sonhos em favor dos meus, aos quais são símbolo de força e determinação, pelas palavras de incentivo e conforto, pela compreensão e principalmente por acreditar que eu poderia chegar até aqui.

A minha irmã, Joyce Carolina Trombini, que mesmo ainda muito jovem acreditou na minha vitória .

Ao Rafael, meu namorado, pelo companherismo, por todos os momentos, difíceis ou não, em que passamos juntos durante esse desafio e por tudo o que ele representa na minha vida .

## Agradecimentos

Foram longos momentos de desafios e provações, porém de aprendizagem, tanto intelectual, como para o sentido da vida. Compartilhei esses momentos com várias pessoas e para algumas delas apresento meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Jonas, meus sinceros agradecimentos pela orientação, dedicação e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e pessoa, que contribuíram para minha formação científica e pessoal.

Aos meus grandes amigos, que sempre acreditaram em mim: Fabiano, Raquel, Priscila, Danilo, Deodato, Flávio, Isac, Carlos Adriano, Jader.

Em especial à Jéssica Alves Craveiro e ao Widicley Santos Souza, grandes amigos, que foram meu apoio psicológico nesse momento tão importante da minha vida, pela paciência que tiveram comigo, pois me deram forças e fizeram eu acreditar em mim mesma, tantos nos momentos ruins como nos bons, uma amizade verdadeira.

Tantos aos colegas do início do curso como os recentes que fiz, ao qual compartilhei alguns momentos que serão sempre lembrados: Kelly, Gláucia, Cícera, Persiely, Ronaldo, Adriana, Keila, Jeani e Edimara.

A todos os outros amigos e colegas que fizeram parte desse estágio da minha vida e que me deram apoio e alegria.

Aos professores Jonas da Silva Mota, Cláudia Andrea Lima Cardoso, Alex Haroldo Jeller, Deizeluci Zanella, Jandira Aparecida Simoneti, Edeemar Benedetti Filho, Antônio Rogério Fiorucci, Hércules da Silva Míglio e Elói Panachuki, aos ensinamentos obtidos junto a cada professor, quer diretamente em disciplinas cursadas ou indiretamente com suas pessoas, também pelas lições de vida.

À Eva Cristina (Cris), secretária da coordenação de química da UEMS, pelo carinho e auxílio.

Ao Franksteffen Silva Maia técnico do centro de pesquisa em biodiversidade - CPBIO.

À minha família: meus pais Elizabeth, Luiz, e minha irmã Joyce, pelo incentivo, amizade e amor. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, acompanhando e torcendo pelas minhas conquistas.

Em especial à minha tia Sirlene Carolina Nonato, minhas primas Gleicielly Carolina dos Santos e Adrielly Carolina dos Santos, e minha amiga Juliana Medeiros, por sempre me darem forças e principalmente acreditarem em mim.

A todos aqueles que direta ou indiretamente se envolveram na realização deste trabalho meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| Lista de Abreviaturas e Símbolos                          | vi   |
| Índice de Figuras   | viii |
| Índice de Tabelas   | ix   |
| Resumo  | x    |
| 1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA                     | 1    |
| 1.1. Aspectos gerais                                      | 1    |
| 1.2. Família Leguminosae                                  | 3    |
| 1.3. Gênero <i>Bauhinia</i>                               | 3    |
| 1.3.1. Espécie <i>Bauhinia unguolata</i>                  | 4    |
| 2. OBJETIVOS  | 6    |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL                                     | 7    |
| 3.1. Procedimentos gerais                                 | 7    |
| 3.1.1. Coleta e identificação da espécie vegetal          | 7    |
| 3.1.2. Solventes  | 7    |
| 3.2. Técnicas e equipamentos utilizados                   | 7    |
| 3.2.1. Cromatografia em camada preparativa                | 7    |
| 3.2.1.1. Preparação das placas                            | 7    |
| 3.2.2. Revelador  | 7    |
| 3.2.3. Visor ultravioleta                                 | 7    |
| 3.2.4. RMN  | 8    |
| 3.3. Preparação dos extratos de <i>Bauhinia unguolata</i> | 8    |
| 3.4. Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico     | 9    |
| 3.5. Fracionamento cromatográfico da subfração 3D         | 10   |
| 3.6. Fracionamento cromatográfico da subfração 4D         | 12   |
| 3.7. Fracionamento cromatográfico da subfração 5D         | 15   |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO                                 | 17   |
| 5. CONCLUSÃO  | 23   |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                             | 24   |

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

|  |   |
|--|---|
| P.A.                                       | Padrão Analítico                            |
| mL   | Mililitros                                  |
| UV   | Ultravioleta                                |
| CCF  | Cromatografia em camada fina                |
| CCDP                                       | Cromatografia em camada delgada preparativa |
| CC   | Coluna Cromatográfica                       |
| g  | Gramas                                      |
| L  | Litros                                      |
| nm   | Nanômetro                                   |
| cm   | Centímetro                                  |
| v/v  | Volume/volume                               |
| mg   | Miligrama                                   |
| $\delta$                                   | Deslocamento químico                        |
| MHz  | Mega-hertz                                  |
| RMN  | Ressonância magnética nuclear               |
| RMN de $^1\text{H}$                        | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| RMN de $^{13}\text{C}$                     | Ressonância magnética nuclear de carbono-13 |
| H  | Hidrogênio                                  |
| Hex  | Hexano                                      |
| $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1:1 v/v) | Hidroalcoólica                              |
| $\text{CH}_3\text{OH}$                     | Metanol                                     |
| $\text{H}_2\text{O}$                       | Água  |
| EtOH                                       | Etanol                                      |
| MeOH                                       | Metanol                                     |
| AcOEt                                      | Acetado de etila                            |



|                         |                              |
|-------------------------|------------------------------|
| $\text{H}_2\text{SO}_4$ | Ácido Sulfúrico              |
| DCM                     | Diclorometano                |
| $\text{CDCl}_3$         | Clorofórmio deuterado        |
| OMS                     | Organização Mundial de Saúde |

**ÍNDICE DE FIGURAS**

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Fotos de diferentes partes da espécie <i>Bauhinia unguolata</i> ; 1- partes aéreas (folhas); 2- flor; 3- frutos; 4- sementes. | 5  |
| Figura 2  | Fluxograma da extração das folhas de <i>Bauhinia unguolata</i>  | 8  |
| Figura 3  | Fluxograma da CC da fração 3D   | 11 |
| Figura 4  | Fluxograma da CC da fração 4D   | 12 |
| Figura 5  | Fluxograma da CC da fração 4Y   | 13 |
| Figura 6  | Fluxograma da placa preparativa da fração 4Y2   | 14 |
| Figura 7  | Fluxograma da placa preparativa da fração 4Y3   | 14 |
| Figura 8  | Fluxograma da placa preparativa da fração 4Y5-6   | 15 |
| Figura 9  | Fluxograma da C18 da fração 5D  | 16 |
| Figura 10 | Estrutura da substância 1 ( $\beta$ -sitosterol)  | 17 |
| Figura 11 | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )   | 19 |
| Figura 12 | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 1, expansão 1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )                                       | 20 |
| Figura 13 | Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 1, expansão 2 (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )                                       | 20 |
| Figura 14 | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 1 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )  | 21 |
| Figura 15 | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 1, expansão 1 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )                                    | 22 |
| Figura 16 | Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 1, expansão 2 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )                                    | 22 |

**ÍNDICE DE TABELAS**

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Sistema de eluição utilizado  | 09 |
| Tabela 2 | Reunião de frações do extrato hexânico                              | 10 |
| Tabela 3 | Sistema de eluição utilizado para 3D                                | 10 |
| Tabela 4 | Reunião das frações 3D  | 11 |
| Tabela 5 | Sistema de eluição utilizado para 4Y                                | 13 |
| Tabela 6 | Reunião de frações da subfração 4Y                                  | 13 |
| Tabela 7 | Sistema de eluição utilizado para 5D                                | 15 |
| Tabela 8 | Dados de <sup>13</sup> C para a substância 1 ( $\beta$ -sitosterol) | 18 |

## RESUMO

A espécie *Bauhinia* pertence à subfamília Caesalpinioideae com distribuição na Ásia, África e alguns países da América Latina, compreendendo aproximadamente 300 espécies, também se destacam pelas suas propriedades medicinais, sendo utilizadas como fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente diabetes, processos dolorosos e infecções. A espécie *Bauhinia unguolata* é conhecida popularmente como Mororó ou Pata de vaca, apresenta atividade hipoglicemiante comprovada. Este trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação dos compostos presentes nas folhas de *Bauhinia unguolata*. O estudo fitoquímico das folhas da *Bauhinia unguolata* resultou no isolamento e identificação do  $\beta$ -sitosterol, ao qual é caracterizado como um esteróide vegetal.

**Palavras-Chaves:** *Bauhinia unguolata*, fitoquímica,  $\beta$ -Sitosterol.

# 1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1. Aspectos gerais

As plantas têm sido um importante recurso medicinal desde os primórdios da humanidade. No momento em que a espécie humana surgiu no planeta, as plantas já existiam há mais de 400 milhões de anos. Têm-se registros como desenhos em cavernas, que revelam uma ligação muito íntima do homem com a natureza, principalmente com as plantas (CAMARGO, 1998). Desde os tempos da alquimia, a medicina empírica, à base de ervas sempre exerceu grande fascínio sobre a humanidade e o faz ainda hoje (MANTELL et al. 1994).

O uso de plantas medicinais como fonte de medicamentos teve seu primeiro registro em documentos datados de cerca de cinco mil anos em civilizações chinesas e indianas, onde hoje é o Oriente Médio. Atualmente as plantas são quase que exclusivamente a fonte de fármacos para a maioria das populações do mundo (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

Por volta de 1800, os químicos e os médicos que estudavam plantas medicinais, cujos recursos experimentais eram extremamente limitados, se dedicaram especialmente, a isolar e determinar a estrutura de compostos ativos de plantas conhecidas e experimentadas pelo uso popular ao longo do tempo, e geralmente, incorporadas nas farmacopéias da época (YUNES e CALIXTO, 2001).

Nos últimos anos, têm se verificado um grande aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas, utilizada para diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Diversos registros da OMS (Organização Mundial de Saúde) revelam que, aproximadamente 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta com finalidade terapêutica. Dentro dessa porcentagem, no mínimo 30% dessas pessoas utilizam plantas medicinais por indicação médica (CAMPOS et al. 2005). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de modelos ou diretamente de fontes naturais, sendo as plantas responsáveis por 25% desse total (CALIXTO, 2003; SOYAMA, 2007).

A vasta gama de informações sobre o uso de plantas como ‘remédios’ em todos os lugares do mundo leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a

enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. Como a maior parte da flora é ainda desconhecido do ponto de vista químico, bem como o saber tradicional associado à flora útil, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um censo de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para o uso científico (ELISABETSKY, 1999).

Grande parte das ervas medicinais existentes no Brasil vieram com os europeus durante a colonização, a utilização dessas plantas para fins terapêuticos deve-se a influência da cultura indígena, africana, além da européia (MARTINS, 1995).

O Brasil que possui cerca de 30% de toda a flora mundial conhecida, tem pouco mais que 1% dessas estudadas química e/ou farmacologicamente (YUNES e CALIXTO, 2001). O Brasil poderia contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos oriundos de espécies dos vários biomas. Porém entre 2003 e 2004, por exemplo, foram desmatados 26.130 Km<sup>2</sup> de floresta na Amazônia Brasileira, que hoje representa 5% do espaço terrestre da América Latina. Com isso, várias espécies desapareceram sem que o homem sequer tenha sido capaz de conhecer toda a magnificência, principalmente a relacionadas às características medicinais (AMAZÔNIA, 2010).

Dados estatísticos revelam o potencial da nação brasileira em termos de espécies vegetais, estima-se que 40 a 55 mil espécies, abrangendo o maior número de espécies do mundo. Esses dados revelam o potencial da flora brasileira para a descoberta de novos fármacos e fitoterápicos. Embora se tenham mais de quarenta anos de pesquisa na área de plantas medicinais, ainda não se tem dados da composição química de 99,6% da flora brasileira (DI STASI et al. 1994).

Assim, a química de produtos naturais tem por objetivo o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundários dos seres vivos, principalmente no campo da fitoquímica, através do seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (MATOS, 1998).

Baseado no fato que plantas possuem centenas ou milhares de metabólitos, a investigação fitoquímica biomonitorada, além de ser um processo demorado, pode revelar apenas uma faixa de seus constituintes de interesse biológico. Além disso este estudo, muitas vezes, exige uma interação multidisciplinar que envolve botânicos, químicos, farmacólogos, biólogos e toxicologistas, envolvidos em várias etapas (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

## 1.2. Família Leguminosae

Leguminosae compreende cerca de 720 gêneros e 19.000 espécies, sendo considerada a terceira maior família de fanerógamas depois de Compositae Giseke e Orchidaceae Juss (LEWIS, 1987).

Nos tratamentos taxonômicos conferidos a Leguminosae são geralmente reconhecidas três subfamílias: Caesalpinioideae (5 tribos, 152 gêneros), Mimosoideae (5 tribos, 63 gêneros) e Papilionoideae (31 tribos, 443 gêneros). Estas subfamílias são consideradas por Cronquist (1988) como famílias distintas pertencentes à ordem Fabales. Porém, Leguminosae é atualmente reconhecida como um grupo monofilético em distintas propostas de classificação (APG, 2003; LEWIS, 2005).

A família Leguminosae, frequentemente, é considerada como a maior família em número de espécies em levantamentos florísticos em florestas neotropicais. No entanto, em algumas localidades no Peru e no Equador, a família Leguminosae é observada como a de maior riqueza de espécies (GENTRY, 1991).

## 1.3. Gênero *Bauhinia*

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse científico, encontra-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencendo a família Leguminosae. *Bauhinia* é um gênero pantropical com distribuição na Ásia, África e alguns países da América Latina (WUNDERLIN et al. 1987). Podem ser utilizadas para diversos fins, como na arborização urbana, na recomposição de vegetação arbórea, bem como possuem interesse medicinal (LORENZI, 2000; SILVA & CECHINEL FILHO 2002).

As espécies brasileiras de *Bauhinia* foram revisadas por Bentham (1870), que reconheceu 64 espécies classificadas em três seções. Entretanto, com o aumento progressivo das coleções botânicas, novas espécies foram citadas e descritas, resultando em um total de mais de 200 nomes de espécies relativos ao gênero no Brasil (VAZ & TOZZI, 2005).

O termo “*Bauhinia*” é uma homenagem a dois botânicos suíços, os irmãos Bauhin. No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas como “pata-de-vaca”, “pé-de-boi” ou “unha-de-boi”, em alusão ao formato das folhas geralmente bilobadas, o que torna o reconhecimento deste gênero relativamente fácil. Porém, a identificação das espécies de *Bauhinia* pode ser dificultada devido às variações morfológicas e à

diversidade de espécies, o que diminui a confiabilidade das citações da literatura (CORRÊA, 1952).

As espécies de *Bauhinia* se destacam pelas suas propriedades medicinais, sendo utilizadas como fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente diabetes, alterações renais, problemas urinários, processos dolorosos e infecções (TESKE & TRENTINI 1995).

O mais antigo registro de estudo clínico do uso de *Bauhinia* como planta anti-diabética foi efetuado por Juliani (1931) e atualmente muitas pesquisas têm confirmado o potencial hipoglicêmico de espécies do gênero (DAMASCENO et al. 1999; VOLPATO, 2001; BRUNETTI, 2002; SILVA & CECHINEL-FILHO 2002).

Alguns pesquisadores forneceram indícios mais concretos sobre a presença de insulina em plantas. Baseados na medicina popular indiana, isolaram uma fração protéica que reagia com anticorpo contra a insulina humana. Investigaram também a presença de insulina nos vegetais da família das Leguminosas (PANIZZA, 1997). Além de evidenciada a presença de insulina em vagens e tegumentos de sementes, os pesquisadores detectaram a presença de insulina nas folhas de pata-de-vaca. A importância dessa descoberta mostra que a insulina se encontra predominantemente associada aos cloroplastos (AZEVEDO, 2000).

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com estas plantas indicam que as mesmas são constituídas principalmente de glicosídeos esteroídicos, triterpenos, lactonas e flavonóides (CECHINEL, 2000).

### **1.3.1. Espécie *Bauhinia unguolata***

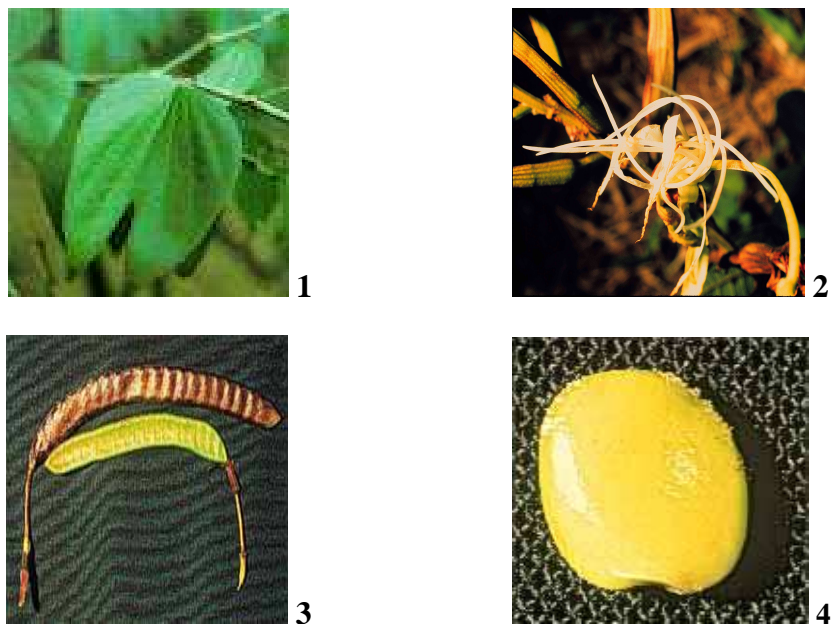
*Bauhinia unguolata* é uma espécie com grande variabilidade morfológica, mas considerando-se sua ampla área de ocorrência, apresenta certos padrões locais, os quais foram reconhecidos como variedades, admitindo-se formas intermediárias entre elas (VAZ & TOZZI, 2003).

Árvore silvestre pequena, de caule muito duro com cascas fibrosas e folhas, formando dois lobos cujas formas lembram o rastro de pata dos bovinos, recebe o nome popular de mororó e unha-de-vaca. A espécie é comum nos estados do Nordeste (MATOS, 1998).

A espécie *Bauhinia unguolata* (figura 1), termo que em latim significa casco, numa alusão a forma da folha. Embora seja ainda pouco estudada quimicamente sua atividade



hipoglicemiante tem sido comparada em vários experimentos, inclusive em ensaios de natureza clínica (MATOS, 1998).



**Figura 1:** Fotos de diferentes partes da espécie *Bauhinia unguolata*: 1- partes aéreas (folhas); 2- flor; 3- frutos; 4- sementes (MASÍS et al. 1998).

## 2. OBJETIVOS

Teve como objetivo o isolamento, identificação e determinação estrutural dos compostos presentes nas folhas de *Bauhinia unguolata*.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Procedimentos gerais**

##### **3.1.1. Coleta e identificação das espécies vegetais**

A espécie de *Bauhinia unguolata* foi coletada na fazenda experimental da EMBRAPA em Campo Grande/MS em março 2007, sob a supervisão do botânico Dr. Arnildo Pott.

##### **3.1.2 Solventes**

Foram utilizados os seguintes solventes P.A, hexano, acetato de etila, etanol, metanol, diclorometano, clorofórmio e solução hidroalcolica (H<sub>2</sub>O/EtOH, 1/1 v/v).

#### **3.2. Técnicas e equipamentos utilizados**

##### **3.2.1. Cromatografia em camada preparativa**

###### **3.2.1.1. Preparação das placas**

Para a preparação de uma placa, pesou-se em uma balança analítica, aproximadamente 6 g de sílica, a seguir, misturou-se com 12 mL de água destilada em um béquer.

Foram utilizadas placas de vidro de medidas de 20 x 20 cm, as quais foram limpas com acetona para a remoção de possíveis sujeiras presentes, após aplicou-se a solução contendo sílica, sobre a placa e espalhou-se com a ajuda de um carreador para que a espessura seja uniforme. A seguir deixou secar em uma estufa (100 °C) por 24 h para ativação.

###### **3.2.2. Revelador**

Utilizou-se como revelador o *p*-anisaldeído, preparado a partir de uma mistura composta por 0,5 mL de *p*-anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85 mL de CH<sub>3</sub>OH e 5,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

###### **3.2.3 Visor ultravioleta**

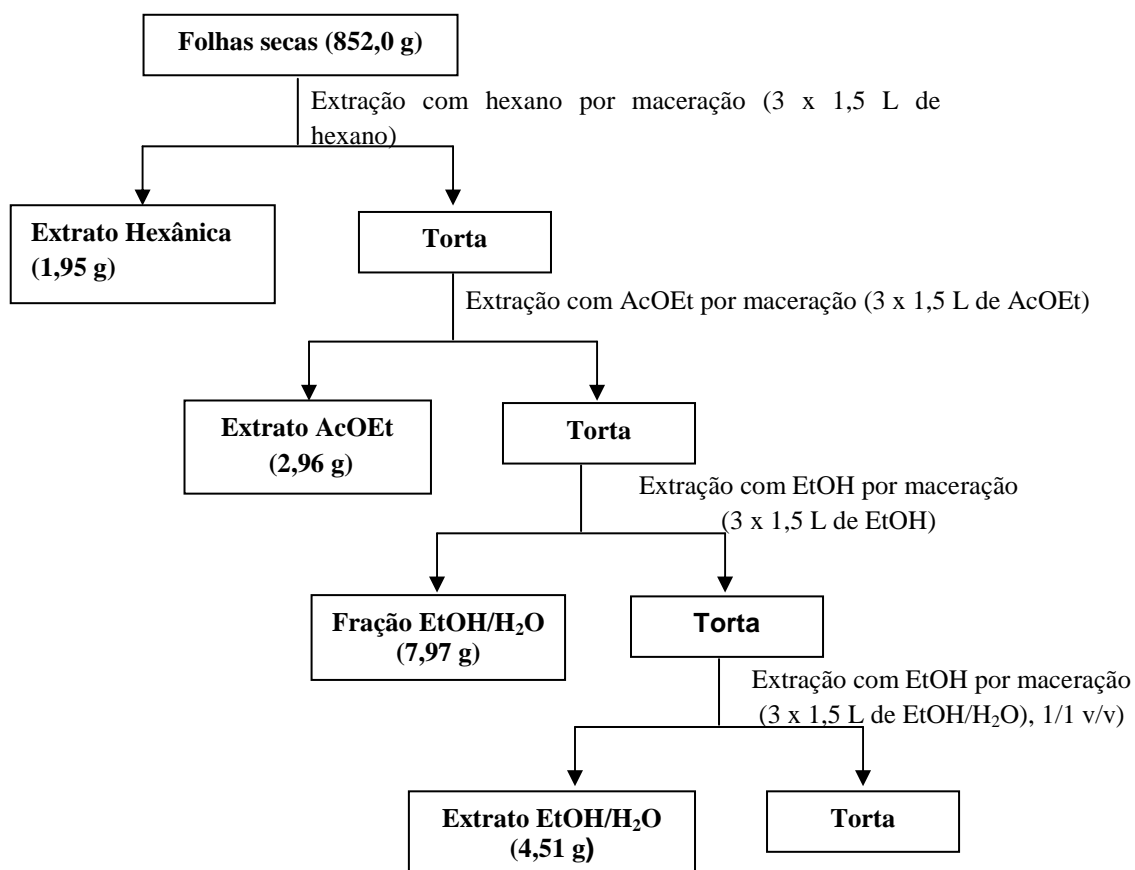
Equipamento utilizado para visualização de placas eluidas em CCF e CCDP, possuindo duas lâmpadas a 254 nm e 365 nm.

### 3.2.4. RMN - Espectrometria de ressonância magnética nuclear

Para a obtenção dos espectros de RMN foi utilizado o seguinte equipamento: Espectrômetro VARIAN INOVA-500, operando a 500 MHz para  $^1\text{H}$  e a 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ . O solvente utilizado para a obtenção dos espectros foi  $\text{CDCl}_3$  (Merck).

### 3.3. Preparação dos extratos de *Bauhinia unguolata*

As folhas de *Bauhinia unguolata* foram secas a temperatura ambiente, obtendo em massa o total de 852,0 g. Estas foram submetidos a extrações sucessivas por maceração com hexano (3 x 1,5 L), foi obtido um total de 1,95 g de extrato. A extração com AcOEt (3 x 1,5 L), resultou em um total de 2,96 g de extrato. Na extração com EtOH (3 x 1,5 L), obtendo-se um total de 7,98 g de extrato. A extração com EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  1/1, v/v (3 x 1,5 L) resultou em uma massa de 4,51 g. Todos os extratos foram concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida (figura 2).



**Figura 2:** Fluxograma da extração das folhas de *Bauhinia unguolata*

### 3.4. Fracionamento cromatográfico do Extrato Hexânico

Escolheu-se a fração hexânica (1,95 g) para realizarmos o estudo fitoquímico, por apresentar uma boa separação por análise das placas cromatográficas analíticas. O extrato hexânica foi submetida a um fracionamento em coluna de 4 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento empregando sílica gel, eluída em gradiente de polaridade crescente empregando Hex e AcOEt como solvente (tabela 1). Esta resultou em 134 frações que foram coletadas em frascos tipo penicilina .

**Tabela 1:** Sistema de eluição utilizado.

| <b>Volume Utilizado (mL)</b> | <b>Hexano: AcOEt % (v/v)</b> |
|------------------------------|------------------------------|
| 50                           | Hexano 100%                  |
| 70                           | 98 : 2                       |
| 90                           | 95 : 5                       |
| 80                           | 90 : 10                      |
| 70                           | 85 : 15                      |
| 90                           | 80 : 20                      |
| 130                          | 75 : 25                      |
| 160                          | 70 : 30                      |
| 170                          | 65 : 35                      |
| 210                          | 60 : 40                      |
| 130                          | 50 : 50                      |
| 70                           | 30 : 70                      |
| 20                           | AcOEt 100%                   |

As frações acima foram analisadas por CCF, reveladas em lâmpada UV e *p*-anisaldeído. As frações foram reunidas em 7 (tabela 2), denominadas de 1D-7D. Utilizando os seguintes sistemas de solvente: 1D (Hex 100 v/v), 2D (Hex/AcOEt 95:5 v/v), 3D (Hex/AcOEt 90:10 v/v), 4D (Hex/AcOEt 85:15 v/v), 5D (Hex/AcOEt 80:20 v/v), 6D (Hex/AcOEt 70:30 v/v) e 7D (Hex/AcOEt 60:40 v/v).

**Tabela 2 :** Reunião de frações do extrato hexânico.

| <b>Subfrações</b>    | <b>Frações Reunidas</b> | <b>Massas obtidas</b> |
|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Subfração <b>1D</b>  | 1 - 6                   | 28,6 mg               |
| Subfração <b>2D</b>  | 7 - 20                  | 101,4 mg              |
| *Subfração <b>3D</b> | 31 - 37                 | 554,3 mg              |
| *Subfração <b>4D</b> | 28 - 38                 | 617,1 mg              |
| *Subfração <b>5D</b> | 39 - 46                 | 207,4 mg              |
| Subfração <b>6D</b>  | 47 - 70                 | 78,0 mg               |
| Subfração <b>7D</b>  | 71 - 134                | 80,7 mg               |

\* Subfrações estudadas.

As subfrações 3D, 4D e 5D foram estudadas por apresentarem uma boa separação quando analisadas em CCF.

### 3.5. Fracionamento cromatográfico da subfração 3D (31 – 37).

A subfração 3D (554 mg), foi submetida a um fracionamento em coluna de sílica de 3 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, eluídas em Hex/Clorofórmio de acordo com a tabela 3, resultando em 175 frações.

**Tabela 3:** Sistema de eluição utilizado para subfração 3D.

| <b>Volume Utilizado (mL)</b> | <b>Hexano: Clorofórmio % (v/v)</b> |
|------------------------------|------------------------------------|
| 40                           | 98 : 2                             |
| 110                          | 95 : 5                             |
| 110                          | 92 : 8                             |
| 60                           | 90 : 10                            |
| 150                          | 85 : 15                            |
| 230                          | 80 : 20                            |
| 250                          | 75 : 25                            |
| 190                          | 65 : 35                            |
| 280                          | 55 : 45                            |
| 330                          | 50 : 50                            |

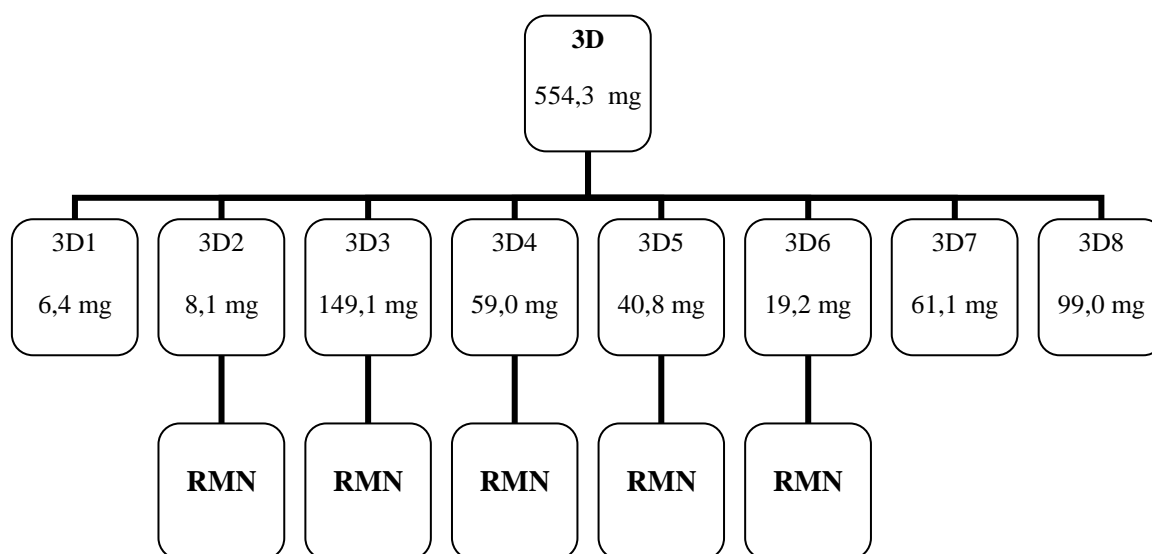
Estas frações foram analisadas por CCF, e posteriormente reveladas com *p*-anissaldeído e reunidas por semelhança de R<sub>f</sub>, resultando em 8 subfrações, que foram denominadas 3D1-3D8 (tabela 4).

**Tabela 4:** Reunião das frações 3D.

| <b>Subfrações</b>     | <b>Frações Reunidas</b> |
|-----------------------|-------------------------|
| Subfração <b>3D1</b>  | 40 – 46                 |
| *Subfração <b>3D2</b> | 47 – 52                 |
| *Subfração <b>3D3</b> | 53 – 80                 |
| *Subfração <b>3D4</b> | 81 – 112                |
| *Subfração <b>3D5</b> | 113 – 129               |
| *Subfração <b>3D6</b> | 130 - 165               |
| Subfração <b>3D7</b>  | 136 - 147               |
| Subfração <b>3D8</b>  | 148 - 175               |

\*Subfrações encaminhadas para RMN.

As subfrações 3D2 (8,1 mg), 3D3 (149,1 mg), 3D4 (59 mg), 3D5 (40,8 mg) e 3D6 (19,2 mg), apresentaram uma única mancha na placa, sendo assim submetidas à análise por RMN (figura 3).

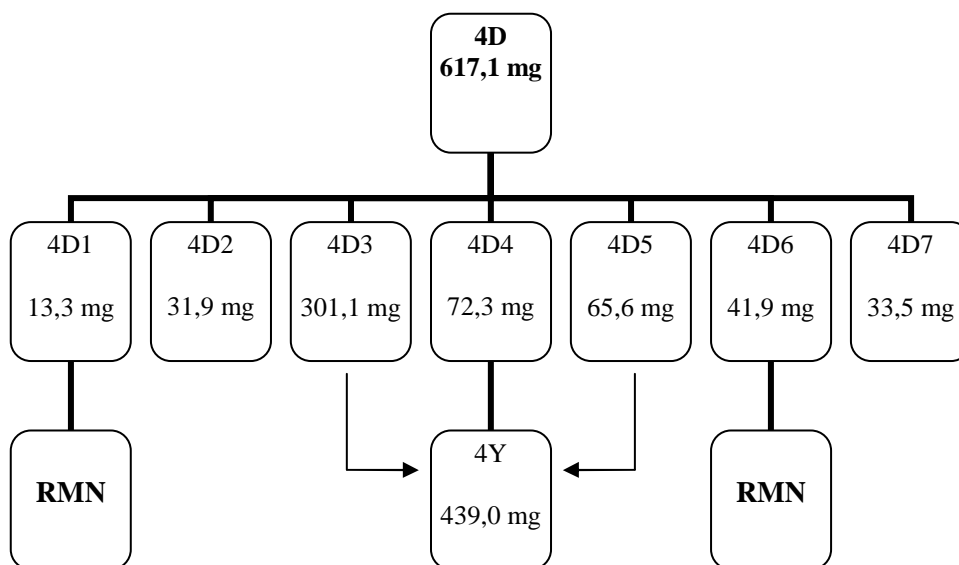
**Figura 3:** Fluxograma da CC da fração 3D.

As subfrações 3D1 (6,4 mg), 3D7 (61,1 mg) e 3D8 (99,0 mg) não foram encaminhadas para o RMN por não apresentarem uma boa separação quando analisadas em CCF, estas ficaram com várias manchas sobrepostas.

### 3.6. Fracionamento cromatográfico da subfração 4D ( 28 – 38).

Por a fração 4D (617,1 mg) apresentar uma boa separação quando analisada por CCF, esta foi submetida a CC (2 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento), utilizando-se o sistema solvente Hex/AcOEt 95:5 v/v, na qual resultou em 32 frações que foram coletadas em frascos tipo penicilina. As frações resultantes foram analisadas por CCF, e reunidas em 7 frações no qual foram denominadas 4D1-4D7.

A subfração 4D1(13,3 mg) e a 4D6 (41,6 mg), apresentaram uma boa separação, mostrando uma única mancha na placa cromatográfica, estas foram enviadas para análise por RMN. Após a análise por CCF as frações 4D3, 4D4 e 4D5 foram reunidas, sendo denominadas de 4Y (439,0 mg) de acordo com a figura 4. As frações 4D2 e 4D7 por não apresentarem uma boa definição quando analisadas por CCF não foram estudadas.



**Figura 4:** Fluxograma da CC da fração 4D.

A fração 4Y foi submetida a uma coluna de sílica, utilizando uma coluna de 1,5 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, resultando em 117 frações. As frações foram eluídas utilizando os sistemas de solventes apresentado na tabela 5, então analisadas por CCF e reunidas em 7 denominadas de 4Y1 - 4Y7 (tabela 6).



**Tabela 5:** Sistema de eluição utilizado para 4Y.

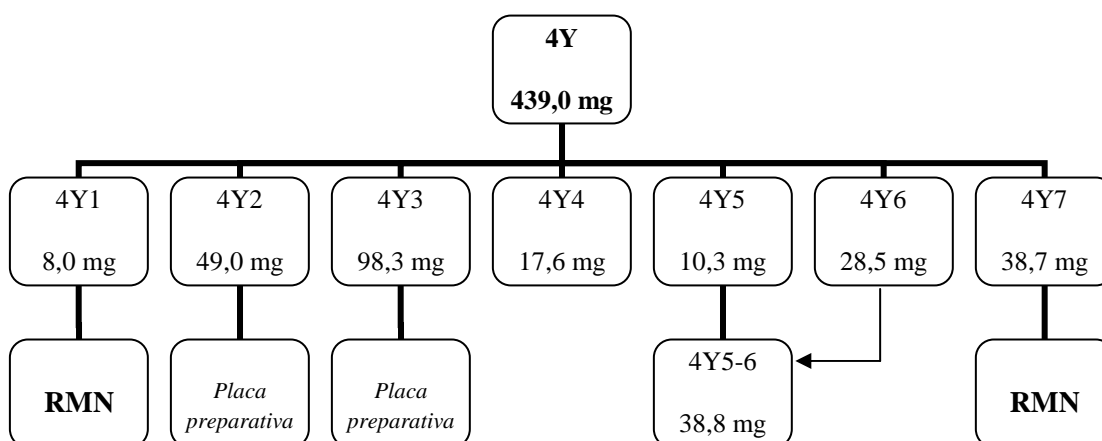
| <b>Volume Utilizado (mL)</b> | <b>Hexano:AcOEt:Clorofórmio % (v/v)</b> |
|------------------------------|---|
| 160                          | 68 : 2 : 30                             |
| 130                          | 48 : 2 : 50                             |
| 380                          | 28 : 2 : 70                             |
| 500                          | 18 : 2 : 80                             |

**Tabela 6:** Reunião de frações da subfração 4Y.

| <b>Subfrações</b>     | <b>Frações Reunidas</b> |
|-----------------------|-------------------------|
| *Subfração <b>4Y1</b> | 17 – 23                 |
| Subfração <b>4Y2</b>  | 24 – 29                 |
| Subfração <b>4Y3</b>  | 30 – 36                 |
| Subfração <b>4Y4</b>  | 37 – 41                 |
| Subfração <b>4Y5</b>  | 42– 50                  |
| Subfração <b>4Y6</b>  | 51 - 67                 |
| *Subfração <b>4Y7</b> | 104 - 117               |

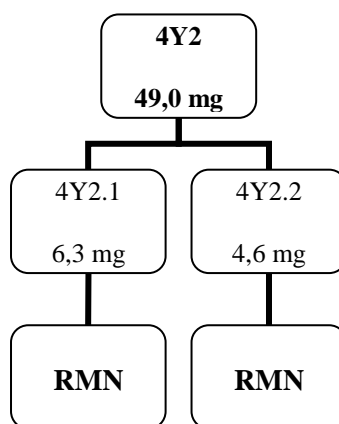
\* Subfrações encaminhadas para RMN.

A subfração 4Y1 (8,0 mg) e a 4Y7 (38,7 mg) foram enviadas para RMN, pois apresentaram uma boa separação, cada uma apresentou uma única mancha na placa analítica (figura 5).

**Figura 5:** Fluxograma da CC da fração 4Y.

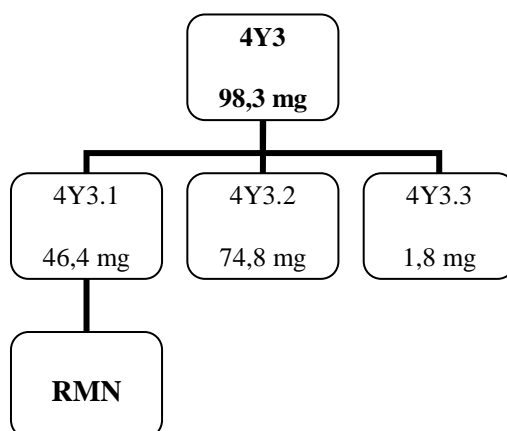
A fração 4Y2 (49,0 mg) foi submetida a CCDP, utilizando o sistema solvente Hex:AcOEt:Clorofórmio 28:2:70 v/v, a qual resultou em duas frações, denominadas

4Y2.1 e 4Y2.2. As frações foram analisada por CCF, utilizando o mesmo sistema de solvente e revelada com *p*-anisaldeído (figura 6), as frações 4Y2.1 e 4Y2.2 foram enviadas para RMN. Com a fração 4Y5 (10,3 mg) e 4Y6 (28,5 mg) realizou a reunião das mesmas, pois apresentaram manchas semelhantes quando analisadas em CCF, denominada 4Y5-6 (38,8 mg). Já a subfração 4Y4 não foi estudada, por não apresentar uma boa separação na placa analítica, aonde formou-se 3 manchas diferentes.



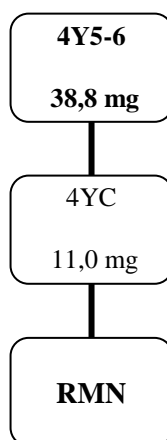
**Figura 6** – Fluxograma da placa preparativa da fração 4Y2.

A fração 4Y3 (98,3 mg) foi fracionada em CCDP, utilizando o sistema solvente Hex:AcOEt:Clorofórmio 48:2:50 v/v, resultou em três frações denominadas de 4Y3.1, 4Y3.2 e 4Y3.3 (figura 7). As frações foram analisadas por CCF, estas foram visualizadas em lâmpada UV e revelada com *p*-anisaldeído. A fração 4Y3.1 apresentou uma única mancha na placa então foi enviada para RMN. As subfração 4Y3.2 e 4Y3.3 não foram estudadas, pois não apresentar uma boa separação na placa analítica.



**Figura 7** – Fluxograma da placa preparativa da fração 4Y3.

A fração 4Y5-6 (38,8 mg) foi fracionada em CCDP utilizando-se o sistema solvente Hex:AcOEt:Clorofórmio 48:2:50 v/v, resultando em uma única fração (figura 8), ao qual foi analisada em CCF e revelada com *p*-anisaldeído.



**Figura 8** – Fluxograma da placa preparativas da fração 4Y5-6.

### 3.7. Fracionamento cromatográfico da subfração 5D (39 – 46).

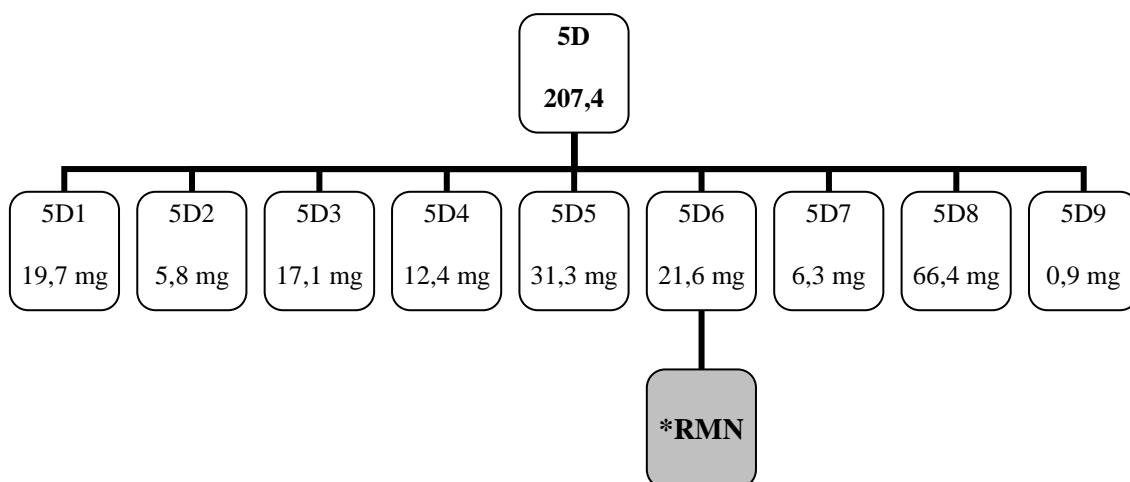
A subfração 5D (207,4 mg) foi fracionada em coluna de C18 de 2 cm de diâmetro por 30 cm de comprimento. Utilizando o sistema solvente MeOH/H<sub>2</sub>O e DCM, conforme a tabela 7, resultando em 9 frações que foram coletadas em frascos tipo penicilina.

**Tabela 7:** Sistema de eluição utilizado para 5D.

| Subfrações 5D | MeOH : H <sub>2</sub> O, MeOH e DCM % (v/v) |
|---------------|---|
| 5D1           | 80 : 20                                     |
| 5D2           | 80 : 20                                     |
| 5D3           | 80 : 20                                     |
| 5D4           | 90 : 10                                     |
| 5D5           | MeOH 100                                    |
| *5D6          | MeOH 100                                    |
| 5D7           | MeOH 100                                    |
| 5D8           | DMC 100                                     |
| 5D9           | DMC 100                                     |

\*Subfrações encaminhadas para RMN.

As frações foram analisadas por CCF e *p*-anisaldeído. A subfração 5D6 (21,6 mg), apresentou uma boa separação, ao qual obteve uma única mancha, esta fração foi enviada para RMN (figura 9).



**Figura 9:** Fluxograma de fracionamento da fração 5D.

As demais frações não foram estudadas por não apresentarem uma boa separação quando analisadas em CCF, estas ficaram com várias manchas sobrepostas.

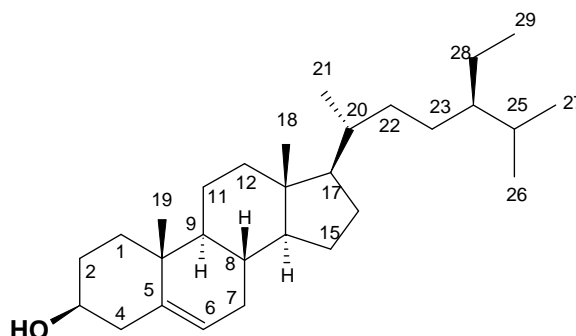
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico das folhas da *Bauhinia unguolata* resultou no isolamento e identificação estrutural da seguinte substância.

A substância 1 (5D6) foi identificada como  $\beta$ -sitosterol (figura 10).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 11 a 13) verificou-se a presença de sinais intensos entre  $\delta$  0,65 - 2,2 relacionados aos grupos metilas e metilênicos. Observou-se singletos para as metilas em  $\delta$  0,65; 0,68; 0,70; 0,80; e 1,19 (H-18, H-19, H-21, H-26, H-27 e H-29), multipletos em 3,55 (1-H, H-3) e em 5,4 (1-H, H-6).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  inferiu a presença de 29 sinais de carbono (Figura 14 a 16). O espectro de C-13 apresenta sinais característicos do sitosterol em  $\delta$  121,7 e 140,7 (MAHATO e KUNDU, 1994). Os dados da literatura confirmam a estrutura proposta, (tabela 8) aonde é possível observar os dados de  $^{13}\text{C}$  para a substância 1 e os dados da literatura para o  $\beta$ -sitosterol.



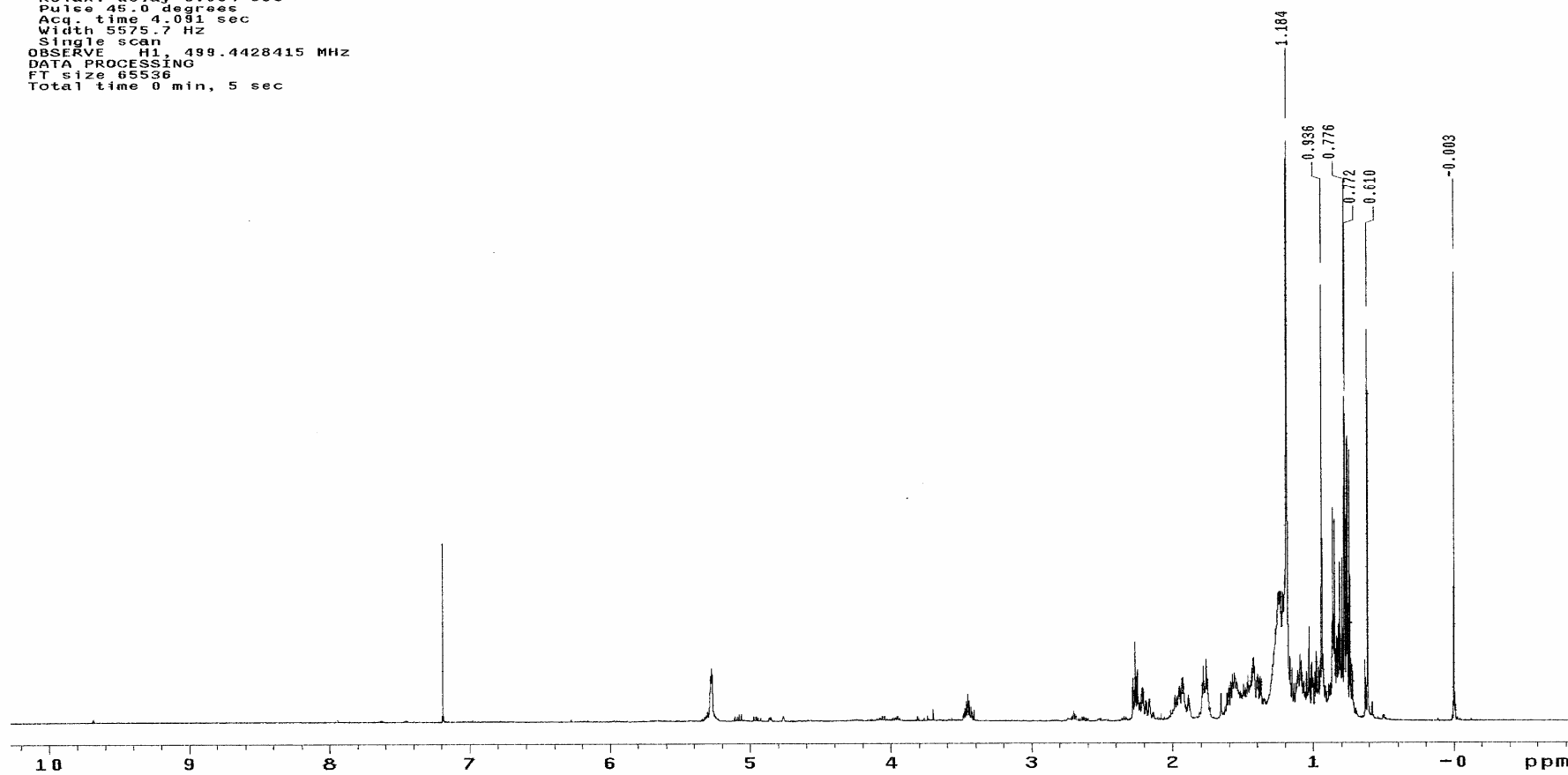
**Figura 10:** Estrutura da substância 1 ( $\beta$ -sitosterol)

As demais amostras mandadas para o RMN foram obtidas como misturas, então optou-se por não trabalhar com as mesmas.

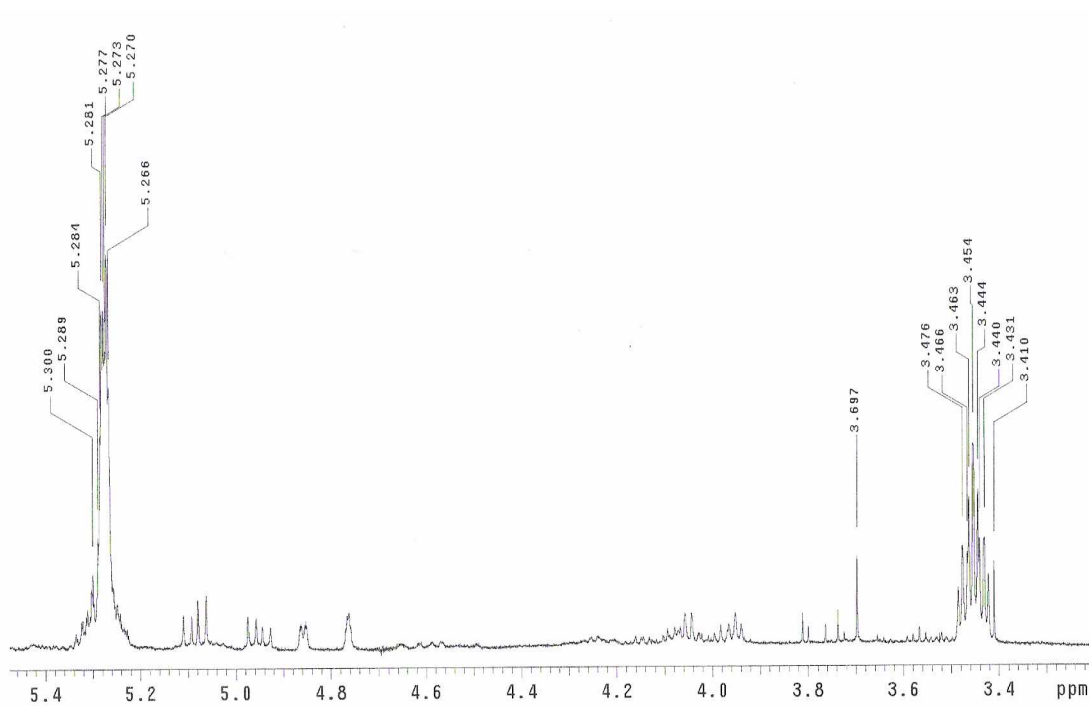
**Tabela 8:** Dados de  $^{13}\text{C}$  para a substância 1 ( $\beta$ -sitosterol) comparados com a literatura.

| <b>N<sup>o</sup></b> | <b>Dados da literatura de <math>^{13}\text{C}</math> (<math>\delta</math>)</b> | <b>Amostra <math>^{13}\text{C}</math> (<math>\delta</math>)</b> |
|----------------------|--|---|
| 1                    | 37,2   | 37,3  |
| 2                    | 31,6   | 31,6  |
| 3                    | 71,8   | 71,8  |
| 4                    | 42,5   | 42,3  |
| 5                    | 140,8  | 140,7   |
| 6                    | 121,7  | 121,7   |
| 7                    | 31,9   | 31,9  |
| 8                    | 31,9   | 31,9  |
| 9                    | 50,1   | 50,1  |
| 10                   | 36,5   | 36,5  |
| 11                   | 21,1   | 21,1  |
| 12                   | 39,7   | 39,8  |
| 13                   | 42,3   | 42,3  |
| 14                   | 56,7   | 56,8  |
| 15                   | 24,4   | 24,3  |
| 16                   | 28,2   | 28,2  |
| 17                   | 56,0   | 56,1  |
| 18                   | 11,9   | 11,8  |
| 19                   | 19,4   | 19,3  |
| 20                   | 36,1   | 36,1  |
| 21                   | 18,8   | 18,7  |
| 22                   | 33,9   | 33,9  |
| 23                   | 26,0   | 26,1  |
| 24                   | 45,8   | 45,8  |
| 25                   | 29,1   | 29,2  |
| 26                   | 19,8   | 19,8  |
| 28                   | 19,1   | 19,1  |
| 28                   | 11,9   | 11,8  |
| 29                   | 12,1   | 12,0  |

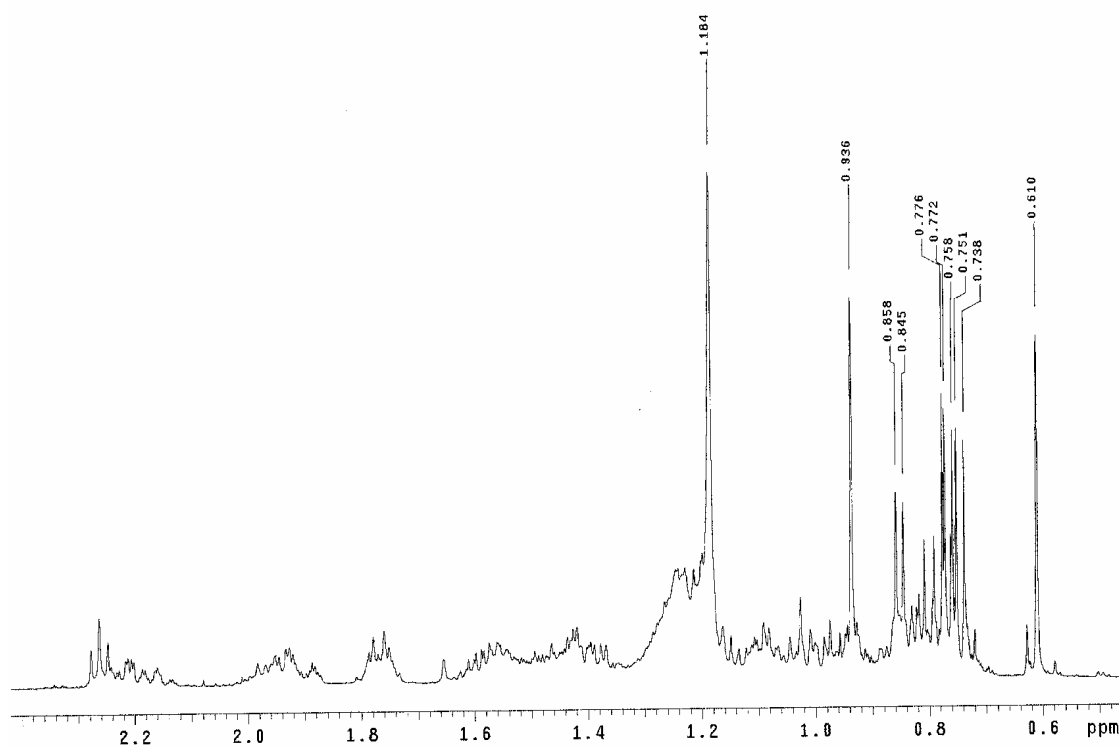
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDCl3  
Temp. 30.0 C / 303.1 K  
INNOVA-500 "mult165"  
  
Relax. delay 0.904 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 4.091 sec  
Width 5575.7 Hz  
Single scan  
OBSERVE H1, 499.4428415 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 65536  
Total time 0 min, 5 sec



**Figura 11:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 12:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1, expansão 1 na região X a Y(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 13:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1, expansão 2 na região K a W(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Temp. 30.0 C / 303.1 K  
User: 1-14-87  
INOVA-500 "multis5"  
  
Relax. delay 0.957 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 1.042 sec  
Width 29027.6 Hz  
496 repetitions  
OBSERVE C13, 125.5849918 MHz  
DECOUPLE H1, 499.4452906 MHz  
Power 30 dB  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 1.0 Hz  
FT size 65536  
Total time 3 hr, 59 min, 54 sec

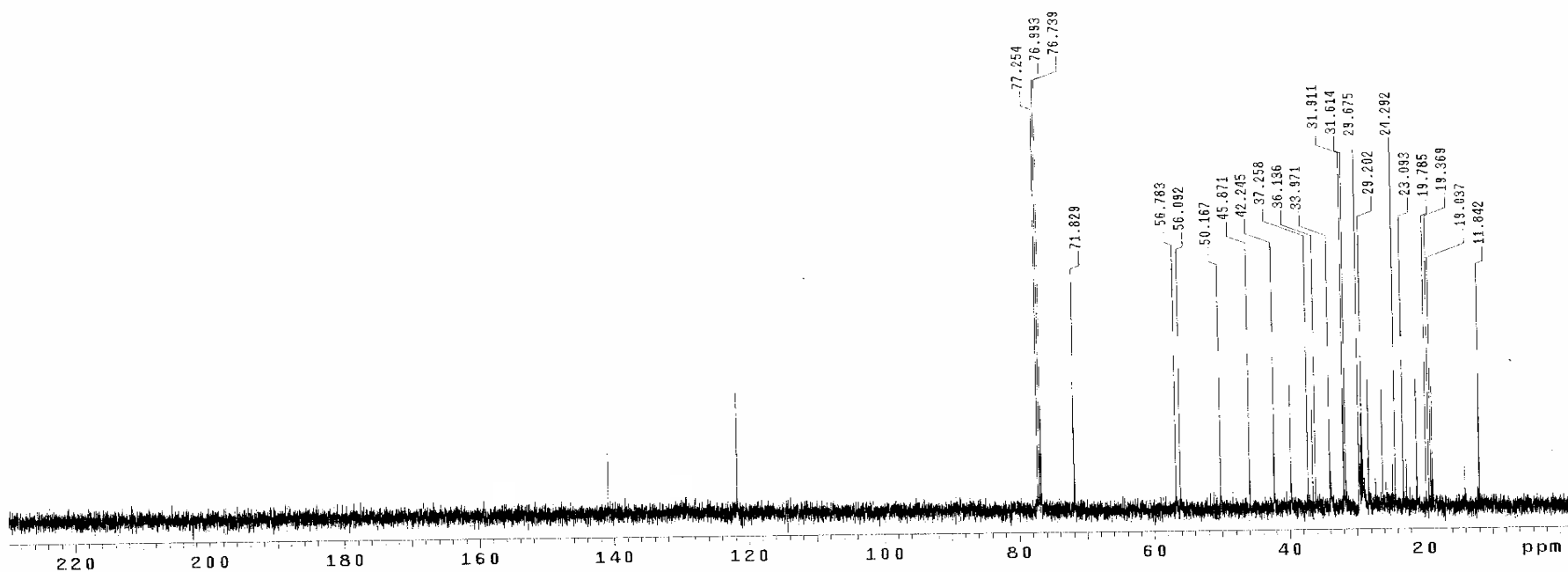
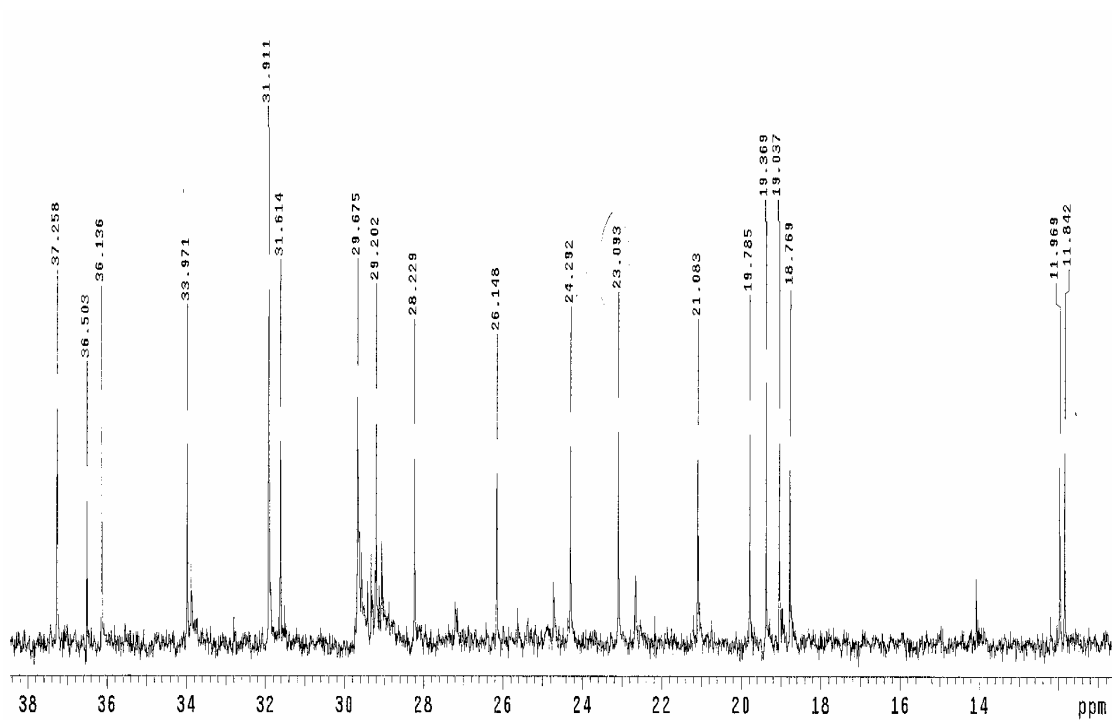
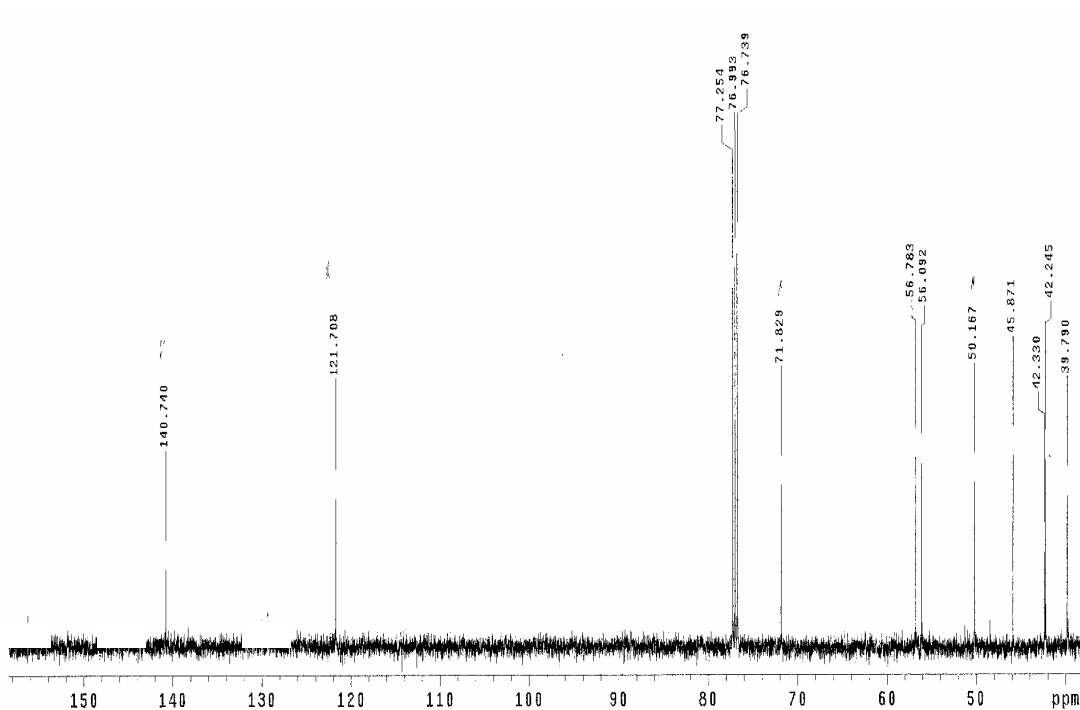


Figura 14: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 1 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 15:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 1, expansão 1 na região A a B (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 16:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 1, expansão 2 na região C a D (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## 5. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da fração hexânica das folhas de *Bauhinia unguolata*, resultou no isolamento e identificação estrutural do  $\beta$ -sitosterol.

As demais frações encaminhadas para o RMN apresentaram-se como mistura, então decidiu-se não trabalhar com as mesmas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAZÔNIA. Disponível em: <<http://www.amazonia.org.br/>> Acesso em 15/01/2010.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- AZEVEDO, C. R. **Investigações sobre a presença de insulina em folhas de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) utilizadas no tratamento de diabetes.** 2000. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes-RJ.
- BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 191-197, 2002.
- CALIXTO, J. B.; Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência & cultura**, v. 55, n. 3, p. 36-39, 2003.
- CAMARGO, M. T. L. A. **Plantas Medicinais e de Rituais afro-brasileiro 2: estudo etnofarmacobotânico.** 1ª ed. Ícone, 1998, São Paulo.
- CAMPOS, K. E.; BALBA, P. C.; ALVES, M. J. Q. F. Efeitos do extrato aquoso de cebola (*Allium cepa* L.) sobre a função renal e a pressão arterial em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 1, p. 24-29, 2005.
- CECHINEL F. V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, p. 99-105, 1998.
- CECHINEL, F. V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 3. 1952.
- DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGET, M. V. C. Study of *Bauhinia forficata* L. extract on diabetes in pregnant rats. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 2, n. 1, p. 49-55, 1999.
- DI STASI, L. C.; HIRUMS, C. S.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, p. 529-540, 1994.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas in SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, p. 97-104, 1999.

GENTRY, A. H. The distribution and evolution of climbing plants. In: Putz, F.E., Mooney, H.A. (Eds), **The Biology of vines**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p. 3-50, 1991.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 12, p. 3864 - 3868, 1991.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. London: Royal Botanic Gardens Kew, p. 369, 1987.

LEWIS, G. P. Tribo Cercideae. In: **Legumes of the World**. Kew-Plants People Possibilities, p. 57-67, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Instituto Plantarum. Nova Odessa, v. 1, 2000.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>CNMR spectra of pentacyclic triterpenoids: a compilation and some satellite feature. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1517-1575, 1994.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de Biotecnologia em Plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Edição Imprensa Universitária - UFV. Viçosa. Minas Gerais, 1995.

MASÍS, A.; ESPINOZA, R.; GUADAMUZ, A.; PEREZ, D. Y; CHAVARRÍA, F. 1998. Species Page de *Bauhinia unguolata* (Fabaceae/Caesalpinioideae), 18 enero 1998. Species Home Pages, Area de Conservación Guanacaste, Costa Rica.

Disponível em: [http://www.acguanacaste.ac.cr/paginas\\_especie/magnoliophyta/fabaceae/bauhinia\\_ungulata/b\\_ungulata18ene98/b\\_ungulata18ene98.html](http://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/magnoliophyta/fabaceae/bauhinia_ungulata/b_ungulata18ene98/b_ungulata18ene98.html).

Acessado em 20 fev. 2010.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1988.

MATOS, F. J. A. **Fármacias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 3ª ed. EUFC. Ceará, 1998.

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

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

SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco explorados pelos dentistas. **Ciência & cultura**, v. 59, n. 1, 2007.

TESKE, M & TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de Fitoterapia**. Herbarium Lab. Botânico, Curitiba: Paraná, Brasil, p. 317, 1995.

VAZ, A.M.S. da F. & TOZZI, A.M.G. de A. Aculeatae, a new series in *Bauhinia* section Pauletia (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cercideae). **Novon**, v. 13, n. 1, p. 141-144, 2003.

VAZ, A.M.S.F. & TOZZI, A.M.G.A. Sinopse de *Bauhinia* sect. Pauletia (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 477-491, 2005.

VOLPATO, G. T. Repercussões maternas, reprodutivas e perinatais do tratamento com extrato aquoso de folhas de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) na prenhez de ratas não-diabéticas e diabéticas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 23, n. 6, p. 404, 2001.

WUNDERLIN, R. P.; LARSEN, K.; LARSEN, S. S. Reorganization of the tribe Cercideae (Fabaceae: Caesalpinioideae). **Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab**, v. 28, p. 1-40, 1987.

YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Santa Catarina: Editora Universitária: UNOESC/Argos, n. 1, p. 500, 2001.