

**Perfil cromatográfico por HPLC-DAD, potencial
antiacetilcolinesterase e toxicidade de extratos etanólicos da espécie
Bauhinia monandra Kurz**

**HPLC-DAD chromatographical profile, potential anti-
acetylcholinesterase and toxicity of ethanolic extracts of the
Bauhinia monandra Kurz species**

DOI:10.34117/bjdv7n1-080

Recebimento dos originais: 05/12/2020

Aceitação para publicação: 05/01/2021

Daniel Pereira de Oliveira

Graduando de Licenciatura em Química

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi - CEP 60.714-903 -
Fortaleza-Ceará

Laboratório de Química de Produtos Naturais

E-mail: pereira.oliveira@aluno.uece.br

Eveline Solon Barreira Cavalcanti

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi - CEP 60.714-903 -
Fortaleza-Ceará

Laboratório de Química de Produtos Naturais

E-mail: eveline.cavalcanti@uece.br

Selene Maia de Moraes

Doutora em Química pela University of London, UL, Inglaterra

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi - CEP 60.714-903 -
Fortaleza-Ceará.

Laboratório de Química de Produtos Naturais

E-mail: selenemaiademoraes@gmail.com

Cleonilda Claita Carneiro Pinto

Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Monsenhor Tabosa S/Nº, 62.500-000, Campus Itapipoca, Ceará, Brasil.

Laboratório de Química de Produtos Naturais

E-mail: claita.pinto@uece.br

Francisco Flávio da Silva Lopes

Graduado de Licenciatura em Química pela Universidade Estadual do Ceará

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi - CEP 60.714-903 -
Fortaleza-Ceará

Laboratório de Química de Produtos Naturais

E-mail: flavio.lopes@aluno.uece.br

Ana Lyvia Moreira Rodrigues

Doutoranda em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi - CEP 60.714-903 -
Fortaleza-Ceará.

Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectroscópicas

Email: livya.rodrigues@aluno.uece.br

Daniela Ribeiro AlvesDoutora em Ciências Veterinárias pela Faculdade de Veterinária da Universidade
Estadual do Ceará

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi - CEP 60.714-903 -
Fortaleza-Ceará.

Laboratório de Química de Produtos Naturais

Email: alves.danielaribero@gmail.com

Ana Isabel Vitorino Maia

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará

Instituição: Universidade Estadual do Ceará

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus Itaperi - CEP 60.714-903 -
Fortaleza-Ceará.

Email: isabel.vitorino@uece.br

RESUMO

Uma das vias de tratamento para a doença de Alzheimer consiste na inibição da acetilcolinesterase, responsável pelo controle de acetilcolina nas sinapses colinérgicas. Foram produzidos extratos etanólicos com folhas, flores e galhos da espécie *Bauhinia monandra* KURZ. Os constituintes químicos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase seguiu a metodologia de (ELLMAN *et al*, 1961). A toxicidade foi testada através de mortalidade dos microcrustáceos de *A. salina*. De acordo com a CLAE, foram evidenciados metabólitos secundários do tipo flavonoides livres e glicosilados. O flavonóide rutina apresentou ocorrência nos três extratos e com maior teor no extrato das flores. Os extratos não demonstraram toxicidade elevada frente aos microcrustáceos de *A. salina*. Os três extratos apresentaram atividade antiacetilcolinesterase moderada de acordo com a classificação de Santos e colaboradores (2018), porém as flores apresentaram uma concentração menor para inibir 50% da enzima na avaliação. Provavelmente esta ação anticolinesterásica é devida em parte aos flavonoides presentes nos extratos como a rutina e quercetina que já tem esta ação comprovada. É necessário um estudo mais profundo, bem como isolamento e purificação de princípios ativos nas flores de *B. monandra*, no intuito de investigar substâncias possivelmente farmacológicas.

Palavras Chaves: *Bauhinia monandra*, perfil cromatográfico, acetilcolinesterase.**ABSTRACT**

One of the treatment routes for Alzheimer's disease is the inhibition of acetylcholinesterase, responsible for the control of acetylcholine in cholinergic synapses

Ethanollic extracts were produced with leaves, flowers and branches of the species *Bauhinia monandra* KURZ. Foral chemical constituents identified by high efficiency liquid chromatography. The inhibitory activity of the acetylcholinesterase enzyme followed the methodology of (ELLMAN et al, 1961). The toxicity was tested by mortality of *A. salina* microcrustaceans. According to CLAE, secondary metabolites of free flavonoid and glycosylated type were evidenced. The flavonoid rutin showed occurrence in the three extracts and with higher content in the flower extract. The three extracts showed moderate antiacetylcholinesterase activity according to Santos and collaborators classification (2018), however the flowers presented a lower concentration to inhibit 50% of the enzyme in the evaluation. The extracts did not show high toxicity against *A. salina* microcrustaceans. A deeper study is necessary, as well as isolation and purification of active principles in the flowers of *B. monandra*, in order to investigate possibly pharmacological substances

Keywords: *Bauhinia monandra*, chromatographic profile, acetylcholinesterase.

1 INTRODUÇÃO

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima cujo principal papel biológico é a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nos complexos colinérgicos. No complexo colinérgico ocorre à transmissão do impulso nervoso de um neurônio ao outro. As sinapses nervosas são amplamente partilhadas no sistema nervosa central (SNC) e periférico (SNP) apresentando uma importância imprescindível em diversas funções fisiológicas humanas (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016)

Diversos fármacos apresentam atividade biológica nas sinapses colinérgicas. Podem atingir o mecanismo de ação da AChE, inibindo ou reativando. Os fármacos que atuam no processo de inibição da AChE são denominados de antiacetilcolinesterásicos ou colinérgicos indiretos. Com o processo de inibição da AChE, o neurotransmissor ACh não é hidrolisado favorecendo a permanência do mesmo na fenda sináptica. A maior duração da ACh configura uma potencialização do impulso nervosa. Quando os colinérgicos indiretos apresentam ação no SNC, podem ser adequados no processo de tratamento de demência relacionada as doenças de Alzheimer e Parkinson (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Fitoquímicos têm sido bastante utilizados na medicina popular para o melhoramento das funções cognitivas perdidas com o tempo, por conta das doenças neurodegenerativas (ADEWUSI; MOODLEY; STEENKAMP, 2010). Extratos vegetais processados têm se mostrado ótimos carreadores de compostos bioativos capacitados não somente a apresentar atividade antiacetilcolinesterase (ANEKONDA; REDDY,

2005), mas também em potenciais antioxidantes e anti-inflamatórios (ADEWUSI; MOODLEY; STEENKAMP, 2010).

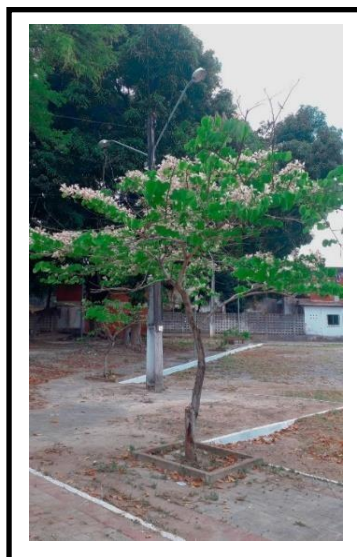
Dentre os fitoquímicos, os alcalóides chamam atenção como compostos promissores no tratamento da Doença de Alzheimer, por conta de sua estrutura nitrogenada complexa (PEREIRA *et al*, 2010). A explicação de determinada consideração dar-se ao fato de que um dos sítios alvos de inibição da acetilcolinesterase circunda à interação de átomos de nitrogênio carregados positivamente, os quais estão presentes nos alcalóides. Entretanto, é válido salientar que outros compostos não alcalóides também apresentam potencial antiacetilcolinesterásico, pois se ligam a outros sítios da molécula AChE (BRUMLMANN *et al*, 2004; HOSTETTMANN; BORLOZ; MARSTON, 2006; HOUGHTON; REN; HOWES, 2006).

Este trabalho objetivou avaliar a composição química, atividade antiacetilcolinesterase e toxicidade de extratos etanólicos da espécie vegetal *Bauhinia monandra* Kurz.

2 METODOLOGIA

A planta (Figura 1) para estudo foi coletado na Universidade Estadual do Ceará-Campus Itaperi, nas coordenadas (lat.: -3.47207; long.: -38.33092), Fortaleza, Ceará, Brasil. A exsiccata da planta foi depositada no herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará com o código EAC 63508.

Figura 1: *Bauhinia monandra* Kurz localizada na Universidade Estadual do Ceará



Fonte: Próprio autor

Folhas, flores e galhos foram colocados em estufa de aeração a 60° C para secagem por um período de dois dias. Em seguida foram picotadas e acondicionadas em recipientes de plástico devidamente lacrados com álcool etílico 96% para o processo de maceração em um período de 7 dias. Logo após foi executada a filtração do material utilizando funil de vidro com algodão, com objetivo de separar a fase líquida da fase sólida. Os extratos foram concentrados utilizando um evaporador rotativo, e logo após, postos em banho-maria.

3 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Condições cromatográficas: Coluna Shim-pack (CLC) ODS GOLD 25 cm. Tempo decorrida: 30 minutos. Comprimento de onda: 350 nm. Vazão: 1,0 mL.mim⁻¹. Fase móvel: 20% acetonitrila: 80% Tampão ácido fosfórico pH=2,8.

Preparação das amostras: 50,0 mg de amostra foi solubilizada em 5,0 mL de metanol. Uma alíquota de 1 mL da solução foi diluída em 10 mL de metanol. Concentração final de 1,0 mg.mL⁻¹.

Padrões utilizados: Rutina, isoquercetrina, kaempferol e quercetina.

Injeção: 20,0 µL.

3.1 PREPARAÇÃO DOS PADRÕES

Os padrões analíticos rutina, isoquercetrina, kaempferol e quercetina foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os solventes usados para extração foram de grau analítico (Vetec®), nas análises os solventes utilizados foram de grau HPLC (J.T. BAKER®). A água foi purificada com um sistema Milli-Q (UV Direct3). Todas as amostras e soluções preparadas para análises por HPLC foram filtradas em membrana de náilon de 0,45 µm e filtro de membrana de 0,22 µm (Millipore), respectivamente, antes do uso. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.2 EQUIPAMENTO E ANÁLISES

A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-DAD) foi realizada com um sistema de HPLC Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AD conectadas a um degaseificador DGU 20A5 com um CBM 20A integrador, detector de matriz de diodos

SPD-M20A e software LC Solution 1.22 SP1. As análises cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa Shim-pack (CLC) ODS GOLD (4,6x250mm, 5µm). As fases móveis C e D foram acetonitrila e água Milli-Q acidificada a pH 2,8 com ácido fosfórico, correspondentemente, gradiente de solvente foi usado como a seguir: 0-15 min, uma eluição isocrática com C:D (20:80 v/v); 17-25 min, variação linear até C:D (40:60 v/v); 25-40 min, uma eluição isocrática com C:D (20:80 v/v). A vazão foi de 1,0 mL.min⁻¹, com volume de injeção de 20µL e comprimento de onda de 350 nm. A solução estoque de referência padrão foi preparada em metanol HPLC em uma faixa de concentração de 0,00032–1,0 mg.mL⁻¹ para rutina; 0,000102–1,0 mg.mL⁻¹ para isoquercetrina; 0,0008–1,0 mg.mL⁻¹ para kaempferol-3-O-rutinosídeo e 0,000064–0,4 mg.mL⁻¹ para quercetina.

Os picos da cromatografia foram confirmados comparando o seu tempo de retenção com o do padrão de referência e por espectros DAD (200 a 400 nm). Curva de calibração para rutina: $y=4,10^{-8}X + 0,005$ ($r=0,9996$); isoquercetrina: $y= 2,10^{-8}X + 0,0136$ ($r=0,9977$); kaempferol-3-O-rutinosídeo: $y= 2,10^{-7}x + 0,0038$ ($r=0,9999$) e quercetina: $y= 2,10^{-8}X -0,00002$ ($r=0,999$). As amostras foram analisadas em triplicado e medidas as áreas médias dos picos.

4 ATIVIDADE ANTIACETILCOLINESTERASE

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi aferida em placas de 96 poços de fundo plano utilizando leitor Elisa BIOTEK, modelo ELX 800, software “Gen5 V2.04.11”, baseando-se na metodologia descrita por ELLMAN et al. (1961). A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (considerada atividade total da AChE, 100%). O padrão utilizado como controle positivo é a fisostigmina.

4.1 TOXICIDADE FRENTE *Artemia salina* Leach

Os ovos de *Artemia salina* foram eclodidos em água salina artificial (Sais utilizados na preparação de 1 L de solução: NaCl = 15,153g; MgCl₂ = 1,398 g; Mg(SO₄)₂ = 1,888 g; CaCl₂ = 0,652 g; KCl = 0,414 g; NaHCO₃ = 0,116 g) e após 48 horas, os microcrustáceos foram coletados para os bioensaios.

Procedimento:

As dissoluções de 20 mg extrato e frações foram realizadas com 2 mL do solvente correspondente, de modo a se obter as seguintes concentrações: 1.000, 100,10 e 1ppm. Posteriormente, um volume equivalente a 500 µL de uma solução-amostra foi adicionado em um recipiente de vidro. Esse procedimento foi realizado para todas as soluções-amostras e em triplicata. Esperou-se todo o solvente evaporar dos recipientes e adicionou-se 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) juntamente com 1 mL de água salina contendo 10 microcrustáceos completando com mais 3,9 mL de água salina em cada sistema-teste. A contagem dos microcrustáceos sobreviventes foi realizada após 24 horas.

Os valores de DL₅₀ foram calculados por gráficos das concentrações (1000, 100, 10 e 1 ppm) por número de *A. salina* mortas, sendo que apenas as amostras que apresentarem um CL₅₀ ≤ 1000 iram ter princípios bioativos frente *A. salina*. A análise dos dados foi realizada no Excel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

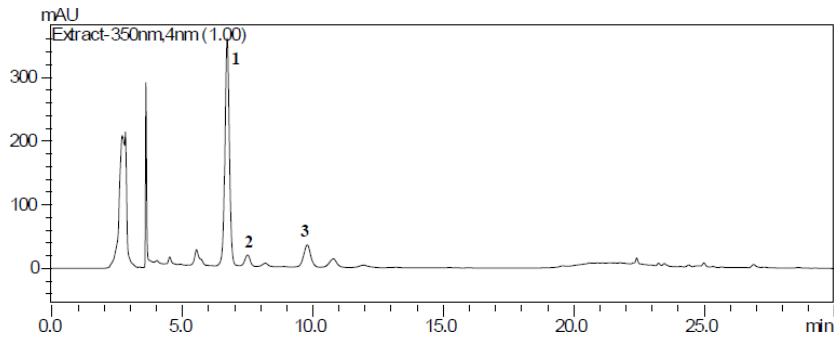
Em relação ao perfil cromatográfico dos extratos, pôde-se observar a presença de flavonóides livres e glicosilados bastante ocorrentes dentro do gênero *Bauhinia* (Tabelas 1,2 e 3). O bioflavonóide glicosilado rutina apresentou ocorrência nos três extratos. As estruturas dos compostos identificados estão expostas na Figura 5.

Tabela 1: Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *B. monandra*.

Nº	TR	Descrição	Comprimento de onda máximo	Teor (mg/g de extrato)
1	6.706 min	Rutina	203;256;354 nm	9,27±0,10
2	7.492 min	Isoquercetrina	199;265;350 nm	1,04±0,00
3	9.780 min	Canferol-3-O-rutinosídeo	198;265;350 nm	7,71±0,08

Legenda: TR=Tempo de retenção
Fonte: Próprio autor

Figura 2: Cromatograma obtido pela injeção do extrato etanólico das folhas de *B. monandra*



Fonte: Próprio autor

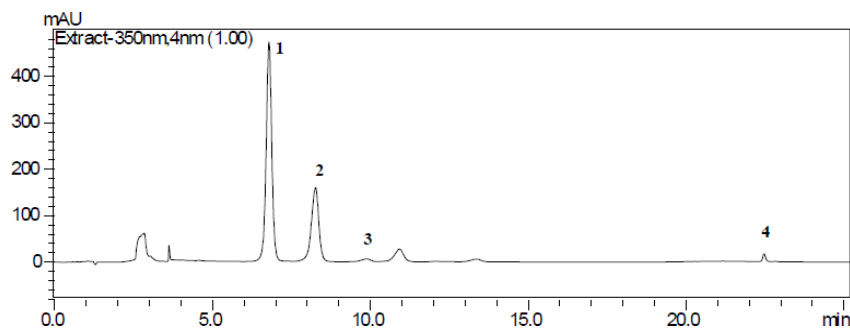
Tabela 2: Perfil cromatográfico do extrato etanólico das flores de *B. monandra*

Nº	TR	Descrição	Comprimento de onda máximo	Teor (mg/g de extrato)
1	6.782 min	Rutina	204;258;355 nm	248,93±4,56
2	8.255min	Isoquercetrina	204;258;354 nm	67,92±0,87
3	9.873 min	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	197;267;350 nm	38,11±0,52
4	22.467 min	Quercetina	202;255;368 nm	2,06±0,03

Legenda: TR=Tempo de retenção

Fonte: Próprio autor

Figura 3: Cromatograma obtido pela injeção do extrato etanólico das flores de *B. monandra*



Fonte: Próprio autor

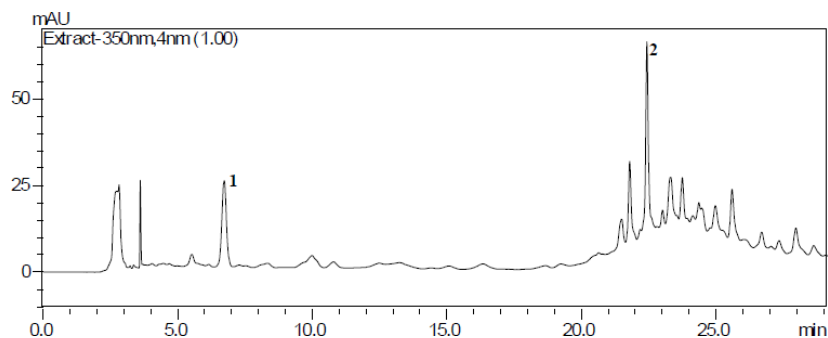
Tabela 3: Perfil cromatográfico do extrato etanólico dos galhos de *B. monandra*

Nº	TR	Descrição	Comprimento de onda máximo	Teor (mg/g de extrato)
1	6.716 min	Rutina	203;255;356 nm	0,95±0,07
2	22.428min	Quercetina	203;255;370 nm	0,68±0,02

Legenda: TR=Tempo de retenção

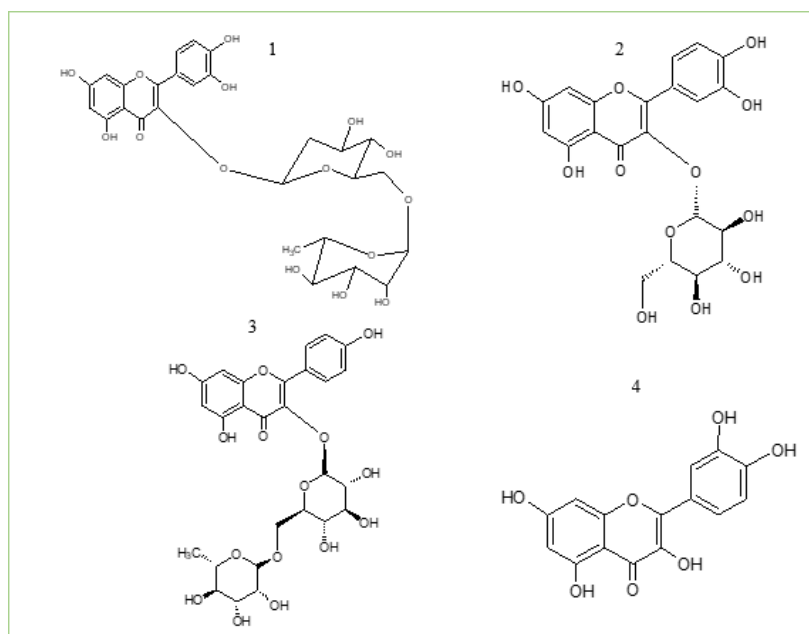
Fonte: Próprio autor

Figura 4: Cromatograma obtido pela injeção do extrato etanólico dos galhos de *B. monandra*



Fonte: Próprio autor

Figura 5: Representação estrutural das substâncias caracterizadas nos extratos etanólicos de *B. monandra*. (1) rutina; (2) isoquercetrina; (3) canferol-3-O-rutinosídeo; (4) quercetina



Fonte: Próprio autor

Autores como Sultana *et al*, 1985; Subramaniam e Nair, 1963; Cechinel Filho *et al*, 1995; Tiwari *et al*, 1978; Row *et al*, 1979 e Abd-El-Wahab *et al*, 1987 já evidenciaram em seus estudos à presença do flavonóide glicosilado rutina nas espécies de *Bauhinias* como: *B. vahlii*; *B. tomentosa*; *B. splendens*; *B. retusa*; *B. tomentosa* e *B. purpurea* respectivamente.

O flavonóide glicosilado isoquercetrina já foi identificado em outras espécies de *Bauhinia*. Dentre as espécies estão: *B. purpurea* (RAMACHANDRAN e JOSHI, 1967); *B. tomentosa* (SUBRAMANIAM e NAIR, 1963); *B. retusa* (ROW *et al*, 1954) e *B. racemosa* (TIWARI *et al*, 1978).

Ocorrências do flavonoide livre quercetina já foram relatadas em espécies de *Bauhinia* como: *B. purpurea* (RAMACHANDRAN e JOSHI, 1967); *B. splendens* (CECHINEL FILHO *et al*, 1995); *B. tomentosa* (ROW, RAMACHANDRA, VISWANADHAM, 1954) e *B. vahlii* (SULTANA *et al*, 1985).

O composto Canferol-3-*O*-rutinosídeo já foi relatado na espécie *B. candicans* (IRIBARREN e POMILIO, 1983).

Com todos esses flavonóides ocorrentes em diversas espécies do gênero *Bauhinia*, pode-se inferir que o gênero apresenta uma riqueza de flavonóides livres e glicosilados em sua composição química.

5.1 ATIVIDADE ANTIACETILCOLINESTERASE

No teste de inibição da enzima acetilcolinesterase os valores são expressos em concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da enzima AChE, esta que participa diretamente do impulso nervoso no complexo colinérgico. Os valores de inibição são comparados com o padrão fisostigmina (1,15±0,05µg/ml), considerado um alcalóide bastante potente.

É possível verificar que o Extrato Etanólico das Flores apresentou a menor concentração inibitória, dessa forma, têm-se a melhor inibição (Tabela 4). A atividade antiacetilcolinesterase é inversamente proporcional aos valores de concentração inibitória de 50% da enzima AChE. Nesse sentido, quando os valores se aproximam do padrão, as amostras são consideradas excelentes inibidoras de AChE. Esta ação provavelmente é promovida pelos flavonoides que estão presentes nos extratos como a rutina e principalmente a quercetina que apresentam atividade anticolinesterasica que juntamente com atividade antioxidante representam possíveis mecanismos pelos quais os flavonoides podem ser usados no manejo da neurodegeneração oxidativa induzida pelo estresse (ADEMOSUM *et al*, 2016).

Tabela 4: (IC₅₀) Concentrações inibitórias de 50% da enzima acetilcolinesterase do extrato etanólico das folhas, flores e galhos de *B. monandra*.

EXTRATOS	INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (IC ₅₀ µg/mL)
EEFO	25,38±0,37 (moderada)
EEFL	23,23± 0,48 (moderada)
EEOG	49,66 ±0,15 (moderada)
FISOSTIGMINA (controle)	1,15± 0,15

Legenda: EEFO (Extrato Etanólico das Folhas); EEFL (Extrato Etanólico das Flores); EEOG (Extrato Etanólico dos Galhos)

Fonte: Próprio autor

Nascimento e colaboradores (2018) já demonstraram que o composto Kaempferol 3-*O*-rutinosídeo apresenta uma ótima atividade anticolinesterase, podendo assim, explicar uma concentração baixa para a inibição de 50% da enzima pelo EEFL, visto que o mesmo foi identificado na composição do extrato.

Outras vias de tratamento para DA vêm sendo bastante discutidas. Dentre elas estão a utilização de substâncias antioxidantes, visto que, os radicais livres desempenham papel significativo em muitas doenças comuns, incluindo a DA. A peroxidação lipídica é um processo mediado por radicais livres, onde ocorre a quebra dos ácidos graxos nas membranas celulares, diminuindo a fluidez da membrana. Este mecanismo relacionado com outros eventos, pode acarretar condições patológicas como doenças cardíacas, alguns tipos de câncer, isquemia cerebral e condições inflamatórias (DUTHIE; DUTHIE; KYLE, 2000). Antioxidantes naturais obtidos de alimentos, como compostos fenólicos e carotenóides, inibem a peroxidação lipídica por meio de sua atividade de eliminação de radicais livres (FALCO *et al*, 2015).

Já existem relatos na literatura acerca do potencial antioxidante da isoquercetrina (quercetina 3-*O*- β -D-glicosídeo). Razavi e colaboradores (2009) já comprovaram excelente potencial fitotóxico e antioxidante da isoquercetrina. Wust e colaboradores (2016) também descreveram um excelente potencial antioxidante da fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico de *Paspalum repens*, onde isoquercetrina se apresentava como componente majoritário da fração. Como a isoquercetrina apresenta atividade antioxidante significativa, é de interesse que seu potencial inibidor de colinesterase seja também avaliado, podendo assim, garantir ou não mais um princípio ativo dentre da indústria farmacológica no tratamento ou melhora das funções cognitivas em indivíduos acometidos com DA.

Santos e colaboradores (2018) revisando o potencial antiacetilcolinesterásico de extratos e frações de 54 plantas de diferentes famílias, conseguiram classificar as amostras de acordo com os valores de IC₅₀ como: alta potência (IC₅₀ < 20 μ g/mL); potência moderada (20 < IC₅₀ < 200 μ g/mL) e baixa potência (200 < IC₅₀ < 1000 μ g/mL). Também expuseram que a atividade anti-AChE dos extratos vegetais é significativamente variável, independentemente da classe metabólitos secundários que dominam a composição das amostras ou da polaridade do solvente de extração.

Outras espécies de *Bauhinia* também já foram analisadas quanto sua atividade anti-AChE. Santos e colaboradores (2011) comparando à inibição da acetilcolinesterase de extratos hexânicos de folhas, flores e ramos de três espécimes de *Bauhinia*,

conseguiram evidenciar uma excelente inibição no extrato das flores de *B. unguolata* L. Com isso, os autores propuseram estudos mais detalhadas na composição química, com intuito de evidenciar princípios ativos potentes para essa atividade biológica.

Os extratos apresentaram perfil de inibição moderada, entretanto o extrato das flores evidenciou menor concentração necessária para inibir 50% da enzima no teste. Isso pode ter sido ao fato de que em sua constituição exista um elevado teor de flavonoides, como a rutina. De Oliveira e colaboradores (2020) já identificaram no extrato etanólico das flores, outros metabólitos que apresentam excelente inibição frente à enzima acetilcolinestrassa, dentre eles estão os alcalóides, podendo assim, justificar uma atividade anti-AChE promissora.

5.2 TOXICIDADE

Visualizando tabela 5, pode-se verificar que os extratos analisados não apresentaram grande toxicidade frente aos microcrustáceos. O extrato etanólico das flores foi o único extrato que apresentou mortalidade no teste, verificando-se uma ($DL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$). Dados que apresentam $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ indicam importante potencial de toxicidade (Meyer *et al*, 1982), sendo considerado um teste de toxicidade preliminar.

Tabela 5: Resultados da toxicidade frente *Artemia salina*.

	DL ₅₀ (ppm)
EEFO	Não apresentou toxicidade
EEFL	5036,00±0,00 ppm
EEGO	Não apresentou toxicidade

Legenda: EEFO (Extrato Etanólico das Folhas); EEFL (Extrato Etanólico das Flores); EEGO (Extrato Etanólico dos Galhos)

Fonte: Próprio autor

De acordo com o sistema tóxico-farmacológico, a intoxicação por plantas medicinais é a segunda maior causa de morte por intoxicação em seres humanos. Existem vários aspectos que acarretam essa problemática, como a falta de conhecimento sobre o cultivo, a não identificação correta da planta, reações adversas, interação medicamentosa, concentração e frequência do uso do fitoterápico. Com isso, é imprescindível o estudo toxicológico de amostras vegetais na utilização de potenciais farmacológicos (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

Muitos estudos já demonstraram relação de toxicidade a *Artemia salina* com potenciais biológicos como, citotoxicidade, antileishmanicida e anti- *Trypanossoma cruzi* (HOCAYEN *et al*, 2013). Esse microcrustáceo vêm sendo considerado um alvo para identificação de substâncias bioativas em plantas (ALVES *et al*, 2000).

6 CONCLUSÕES

O flavonóide glicosilado rutina foi evidenciado na composição química dos três extratos etanólicos analisados, apresentando um elevado teor nas flores.

Com a cromatografia líquida de alta eficiência, pôde-se comprovar que o gênero *Bauhinia* apresenta uma rica composição de flavonóides livres e glicosilados, como já demonstrado em diversos estudos.

Os extratos de folhas, flores e galhos apresentaram uma moderada atividade antiacetilcolinesterásica, enfatizando que a IC_{50} ocorreu nas flores.

Os extratos não apresentaram toxicidade elevada frente *A. salina*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a análise dos constituintes químicos, faz-se necessário um estudo mais profundo como: isolamento e purificação dos compostos bioativos majoritários, principalmente das flores de *B. monandra* objetivando a produção de fitofármacos na indústria. Além disso, é imprescindível o ensaio de toxicidade dos compostos com diversos métodos, focalizando em um status menos tóxico possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual do Ceará (UECE), ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e ao Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectroscópicas.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL-WAHAB, S. M.; WASSEL, G. M.; AMMAR, N. M.; HANNA, T. Flavonoid constituents in the different organs of selected Bauhinia species and their effect on blood glucose. **Herba Hungarica**, v. 26, n.1, p. 27-39, 1987
- ADEMOSUN, A. O.; OBOH, G; BELLO, F; AYENI, P. O. Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. **Journal of Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 21, n. 4, p. 11-17, 2016
- ADEWUSI, E. A.; MOODLEY, N.; STEENKAMP, V. Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: a review. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 49, p. 8257–8276, 2010
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR., A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000
- ANEKONDA, T. S.; REDDY, P. H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**, v. 50, n. 2, p. 361-376, 2005.
- ARAÚJO, C. R. M; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- BRÜHLMANN, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, n. 6, p. 819–829, 2004
- CECHINEL FILHO, V.; BREVIGLIERI, E.; WILLAIN FILHO, A.; SANTOS, A. R. S. Phytochemical analysis and analgesic effects of *Bauhinia splendens*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 76, n.4, p. 115-117, 1995
- DE OLIVEIRA, D. P; CAVALCANTI, E.S.B; MORAIS, S. M; PINTO, C. C. C; MONTES, R. A; DOS SANTOS, L. M. B; FURTADO, M. L; DA SILVA, E. S. Perfil fitoquímico e potencial antioxidante de extratos etanólicos da espécie Bauhinia Monandra Kurz (FABACEAE). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 86551-86564, 2020.
- DUTHIE, G; DUTHIE, S; Kyle, J. Polifenóis de plantas no câncer e doenças cardíacas: implicações como antioxidantes nutricionais. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 79-106, 2000
- ELLMAN, G. C; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FHEATHERSTONE, R. M. A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961
- FALCO, A; CUKIERMAN, D. S; HAUSER-DAVIS, R. A; REY, N. A. ALZHEIMER'S DISEASE: etiological hypotheses and treatment perspectives. **Química Nova**, [S.L.], p. 63-80, 2015
- HOCAYEN, P. A. S; CAMPOS, L. A; POCHAPSKI, M. T; Malfatti, C. R. M. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de Botânica**, n. 41, p. 23-31, 2012
- HOSTETTMANN, K.; BORLOZ, A.U.; MARSTON, A. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. **Current Organic Chemistry** v. 10, n. 8, p. 825–847, 2006
- HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Report**, v. 23, n. 2, p. 181–199, 2006
- INOUYE, K.; OLIVEIRA, G. H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer. **Infarma**, v. 15, n. 11-12, 2004
- IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B. Components of *Bauhinia candicans*. **Journal. Natural. Products**, v. 46, n. 5, p. 752-753, 1983

MEYER, B. N, FERRIGNI, N. R, PUTNAM, J. E, JACOBSEN, L. B, NICHOLS, D. E, MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982

NASCIMENTO, J. E. T; RODRIGUES, A. L. M; LISBOA, D. S; LIBERATO, H. R; FALCÃO, M. J. C; SILVA, C. R; NOBRE JÚNIOR, H. V; BRAZ FILHO, R; PAULA JUNIOR, V. F; ALVES, D. R. Chemical Composition and Antifungal In Vitro and In Silico, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Extracts and Constituents of *Ouratea fieldingiana* (DC.) Baill. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2018, p. 1-12, 2018

PARK, Y. K; EUNJU, P; KIM, J. S; KANG, M. E. O consumo diário de suco de uva reduz o dano oxidativo ao DNA e os níveis plasmáticos de radicais livres em coreanos saudáveis. **Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 529, n. 1-2, p. 77-86, 2003.

PEREIRA, D. M.; FERRERES, F.; OLIVEIRA, J.M.; GASPAR, L.; FARIA, J.; VALENTÃO, P.; SOTTOMAYOR, M.; ANDRADE, P. B. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8/9, p. 646–652, 2010.

RAMACHANDRAN, R., JOSHI, B.C. Chemical examination of *Bauhinia Purpurea* flowers. **Current. Science**, v. 36, n. 21, p. 574-575, 1967

RAZAVI, S. M; ZAHRI, S; ZARRINI, G; NAZEMIYEH, H; MOHAMMADI, S. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 376-378, 2009.

ROW, L., RAMACHANDRA, L., VISWANADHAM, N. Colouring matter of the flower petals of *Bauhinia Tomentosa* linn. In: **Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section A**. Springer India, 1954. p. 240-242.

SANTOS, K. M; GONÇALVES, P. S; DE PAIVA, J. N; LACERDA, G. A. Acetylcholinesterase inhibition starting from extracts of *Bauhinia variegata* L., *Bauhinia* var. *candida* (Aiton) Buch.-Ham., and *Bauhinia unguolata* L. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 781-783, 2011.

SANTOS, T. C.; GOMES T. M.; PINTO B. A. S.; CAMARA A. L.; PAES A. M. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1192, 2018

SILVEIRA, P. F; BANDEIRA, M. A, ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 618-626, 2008

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Em Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 20.

SUBRAMANIAN, S. S., NAIR, A.G.R. Isolation of isoquercitrin from the flowers of *Bauhinia tomentosa*. **Indian Journal of Chemistry**, v.1, n. 10, p. 450, 1963

SULTANA, S.; ILYAS, M.; MOHAMMED, K.; SHAIDA, W. A. Chemical investigation of *Bauhinia vahlii* Linn. (Leguminosae). *Journal of Indian Chemical Society*, v. 62, p. 337-338, 1985.

TIWARI, K. P.; MASOOD, M.; RATHORE, Y. K. S. Flavonoid constituents of bark of *Bauhinia retusa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences**, v. 48, n. 3, 183-184, 1978

WUST, K. M; CORNELIUS, M. T. F; SCHIRMANN, J; BRAUN, G; SARRAGIOTTO, M, H; OLGUIN, C, F, A. Investigação Fitoquímica, Atividade Antioxidante, Antifúngica e Antibacteriana da Parte Aérea da Macrófita *Paspalum Repens* PJ Bergius. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, 2016.