



Potencial antioxidante *in vitro* das folhas da *Bauhinia unguolata* L.

Cristiane da Silva Paula^{1*}; Vanessa Cristina Dias Canteli¹; Beatriz Cristina Konopatzki Hirota¹; Ranieri Campos¹; Vinícius Bednarczuk de Oliveira¹; Milena Kalegari¹; Cristiane Bezerra da Silva¹; Geciani Miriam Silva²; Obdúlio Gomes Miguel¹; Marilis Dallarmi Miguel¹

¹ Universidade Federal do Paraná (UFPR). Departamento de Farmácia. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

RESUMO

A *Bauhinia unguolata* L. (Pata de Vaca) é uma planta nativa do Brasil, encontrada principalmente na região Amazônica, Cerrado e Mata Atlântica, utilizada popularmente no tratamento do diabetes. Este trabalho descreve uma análise *in vitro* do potencial antioxidante do extrato bruto etanólico e frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica residual) obtidos de folhas desta espécie, através de três metodologias distintas: 1) captura de radical orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH•, 2) redução do complexo fosfomolibdênio e 3) quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS). O potencial antioxidante do extrato e frações foi variável de acordo com a metodologia utilizada com destaque para a fração acetato de etila que apresentou atividade similar aos padrões utilizados nos três métodos. Os resultados obtidos fornecem evidências de que as folhas de *B. unguolata* L. são uma potencial fonte de antioxidantes naturais, estimulando novos estudos que objetivem a produção de possíveis medicamentos destinados ao tratamento de patologias associadas aos radicais livres.

Palavras chave: Bauhinia. TBARS. Radicais livres.

INTRODUÇÃO

A família *Fabaceae* (*Leguminosae*) é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, espalhadas em todo mundo (Joly, 1985). Compreende cerca de 720 gêneros e 19.000 espécies (Barroso, 1991), com elevada importância econômica principalmente alimentar (Lewis, 2005) além de propriedades medicinais.

Representante desta família, a *Bauhinia unguolata* L., conhecida popularmente como “mororó vermelho” e “pata de vaca” (Morais et al., 2005), é nativa do Brasil encontrada principalmente na região Amazônica, Cerrado e Mata Atlântica (Vaz, 2010). Pouco estudada cientificamente, a literatura reporta o uso da *B. unguolata* L. por índios Tapebas no Ceará, por sua ação hipoglicemiante utilizada popularmente no tratamento do diabetes (Morais et al., 2005). Recentemente uma pesquisa que investigou o potencial de inibição da acetilcolinesterase, demonstrou resultados preliminares promissores com o uso da fração hexano da flor de *B. unguolata* L. no tratamento da doença de Alzheimer (Santos et al., 2011).

Grande interesse tem sido voltado para o papel do estresse oxidativo e dos radicais livres (Ferreira & Matsubara, 1997) na etiologia de várias doenças como as cardiovasculares, cânceres, aterosclerose, inflamação e envelhecimento (Yunes & Calixto, 2001). Nesta perspectiva, existe um grande estímulo relacionado à busca por novas substâncias obtidas de plantas com potencial antioxidante. Além disto, o interesse pela avaliação do potencial antioxidante da *B. unguolata* L. foi reforçado pela confirmação da presença de flavonoides (Maia Neto et al., 2008) nas folhas, metabólitos secundários que apresentam reconhecida atividade antioxidante.

A atividade proporcionada por estes metabólitos secundários ocorre pela capacidade que estes compostos apresentam de neutralizar ou eliminar os radicais livres, além do fato de apresentarem propriedade redox e presença de estrutura com anéis conjugados e grupos carboxílicos capazes de inibir a peroxidação lipídica (Garg et al., 2012). Acrescenta-se o fato de não existir na literatura estudo semelhante sobre a espécie. No seu aspecto prático, a pesquisa do potencial antioxidante tem contribuído para um novo ou renovado interesse científico, relacionado ao desenvolvimento de novos medicamentos (Nariya et al.,

Autor correspondente: Cristiane da Silva Paula. Universidade Federal do Paraná. Campus Jardim Botânico. Departamento de Farmácia. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba, PR. E-mail: crisspaula@onda.com.br

2012) destinados ao tratamento de doenças associadas aos radicais livres.

O potencial antioxidante do extrato e frações de plantas não pode ser avaliado utilizando somente uma metodologia, tendo em vista a complexidade da composição química dos mesmos, assim como pelo processo oxidativo (Garg et al., 2012). Métodos colorimétricos podem ser utilizados para avaliar o potencial antioxidante, um exemplo é o que utiliza substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Neste ensaio é avaliada a proteção da lipoperoxidação promovida por substâncias antioxidantes presentes nas amostras com o auxílio de uma fonte rica em lipídios (Ex; gema de ovo), pela formação de um cromóforo rosado medido espectrofotometricamente. A atividade antioxidante é calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídeos (Moraes et al., 2006).

Outro método colorimétrico utiliza o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Este método é baseado na captura ou sequestro deste radical, por substâncias antioxidantes presentes na amostra. O grau de descoloração é avaliado espectrofotometricamente e indica a capacidade sequestradora do radical livre (Mensor et al., 2001). Já a capacidade antioxidante total, que engloba componentes hidrofílicos e lipofílicos, do extrato e frações pode ser determinada pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio, que se baseia na determinação espectrofotométrica da redução do Molibdênio VI a Molibdênio V com formação do fosfato de Mo+5 (Prieto et al., 1999).

Diante destes aspectos, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato e frações obtidas de folhas de *Bauhinia unguolata L.*

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas da espécie *Bauhinia unguolata L.* foram coletadas em janeiro de 2007 na cidade de Campo Grande – MS coordenadas geográficas 20°30'37,5" S e 54°36'46,6" W, 545m. A identificação foi realizada por um especialista na área, e uma exsiccata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS sob o número CGMS 19754.

Obtenção do Extrato e Frações

O material coletado foi seco em temperatura ambiente e triturado em moinho de facas/martelo. O extrato bruto foi obtido a partir de 1,5 kg do material vegetal em etanol, com a utilização do aparelho de Soxhlet. Este foi filtrado e concentrado através da eliminação do solvente por destilação e mantido em banho-maria (65 oC) até a remoção total. O extrato bruto foi utilizado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. Cada fração obtida foi submetida à destilação, para remoção do solvente, sendo posteriormente mantidas em banho-maria (65 oC) até a eliminação total. A partir do extrato bruto etanólico (EB / 50 g), fração hexano (FH / 10,21 g), fração clorofórmio (FCL / 15,15 g), fração acetato de etila (FAE / 10,31 g) e fração hidro alcoólica residual (FR / 13,17 g) foram realizados os ensaios propostos.

Métodos de Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante

Ensaio da atividade antioxidante pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

As amostras obtidas a partir das folhas de *Bauhinia unguolata L.* foram submetidas ao ensaio da atividade antioxidante pelo método TBARS, de acordo com Moraes et al.(2006) com modificações. Pesou-se 3 mg das amostras (extrato e frações) e padrão BHT (Butil-hidroxi-tolueno) diluindo em 1 mL de etanol. Todo o procedimento foi realizado em triplicata. Um volume de 0,5 mL de solução de gema do ovo homogeneizada (5% m/v), meio rico em lipídeos, e 0,1 mL de cada amostra e controle foram adicionados a tubos de ensaio.

Cada um dos tubos de ensaio, em seguida, recebeu 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis (2 amidinopropano) dicloridrato - ABAP (0,035%) para induzir a peroxidação lipídica. Adicionou-se 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico – TBA (0,4% m/v) em solução de sulfato de dodecil de sódio – SDS (0,55% m/v) e 400 µL de água destilada. O material assim preparado foi submetido ao banho-maria (95 °C) durante 1 hora sob agitação. Após resfriamento, cada tubo recebeu 1,5 mL de n-butanol e foi centrifugado durante 3 minutos a 3.000 rpm, com posterior leitura espectrofotométrica dos sobrenadantes a 532 nm.

Obteve-se o Índice Antioxidante da amostra em percentual (IA%) usando a fórmula:

$$IA\% = (1 - A/C) \times 100$$

Em que C é a absorbância do controle totalmente oxidado e A, a média aritmética das absorbâncias da amostra testada. Os resultados foram expressos em % de Redução da Peroxidação lipídica (RP%).

Potencial de redução do radical DPPH●

O potencial de redução do radical DPPH● (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) do extrato e frações foi analisado espectrofotometricamente, segundo Mensor et al.(2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas do EB nas concentrações de 15,0 a 35,0 µg/mL, de 100 a 225 µg/mL para a FH; de 10,0 a 34,0 µg/mL para as FCL e FR; de 5,0 a 13,0 µg/mL para a FAE, de 2,0 a 6,0 µg/mL para a vitamina C e 2 a 10 µg/mL para a rutina. Destas soluções, 2,5 mL foram adicionados a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH● na concentração de 0,03 mmol/mL. Como controle foi utilizado 2,5 mL de metanol e 1 mL da solução de DPPH●.

Pelo fato do extrato e frações obtidos de plantas possuírem cor, e para que esta cor não interferisse na leitura foi necessária a utilização do branco que é composto somente pelas amostras e pelo solvente metanol. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, protegido da luz, a redução do radical livre DPPH● foi mensurada pela leitura da absorbância em 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. A determinação da CI50, ou seja, concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH● foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição do DPPH}^* = 100 - \left[\frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}} \right]$$

Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio, descrito por Prieto et al. (1999) avalia a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos. O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na₃PO₄ (28 mL, 0,1 mol/L) com solução de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (12 mL, 0,03 mol/L) e solução de H₂SO₄ (20 mL, 3 mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com H₂O destilada para 100 mL. Possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz. As amostras foram levadas à secura em banho-maria (40 °C), e a partir do material seco, foram preparadas soluções metanólicas com concentração final de 200 µg/mL. Destas, 0,3 mL foram adicionados a 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, foi feita a leitura a 695 nm, em um espectrofotômetro UV- 1600 Shimadzu® para obtenção das absorvâncias, usando 0,3 mL de metanol com 3 mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200 µg/mL) usada como padrão e vitamina C (200 µg/mL) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 100%. O ensaio foi realizado em triplicata.

Análise estatística

Todos os cálculos foram realizados nos *softwares* Microsoft Office Excel 2010 e SISVAR 5.3. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparações entre as médias dos índices de atividade, utilizou-se o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando P < 0,05.

RESULTADOS

Os resultados mostraram que o EB e frações diminuíram a formação de MDA, indicando que houve redução da peroxidação lipídica. A maior inibição, dentre as amostras testadas foi de 42,18% observada com a FAE, seguida por 36,78% obtido com a FH (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra a atividade antioxidante das amostras de pela capacidade sequestrante do radical DPPH. As concentrações das amostras capazes de inibir ou reduzir a concentração inicial de DPPH• em 50% variou de 7,68 ± 0,09 à 124,74 ± 2,15.

Os resultados da avaliação da capacidade antioxidante total do extrato e frações obtidas pelo ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 1. Redução da peroxidação lipídica promovida pelo extrato bruto e frações obtidos das folhas de *Bauhinia unguolata* L.

Amostra	Redução da Peroxidação (RP%) (Média ± DP)
BHT	48,09 ± 2,62 a
EB	21,87 ± 1,63 b
FH	36,78 ± 1,45 c
FCL	18,79 ± 2,22 b
FAE	42,18 ± 1,65 a c
FR	25,68 ± 0,56 b

Extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), fração hidroalcoólica remanescente (FR).

*Resultados seguidos pela (s) mesma (s) letra (s) não diferem estatisticamente (p < 0,05) entre si, pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Resultados de CI50 para a redução do DPPH• do extrato bruto e frações obtidos das folhas de *Bauhinia unguolata* L.

Amostra	CI50 (µg) ± DP
Vitamina C	4,22 ± 0,04 a
Rutina	6,35 ± 0,14 a d
EB	20,84 ± 0,73 b
FH	124,74 ± 2,15 c
FCL	18,20 ± 0,26 b
FAE	7,68 ± 0,09 d
FR	19,30 ± 1,16 b

Extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), fração hidroalcoólica remanescente (FR). CI50 (µg) ± DP= concentração inibitória ± desvio padrão. *Resultados seguidos pela(s) mesma (s) letra (s) não difere estatisticamente (p < 0,05) entre si, pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Resultados do ensaio do extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Bauhinia unguolata* L. pela redução do complexo fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante em relação à Rutina - AA (%) ± DP	Atividade Antioxidante em relação à Vitamina C - AA (%) ± DP
Rutina	100a	-----
Vitamina C	-----	100c
EB	72,09 ± 2,71 b	22,42 ± 2,78 d
FH	86,20 ± 1,61 a b	26,81 ± 1,30 d e
FCL	89,92 ± 1,05 a b	27,96 ± 2,19 d e
FAE	100 ± 0,51 a	31,10 ± 1,27 e
FR	79,53 ± 1,53 a b	24,73 ± 2,28 d

Extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC), Fração acetato de etila (FAE), fração hidroalcoólica remanescente (FR). AA=atividade antioxidante. DP= desvio padrão. *Resultados seguidos pela (s) mesma (s) letra (s) na mesma coluna não diferem estatisticamente (p < 0,05) entre si, pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos no ensaio redução da peroxidação lipídica promovida pelo extrato bruto e frações das folhas de *Bauhinia unguolata L.*, observa-se que dentre as amostras testadas a que apresentou a maior redução foi o padrão BHT (48,09%) e com relação às amostras obtidas da planta, a FAE reduziu a peroxidação lipídica em 42,18%. A análise estatística dos dados demonstra que não existe diferença entre esta fração e o controle BHT que é um antioxidante de reconhecida atividade, utilizado principalmente na indústria de alimentos. Neste ensaio, o parâmetro analisado é a peroxidação de lipídios presentes na gema do ovo, quantificando o malondialdeído (MDA), formado durante a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados. Envolve a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA gerando um cromóforo rosado medido espectrofotometricamente (Dawn-Linsley et al., 2005). O ponto final é a mensuração do MDA permitindo avaliar a proteção da lipoperoxidação pelas substâncias antioxidantes das amostras.

No seu aspecto prático, a proteção exercida auxilia na prevenção e combate aos danos celulares causados pela peroxidação lipídica, como por exemplo, o aumento da permeabilidade celular com a entrada de cálcio, saída de citocromo C das mitocôndrias e ativação da esfingomielinase, todos os processos que ativam as cascatas de caspases, proteínas sinalizadoras de morte celular (Patel et al., 2001). De acordo com Falkenberg et al. (2003), no processo de extração para a obtenção da FAE as substâncias que são preferencialmente extraídas são flavonoides e cumarinas simples. O fato de Maia Neto et al. (2008) confirmar a presença de flavonoides nas folhas permite afirmar que estas substâncias podem ser em parte responsáveis pela atividade antioxidante observada. Com relação às outras frações também se observou atividade antioxidante, porém, em menor intensidade do que a obtida pela FAE, no entanto, os valores obtidos também são significativos.

Levando em consideração a análise estatística dos dados que demonstrou a atividade sequestrante de radicais DPPH• (Tabela 2), verificou-se que entre o extrato e frações investigadas, a FAE apresentou os resultados antioxidantes mais promissores, pois sua CI50, ou seja, a concentração da amostra necessária para reduzir a quantidade inicial do radical livre em 50% foi similar ao padrão rutina. A rutina é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas, em especial a antioxidante. De acordo com Afanasev et al. (1989), este flavonoide têm uma ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres, além de não apresentar toxicidade. A atividade antioxidante de compostos fenólicos como a rutina deve-se principalmente à propriedade redutora e estrutura química, neutralizando ou sequestrando os radicais livres e quelando metais de transição, agindo tanto na etapa inicial como na propagação do processo oxidativo (Sousa et al., 2007).

No seu aspecto prático, já que não foi observada diferença entre a atividade antioxidante da rutina e da FAE, acredita-se que a fração possa constituir fonte promissora de substâncias antioxidantes, equivalente a este padrão. O potencial de atividade antioxidante também foi verificada com outras espécies deste gênero utilizando a mesma

metodologia, é o caso da *B. monandra* (Argolo et al., 2004), *B. forficata* (Sousa et al., 2004); *B. racemosa* (Kumar et al., 2005) *B. variegata* (Rajani & Ashok, 2009) e *B. rufescens* (Aliyu et al., 2009).

A FH difere das demais amostras, com valores de CI50 elevados, indicando baixa atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres quando comparada as demais frações e extrato, pois é preciso uma quantidade maior de amostra para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH•. As demais frações e o extrato apresentaram valores de CI50 superiores aos padrões, indicando também menor atividade comparada a eles.

Vários compostos químicos têm apresentado estreita correlação entre as atividades sequestradora de DPPH• e antioxidante determinada em modelos biológicos e outros não biológicos (Yamazaki et al., 1994). Logo, o ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH•, apresenta-se como um teste de predição de uma potencial atividade antioxidante e pode ser empregado para *screening* de produtos naturais, tornando-se importante como teste preliminar para a determinação do potencial antioxidante de um extrato, fração ou substância pura.

A vitamina C também foi utilizada como padrão neste experimento, que pelo seu alto poder redutor proporciona proteção contra a oxidação. Ao comparar as amostras testadas com este padrão (Tabela 2), observa-se que nenhuma delas apresentou resultados similares ou próximos ao obtido com a vitamina C.

No ensaio antioxidante pelo complexo fosfomolibdênio, observa-se na comparação dos resultados (Tabela 3) obtidos com as amostras e o padrão rutina, considerada com 100% de atividade antioxidante, que a FAE apresentou resultado similar a este padrão. Já quando o padrão considerado com 100% de atividade foi a vitamina C, a FAE apresentou somente 31,10 % de atividade antioxidante. As outras amostras apresentaram resultados inferiores ao padrão e a FAE, porém quando comparados a rutina resultados expressivos foram observados com todas as amostras. Já comparando com a vitamina C os resultados não foram tão expressivos (Tabela 3).

Os resultados indicam que as amostras, por reduzirem o molibdênio VI a molibdênio V podem inibir a ação da xantina oxidase, uma vez que o molibdênio é utilizado como cofator desta enzima (Coughlan et al., 1969). A xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico que, em ambiente fisiológico, está na forma de urato. A hipoxantina e a xantina são muito mais solúveis que o ácido úrico, e este último pode se depositar como urato de sódio, um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença conhecida como gota (Tsutomu et al., 1991). Durante este processo, ocorre a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, apesar de não ser uma espécie radical, está parcialmente reduzida podendo liberar elétrons em processos oxidativos com promoção da apoptose, e também estar associado a doenças neuro degenerativas como Alzheimer e Parkinson (Westphal & Kalthoff, 2003). Van Hoorn et al. (2002) testaram uma série de flavonoides de diferentes classes, e verificaram a inibição sobre a xantina oxidase. Diante de todos os aspectos, verifica-se que compostos presentes no extrato

e frações podem ser consideradas alvos potenciais e interessantes para inativação da xantina oxidase.

Analisando os resultados obtidos a partir das três metodologias, observa-se em comum a atividade antioxidante da FAE similar aos padrões utilizados nos diferentes métodos. No seu aspecto prático, a FAE demonstra apresentar substâncias na sua composição que podem atuar no sequestro de radicais livres, reduzir a peroxidação lipídica e reduzir o molibdênio VI a V com bastante eficácia. Sabe-se que flavonoides são um grupo de metabólitos majoritariamente encontrados na FAE (Falkenberg et al., 2003) característicos da família *Fabaceae* e vários deles já foram descritos estarem presentes no gênero *Bauhinia* (Silva & Cechinel-Filho, 2002). Quercetina, quercetina-3-O-arabinofuranosídeo e quercitrina já foram isoladas das folhas da *Bauhinia unguolata* L. (Maia Neto et al., 2008). Desta forma, sugere-se que a ação antioxidante observada nos ensaios esteja relacionada a esta classe de substâncias.

Com relação ao extrato e outras frações, os resultados antioxidantes variaram com relação à metodologia utilizada, mas basicamente todas as amostras apresentaram atividade. Acredita-se que esta variação nos resultados seja devido a presença de diferentes polifenóis que são substâncias que apresentam uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático, com reconhecida atividade antioxidante, e podem ser representados por flavonoides, taninos, lignanas, derivados do ácido cafeico, entre outros. Por sua vez, estas classes de metabólitos secundários apresentam grande quantidade de representantes que podem variar com relação a sua potência de atividade. Neste contexto, podem atuar de forma distinta de acordo com a metodologia utilizada, ou seja, sequestrando radicais livres, reduzindo a peroxidação lipídica ou reduzindo o molibdênio em maior ou menor proporção. Estudos fitoquímicos de isolamento e identificação destes compostos são necessários para que se atribua a um determinado composto esta atividade.

CONCLUSÃO

Os ensaios realizados com o extrato etanólico e frações obtidas das folhas de *Bauhinia unguolata* L. fornecem evidências do potencial antioxidante *in vitro*, verificado através de três métodos distintos. Os resultados indicam que a espécie pode ser uma fonte promissora de antioxidantes naturais, com destaque para a FAE, que estimulam novos estudos objetivando a produção de medicamentos destinados ao tratamento de patologias associadas aos radicais livres.

AGRADECIMENTOS

À REUNI/CAPES pela concessão das bolsas de Doutorado e apoio financeiro.

ABSTRACT

Antioxidant Potential in vitro of leaves of Bauhinia unguolata L.

***Bauhinia unguolata* L. (Pata de Vaca) is native to Brazil, mainly found in the Amazon, Cerrado and Atlantic Forest, and popularly used in the treatment of diabetes. This paper describes an analysis of the *in vitro* antioxidant potential of crude ethanol extract and fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic residue) obtained from leaves of this species, using three different methods: 1) scavenging of organic radical 2,2 - diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), 2) reducing phosphomolybdenum complex and 3) assaying the products formed during lipid peroxidation (TBARS). The antioxidant potential of the extract and fractions varied with the methodology, but the ethyl acetate fraction showed activity similar to the standards used in the three methods. The results provide evidence that the leaves of *B. unguolata* L. are a potential source of natural antioxidants, stimulating new studies aimed at the production of potential drugs for the treatment of diseases related to free radicals.**

Keywords: *Bauhinia*. TBARS. Free radicals.

REFERÊNCIAS

- Afanasev JB, Dorozhko AJ, Brodskill AV, Kostyuk VA, Patapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38(11):1763-9.
- Aliyu AB, Ibrahim MA, Musa AM, Ibrahim H; Abdulkadir IE, Oyewale AO. Evaluation of antioxidant activity of leave extract of *Bauhinia rufescens* Lam. (Caesalpinaceae). *J Med Plant Res.* 2009;3(8):563-7.
- Argôlo AC, Santa'ana AE, Pletsch M, Coelho LC. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia*. *Bioresour Technol.* 2004;95(2):229-33.
- Barroso GM. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: Imprensa Universitária; 1991.
- Coughlan MP, Rajagopalan kv, Handler p. The Role of Molybdenum in Xanthine Oxidase and Related Enzymes: Reactivity with Cyanide, Arsenite, and Methanol. *J Biol Chem.* 1969;244(10):2658-63.
- Dawn-Linsley M, Ekinci FJ, Ortiz D, Rogers E, Shea, TB. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. *J Neurosci Methods.* 2005;141(2):219-22.
- Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO. In: Simões, C.M.O. et al. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Editora da Universidade Federal de Santa Catarina; 2003. p. 230-245.

- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras.* 1997;43(1):61-8.
- Garg D, Shaikh A, Muley A, Marar T. In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. *Free Rad Antiox.* 2012; 2(3):41-6.
- Joly AB. Botânica, introdução à taxonomia vegetal. 7ª ed. São Paulo: Editora Nacional; 1985.
- Kumar RS, Sivakumar T, Sunderam RS, Gupta M, Mazumdar UK, Gomathi P, Rajeshwar Y, Saravanan S, Kumar MS, Muruges K, Kumar KA. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(7):1015-24.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M. Tribo Cercideae. In: *Legumes of the World.* Kew- Plants People Possibilities; 2005;1:57-67.
- Maia Neto M, Andrade Neto M, Braz Filho R, Lima MAS, Silveira ER. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochem Systematic Ecol.* 2008;36:227-9.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG. *Screening* of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytoter Res.* 2001;15(2):127-30.
- Morais SM, Dantas JDP, Silva ARA, Magalhães EF. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Braz J Pharmacog.* 2005;15(2):169-77.
- Morais SM, Catunda Júnior FEA, Silva ARA, Martins Neto JS. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de croton do nordeste do brasil. *Quim Nova.* 2006;29(5):907-10.
- Nariya PB, Shukla VJ, Acharya RN. Phytochemical screening and *in vitro* evaluation of free radical scavenging activity of *Cordia macleodii* bark. (HOOK.F. & THOMSON). *Free Rad Antiox.* 2012;2(3):36-40.
- Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, Parks DA, Barnes S, Darley-USmar V. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Rad Biol Med.* 2001;31(12): 1570-81.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M.. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 1999;269(2):337-41.
- Rajani GP, Ashok P. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. *Indian J Pharmacol.* 2009;41(5):227-32.
- Santos KM, Gonçalves PS, Paiva MJ, Lacerda GA. Acetylcholinesterase inhibition starting from extracts of *Bauhinia variegata* L., *Bauhinia* var. *candida* (Aiton) Buch.-Ham., and *Bauhinia unguolata* L. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(6):781-3.
- Silva KL, Cechinel Filho V. Plantas do Gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quim Nova.* 2002;25(3):449-54.
- Sousa CCC, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres, MCC, Costa CLS, Araújo, DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova.* 2007;30(2):351-5.
- Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FRMB. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *J Nat Prod.* 2004;67(5):829–32.
- Tsutomu H, Taeko Y, Rieko Y, Yukihiko I, Muneto M, Kazufumi Y, Isao A, Sansei N, Tadataka N, Massao Y, Takuo O. Inhibitory Effects of Galloylated Flavonoids on Xanthine Oxidase. *Planta Med.* 1991;57(1):83-4.
- Van Hoorn DEC, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PAM, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DBA, Van Norren K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur Pharmacol.* 2002;451(2):111-8.
- Vaz AMSF. *Bauhinia unguolata* L. in Lista de Espécies da Flora do Brasil 2010. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB022831>.
- Yamasaki K, Hashimoto A, Kokusenya Y, Miyamoto T, Sato T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs. *Chem Pharm Bull.* 1994;42(8):1663-5.
- Yunes RA, Calixto JB. Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó (SC): Argos Editora Universitária; 2001.
- Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003;2(6):6–20.

Recebido em 20 de janeiro de 2013.

Aceito em 18 de abril de 2013.