

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Estudos Fitoquímicos de Espécies de *Bauhinia* (Fabaceae) da Amazônia

Bolsista: Priscila Moraes dos Santos, CNPq

MANAUS  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-E /0020 /2009

Estudos Fitoquímicos de Espécies de *Bauhinia* (Fabaceae) da Amazônia

Bolsista: Priscila Moraes dos Santos, CNPq

Orientadora: Profº Drº Valdir Florêncio da Veiga Júnior

MANAUS

2010

## 1. Resumo

O estudo relacionado às atividades biológicas com espécies de *Bauhinia* sp. presentes na região amazônica é inovador, já que pesquisas com outras espécies já foram realizadas em outras regiões. Os ensaios de citotoxicidade, seqüestro de radicais livres e inibição de acetilcolinesterase realizados mostraram que estas espécies apresentam potencial medicinal. Flavonóides com propriedades medicinais já relatadas, como quercetina e caempferitrina foram detectados em alguns dos extratos estudados.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>03</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>05</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BILIOGRÁFICA.....</b>	<b>06</b>
<b>4</b>	<b>METODOS.....</b>	<b>08</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>09</b>
	5.1 Identificação e rendimentos dos extratos.....	09
	5.2 Atividade antioxidante de DPPH.....	09
	5.3 Ensaio de Inibição da Enzima acetilcolinesterase.....	10
	5.4 Ensaio avaliativo de toxicidade em <i>Artemia salina</i> .....	11
	5.5 Fracionamento por extração múltipla e Identificação a partir de cromatografia em camada delgada.....	12
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>14</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>15</b>
	<b>CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....</b>	<b>16</b>

## 2. Introdução

A variedade e riqueza de plantas existentes em nossa Região Amazônica desperta grande interesse no aprofundamento de estudos sobre as espécies utilizadas na medicina popular para verificação de sua real eficiência terapêutica. Nesse âmbito, existem entre 250 e 500 mil espécies existentes na flora mundial, muitas delas possuem importantes propriedades terapêuticas<sup>1</sup>.

As plantas do gênero *Bauhinia* (Fabaceae) são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, sendo muito usadas como remédio na medicina popular em várias regiões, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul.<sup>12</sup> Em nosso país, este gênero é conhecido popularmente como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi”.

Neste trabalho realizou-se estudos fitoquímicos e análises biológicas de extratos de espécies de *Bauhinia* da Amazônia para comprovação de alguns de seus usos populares, como em diabetes<sup>2-4</sup>. Os ensaios foram realizados em amostras de folhas e galhos coletados em Manaus (figura 1), na Vila Olímpica; e no interior do Amazonas, em São Gabriel da Cachoeira; e nas Comunidades Bom Senhor Jesus e Nossa Senhora de Nazaré, em Manacapuru.



**Figura 1.** *Bauhinia* sp coletada na Vila Olímpica de Manaus- AM.

A verificação da presença de substâncias fenólicas e isoflavonas, como a kaempferitrina, responsável por maior parte da ação terapêutica deste gênero, também é incluso no estudo. O alvo de maior pesquisa são os flavonóides, diante o benefício promovido no organismo humano combatendo os agentes oxidantes como os raios UV, poluição ambiental, entre outros<sup>2</sup>.

### 3. Revisão Bibliográfica

Apesar de toda modernização e inclusão cada vez mais comum de remédios sintéticos, a utilização de plantas e recursos naturais como tratamento terapêutico é bastante usual até nos dias de hoje, e não só no meio rural. Atualmente, a estimativa é de que de 3,5 a 4,0 bilhões de pessoas dependem de plantas como fontes de drogas<sup>5</sup>. Muitas pessoas utilizam as plantas medicinais, como forma alternativa da cura de enfermidades, por não possuírem acesso à medicina tradicional, principalmente por fatores financeiros. No caso das comunidades ribeirinhas de nossa região, pode-se salientar que a distância das comunidades até os hospitais, a qual normalmente é feita através de embarcações, dificulta ainda mais o atendimento médico<sup>5</sup>.

Na floresta amazônica, que abriga a maior diversidade biológica do planeta, a prática de uso de plantas é baseada no conhecimento popular, transmitido oralmente na maior parte das situações<sup>5</sup>. Dentro de um gênero botânico, espécies correlatas podem apresentar alta toxicidade, ao invés da esperada atividade terapêutica, o que desencadeia outras enfermidades e infecções em pessoas que fazem uso da mesma para certos tratamentos.

O despertar para o estudo das propriedades dessa infinidade de plantas comuns entre seu povo local e utilizadas pra fins medicinais, foi demorado. Somente nos últimos anos é que tem 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 utilizadas para diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica<sup>2-6</sup>.

As espécies de *Bauhinia* (figura 2) mais conhecidas no Brasil são *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha* e *B. splendens*, as quais são amplamente utilizadas na forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento principalmente de infecções, processos dolorosos e diabetes<sup>7,8,9</sup>. Estudos químicos realizados com as espécies *B. manca*, *B. candicans*, *B. uruguayensis*, *B. purpurea*, *B. forficata* e *B. splendens* evidenciaram a presença de compostos esteroídicos, terpenóides e flavonóides<sup>10</sup>, o que possibilita a existência de compostos ativos em outras espécies, especialmente na região amazônica, onde a população também faz grande uso das plantas do gênero *Bauhinia*.



**Figura 2.** Imagem do galho e folhas de *Bauhinia sp.*

A utilização de *Bauhinia* para tratamentos medicinais e principalmente no tratamento de “açúcar no sangue”, como é chamada popularmente a diabetes, é extensa. Em pesquisa realizada em comunidades indígenas e ribeirinhas das Bacias do Alto Paraguai e do Vale do Guaporé, em Mato Grosso, a família das Fabaceae foi a que teve maior citação de utilização medicinal, dentre elas a espécie *Bauhinia glabra*.<sup>11</sup>

Com toda a diversidade existente no mercado de preparações a partir de folhas de *Bauhinia sp.*, é de alta importância o estudo para verificação da qualidade destes produtos <sup>12</sup>, já que a atribuição principal à sua utilização medicinal é devido à presença da kaempferitrina, considerada como o marcador químico no controle de qualidade dos produtos à base de *Bauhinia* <sup>12</sup>.

Já que muitas das *Bauhinia* são similares<sup>13</sup>, há o risco de utilização de mais de uma espécie nos preparos. Neste caso, ocorre a alteração da eficácia dos chás, devido à diferença de composição química entre as espécies <sup>14</sup>.

#### **4. Métodos**

##### Preparação dos extratos

As coletas do material botânico foram realizadas na Vila Olímpica e na Reserva Ducke (*Bauhinia coronata*), em Manaus; na área urbana de São Gabriel da Cachoeira; e nas comunidades interioranas de Bom Senhor Jesus e Nossa Senhora de Nazaré, no município de Manacapuru. Após a limpeza, o material foi seco, triturado e preparado para extração em metanol. Exsiccatas foram preparadas a partir das espécies ainda não identificadas, depositadas nos herbários do INPA e da UFAM. Autorizações de coleta e transporte de material biológico foram obtidas junto ao SISBIO, número 21122-1.

##### Atividade antioxidante de DPPH

No método qualitativo, os extratos das espécies de *Bauhinia sp* foram diluídos em metanol HPLC, aplicados na placa de sílica e, sobre esta, borrifada a solução de DPPH. Para quantificação, os testes foram realizados em placa de 96 poços com diversas concentrações dos extratos e aplicação da solução de DPPH. Após 30 minutos foi realizada a leitura em absorvância de 465 nm.

##### Ensaio de Inibição de acetilcolinesterase (Método de Ellman)

As soluções dos extratos foram analisadas quanto a sua atividade de inibição frente a enzima acetilcolinesterase, sendo aplicadas numa placa de sílica e, após borrifar a solução da enzima, havendo a ausência de coloração, indicava resultado positivo. Se a mudança for para coloração amarelada, é indicativa de não atividade.

##### Ensaio avaliativo de toxicidade em *Artemia salina*

São incubados em um frasco com solução marinha e DMSO, dez unidades de náuplios de *Artemias salinas* juntamente com as soluções diluídas dos extratos. Após 24h é realizada a contagem dos náuplios vivos. O índice de toxicidade é dado a partir da taxa de 50% de náuplios vivos em solução.

##### Fracionamento por extração múltipla (partição com solvente orgânicos diversos) e Identificação a partir de cromatografia em camada delgada

A partir dos extratos obtidos, foram feitos fracionamentos com os solventes diclorometano e acetato de etila. A partir das frações de cada solvente, dos extratos e dos padrões de kampferitrina e quercetina, foram observados a presença destes flavonóides.



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Identificação e rendimento dos extratos

Após as amostras serem coletadas, limpas, trituradas e colocadas junto ao solvente metanol, individualmente, foram organizadas siglas para identificação, junto ao rendimento médio dos extratos feitos. Na tabela 1 é relatada tal identificação.

Tais valores possibilitaram a realização de todos os testes propostos para a conclusão do projeto, com exceção do fracionamento com extrações múltiplas dos extratos com menos de 900 mg, como a FBXB37 e FBXN37. Como é possível observar, os menores rendimentos encontram-se, em geral, para os extratos a partir de galhos das espécies de *Bauhinia sp.*, com a exceção da *Bauhinia coronata*.

**Tabela 1.** Organização das amostras e seus respectivos rendimentos.

Local de coleta da amostra da <i>Bauhinia sp</i> e padrão utilizado no DPPH	Parte Estudada	Sigla	Rendimento (%)	Capacidade de Sequestro 50% (ug/ml)
Reserva Ducke	Folha	FBCR17	10,17%	9,446 ± 0,126
Reserva Ducke	Cipó	FBCR87	11,84%	12,675 ± 1,787
Comunidade Bom Jesus	Folha	FBXB17	10,13%	-
Comunidade Bom Jesus	Galho	FBXB37	1,93%	70,250 ± 0,664
Comum. N. Sen. Nazaré	Folha	FBXN17	6,51%	86,918 ± 0,721
Comum. N. Sen. Nazaré	Galho	FBXN37	1,55%	40,392 ± 0,671
Vila Olímpica (Manaus)	Folha	FBXM17	21,50%	56,373 ± 0,280
Vila Olímpica (Manaus)	Galho	FBXM37	19,76%	16,541 ± 0,522
São Gabriel da Cachoeira	Folha	FBXS17	9,06%	9,446 ± 0,126
Padrão (quercetina)	-	-	-	30,777 ± 0,811

### 5.2 Atividade Antioxidante DPPH

Nos ensaios qualitativos realizados para observação da atividade dos extratos frente ao radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), foi observado que a maioria mostrou-se ativa, sendo inativas somente FBXB17 e FBXS17. Após borrifar a solução de DPPH, tem-se a placa com coloração roxa, assim como o padrão-negativo (branco, metanol), e as amostras ativas, assim como o

padrão quercetina, com coloração amarela, evidenciando que não houve interferência do solvente utilizado no resultado final.

Para as amostras que apresentaram atividade no método qualitativo, e também com a amostra FBS17, a qual apresentou dúvida no resultado final, foi realizado o ensaio quantitativo para verificação da concentração que possui capacidade antioxidante. A concentração que inibe 50% do total (100%) é dita como CS<sub>50</sub>. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 1.

A partir desses resultados, pode-se observar a baixa concentração para seqüestro de 50% para a maioria dos extratos, o que promove uma possível utilização futura em aplicações no mercado farmacêutico, como remédios, cosméticos, entre outros.

A perspectiva para os resultados obtidos é a provável presença de flavonóides nas espécies de *Bauhinia sp.*, uma vez que já é conhecido que os flavonóides constituem o grupo mais representativo desta classe de estudo <sup>15</sup>, o que motiva o estudo na determinação dos flavonóides existentes nas espécies relacionadas.

### 5.3 Ensaio de Inibição da Enzima acetilcolinesterase

No ensaio qualitativo foi possível a observação dos extratos das espécies de *Bauhinia sp* que possuem atividade inibitória desta enzima. Os primeiros ensaios realizados não foram bem sucedidos, pois não houve mudança na coloração na placa após adição da enzima. Com a chegada de novas enzimas no Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia, houve realização de um novo ensaio, cujo resultado é apresentado abaixo:

Com exceção da amostra FBXB17 que possuiu baixa atividade, todas as outras mostraram-se ativas pela presença de um halo branco ao redor das amostras aplicadas após a utilização da enzima, como representado no padrão, onde houve total isenção de cor.

Neste processo de coloração da placa, a utilização da enzima mantida em temperatura igual a 37° C por 5 minutos, após sua retirada do congelador (onde tinha temperatura igual a -1,6° C) foi essencial. Nos testes anteriores não houve esse parâmetro, as enzimas já se encontravam a temperatura ambiente, o que pode ter comprometido o desempenho do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase.

#### 5.4 Ensaio avaliativo de toxicidade em *Artemia salina*

Após a incubação por 24 horas de 10 náuplios de *Artemia salina* em solução marinha 37% juntamente com DMSO e soluções diluídas dos extratos de *Bauhinia sp.*, foi verificada a dose letal de 50% (DL<sub>50</sub>) a partir da contagem dos sobreviventes e o registro no programa Probitos, onde calculou-se a DL<sub>50</sub>. Dentro deste ensaio o padrão utilizado foi solução de lapachol juntamente com DMSO, com as concentrações correspondentes às utilizadas para os extratos analisados.

As concentrações utilizadas no primeiro teste foram 25, 50 e 100 mg/μl. Como não foram suficientes para matar metade dos náuplios nas amostras, aumentou-se a concentração dos extratos para 200, 300 e 500 mg/μl. Os resultados para a análise são relatados na tabela 2 abaixo.

**Tabela 2.** Resultado dos ensaios de toxicidade em *Artemia salina* a partir das soluções de extrato bruto de espécies de *Bauhinia sp.*

<b>Amostra analisada</b>	<b>Dose Letal 50% (μg/ml)</b>	<b>Concentrações utilizadas (μg/ml)</b>
FBCR17	280,9180	500, 300 e 200
FBCR87	268,4136	500, 300 e 200
FBXB37	280,9180	250, 200 e 150
FBXN17	320,5190	500, 300 e 200
FBXN37	401,4640	500, 300 e 200
FBXM17	290,2496	400, 350 e 300
FBXM37	173,1902	350, 300 e 250
FBXS17	350,0000	500, 300 e 200
FBXB17	367,2900	400, 350 e 300

Como relatado na tabela, as concentrações utilizadas para atingir o índice de dose letal 50% foram altas, podendo-se verificar a baixa toxicidade dos extratos brutos de *Bauhinia sp.* frente aos náuplios, onde houve necessidade de aumento na concentração das soluções de extrato bruto para atingir o índice de DL<sub>50</sub>. Com essa relação é possível afirmar mais uma vez a possibilidade de aplicação em indústria farmacêutica e cosmética, devido ao baixo índice de toxicidade neste ensaio prévio.

### 5.5 Fracionamento por extração múltipla e Identificação a partir de cromatografia em camada delgada

Para os extratos que possuíam no mínimo 1g de rendimento, foram realizadas extrações múltiplas em um funil de separação a partir do uso de, primeiramente, quatro adições de solvente diclorometano e, posteriormente, quatro adições de solvente acetato de etila. A partir das frações obtidas de cada solvente individualmente, concentrou-se cada solução em aparelho rotaevaporador, e a partir dos extratos fracionados (diclorometano e acetato de etila) realizou-se placas cromatográficas juntamente com os respectivos extratos brutos, o padrão campferitrina e com quercetina, para verificação da presença de um desses flavonóides nas espécies de *Bauhinia sp.*

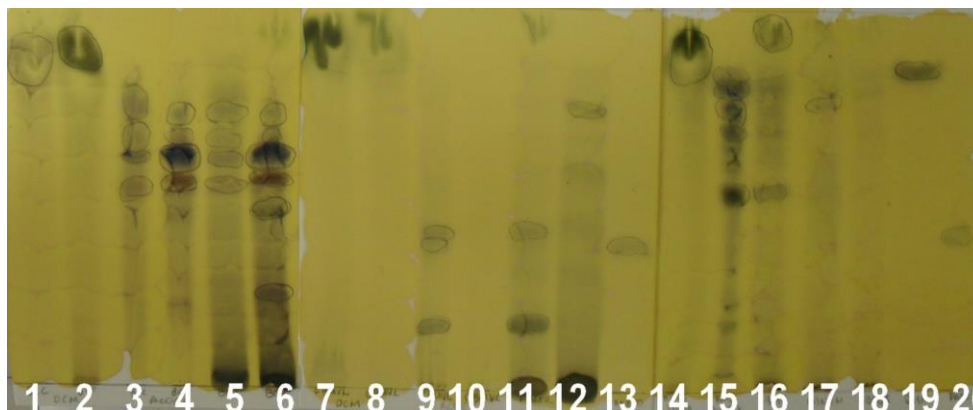
Inicialmente, o revelador utilizado para as placas cromatográficas foi o NP-PEG, mas com o mesmo não foi obtido sucesso já que o padrão não estabeleceu a coloração necessária, amarela.

Entretanto, na placa revelada foi observada a existência da coloração azul que se destaca intensamente em FBCR87 e em seus extratos fracionados. Essas manchas evidenciam a possibilidade de presença de outros flavonóides nessa espécie, o que é um forte indício para a continuação de um estudo e pesquisa mais profunda para a descoberta da composição dos flavonóides existentes, e que podem estar relacionados também às atividades biológicas da espécie de *Bauhinia coronata*.

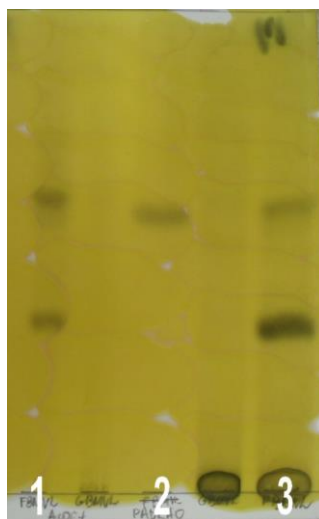
Como a utilização do revelador NP-PEG não alcançou as expectativas para o padrão campferitrina, a metodologia baseou-se na realização de placas cromatográficas com revelador  $FeCl_3$  para indicação da presença deste flavonóide nas espécies de *Bauhinia sp.* estudadas neste projeto. Na figura 3 abaixo tem-se as amostras dos extratos brutos das espécies de *Bauhinia sp.* e dos respectivos fracionamentos em diclorometano e acetato (para os extratos brutos com rendimento suficiente). Observando tal figura, é notável que a eluição do extrato bruto da amostra de *Bauhinia sp.* coletada na Vila Olímpica de Manaus, e de seu fracionamento em acetato de etila indiquem alguma similaridade com a eluição do padrão campferitrina.

Foi realizada uma nova placa cromatográfica para verificar a presença da campferitrina nessas amostras, como é mostrado na figura 4. Com a confirmação da existência de campferitrina nessas amostras, e a identificação

de outros flavonóides nas amostras de *Bauhinia coronata*, o projeto obteve sucesso em sua realização, gerando estudos mais aprofundados no que se relaciona à composição fitoquímica dessas espécies próprias de nossa região.



**Figura 3.** Placa cromatográfica com os respectivos extratos: FBCR87 (1) e FBCR17 (2) da extração com AcoEt, suas respectivas extrações em DCM (3) e (4), e extratos brutos (5) e (6); amostra da extração com DCM de FBXM17 (7) e FBXM37 (8), respectivas extrações com AcoEt (9) e (10), extratos brutos (11) e (12), e o padrão campferitrina (13); extrações com DCM (14) de FBXN17 e com AcoEt (15), e o extrato bruto (16); Extratos brutos de FBXN37 (17), FBXB37 (18); padrões quercetina (19) e novamente, campferitrina (20). DCM = diclorometano; AcoEt: acetato de etila.



**Figura 4.** Placa cromatográfica do extrato com AcoEt de FBMX17 (1), padrão campferitrina (2) e extrato bruto de FBMX17 (3).

## 6. Conclusão

O consumo de chás e infusões de folhas e galhos da “pata-de-vaca” para o tratamento de diversas enfermidades é bastante comum, assim como o risco de intoxicação pelo uso de extratos sem estudos relativos aos índices de toxicidade, o que oferece um risco contínuo para as pessoas usuárias dos chás caseiros a partir das espécies de *Bauhinia sp.*

Os resultados das análises realizadas no decorrer do projeto para verificação da atividade toxicológica e antioxidante apontam para a possibilidade da existência de mais uma grande potência farmacológica da nossa região amazônica, já que os baixos níveis de toxicidade, alta atividade antioxidante e a presença de flavonóides, como a campferitrina nas amostras coletadas na Vila Olímpica de Manaus, onde próprios moradores locais utilizam as mesmas para tratamento de diabetes, e a descoberta de outros flavonóides nas amostras de *Bauhinia coronata*, os quais serão caracterizados futuramente, demonstram um alto interesse para pesquisas mais aprofundadas, já que os flavonóides presentes são os principais compostos relacionados à ação medicinal dos chás e infusões das espécies de *Bauhinia sp.* em outras regiões.

## 7. Referências Bibliográficas

1. HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K.; *Phytochemistry*. V. 30. 1991.
2. ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; *Phytochemistry* v. 27. 1988.
3. TESKE, M; TRENTINI, A..M. M.; *Compêndio de Fitoterapia*. Herbarium Laboratório Botânico.1995.
4. GUPTA, M.P. *Plantas Medicinales Iberoamericanas*; Talleres de Editorial Presencia, Santafé de Bogotá. 1995.
5. AZEVEDO, S. K.; SILVA, I. M. *Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil*. Acta Botânica Brasileira. São Paulo. 2006.
6. LOZOYA, X.; *Investigación y Ciencia*. 1997.
7. ACHENBACH, H.; STOCKER, M. *Phytochemistry*. V. 23.1835.
8. Sousa, E.; PIZZOLATTI, M.G.; VI Encontro de Química da Região Sul da Sociedade Brasileira de Química. Maringá. 1998.
9. VIANA, E. P.; ALMEIDA, S.S.M.S.; Resumos da 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Caxambu. 2000.
10. SILVA, M.L.; FILHO, V.C. *Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico*. 2002.
11. MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. *Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso- Brasil*. 2005.
12. ENGEL, I. C.; FERREIRA, R. A. *Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)*. Universidade do Vale do Itajaí. 2008.
13. MIYAKE E.T.; AKISUE G. *Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link)*. 1986
14. NIERO R.; MALHEIROS, A.; *Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos*. 2003.
15. WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; *Flavonóides Antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos; Importância e Perspectivas Terapêuticas*. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinais: sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

## Cronograma de Atividade

Nº.	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
		2009					2010						
01	Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
02	Coleta dos espécimes	X	X			X							
03	Preparação dos extratos	X	X	X		X	X						
04	Análise cromatográfica			X	X		X						X
05	Atividade antioxidante frente ao radical DPPH			X	X		X				X		
06	Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase				X				X				
07	Ensaio em <i>Artemia salina</i>			X				X	X				
08	Preparação do Relatório Parcial					X	X						
09	Elaboração do Resumo e Relatório Final											X	X
10	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X