

Caracterização fitoquímica, toxicidade e avaliação preliminar da atividade antibacteriana das folhas de *Bauhinia unguolata* L.

Phytochemical characterization, preliminary toxicity and evaluation of the antibacterial activity of the leaves of *Bauhinia unguolata* L.

Cristiane da Silva Paula^{1,*}, Maria Christina dos Santos Verdam¹, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota¹, Angela Maria de Souza¹, Cristiane Bezerra da Silva¹, Obdúlio Gomes Miguel² & Marilis Dallarmi Miguel¹.

¹Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacotécnica, Curitiba, PR, Brasil

²Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Fitoquímica, Curitiba, PR, Brasil

Contato: *e-mail: crisspaula@onda.com.br. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Av. Pref. Lothário Meissner, 632. Jardim Botânico CEP: 80210-170 – Curitiba – Pr.

RESUMO

A *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae), conhecida como “pata-de-vaca”, apresenta características ornamentais e propriedades medicinais, utilizada pela população para o tratamento do diabetes e diarreia. Neste trabalho foi realizada uma caracterização fitoquímica preliminar para determinar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato e frações provenientes das folhas, utilizando reações clássicas de caracterização de grupamentos químicos. A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando o método da micro diluição frente a algumas cepas, a citotoxicidade utilizando modelo de toxicidade sobre náuplios de *Artemia salina*, e atividade hemolítica por método descrito na Farmacopeia Brasileira, que é indicador de toxicidade geral e bioatividade de extratos de plantas. Os resultados da caracterização fitoquímica sugerem a presença no extrato das folhas principalmente de alcaloides, flavonoides, antraquinonas, esteroides, triterpenos e taninos condensados. As amostras testadas não foram ativas frente às cepas bacterianas utilizadas e também não se mostraram tóxicas frente à *Artemia salina* além da ausência de atividade hemolítica. Estes ensaios preliminares sugerem que as folhas de *Bauhinia unguolata* podem ser fonte de compostos com atividades medicinais importantes e com ausência de toxicidade.

PALAVRAS CHAVE

Fabaceae, *Bauhinia*, Flavonoides.

ABSTRACT

The *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae), known as “cow’s paw ”, shows ornamental and medicinal properties, used by the population for the treatment of diabetes and diarrhea. In a preliminary study phytochemical characterization was carried out to determine the major classes of secondary metabolites present in the extract and fractions from the leaves, using conventional chemical reactions of characterization of groups. We evaluated the antibacterial activity by the micro-dilution method against some strains, the cytotoxicity using models of toxicity to *Artemia salina* nauplii and hemolytic activity by the method described in the Brazilian Pharmacopoeia, which is indicative of general toxicity and bioactivity of plant extracts. The results of the phytochemical characterization suggest the presence in the extract of the leaves mainly alkaloids, flavonoids, anthraquinones, steroids, triterpenes and tannins. The samples tested were not active against the bacterial strains used and are not toxic against on *Artemia salina* with absence of hemolytic activity. These preliminary experiments suggest that the leaves of *Bauhinia unguolata* can be a source of important medicinal compounds with activity and not toxic.

KEY WORDS

Fabaceae, Bauhinia, Toxicity, Flavonoids.

INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Bauhinia* L. (Fabaceae) são conhecidas popularmente como “pata-de-vaca”, “pé-de-boi” ou “unha-de-boi” (Corrêa, 1952) além de “mororó do sertão”, “miroró”, “pata de cabra”, “mão de vaca”, “pata de veado” (Lorenzi & Matos, 2008) em alusão ao formato das folhas que lembram o rastro de animais. Algumas espécies podem ser utilizadas na recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 1991) e na arborização pública como ornamentais, entretanto, representantes deste gênero se destacam por suas propriedades medicinais, sendo utilizados na forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente com finalidade hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, expectorante, depurativa, diurética, antidiarreica, anti-infecciosa e em processos dolorosos (Silva & Cechinel-Filho, 2002).

O uso popular medicinal mais comum do gênero é na redução da glicemia observado com várias espécies que são geralmente utilizadas na forma de chá obtido das folhas. Diante do fato de que todas as plantas do gênero recebem a mesma denominação popular, elas muitas vezes são utilizadas indistintamente por grande parte da população (Lorenzi & Matos, 2008) e em alguns casos os resultados esperados nem sempre são obtidos, tendo em vista a diferente composição química. Este fato reforça a necessidade de estudo das diversas espécies na busca por informações químicas e biológicas.

Uma pesquisa realizada com idosos assistidos em uma Unidade Básica de Saúde de Pelotas-RS demonstrou que espécies de *Bauhinia* estiveram entre as plantas medicinais mais utilizadas (Feijó *et al.*, 2012) fato este observado também em uma cidade do estado de Pernambuco (Santos, Nunes & Martins; 2012) e no Mato Grosso (Da Silva *et al.*, 2010; Macedo & Ferreira, 2004). Em Maracanaú (Ceará), em 2002, a *B. forficata* na forma de tintura para uso interno era produzida e distribuída através do Programa Farmácias Vivas no sistema público de Saúde para tratamento do diabetes, sendo considerado o segundo fitoterápico mais prescrito no período analisado (Silva *et al.*, 2006). A casca do caule e raiz de *B. reticulata* é utilizada pela população na lavagem de feridas e as folhas e frutos (secos) da *B. rufescens* é aplicado na forma de pó em micoses na cabeça de crianças (Inngjerdingen *et al.*, 2004).

Uma das espécies, a *Bauhinia unguolata* foi pouco estudada com relação à constituição química e atividades biológicas. É planta que se apresenta como arbusto, arvoreta ou subarbusto que em média possui de 2-4 m de altura (Dutra *et al.*, 2009), podendo alcançar até 10 metros (Mena-Ali & Rocha, 2005). Apresentam flores actinomorfas, brancas e nectaríferas com polinização noturna realizada por morcegos (quiropterófila) que são atraídos pelo seu forte odor. É uma angiosperma

cuja principal característica é a existência de um fruto que envolve e protege a semente e com folhas uni folioladas e bilobadas características do gênero (Dutra *et al.*, 2008).

A *Bauhinia unguolata* é utilizada pela população por sua ação hipoglicemiante (Morais *et al.*, 2005) no tratamento do diabetes e para diarreia (Bieski *et al.*, 2012). Paula *et al.* (2014) demonstraram que extrato e frações obtidas das folhas apresentam elevado potencial antioxidante, sugerindo que a planta possa ter ação no tratamento de várias doenças associadas ao estresse oxidativo como câncer, aterosclerose e inflamação (Ferreira & Matsubara, 1997).

Recente trabalho que investigou o potencial de inibição da acetilcolinesterase demonstrou resultados preliminares promissores com o uso do extrato hexano da flor desta espécie no tratamento da doença de Alzheimer (Santos *et al.*, 2011). Ainda são poucas as pesquisas que relatam as propriedades biológicas dessa espécie, que podem favorecer o desenvolvimento e a descoberta de novas drogas vegetais para contribuição significativa no campo da saúde em nível mundial (Barbosa-Filho *et al.*, 2007). Nesta perspectiva, este trabalho objetiva fornecer informações preliminares sobre o potencial de toxicidade e antibacteriano, bem como a investigação fitoquímica das folhas de *B. unguolata* L.

METODOLOGIA

As folhas da espécie *Bauhinia unguolata* L. foram coletados 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 planta foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS sob o número CGMS 19754.

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A identificação qualitativa dos grupos químicos presentes nas folhas foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003), utilizando o extrato hidro alcoólico 20% e extrato aquoso. Para o preparo do extrato hidro alcoólico 20%, 40 g das folhas foram submetidas à maceração (banho Maria 70 °C / 1 hora) em 200 mL de álcool etílico a 70% (v/v). Posteriormente realizou-se o fracionamento do extrato em funil de separação com os solventes orgânicos hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se as frações hexano (FH), clorofórmio (FCL), acetato de etila (FAE) e a porção residual, chamada fração hidro alcoólica residual (FR). O extrato aquoso foi obtido a partir de 40 g do material vegetal, macerados (banho-maria a 70 °C) com 200 mL de água destilada por duas horas com agitação ocasional.

Para o extrato aquoso realizou-se reações de caracterização para pesquisa de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos, amino grupos e taninos. Para o extrato hidro alcóolico 20% foram realizadas reações para pesquisa de flavonoides (reação de Taubock, ensaio de Pacheco, reação de Shinoda), leucoantocianidinas, esteroides e triterpenoides (reação de Liebermann-Burchard), cumarinas (extração com éter e verificação em câmara de luz ultravioleta), alcaloides (reativos de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand), antraquinonas (reação de Borntraeger) (Paula *et al.*, 2013).

AValiação da Toxicidade Frente À *Artemia salina*

A água do mar artificial foi preparada com 38 g de sal marinho (23 g NaCl, 11 g MgCl₂·6H₂O, 4 g Na₂SO₄; 1,3 g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O; 0,7 g KCl) e 1.000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9,0 com Na₂CO₃, mantendo-o na faixa de 6-10,5 (Lewan, Andersson & Morales *et al.*, 1992). Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados na água do mar artificial para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e expostos à luz diurna e temperatura controlada (27-30 °C). Paralelamente, prepararam-se as amostras do EB, FH, FCL FAE e FR a serem analisadas, nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg.mL⁻¹. As amostras foram diluídas em metanol e colocadas em frascos adequados para a realização do teste. O solvente foi evaporado em estufa a 40 °C, 24 horas antes do teste. Como controle positivo, foi utilizado sulfato de quinidina, nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo foi utilizado o metanol. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidas para cada frasco contendo as amostras e controles. O volume de todos os tubos foi então ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL. Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas. Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de CL₅₀ com 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas tóxicas quando CL₅₀ foi menor que 1000 µg.mL⁻¹ (Meyer *et al.*, 1982).

AValiação da Atividade Hemolítica

- Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão

A atividade hemolítica das amostras foi avaliada seguindo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010) com adaptações. Foi utilizado no ensaio uma suspensão de sangue de carneiro (Newprov[®]) a 2% e solução de saponina (controle positivo). Partindo de uma concentração das amostras do EB, FH, FCL FAE e FR de 1000 µg.mL⁻¹, uma

diluição em série foi preparada com tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue 2%, usando 4 tubos de ensaio, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Esquema da diluição em série das amostras

TUBO	1	2	3	4
Extrato vegetal (ml)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (ml)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (2%) (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00

Fonte: Brasil (2010).

Logo que os tubos foram preparados, os mesmos foram invertidos cuidadosamente evitando a formação de espuma. Após 30 minutos foram novamente agitados com cuidado e então deixados em repouso por 150 minutos. Posteriormente, foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. Observou-se então se dentre eles existia algum na qual foi detectada a presença de hemólise total, ou seja, ocorreu solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos.

- Teste de Atividade Hemolítica em Placas de Ágar Sangue

Em discos de papel filtro Whatman (n^o1), com aproximadamente 7mm de diâmetro, foram aplicados 20 µL da amostra a ser testada, na concentração de 1000 µg.mL⁻¹. Após secagem, os discos foram colocados em placas de ágar sangue e incubadas por 24 horas a 35 °C em estufa. Após este período verificou-se a existência de halo de hemólise ao redor do disco de papel. Como controle positivo foi utilizada solução de saponina 1000 µg, e como controle negativo, discos impregnados com os solventes utilizados foram submetidos ao teste para descartar a influência destes (Kalegari, 2011).

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para avaliação da atividade antibacteriana foi utilizada a técnica de micro diluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os microrganismos utilizados na pesquisa foram: *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923, *Escherichia coli* ATCC[®] 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212. As linhagens de referência permaneceram armazenadas a - 80°C em TSB com glicerol a 15%, até o momento do uso. Para reativação, as cepas conservadas em condições de congelamento foram subcultivadas em ágar TSA (Difco), a temperatura de 37 °C por 20-24 horas. O preparo dos inóculos para as linhagens referência foram realizadas suspensões em tubo contendo salina estéril (NaCl a 0,85%) na concentração de 1,0 x 10⁸ UFC.mL⁻¹, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland.

- Concentração inibitória mínima (CIM)

Os valores da concentração inibitória mínima foram determinados pelo método da micro diluição em caldo (CLSI, 2008). Os extratos e frações foram preparados em etanol 10% e DMSO 2% e filtrados através de membrana milipore 0,22 μm (TPP, Trasadingen, Suíça). Na sequência o extrato e frações foram preparados através de diluição seriada em 100 μL de caldo Mueller-Hinton (MHB), em um intervalo de concentração de 5000 a 39 μL e as frações de 200 a 1,56 μL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U. As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland e em seguida inoculados em um volume de 5 μL nos orifícios, permanecendo uma concentração final de 10^4 UFC/mL. O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes, etanol e DMSO, foram realizados adicionando-se 100 μL de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 μL de MHB e 5 μL dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 μL de MHB e 100 μL dos extratos e frações. O controle positivo foi preparado com 100 μL de MHB e 5 μL dos inóculos bacterianos. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 16 a 20 horas e posteriormente foram adicionados 20 μL de solução aquosa de Cloreto de Trifenil Tetrazolium (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,5%. As microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C, e após este período foi realizada a leitura dos resultados. A formação de coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como ausência de atividade antibacteriana, enquanto que a não formação da coloração vermelha foi considerada como presença de atividade antibacteriana. Cada teste foi realizado em duplicata (Ayres *et al.*, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Resultados obtidos a partir das análises fitoquímicas de caráter qualitativo para o material vegetal constituído por folhas de *Bauhinia unguolata* L. podem ser visualizadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Resultados da caracterização fitoquímica para as frações do extrato hidro alcoólico 20% obtido a partir das folhas de *Bauhinia unguolata* L.

METABÓLITO VEGETAL		Fração			
		FH	FCL	FAE	FR
Alcaloides	Reativo Mayer	-	-	-	-
	Reativo Dragendorff	-	+	+	+
	Reativo Bouchardat	-	-	-	-
	Reativo Bertrand	-	-	-	-
Leucoantocianidinas		+	-	+	-
Flavonoides	Heterosídeos flavônicos	-	-	+	-
	Oxálico-Bórico	-	+	+	-
Cumarinas	Tubo	-	-	-	-
	Papel	-	-	-	-
Heterosídeo Antraquinônico		+	-	-	-
Esteroides/triterpenos	Liebermann-Burchard	cor amarela	cor rosa	cor amarela	cor verde
	Keller Kelliani	-	-	-	-

Legenda: (+) positivo; (-) negativo. FH=Fração Hexano, FCL=Fração Clorofórmio, FAE=Fração Acetato de Etila, FR=Fração Hidro alcoólica Residual.

Algumas classes de substâncias podem ser caracterizadas diretamente em tecidos vegetais, porém, na maioria das vezes é necessário a extração de um determinado grupo de compostos com solventes adequados, e então caracterizá-los. Essa caracterização foi realizada pelo emprego de reações químicas que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitação característicos

(Paula *et al.*, 2003), sugerindo a presença de flavonoides e alcaloides, que já haviam sido encontrados nas folhas da *B. unguolata* (Maia Neto *et al.*, 2008).

Com relação à metodologia utilizada, as reações qualitativas para caracterização de alcaloides baseiam-se na formação de complexos insolúveis (precipitados), e na avaliação quanto à presença desta classe as amostras demonstraram positividade para o teste, ocorrendo o aparecimento de precipitado de cor laranja avermelhado para o reagente de Dragendorff. Este reagente constitui uma solução de iodo bismutado de potássio $K(BiI_4)$ em ácido diluído que forma precipitados laranja avermelhados quando em contato com alcaloides e compostos nitrogenados.

Como se trata de uma reação não específica para alcaloides, resultados falso-positivos podem ser comuns (Santos, 2003), portanto, o resultado é apenas sugestivo. Quando a reação foi realizada utilizando outros reagentes para a detecção de alcaloides os resultados foram negativos. A presença destes compostos foi detectada em outras plantas do gênero, de acordo com a literatura, como a *B. candicans* que contém o alcaloide trigonelina (Silva & Cechinel Filho, 2002) e alcaloides β -carbolínicos harmano e eleagnina já foram identificados na *B. unguolata* (Maia Neto *et al.*, 2008).

Positividade ocorreu com a FAE e FR na pesquisa de leucoantocianidinas, em que se observou o aparecimento de coloração vermelha. Resultados positivos foram demonstrados também através da coloração vermelha para a pesquisa de heterosídeos flavônicos na fração acetato de etila da *B. unguolata* e no aparecimento de coloração amarela fluorescente sob luz ultravioleta, no teste que utiliza oxálico bórico, para a fração hexano e fração acetato de etila, sugerindo a presença de flavonóis. Estudos realizados com outras plantas do gênero mostram a presença de quercetina e quercitrina, exemplos de flavonóis observados na *B. purpúrea* e *B. tomentosa*, respectivamente (Silva & Cechinel Filho, 2002). Os flavonoides são compostos encontrados no gênero *Bauhinia* e vários estudos com plantas do gênero reportam o isolamento e identificação de compostos pertencentes a esta classe (Silva & Cechinel Filho, 2002; Reddy *et al.*, 2003; Estrada *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009).

Ocorreu a formação de coloração vermelha com as frações hexano e fração acetato de etila quando realizada a pesquisa por heterosídeos antraquinônicos, sugerindo desta forma a presença de naftoquinonas e/ou antraquinonas.

Para a pesquisa de esteroides/triterpenos foi observada a formação de coloração amarela com as frações hexano e acetato de etila, e este resultado indica a possível presença de um composto que apresenta um grupamento metila no carbono 14 em sua fórmula estrutural (Miguel, 2003). Para a fração clorofórmio foi observado a formação de coloração rosa que possivelmente sugere a presença de um composto que apresenta na sua fórmula estrutural uma função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. Para a fração hidro alcoólica residual foi

observada a formação de coloração verde que sugere também a presença de um composto que apresenta na sua fórmula estrutural uma função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 (Miguel, 2003). Esteroides são uma classe de compostos químicos encontrados muito comumente em plantas do gênero pesquisadas, é o caso da *B. candicans*, *B. forficata*, *B. guianensis*, *B. manca*, *B. splendens*, *B. uruguayensis*, *B. vahlii*, *B. variegata*. Com relação aos triterpenos a literatura reporta a presença na *B. vahlii* e *B. variegata* (Silva & Cechinel Filho, 2002).

A pesquisa utilizando o extrato aquoso (Tabela 3) obteve resultado negativo para a presença de heterosídeos antociânicos e heterosídeos saponínicos, pois não houve formação de espuma maior ou igual a um centímetro.

Tabela 3 - Resultados da caracterização fitoquímica com o extrato aquoso obtido a partir das folhas de *Bauhinia unguolata* L.

ANÁLISE	EXTRATO AQUOSO
Heterosídeos antociânicos	-
Heterosídeos saponínicos	-
Heterosídeos cianogênicos	-
Taninos hidrolisáveis	-
Taninos condensados	+
Aminogrupos	+
Ácidos fixos	+
Ácidos voláteis	-

Legenda: (+) positivo; (-) negativo.

Não foi detectada a presença de heterosídeos cianogênicos no ensaio tendo em vista a ausência de coloração vermelha na tira de papel picro-sódico utilizado.

Na pesquisa de taninos não foi observado a presença de taninos hidrolisáveis e polifenóis, tendo em vista a não ocorrência de coloração azul e marrom respectivamente, utilizando como reagente o cloreto férrico. Quando a busca foi pela presença de taninos condensados, o resultado foi considerado positivo tendo em vista ocorrência de coloração verde quando o resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool 50% e gotejadas algumas gotas de KOH a 5%.

Na pesquisa de ácidos voláteis o valor do pH observado na fita foi superior a 7 sugerindo a ausência destes compostos. Na pesquisa de ácidos fixos houve formação de coloração marrom quando o reativo de Nessler foi gotejado sobre uma das manchas do resíduo amoniacal do extrato em tira de papel de filtro, conferindo positividade ao teste e sugerindo a presença de ácidos fixos.

Os ensaios fitoquímicos preliminares foram realizados com o objetivo de servirem de guia para o isolamento de substâncias, informando quais são os principais grupos de metabólitos presentes na amostra. Os resultados obtidos coincidem com a composição da família descrita na literatura, com a presença principalmente de alcaloides, flavonoides, esteroides e triterpenos. A partir destes ensaios será possível estabelecer estratégias para a obtenção de compostos isolados pertencentes à determinados grupamentos químicos, principalmente os flavonoides.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Os resultados obtidos referentes à avaliação da toxicidade sobre a *A. salina* são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Mortalidade de *Artemia salina* e CL₅₀ utilizando o extrato e frações das folhas de *Bauhinia unguolata* L.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO µg.mL ⁻¹ / MORTALIDADE			CL ₅₀ µg.mL ⁻¹	IC de 95% µg.mL ⁻¹
	10	100	1000		
EB	4	6	5	> 1000	-
FH	1	0	2	> 1000	-
FCL	0	6	2	> 1000	-
FAE	1	2	2	>1000	-
FR	0	2	3	> 1000	-
Metanol	0	0	0	> 1000	-
Sulfato de quinidina	16	10	18	50,12	35,80-70,16

Extrato Bruto (EB), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmio (FCL),
Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Hidro alcoólica Residual (FR).
IC= Intervalo de Confiança. CL₅₀= concentração letal.

De acordo com Meyer *et al.* (1982), as amostras são consideradas ativas quando a CL₅₀ for menor que 1000 µg.mL⁻¹, portanto, de acordo com os valores obtidos nenhuma das amostras testadas apresentaram toxicidade sobre *A. salina*. Apesar de algumas mortes terem sido observadas com as amostras no experimento, o número total não foi estatisticamente significativo quando comparados ao sulfato de quinidina utilizado como controle positivo do teste e nem com o controle negativo (metanol / solvente utilizado para solubilização das amostras).

O ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *A. salina*, que são microcrustáceos de água salgada empregados como alimento vivo para peixes, pode ser utilizado para a determinação preliminar de toxicidade de extratos vegetais por meio da estimativa da concentração letal (CL₅₀) capaz de matar 50% dos náuplios (Cavalcante *et al.*, 2000; Parra *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*,

2008), tendo como principais vantagens a fácil obtenção, rapidez de realização do ensaio além do baixo custo (Meyer *et al.*, 1982) e simplicidade de execução (Siqueira *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2008).

Outras plantas do gênero *Bauhinia* foram analisadas e também não demonstraram efeitos tóxicos, como por exemplo, a *B. forficata* que apresentou CL_{50} 1780 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figueira *et al.*, 2012), a *B. purpurea* que apresentou $CL_{50} > 5000$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Krishnarajua *et al.*, 2005) e o extrato bruto da *B. variegata* com $CL_{50} > 1000$ mg.mL^{-1} , porém este autor encontrou atividade quando testou alcaloides totais isolados desta planta (Martínez *et al.*, 2011). Por outro lado, o extrato acetato de etila e o metanólico obtido das folhas e da *B. rufescens* foram tóxicos (0,059 e 0,389 mg.mL^{-1} respectivamente) (Muhammad & Sirat, 2013).

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para avaliação da atividade hemolítica proposta pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, foram testados o EB e frações obtidas a partir das folhas da *B. unguolata* L., sendo que não foi observada formação de hemólise total para nenhuma amostra em nenhuma diluição. Em todos os tubos ocorreu a formação de depósitos de eritrócitos, demonstrando que as amostras não foram capazes de promover hemólise total *in vitro*.

Resultado semelhante foi observado com a avaliação da atividade hemolítica em placas de ágar sangue ou teste de difusão em discos, em que também não foram observados a formação de halos de hemólise ao redor do disco de papel, característico deste método, para nenhuma amostra analisada.

A avaliação de atividade hemolítica é considerada um indicador de toxicidade geral e bioatividade, sendo importante na investigação da ação de extratos de plantas sobre o sangue humano. Os testes *in vitro* para determinar a ação hemolítica têm sido utilizados como um dos métodos de triagem para os diferentes agentes tóxicos (Kublik *et al.*, 1996), incluindo a avaliação de plantas (Gandhi & Cherian, 2000).

Os resultados obtidos confirmaram a reação negativa de Lieberman Bouchardt da marcha fitoquímica, sugerindo a ausência de saponinas e podem indicar não toxicidade das amostras nestes modelos, no entanto outros estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

- Concentração Inibitória Mínima

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na técnica de micro diluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A determinação da CIM vem sendo bastante utilizada, principalmente devido à sua maior sensibilidade e uso de quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (Ostrosky *et al.*, 2008).

Tabela 5 - Atividade antibacteriana do extrato e frações de *Bauhinia unguolata* avaliada a partir do teste de microdiluição em caldo

AMOSTRA	MICRO-ORGANISMO $\mu\text{g.mL}^{-1}$			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 5922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
EB	1250	5000	5000	1250
FH	>200	>200	>200	>200
FAE	>200	>200	>200	>200
FCL	>200	>200	>200	>200
FR	>200	>200	>200	>200

Legenda: Extrato Bruto (EB), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmio (FCL), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Hidro alcoólica Residual (FR).

ATCC - American Type Culture Collection; CIM – Concentração Inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). > = superior a. Interpretação da atividade: CMI $\geq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ = inativo; CMI $\leq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ = ativo.

A maior parte dos trabalhos considera extratos obtidos de plantas com bom potencial inibitório se demonstram atividade em concentrações de até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, atividade inibitória moderada de $100\text{-}500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, atividade fraca de $500\text{-}1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e inativos maiores que $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Dall'Angol *et al.*, 2003; Ayres *et al.*, 2008). Por outro lado Mitscher *et al.* (1972) considera inativo quando os valores da CIM estão acima de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pois não apresentam interesse para uso clínico. Portanto, baseado no interesse clínico, não foi observada atividade do extrato e frações sobre as espécies analisadas, pois ao avaliar a atividade antibacteriana do EB foi observada CIM acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para as frações as CIMs obtidas encontraram-se acima de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que foram as maiores concentrações testadas.

Outras espécies de *Bauhinia* também foram analisadas com relação a atividade antibacteriana. Martínez *et al.* (2011) testaram a atividade do extrato etanólico de *B. variegata* sobre *Escherichia coli* utilizando o método da difusão em ágar sem observação de inibição do crescimento bacteriano. O mesmo ocorreu com *Enterobacter aerogenes*, *Providencia* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Klebsiella* spp que se mostraram resistentes ao contato com o extrato hidro alcoólico de *B. forficata* também utilizando o método da difusão em disco (Gonçalves *et al.*, 2013). Folhas e casca do caule de *B. rufescens* foram submetidas a extração com éter de petróleo, acetato de etila e metanol e os extratos resultantes submetidos a avaliação do potencial antibacteriano utilizando MIC e difusão em disco. De acordo com os autores (Muhammad & Sirat, 2013) foi observada uma maior atividade da fração acetato de etila das folhas e cascas do caule contra *P.aeruginosa* e *B. subtilis* e do extrato metanólico contra *P. aeruginosa*. Eficácia antibacteriana também foi observada com os extratos acetato de etila, n-butanol e metanol da casca do caule de *B. rufescens* contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Usman, 2009). Adicionalmente, o extrato n-hexano e metanol de *B. racemosa* e *B. variegata* foram investigados contra *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo o extrato metanólico mais ativo. Souza *et al.* (2004) utilizaram o método da difusão em ágar para avaliar atividade dos extratos e frações da *B. forficata* e *B. microstachya*, encontrando que somente uma fração da *B. forficata* foi capaz de inibir crescimento da *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 1.000 µg.mL⁻¹. A *B. microstachya* não apresentou atividade antibacteriana.

CONCLUSÃO

A análise fitoquímica qualitativa preliminar apontou a presença de alcaloides, flavonoides, antraquinonas, esteroides, triterpenos e taninos condensados. As amostras testadas não foram ativas frente às cepas bacterianas utilizadas e também não se mostraram tóxicas frente à *Artemia salina* além da ausência de atividade hemolítica. A ausência de toxicidade estimula a realização de estudos adicionais para a determinação de propriedades biológicas e terapêuticas desta espécie.

AGRADECIMENTOS

A Capes pelo suporte financeiro e bolsas de doutorado, a Sra. Geciane Mirian da Silva pelo auxílio com a coleta do material e ao Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela identificação da espécie.

REFERÊNCIAS

- Ayres MCC, Brandão MS, Vieira Júnior GM, Menor JCASB, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18(1): 90-97, 2008.
- Barbosa Filho JM, Nascimento Júnior FA, Tomaz ACA, Athayde Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Souza MFV, Batista LM, Diniz MFFM. Natural products with antileprotic activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17(1): 141-8, 2007.
- Bieski IGC, Santos FR, Oliveira RM, Espinosa MM, Macedo M, Albuquerque UP, Martins DTO. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: 1-36, 2012.
- Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 1, 546p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 20 fev. 2011.
- Cavalcante M F, Oliveira MCC, Velandia JR, Echevarria A. Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* leach. *Quím. Nova.* 23(1): 20-22, 2000.
- Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1952. 646 p.
- Da Silva MAB, Melo LVL, Ribeiro RV, Souza JPM, Lima JCS, Martins DTO, Silva RM. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20(4): 549-562, 2010.
- Dall' Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, Sarmiento L, Lamb L, Hass M, Von Poser G, Schapoval EES. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine.* 10: 511-516, 2003.
- Dutra VF, Garcia FCP, Lima HC. Caesalpinioideae (Leguminosae) nos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 22(2): 547-558, 2008.

Dutra VF, Vieira MF, Garcia FCP, Lima HC. Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de leguminosae dos campos rupestres do parque estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*. 60(2): 371-387, 2009.

Estrada O, Hasegawa M, Gonzalez-Mujica F, Motta N, Perdomo E, Solorzano A, Méndez J, Méndez B, Zea E. Evaluation of Flavonoids from *Bauhinia megalandra* Leaves as Inhibitors of Glucose-6-Phosphatase System. *Phytother. Res.* 19: 859–863, 2005.

Feijó AM, Bueno MEN, Ceolin T, Linck CL, Schwartz E, Lange C, Meincke SMK, Heck RM, Barbieri RL, Heiden G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. *Rev. Bras. Pl. Med.* 14(1): 50-56, 2012.

Ferreira ALA & Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43(1): 61-68, 1997.

Figueira ACG, Brito AF, Silva GA. Avaliação da toxicidade de plantas medicinais brasileiras por meio do bioensaio com *Artemia salina*. *III Jornada de Pesquisa e Iniciação Científica*, 3, Morada Verde Ceres, Brasil, 2012,

Gandhi VM, Cherian KM. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicol. In Vitro.* 14: 513-516, 2000.

Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Árvores medicinais nativas com potencial para extrativismo autossustentável - atividade antimicrobiana. *Gl. Sci. Technol.* 6(2): 114 – 120, 2013.

Inngjerdingen K, Nergard CS, Diallo D, Mounkoro PP, Paulsen BS. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa. *J. Ethnopharmacol.* 92: 233–244, 2004.

Kalegari M, Miguel MD, DIAS JFG, Lordello ALL, De Lima CP, Miyazaki CMS, Zanin SMW, Verdam MCS, Miguel OG. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). *Braz. J. Pharm. Sci.* 47(3): 635-642, 2011.

Krishnarajua AV, Raoa TVN, Sundararajua D, Vanisreeb M, Tsayb HS, Subbaraju GV. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 3(2): 125-134, 2005.

Kublik H, Bock TK, Schreier H, Müller BW. Nasal absorption of 17- β estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42: 320-24, 1996.

Lewan L, Andersson M, Morales PG. The use of *Artemia salina* in toxicity.test. *Altern. Lab. Anim.* 20: 297-301, 1992.

Lewis GP. Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens: Kew, 1987. 369 p.

Lorenzi H. Árvores brasileiras. Manual de identificação. São Paulo: Editora Plantarum, 1991. 352 p.

Lorenzi H & Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

Maia Neto M, Andrade Neto M, Braz Filho R, Lima MAS, Silveira ER. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 36(3): 227-229, 2008.

Martínez MM, Ocampo DM, Galvis JH, Valencia A. Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Rev. Cubana Plant. Med.* 16(4): 313-323, 2011.

Mena-Ali'JI & Rocha OJ. Selective seed abortion effects the performance of the offspring in *Bauhinia unguulate*. *Ann. Bot.* 95: 1017–1023, 2005.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam LB, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin, J L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45: 31-34, 1982.

Miguel OG. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

Mitscher LA, Leu RP, Bathala MS, Wu WN, Beal JL. Antimicrobial agents from higher plants. *Lloydia*. 35: 157-166, 1972.

Morais SM, Dantas JD P, Silva ARA, Magalhães EF. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15(2): 169-177, 2005.

Moreira EA. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. *Tribuna Farmacêutica*. 47(1): 1-19, 1979.

Muhammad A & Sirat HM. Antimicrobial, antityrosinase and brine shrimp lethality test of *Bauhinia rufescens* Lam (Fabaceae). *J. Coastal Life Med.* 1(2): 123-128, 2013.

Nascimento J E, Melo AFM, Lima e Silva TC, Veras Filho J, Santos EM, Albuquerque UP, Amorim ELC. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 29(2): 145-150, 2008.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18(2): 301-307, 2008.

Parra A, Yhebra R, Sardinias I, Buella L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acutetotoxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 8(5): 395-400, 2001.

Paula CS, Verdam MCS, Hirota BCK, Miguel OG, Miguel MD. Prospecção fitoquímica e avaliação preliminar da atividade antibacteriana dos extratos das folhas e casca do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Visão Acadêmica*. 14: 4-12, 2013.

Paula CS, Cantelli VCD, Hirota BCK, Campos R, Oliveira VB, Kalegari M, Silva CB, Silva GM, Miguel OG, Miguel MD. Potencial antioxidante in vitro das folhas da *Bauhinia unguolata* L. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 35: 217-222, 2014.

Reddy MV, Reddy MK, Gunasekar D, Caux C, Bodo B. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry*. 64: 879–882, 2003.

Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: Simões CMO (Org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 16, p. 403-434.

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.* 44(6): 781-3, 2011.

Santos MM, Nunes MGS, Martins RD. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 14(2): 327-334, 2012.

Silva KL & Cechinel Filho. V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quím. Nova*. 25(3): 449-454, 2002.

Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FCF. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev. Bras. Farmacogn.* 16(4): 455-462, 2006.

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.* 67: 829-832, 2004.

Usman H, Abdulrahman FI, Kaita AH, Khan IZ. Antibacterial assays of the solvents partitioned portions of methanol stem bark extract of *Bauhinia rufescens* Lam (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Packag. Technol. Sci.* 10(2): 857-867, 2009.

Wu ZB, Zhao YT, Yang XW, Liang H. Flavonoids from *Bauhinia glauca* subsp. *Pernervosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 57(6): 628—631, 2009.