



Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L.

Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L.

Recebido em 22/09/2011

Aceito em 12/11/2011

Juliana Couto Nascimento, Luiz Fernando Oliveira Lage, Cláudio Rodrigues Dayrell Camargos, Juliana Coelho Amaral, Lucas Martins Costa, Adriana Nascimento de Sousa, Franciêlda Queiroz Oliveira*

Centro Universitário Newton Paiva, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 30431-262, Belo Horizonte, MG, Brasil, Belo Horizonte, MG, Brasil

RESUMO

Diferentes espécies vegetais vêm sendo amplamente pesquisadas. Estudos têm relacionado o gênero *Bauhinia* como fonte de compostos fenólicos, o qual apresenta propriedades antioxidantes. O presente trabalho teve como objetivo realizar o doseamento de flavonóides totais e a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH em extratos de folhas de *Bauhinia variegata* L. em diferentes épocas do ano. Os resultados mostraram a presença de flavonóides tanto no teste fitoquímico quanto no doseamento e foi possível notar pelo método de DPPH que há atividade antioxidante nos extratos das folhas das diferentes amostras testadas.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, radical livre, absorvância

ABSTRACT

Different species of plant have been widely researched. Studies have linked the genus *Bauhinia* as a source of phenolic compounds, which has antioxidant properties. This study aimed to make the determination of total flavonoids and the determination of antioxidant activity by DPPH method in leaf extracts of *Bauhinia variegata* L. at different times of the year. The results showed the presence of flavonoids in both phytochemical and doseament test, and It was possible notice by DPPH method there is antioxidant activity in leaf extracts of different samples tested.

Keywords: Phenolic compounds, free radical, absorbance

INTRODUÇÃO

Os radicais livres e outros oxidantes, vem sendo considerados nos últimos anos como grandes causadores de várias doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I (Sousa et al., 2007).

No entanto, quando em excesso, podem gerar o estresse oxidativo (EO), que pode ser definido como as circunstâncias nas quais os radicais livres causam danos teciduais.

A produção de radicais livres ocorre naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, no metabolismo ce-

lular ou pela exposição à fatores exógenos (Barreiros et al., 2006; Bianchi et al., 1999).

Um organismo encontra-se sob EO quando ocorre um desequilíbrio entre sistemas prooxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (Bianchi et al. 1999; Schneider et al., 2004). O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos de forma exógena. De acordo com Sousa et al. (2007), denominam-se antioxidantes, as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável,

* **Contato:** Franciêlda Queiroz Oliveira, Centro Universitário Newton Paiva, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 30431-262, Belo Horizonte, MG, Brasil, Belo Horizonte, MG, Brasil, e-mail: franciequeiroz@gmail.com

retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (Barreiros et al., 2006).

Assim, pesquisas têm se voltado para o desenvolvimento de produtos naturais com atividade antioxidante. É possível que os flavonóides presentes em extratos de folhas de *Bauhinia variegata* possam ser uma importante fonte para redução do EO.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

As folhas da espécie *Bauhinia variegata* foram coletadas no município de Belo Horizonte, no bairro Nova Granada nos meses de fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro, utilizando-se sempre a mesma fonte de coleta. Exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (Departamento de Botânica/ICB/UFMG) sob registro BHCB 96279.

Preparo de materiais, soluções e reagentes (Prospecção Fitoquímica)

Todos os reagentes foram preparados de acordo com as técnicas convencionais em Fitoquímica (Matos, 1988; Wagner & Bladt, 1996; Costa, 2001). Após triagem, as folhas da espécie foram secas em estufa de secagem Fanem®, com temperatura controlada. Estas foram trituradas em moinho de facas Technal® tipo willye e posteriormente acondicionadas em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz e umidade.

Prospecção fitoquímica

Testes convencionais em análise fitoquímica foram realizados para verificar a presença de Cumarinas, Flavonóides, Taninos, Antraquinonas, Saponinas e Alcalóides visando à caracterização de metabólitos secundários em diferentes épocas do ano, com ênfase nos flavonóides (Matos, 1988; Wagner & Bladt, 1996; Costa, 2001; Simões et al., 2004).

Caracterização de flavonóides

Dois gramas da droga vegetal em pó foram aquecidos até fervura, por cerca de 10 minutos com 40 ml de etanol em seguida esfriado e filtrado separando este filtrado em três tubos de ensaio, em torno de 4 mL e aproximadamente 3 mL em uma cápsula de porcelana pequena.

O restante do extrato foi reservado para a cromatografia.

a) Reação da Cianidina: a um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de HCL concentrado e uma espátula pequena de zinco metálico.

b) Reação com FeCl₃: a um tubo de ensaio foi adicionado uma gota da solução aquosa de FeCl₃ a 4,5%.

Cromatografia: Em uma placa cromatográfica de sílica gel, foi aplicado o extrato etanólico da espécie e como marcador utilizou-se a Rutina.

Como eluente foi utilizado uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27).

Para revelação da placa cromatográfica, borrifou-se uma solução etanólica de AlCl₃ a 5%. Esta foi aquecida rapidamente em chapa aquecedora e observada no UV visível Enela UVGL 58® sob luz UV365nm.

Em cápsula de porcelana:

a) Reação com AlCl₃: ao filtrado da cápsula de porcelana com 3mL adicionou-se cerca de 8 gotas de solução etanólica de AlCl₃ a 5%. O conteúdo da cápsula foi aquecido em banho-maria até reduzir o volume e observado sob lâmpada UV.

Determinação quantitativa de flavonóides totais por espectroscopia na região do UV-vis

Foi empregada a técnica descrita por Costa (1982) com algumas modificações.

O extrato foi obtido a partir de 3g do material vegetal triturado em Moinho de facas Technal® tipo willye e transferido para um balão de fundo chato. Foram adicionados 25 mL de metanol e aquecidos, sob refluxo, durante 30 minutos. O extrato obtido foi resfriado, deixado em repouso para que decantasse e posteriormente foi filtrado através de algodão. Este filtrado foi recolhido, quantitativamente, em um balão volumétrico de 50 mL. Retirou-se do balão anterior, o algodão contendo parte do pó, e acrescentou-se a este 20 mL de metanol. A mistura foi extraída nas mesmas condições descritas anteriormente e filtrada, ao final, através de algodão, o filtrado foi recolhido, quantitativamente, no mesmo balão. Lavou-se o algodão com 5mL de metanol e o volume foi completado com este mesmo solvente.

Em um tubo de ensaio com tampa foram misturados, na ordem indicada, 10 mL da solução metanólica obtida anteriormente, 4 mL de diclorometano e 6mL de água. A mistura foi homogeneizada e transferida para um tubo de centrifuga e centrifugada em centrífuga Quimis Q222B® para completa separação de fases. A camada hidrometanólica (superior) foi retirada com ajuda de uma pipeta de Pasteur e colocada em um balão volumétrico de 25 mL e este foi completado com metanol.

Reação de coloração

Foram transferidos 5 mL da solução hidrometanólica, obtida anteriormente, para um balão volumétrico de 25 mL e acrescentou-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução piridina:água (2:8) e 2 mL de solução a 12% de cloreto de alumínio em água, 5 mL de metanol e completou-se o volume com água.

Leitura das absorvâncias

Mediu-se a absorvância da amostra a 420 nm em Espectrofotômetro HP series 8453®. Os procedimentos foram feitos em triplicata. Um branco foi constituído de 5mL da solução hidrometanólica e 0,6 mL de ácido acético glacial, 5 mL de Metanol, diluído com água para volume final de 25 mL. Nos casos em que se observou turbidez, a solução foi centrifugada, empregando-se o sobrenadante para fazer a leitura da absorvância.

Curva padrão para flavonóides

Dissolveu-se 10 mg de rutina, em metanol, em um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente. Foram empregadas alíquotas de 0,125 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,25 mL e 1,5 mL desta solução, correspondentes a 0,125 mg; 0,250 mg; 0,500 mg; 1,0 mg; 1,25 mg e 1,5 mg de rutina, respectivamente. Em cada um destes volumes, foram adicionados 5 mL de

metanol, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução piridina-água (2:8) e 2 mL de solução a 12% de cloreto de alumínio em água e completou-se para 25 mL com água. Foi medida a absorvância, em Espectrofotômetro HP series 8453®, da solução a 420 nm, em cubetas de quartzo, frente a água. A partir das concentrações finais obtidas (5, 10, 20, 40, 50, 60 µg/mL) e das respectivas leituras de absorvância foi construída a curva de calibração e obtida a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2007) e Sousa et al. (2007). O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres.

A partir de extrato etanólico preparado como no doseamento para flavonóides, foram preparadas as soluções das amostras nas seguintes concentrações: 280, 140, 70, 35, 14, 7 e 1,4 µg/mL, que correspondem à concentração final no ensaio de 200, 100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL. Um controle negativo foi feito pela adição de etanol e DPPH e o controle positivo foi feito pela adição de solução de um padrão (rutina) e DPPH.

Adicionou-se a cada concentração de extrato etanólico uma solução de DPPH 300 µM, exceto nos brancos, onde foi adicionado o solvente. Após a adição do DPPH, esperou-se 40 minutos e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 515nm. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{controle(-)}} - A_{\text{amostra}} \times 100}{A_{\text{controle(-)}}$$

Em que:

$A_{\text{controle(-)}}$ = absorvância da solução de DPPH sem a amostra;

A_{amostra} = absorvância da amostra com o DPPH.

Curva padrão para o DPPH

Preparou-se uma solução etanólica de DPPH a 300 µMol (120µg/mL). Em seguida, foram preparadas diluições dessa solução para obtenção de diferentes concentrações 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 e 1 µg/mL. Foram feitas as leituras das absorvâncias das soluções, em triplicata, utilizando-se etanol como branco. Foi construída a curva padrão de DPPH plotando-se o valor médio das absorvâncias obtidas x concentração da solução.

Análises estatísticas

Os dados foram tratados por Regressão Linear Simples, através do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), com verificação prévia de outliers e das premissas de normalidade, independência, homocedasticidade dos resíduos e ajuste ao modelo. Para isto realizou-se: inspeção visual dos dados e dos gráficos; tratamento de outliers pelo método de resíduos padronizados de "Jackknife"; normalidade pelo Teste de Ryan-Joiner (Req); Independência pelo Teste de Durbin-Watson (d); homocedasticidade pelo Teste de Brown Forsythe e ajuste ao Modelo pelo ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio fitoquímico

A qualidade das plantas medicinais depende de vários fatores, incluindo variações de espécies clima, coleta, armazenamento e processamento. Conseqüentemente, a padronização e o controle de qualidade dessas plantas medicinais é importante para garantir sua eficácia e o uso seguro das mesmas (Souza et al., 2009).

Foi observada a presença de flavonóides, sendo esta a principal classe de interesse para a possível atividade antioxidante da *Bauhinia variegata* L. Estudos semelhantes comprovam a presença deste metabólito secundário. Pizzolatti et al. (2003) encontraram flavonóides em *Bauhinia forficata*, enquanto Salatino et al. (1999) encontraram flavonóides em *B.variegata*.

Para o método de detecção de flavonóides houve uma maior fluorescência nos meses de abril, agosto e outubro, o que pode significar uma maior concentração desses compostos nesses meses. Vale ressaltar que as amostras de agosto (0,869%) e outubro (0,6611%) foram as que apresentaram maior percentual de flavonóides no doseamento. Somente foram verificados resultados positivos para os flavonóides e saponinas.

Determinação do teor de flavonóides

No gráfico (Figura 1) é possível observar a curva padrão utilizada no doseamento de flavonóides totais. Para esta curva foi realizado tratamento estatístico para verificação da linearidade e resíduos.

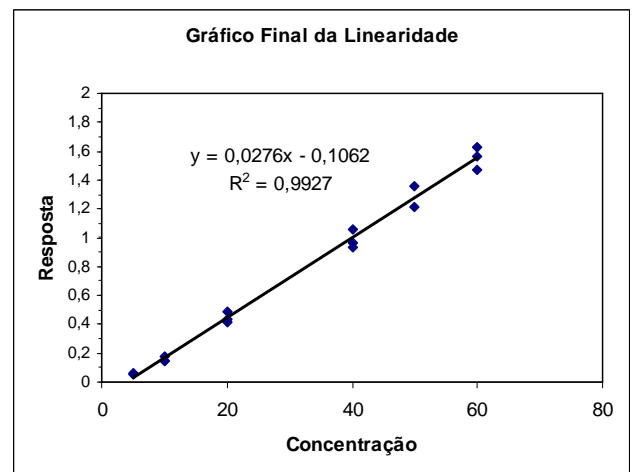


Figura 1. Curva padrão para flavonóides.

Foi realizado doseamento de flavonóides totais para amostras coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro ao longo do ano de 2009. Cada amostra foi identificada como BV Fev, BV Abr, BV Jun, BV Ago, BV Out e BV Dez, respectivamente.

Pela curva padrão foi possível notar que as absorvâncias das soluções de referência encontram-se dentro do esperado, em proporcionalidade com as concentrações.

No gráfico abaixo (Figura 2) é possível observar o teor de flavonóides totais nas diferentes épocas do ano. Foi observada uma variação no teor de acordo com a época de coleta, isso pode ser devido a variantes causadas pela sazonalidade, umidade, luminosidade, temperatura, entre outros (Sobrinho et al., 2009). Os meses em que foram registrados os teores de flavonóides mais baixos podem indicar que a planta produz menos dessa substância coincidindo com as épocas onde a temperatura e a umidade se encontram extremas. Assim, em junho temos o mês que possui menores temperaturas e umidade e dezembro o mês com as maiores temperaturas e umidade. Deste modo podemos explicar os teores apresentados com as amostras de junho e dezembro, que apresentaram os menores teores de flavonóides.

A amostra que apresentou maior teor de flavonoide foi a de agosto e a de menor foi a de dezembro (variância 0,033415), $p < 0,05$. Foi também possível notar teor significativo para as amostras de fevereiro, abril e outubro, quando comparadas com a de dezembro.

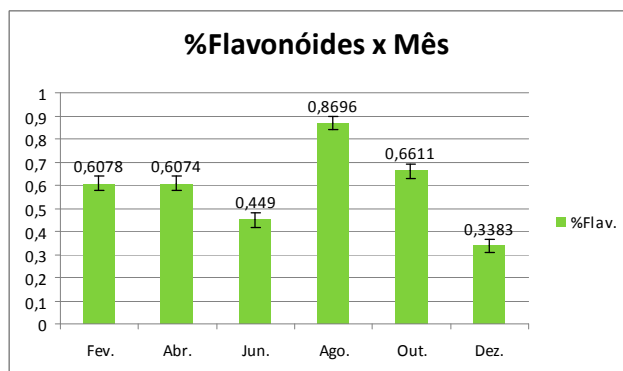


Figura 2. Teor de flavonóides *Bauhinia variegata* L. em diferentes épocas do ano.

Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

O gráfico (Figura 3) refere-se à curva de calibração empregada para o experimento de DPPH. Esta curva também foi avaliada quanto à linearidade.

Com a finalidade de avaliar a capacidade dos constituintes do extrato etanólico de *Bauhinia variegata* em capturar radicais livres (DPPH) foi feita análise de soluções deste extrato com DPPH. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (Figura 5). É importante destacar que para o cálculo dessa atividade antioxidante é necessária a utilização das leituras das absorvâncias dos controles negativos encontrados para cada mês analisado (Figura 4).

Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior é

sua atividade antioxidante (AA) (Alves et al., 2007). Sendo assim, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorvância, maior o consumo de DPPH. Constatou-se que a amostra do mês de abril obteve 98,32% de atividade antioxidante na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, sendo este o mês em que se obteve a maior AA. Foi observado que até a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (em todos os casos, exceto abril) o consumo de DPPH foi diretamente proporcional à concentração da amostra, ou seja, com absorvâncias menores e que a partir da concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ isto não ocorreu, visto que a absorvância aumentou. Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, visto que as absorvâncias após reação de DPPH com as diferentes concentrações das amostras testadas foram significativamente menores em se comparando com as absorvâncias obtidas para o controle negativo (DPPH + solvente), o que pode demonstrar preliminarmente a atividade antioxidante para o extrato testado. A menor AA foi evidenciada para a amostra de agosto, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, porém foi observado significativo percentual para esta mesma amostra nas outras concentrações.

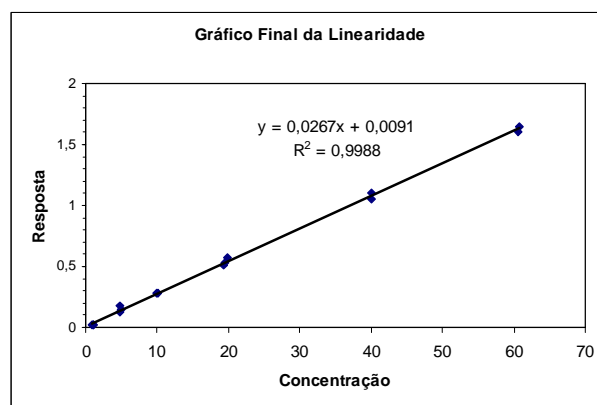


Figura 3. Curva padrão empregada no experimento de DPPH.

Geralmente esta atividade tem sido correlacionada com a presença de flavonóides, classe esta presente em todas as amostras analisadas, isto em diferentes teores de acordo com a época do ano.

Rajani & Ashok (2009) em estudo semelhante para caule e raiz de *B.variegata* também evidenciaram atividade antioxidante pelo mesmo método de DPPH e comparação com outros.

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana (Alves et al., 2007; Neves et al., 2008).

Alguns estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante dos flavonóides é maior que a das vitaminas E e C (Rice-Evans et al., 1996 apud Neves et al., 2008).

Diferentes autores vêm empregando o mesmo método para avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais, tendo-se observado resultados semelhantes e significativos (Lima et al., 2006; Sousa et al., 2007; Roesler et al., 2007; Iha et al., 2008; Nunes et al., 2008; Ayres & Chaves, 2010).

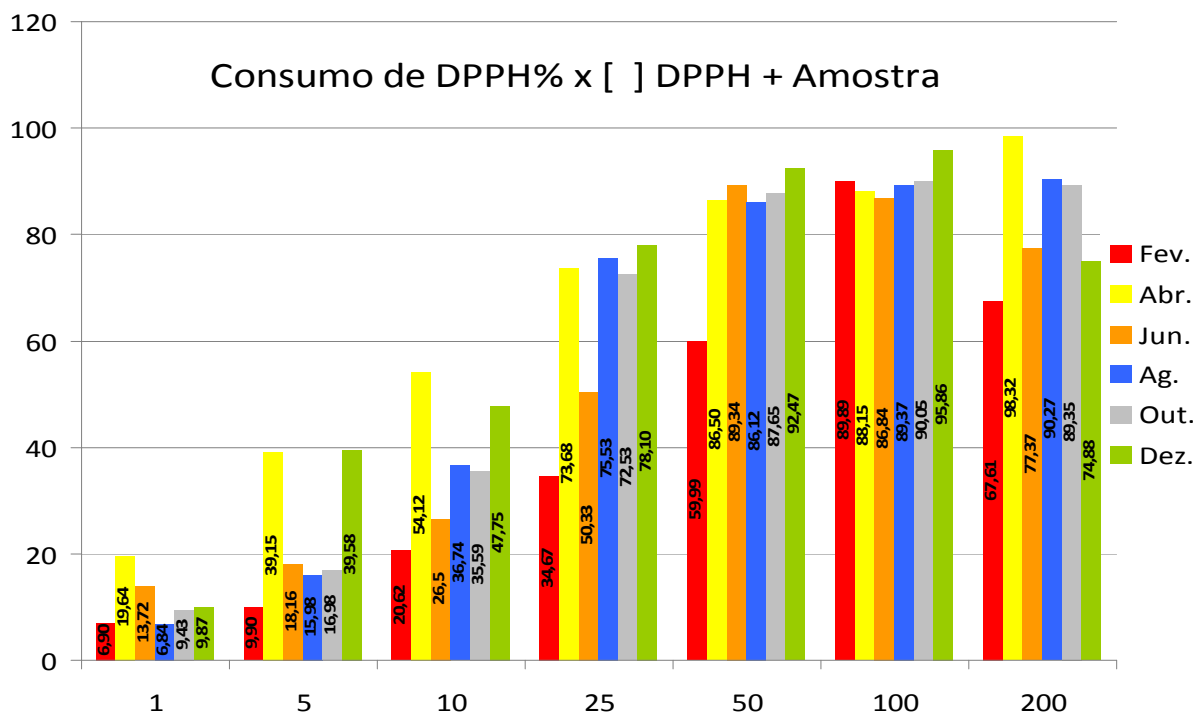


Figura 4. Percentual de Atividade Antioxidante de *Bauhinia variegata* L. em diferentes épocas do ano

CONCLUSÃO

Foram detectados flavonóides nos extratos de folhas de *B. variegata* em todos os meses analisados. Porém nos meses abril, agosto e outubro, quando comparados com os outros meses, observou-se uma maior intensidade da fluorescência na análise fitoquímica, o que foi corroborado com os resultados obtidos no doseamento.

Foi possível observar atividade antioxidante para os extratos de folhas da espécie *B. variegata* coletada em Belo Horizonte em diferentes épocas do ano.

Geralmente esta atividade tem sido correlacionada com a presença de flavonóides, classe que foi evidenciada para todas as amostras.

A linearidade das curvas padrão de doseamento de flavonóides e DPPH foi confirmado através de métodos de tratamentos estatísticos (Método dos mínimos quadrados ordinários).

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: FUNADESP.

REFERÊNCIAS

Alves CQ, Brandão HN, David JM, David JP, Lima LS. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC, 5(12): 7-8, 2007.

Ayres MC, Chaves MH. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos as folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. Química Nova, 33(1): 141-145, 2010.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa dos organismos. Química Nova, 29 (1): 113-123, 2006.

Bianchi MLP & Antunes LMG. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev. Nutr, 12(2): 123-130, 1999.

Costa AF. Farmacognosia. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.1032p.

Costa AF. Farmacognosia.3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.1032p.

Iha SM, Migliatok F, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro RCLR, Issac VLB, Brunetti, L, Corrêa MA, Salgado HRN. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. Rev. Bras. Farmacogn., 18(3): 387-393, 2008.

Lima AR, Barbosa VC, Santos Filho PR, Gouvea CMCP. In vitro evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana. Rev. Bras. Farmacogn., 16(4): 531-536, 2006.

Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 1988. 150 p.

Neves LC, Alencar SM, Carpes ST. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. Braz. J. Food Technol., 2(15), 2008.

Nunes XP, Mesquita RF, Silva DA, Lira DP, Costa VCO, Silva MVB, Xavier AL, Diniz MFFM, Agra MF. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica

e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). Rev. Bras. Farmacogn., 18: 718-723, 2008.

Pizzolatti MG, Junior AC, Szpoganicz B, Souza E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). Química Nova, 26(4): 466-469, 2003.

Rajani GP, Ashok P. In vitro antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. Indian J Pharmacol., 41(5):227-232, 2009.

Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciênc. Tecnol. Aliment., 27(1): 53-60, 2007.

Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Jimenez JP, Calixto FDS. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico Embrapa, 127: 1-4, 2007.

Salatino A, Blatt CTT, Santos DYA, Vaz AMSF. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. Rev. Bras. de Plantas Medicinai, 22(1):1720, 1999.

Schneider CD & Oliveira AR. Radicais Livres de Oxigênio e exercício: Mecanismos de Formação e Adaptação ao Treinamento Físico. Rev. Bras. de Medicina e Esporte, 10(4): 308-313, 2004.

Simões CM. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Florianópolis, 2004. 1104 p.

SobrinhoTJSP, Cardoso KCM, Gomes TLB, Ulysses P, Albuquerque UP, Amorim ELC. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. Rev. Bras. Farmacogn., 19(3): 740-745, 2009.

Sousa CMM, Silva HR, Vieira GM, Ayres MCC, Costa CS, Araújo DS. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, 30(2): 351-355, 2007.

Souza CRF, Georgetti SR, Salvador MJ, Fonseca MJVF, Oliveira WPO. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. Braz. J. Pharm. Sci., 45(2), 2009.

Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis. Berlin: Springer Verlag, 1996. 320 p.