

Artigo

Flavonoides e Atividade Antioxidante das Folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud.

dos Santos, A. E.;* Barreto Junior, C. B.; Kuster, R. M.

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (3), no prelo. Data de publicação na Web: 5 de junho de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>**Flavonoids and Antioxidant Potential from the Leaves of *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud.**

Abstract: In this study the chemical composition of *Bauhinia longifolia* leaves was evaluated. The phytochemical study of the methanolic extract from the leaves of *B. longifolia* led to the isolation and structural elucidation of aglycone quercetin and its 3-O-monoglycoside derivatives: quercetin-3-O- α -arabinofuranoside, quercetin-3-O- α -rhamnopyranoside, quercetin-3-O- β -glucopyranoside and quercetin-3-O- β -galactopyranoside. Flavonoid structures were determined using a combination of techniques, including HPLC-UV, ESI-MS and NMR, in addition to the literature data. The antioxidant activity of the hexane, dichloromethane, ethyl acetate (EtOAc) and butanol (BuOH) fractions from the partition of the methanolic extract from the leaves of *B. longifolia* was evaluated by the DPPH radical reduction method and expressed in terms of its CE₅₀. The highest antioxidant activity was observed for EtOAc fractions (CE₅₀ = 21.2 μ g/mL) and BuOH (CE₅₀ = 16.1 μ g/mL) fractions. They were also evaluated for total phenol content by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, which revealed high concentrations of phenolic compounds in EtOAc (393.8 μ g EAG/mg) and BuOH (422.4 μ g EAG/mg) and low total phenolic content in hexane (23.8 μ g EAG/mg) and dichloromethane (61.9 μ g EAG / mg) fractions. For the first time the antioxidant activity of *B. longifolia* leaves is reported, as well as the presence of the monoglycosides avicularin, hyperin and isoquercitrin, flavonoid common on *Bauhinia* genus, but never described for *B. longifolia*. Thus the present study contributes with the chemical and pharmacological knowledge of *B. longifolia*, a great medicinal importance specie.

Keywords: *Bauhinia longifolia*; flavonoids; quercetin derivatives.

Resumo

Neste estudo, a composição química das folhas de *B. longifolia* foi avaliada. O estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *B. longifolia* levou ao isolamento e elucidação estrutural da aglicona quercetina e de seus quatro derivados 3-O-monoglicosídeos: quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo, quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo e quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo. As estruturas dos flavonoides foram determinadas a partir do uso de uma combinação de técnicas, incluindo CLAE-UV, IES-EM e RMN, além da comparação com dados da literatura. A atividade antioxidante das frações hexânica, diclorometano, acetato de etila (AcOEt) e butanólica (BuOH), oriundas da partição do extrato metanólico das folhas de *B. longifolia* foi avaliada através do método de redução do radical DPPH e expressa em termos de sua CE₅₀. A maior atividade antioxidante foi observada para as frações AcOEt (CE₅₀ = 21,2 μ g/mL) e BuOH (CE₅₀ = 16,1 μ g/mL). As folhas de *B. longifolia* foram ainda avaliadas quanto ao teor de fenóis totais através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, que revelou elevadas concentrações de compostos fenólicos nas frações AcOEt (383,8 μ g EAG/mg) e BuOH (422,4 μ g EAG/mg) e baixos teores de fenóis totais nas frações hexânica (23,8 μ g EAG/mg) e diclorometano (61,9 μ g EAG/mg). Pela primeira vez a atividade antioxidante das folhas de *B. longifolia* é reportada, bem como a presença dos monoglicosídeos avicularina, hiperina e isoquercitrina, flavonoides comuns no gênero *Bauhinia*, mas até então jamais descrito para *B. longifolia*. Neste sentido, o presente estudo contribui com o conhecimento químico e farmacológico de *B. longifolia*, espécie de grande importância medicinal.

Palavras-chave: *Bauhinia longifolia*; flavonoides; derivados da quercetina.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Fitoquímica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Bloco H, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

 aldasantosufjr@gmail.com

DOI:

Flavonoides e Atividade Antioxidante das Folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud.

Alda Ernestina dos Santos,^{a,*} Cleber B. Barreto Junior,^b Ricardo M. Kuster^a

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Fitoquímica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Bloco H, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Núcleo de Ciências Químicas, CEP 20270-021 Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* aldasantosufrj@gmail.com

Recebido em 26 de outubro de 2016. Aceito para publicação em 31 de maio de 2017

1. Introdução

2. Experimental

- 2.1. Procedimentos experimentais gerais
- 2.2. Material vegetal
- 2.3. Extração e isolamento dos flavonoides
- 2.4. Avaliação da atividade antioxidante
- 2.5. Determinação do teor de fenóis totais

3. Resultados e discussão

- 3.1. Composição química
- 3.2. Atividade antioxidante
- 3.3. Teor de fenóis totais

4. Conclusões

1. Introdução

O gênero *Bauhinia* pertence à família Fabaceae e compreende cerca de 300 espécies¹ que ocorrem em regiões tropicais da África, Ásia e das Américas Central e do Sul,² onde são empregadas na medicina popular no tratamento do diabetes.³ No Brasil são encontradas aproximadamente 200

espécies de *Bauhinia*, 98 das quais são nativas.¹ Muitas espécies foram introduzidas com fins ornamentais, adaptaram-se bem ao clima brasileiro e hoje são encontradas em regiões diferentes do país.⁴ *B. forficata* e *B. longifolia* são espécies nativas de uso difundido na medicina popular brasileira, sendo conhecidas por pata-de-vaca, devido ao formato bilobado de suas folhas.⁵

Estudos fitoquímicos com o gênero

Bauhinia têm levado ao isolamento de metabólitos secundários diversos, incluindo terpenos,⁶ quinonas,⁷ oxepinas,⁸⁻¹⁰ alcaloides¹¹ e, principalmente, flavonoides.¹²⁻¹⁵ O gênero *Bauhinia* é caracterizado pelo acúmulo de flavonoides livres e glicosilados, especialmente derivados do canferol e da quercetina.¹⁶

Estudos diversos revelaram o potencial do gênero *Bauhinia* como fonte de fenóis com atividade antioxidante.^{15,17-19} Antioxidantes são substâncias capazes de minimizar ou impedir os danos causados pela oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares, protegendo os sistemas biológicos da ação danosa provocada pelos radicais livres.²⁰ Os vegetais são fontes potenciais de substâncias antioxidantes que pertencem as mais variadas classes de metabólitos secundários, especialmente flavonoides, polifenóis cujo potencial antioxidante é bem conhecido.²¹

Apesar da importância química e medicinal do gênero *Bauhinia*, diversas espécies são ainda pouco exploradas quanto ao potencial químico e farmacológico.⁵ Incluindo *B. longifolia*, espécie que conta com poucos estudos publicados. Um estudo avaliando a composição química do óleo volátil das folhas de *B. longifolia* revelou a presença de diversos terpenos, dentre eles β -cariofileno, biciclogermacreno, isoespatulenol e o espatulenol, componente majoritário.⁶ *B. longifolia* é espécie nativa do Brasil e de grande ocorrência em áreas do Cerrado de Minas Gerais, mas também encontrada na Mata Atlântica, Amazônia e Caatinga.¹

Considerando o interesse crescente por substâncias naturais antioxidantes, o potencial do gênero *Bauhinia* como fonte de flavonoides e a escassez de estudos científicos com a espécie *B. longifolia*, este trabalho teve por objetivo avaliar a composição dos flavonoides e o teor de fenóis totais das folhas de *B. longifolia*, bem como sua atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Os flavonoides foram isolados através de técnicas clássicas de cromatografia e a elucidação estrutural realizada com base na combinação dos dados

obtidos nas análises por CLAE-UV, IES-EM e RMN. Por sua vez, a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais foram avaliados através de ensaios espectrofotométricos em microplacas.

2. Experimental

2.1. Procedimentos experimentais gerais

As análises por RMN foram conduzidas à temperatura ambiente em espectrômetro Bruker DRX-400 operando em uma frequência de 400,13 MHz para ¹H e 100,16 MHz para ¹³C. Na solubilização das amostras utilizou-se o solvente DMSO-d₆, contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As análises por IES-EM foram conduzidas em espectrômetro de massas Macromass/Waters ZQ 4000 através da inserção direta das amostras na fonte de ionização. As amostras foram ionizadas pela fonte de ionização por “eletrospray” operando em modo negativo. As análises por CLAE-UV foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu CBM-10 A equipado com uma bomba modelo LC-10AD e detector UV-Vis modelo SPD-M10. A fase estacionária foi composta por uma coluna analítica LiChrosorb RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Phenomenex®). A fase móvel consistiu de uma mistura entre metanol (MeOH) e solução aquosa de ácido fosfórico (1%). Os espectros UV foram adquiridos em comprimentos de onda no intervalo 254-400 nm e a detecção realizada nos canais 254 e 365 nm. As leituras das absorbâncias nos testes de determinação da atividade antioxidante e do teor de fenóis totais foram realizadas em aparelho espectrofotômetro do tipo ELISA, da marca Molecular Devices®, modelo Versamax, com faixa de leitura de 340-850 nm. O fracionamento cromatográfico em coluna foi realizado empregando-se XAD-16 (Sigma-Aldrich®) e Sephadex LH-20 (Pharmacia®) como fases estacionárias. Por sua vez, as análises por CCD foram realizadas empregando-se

cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®) e sistema eluente composto por acetato de etila, metanol, água e ácido acético na proporção 8:1:0,5:0,5 e NP-PEG como revelador, ambos aplicáveis na análise de flavonoides.

2.2. Material vegetal

Folhas de *B. longifolia* (Figura 1) foram coletadas em área rural do município de Luz, Minas Gerais. A espécie foi identificada pela botânica Dra. Ângela Vaz, sendo uma exsicata depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob o número de registro BHCB 18778. Após a coleta, as folhas de *B. longifolia* foram secas em estufa a 35 °C por 3 dias e posteriormente trituradas em moinho de facas.

2.3. Extração e isolamento dos flavonoides

O material vegetal seco (1,5 Kg) foi submetido à extração com metanol por um período de 7 dias, à temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 45 °C, fornecendo 95 g de extrato bruto, que foi posteriormente ressuspenso em uma mistura de MeOH:H₂O (9:1) e submetido à partição com hexano, fornecendo a fração hexânica (5 g). Posteriormente, procedeu-se à eliminação do metanol da fase aquosa em evaporador rotatório e a fase aquosa foi então submetida à partição com diclorometano, acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH), em escala crescente de polaridade, fornecendo as frações diclorometano (0,5 g), AcOEt (7 g) e BuOH (6 g), respectivamente. As frações obtidas foram analisadas por CCD, sendo detectada a presença de flavonoides apenas nas frações AcOEt e BuOH, que foram então selecionadas para o fracionamento cromatográfico. Tais frações foram separadamente aplicadas em coluna de XAD-16 e eluídas em gradientes de metanol em

água (0-100%), sendo 11 subfrações com volume de 10 mL coletadas em cada caso (subfrações A1-A11 para BuOH e subfrações B1-B11 para AcOEt). Após análise por CCD, as mesmas foram agrupadas em três grupos: G1: subfrações B6 a B9; G2: subfrações B10 e B11 e G3: subfrações A6 a A11. G1 e G3 foram aplicadas separadamente em colunas de Sephadex LH-20 empregando-se metanol e água (1:1) na eluição. O fracionamento de G1 forneceu 39 mg do flavonoide quercitrina (1) e 60 mg do flavonoide avicularina (2). O fracionamento de G3 forneceu uma mistura (45 mg) dos monoglicosídeos hiperina (3) e isoquercitrina (4). G2 foi aplicada em coluna de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, fornecendo 27 mg da aglicona quercetina (5).

2.4. Avaliação da atividade antioxidante

As frações hexânica, diclorometano, AcOEt e BuOH do extrato metanólico das folhas de *B. longifolia* foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante *in vitro* através do método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).²¹ Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, com cada amostra avaliada em seis concentrações diferentes (5, 25, 50, 100, 200 e 500 µg/mL). Em cada poço foram adicionados 175 µL de amostra e 50 µL de solução metanólica de DPPH a 0,3 mM. O branco de cada concentração consistiu da mistura entre 175 µL da amostra e 50 µL de MeOH. O controle negativo da reação consistiu da mistura entre 125 µL de MeOH e 50 µL de DPPH. O flavonol quercetina foi utilizado como controle positivo e avaliado em seis concentrações diferentes (0,16-5,0 µg/mL) e a curva de regressão linear dada pela equação $y = 10,797x + 11,285$ ($R^2 = 0,9995$), foi utilizada para se determinar a CE₅₀ (concentração de amostra necessária para reduzir em 50% os radicais DPPH). A absorbância foi lida a 517 nm em leitor de microplacas ELISA, 30 minutos após a reação entre a amostra e o radical DPPH. A atividade antioxidante percentual (%AA) em cada concentração foi

calculada a partir da equação: $AA (\%) = 100 - \frac{[(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco}) \times 100]}{Abs \text{ controle}}$. A atividade antioxidante foi expressa pela CE_{50} , calculada através da linha de tendência da curva obtida para cada

amostra, através da plotagem dos valores das concentrações das amostras (eixo x) e de suas respectivas percentagens de atividade antioxidante (eixo y).²²



Figura 1. Espécime de *B. longifolia* no local de coleta em área rural do município de Luz-MG

2.5. Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi avaliado através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu em microplacas.²³ Em tubos de 1 mL foram misturados 100 μ L de amostra, 100 μ L de MeOH e 100 μ L do reagente Folin-Ciocalteu (1:10 em água destilada) e após 5 minutos da adição do reagente Folin-Ciocalteu, 700 μ L de solução aquosa de Na_2CO_3 (20% m/v) foi adicionado. O branco consistiu na mistura de 200 μ L de MeOH, 100 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e 700 μ L da solução de Na_2CO_3 . A reação ocorreu por 20 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos e uma alíquota de 250 μ L transferida para cada poço da microplaca em triplicata e a absorbância lida a 760 nm. O teor de fenóis totais de cada amostra foi expresso em μ g de equivalente de ácido gálico por mg de extrato (μ g EAG/mg de extrato), de acordo com a equação da curva de calibração: $y = 0,0168x -$

$0,146$ ($R^2 = 0,9981$) obtida com soluções de ácido gálico a concentrações variadas (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 μ g/mL).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição química

As frações AcOEt e BuOH do extrato metanólico das folhas de *B. longifolia* apresentaram perfil químico idêntico (Figura 2), consistindo de uma mistura de cinco flavonoides, pertencentes à classe dos flavonóis, conforme sugere as absorções observadas nos espectros UV.

O fracionamento das frações AcOEt e BuOH em colunas de XAD-16 e Sephadex LH-20 demonstrou alta eficiência, levando à obtenção da quercetina e de seus quatro derivados 3-O-monoglicosídeos (Figura 3).

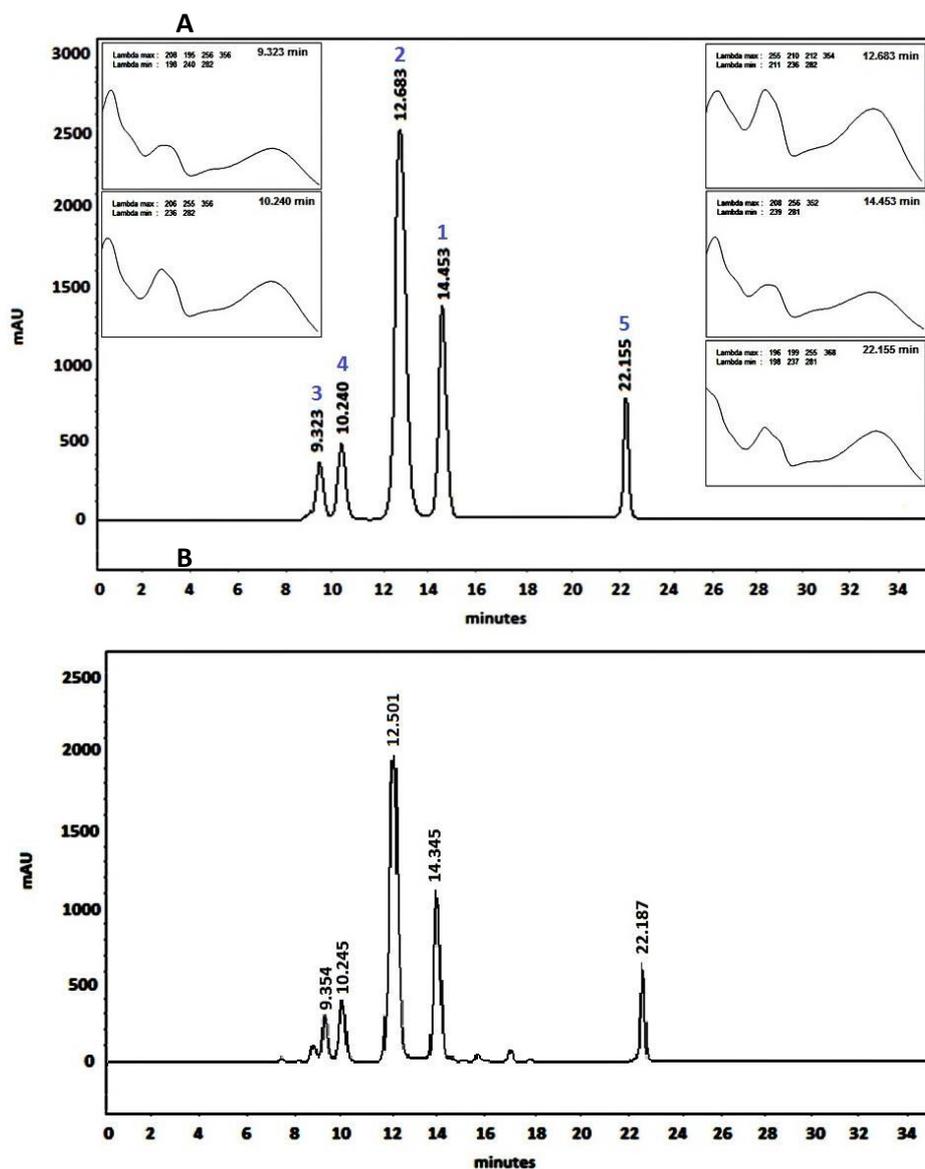


Figura 2. Cromatograma CLAE-UV das frações BuOH (A) e AcOEt (B) das folhas de *B. longifolia* e espectros UV dos flavonoides 1-5. Detecção em 365 nm

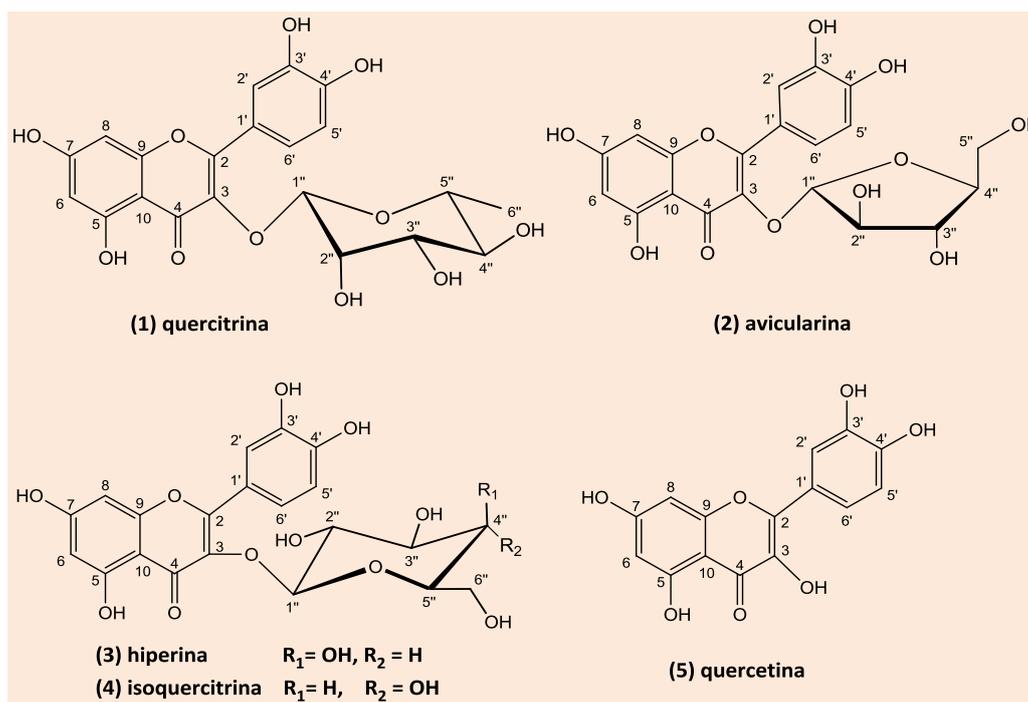


Figura 3. Flavonoides obtidos das folhas de *B. longifolia*

O flavonoide **1** foi obtido como um sólido amorfo amarelo e apresentou máximos de absorção em 256 e 352 nm no espectro UV. O espectro obtido por IES-EM indicou a presença do íon pseudomolecular $[M-H]^- = 447,4$; compatível com a fórmula $C_{21}H_{20}O_{11}$ de uma desoxi-hexosil quercetina. Os espectros de RMN 1H e ^{13}C confirmaram se tratar de uma ramnosil quercetina, dado o duplete em δ_H 0,85 ppm (3H, d, $J = 6,0$ Hz) (Tabela 1) e o sinal em δ_C 17,9 (C-6''), típicos do grupo metila da ramnose. O espectro HMBC revelou que a glicosilação ocorrera em C-3, dado o acoplamento 3J do hidrogênio anomérico δ_H 5,29 ppm (H-1'') com o carbono em 134,6 ppm (C-3). O baixo valor da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico revelou uma configuração α para a ramnose. O flavonoide **1** foi então elucidado como sendo a quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo, conhecido por quercitrina e previamente descrito para as folhas das espécies *B. unguolata*,¹¹ *B. megalandra*,²⁴ *B. malabarica*,²⁵ e *B. variegata*.¹⁵

O flavonoide **2** foi obtido como um sólido amarelo que, após revelação com NP/PEG, demonstrou coloração laranjada sob luz UV a 365 nm. No espectro UV foram observados

máximos de absorção em 255 e 354 nm, relativos às bandas II e I, respectivamente. Na análise por IES-EM a presença do íon pseudomolecular $[M-H]^- = 433,4$ para o qual foi sugerido a fórmula $C_{20}H_{18}O_{11}$ indicou se tratar de uma pentosil quercetina. Os espectros de RMN 1H , ^{13}C e HSQC revelaram um conjunto de sinais característicos de um derivado arabinofuranosídico da quercetina, cujos sinais relativos ao hidrogênio e ao carbono anomérico foram observados em δ_H 5,59 (H-1'', $J = 1,0$ Hz) e δ_C 108,3 ppm (C-1''), respectivamente. No espectro HMBC o acoplamento 3J do hidrogênio anomérico com o carbono em δ_C 133,8 ppm (C-3) revelou a 3-O-glicosilação. O sinal do carbono anomérico em δ_C 108,3 ppm, diferente do previsto para a forma piranosídica, o qual aparece próximo de δ_C 102 ppm, indica a arabinose na conformação furanosídica. Por sua vez, o baixo valor da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico sugere uma configuração α para a arabinose. Desta forma, o flavonoide **2** foi elucidado como sendo a quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, conhecido por avicularina, monoglicosídeo previamente

reportado para as folhas de *B. unguolata*¹¹ e *B. megalandra*.²⁴

Os flavonoides **3** e **4** foram obtidos como uma mistura, consistindo de um sólido amorfo amarelo para o qual foram observados dois sinais no cromatograma obtido por CLAE-UV e os espectros UV revelaram máximos de absorções em 256 e 356 nm e 255 e 356 nm, respectivamente. A presença de apenas um sinal no espectro obtido por IES-EM, o íon pseudomolecular $[M-H]^- = 463,4$; sugeriu a mistura de dois flavonoides isoméricos de fórmula $C_{21}H_{20}O_{12}$, compatíveis com uma hexosil quercetina. Os espectros de RMN 1H e ^{13}C da mistura demonstraram a presença dos sinais em δ_H 5,45 (d, $J = 7,7$ Hz), δ_C 101,5 ppm e δ_H 5,37 (d, $J = 7,1$ Hz), δ_C 102,4 ppm, relativos aos hidrogênios e aos carbonos anoméricos dos flavonoides **3** e **4**, respectivamente. No espectro HSQC foram observadas as correlações C-H para ambos os flavonoides da mistura e com base na multiplicidade dos sinais, nos valores de deslocamento químico (δ_H e δ_C) e das constantes de acoplamento, a porção osídica dos flavonoides **3** e **4** foi identificada como sendo galactose e glucose, respectivamente. O espectro COSY da mistura de **3** e **4** revelou um elevado valor para a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico de ambas as hexoses, sugerindo uma configuração β para a porção osídica de ambos os monoglicosídeos. No espectro HMBC foi observado o acoplamento 3J do hidrogênio anomérico da galactose em δ_H 5,37 ppm e da glucose em δ_H 5,45 ppm, com os carbonos em δ_C 113,8 (C-3) e 133,7 ppm (C-3), respectivamente, confirmando a 3-*O*-glicosilação para ambos os flavonoides da mistura. Os flavonoides **3** e **4** foram então elucidados como sendo respectivamente a quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (hiperina) e a quercetina-3-*O*- β -glucopiranosídeo (isoquercitrina), monoglicosídeos previamente reportados para as folhas de *B. malabarica*.²⁵

As subfrações B10 e B11, oriundas do fracionamento da partição AcOEt em coluna de XAD-16, foram agrupadas, reaplicadas em coluna de Sephadex LH-20 e eluídas com MeOH, fornecendo 27 mg do flavonoide **5**, obtido como um sólido amorfo amarelo, cujo espectro UV demonstrou máximos de absorção em 255 e 368 nm. O espectro obtido por IES-EM revelou a presença de um íon pseudomolecular $[M-H]^- = 301,3$; para o qual foi sugerida a fórmula $C_{15}H_{10}O_5$, compatível com uma aglicona. O espectro de RMN 1H do flavonoide **5** revelou o acoplamento do tipo *meta* entre os sinais em δ_H 6,18 (1H, d, $J = 1,9$ Hz) e δ_H 6,40 (1H, d, $J = 1,9$ Hz), relativos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. Para o anel B foram observados três sinais no espectro, os dupletos em δ_H 7,67 (1H, $J = 2,1$ Hz) e δ_H 6,88 (1H, $J = 8,5$ Hz) e o duplo duplete em δ_H 6,88 (1H, $J = 8,2$ e $2,1$ Hz), relativos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Os espectros de RMN 1H , ^{13}C e HSQC revelaram um conjunto de sinais característicos da aglicona quercetina (**5**).

Das folhas de *B. longifolia* foram obtidos flavonoides derivados de uma única aglicona, a quercetina, não sendo detectados flavonoides derivados do canferol, muito comuns no gênero. Os flavonoides elucidados neste estudo são bastante comuns no gênero *Bauhinia*. Quercetina, avicularina e quercitrina são reportados para espécies diversas, incluindo *B. megalandra*,²⁴ *B. purpurea*,²⁶ *B. unguolata*¹¹ e finalmente *B. malabarica*²⁵ para a qual são reportados ainda hiperina e isoquercitrina. A ausência de derivados do canferol torna a composição química das folhas de *B. longifolia* diferente da maioria das espécies do gênero, incluindo *B. forficata*, espécie que pertence ao mesmo subgênero e seção de *B. longifolia*. Entretanto, sua composição foliar de flavonoides é baseada em di e triglicosídeos derivados da quercetina e do canferol.¹⁶

Tabela 1. Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos flavonoides 1-5

C/H	1		2		3		4		5	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$								
2	156,9	-	156,8	-	156,9	-	156,4	-	156,3	-
3	134,6	-	133,8	-	133,8	-	133,7	-	135,9	-
4	178,1	-	178,2	-	177,7	-	177,6	-	176,1	-
5	161,7	-	161,7	-	161,6	-	161,5	-	160,9	-
6	99,2	6,23 d	99,2	6,22 s	99,6	6,16 s	99,6	6,16 s	99,1	6,18 d
7	164,6	-	164,7	-	166,3	-	166,2	-	164,1	-
8	94,1	6,42 d	94,0	6,43 s	94,2	6,37 s	94,2	6,37 s	94,4	6,40 d
9	157,8	-	157,4	-	156,9	-	156,5	-	157,4	-
10	104,5	-	104,4	-	103,7	-	103,8	-	103,3	-
1'	121,1	-	122,2	-	121,4	-	121,4	-	122,2	-
2'	116,0	7,33 d	115,9	7,49 s	116,3	7,58 d	116,4	7,55 d	115,2	7,67 d
3'	145,6	-	145,5	-	145,4	-	145,5	-	145,3	-
4'	148,8	-	148,9	-	149,2	-	149,2	-	147,9	-
5'	115,9	6,90 d	116,0	6,87 d	115,7	6,81 d	115,7	6,86 d	116,6	6,88 d
6'	121,6	7,28 dd	121,4	7,56 d	122,3	7,65 dd	121,5	7,65 dd	122,4	7,53 dd
1''	102,2	5,29 d	108,3	5,59 d	102,4	5,37 d	101,5	5,45 d	-	-
2''	70,5	4,01 d	82,6	4,17 m	71,7	3,58 s	74,6	3,15 s	-	-
3''	71,6	3,54 dd	77,4	3,73 m	73,7	3,38 dd	76,3	3,23 s	-	-
4''	71,0	3,18 t	86,3	3,53 m	68,4	3,66 d	70,5	3,09 d	-	-
5''	70,8	3,24 dd	61,1	3,30 m	77,0	3,32 d	78,0	3,28 d	-	-
6''	17,9	0,85 d	-	-	60,6	3,47 dd	61,4	3,56 m	-	-

3.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das frações hexânica, diclorometano, AcOEt e BuOH do extrato metanólico das folhas de *B. longifolia* foi determinada através do método do DPPH, que avalia a capacidade redutora de uma

substância ao reagir com o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).²⁷ O flavonol quercetina foi utilizado como controle positivo e avaliado em seis concentrações diferentes e a partir da curva de regressão linear (Figura 4) foi calculado seu $\text{CE}_{50} = 3,59 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$.

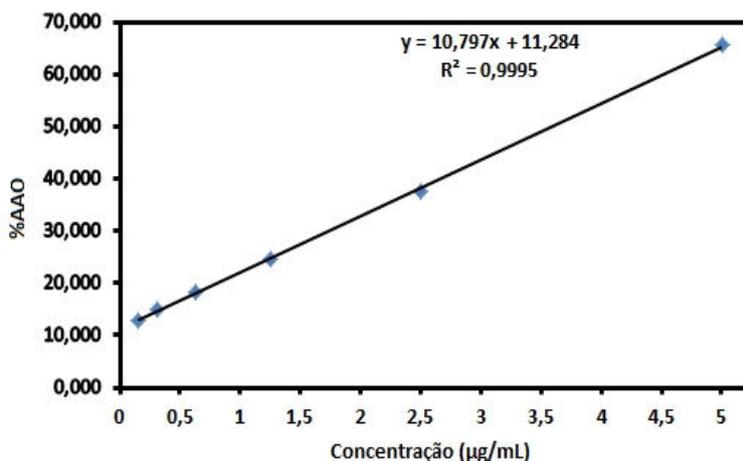


Figura 4. Curva de regressão linear da quercetina

Conforme apresentado na Tabela 2, os maiores percentuais de atividade antioxidante foram observados para as frações AcOEt e BuOH, que na concentração

mais elevada (500 µg/mL) apresentaram percentuais de atividade antioxidante superiores a 90%.

Tabela 2. Percentuais de atividade antioxidante e CE_{50} das frações hexânica, diclorometano, AcOEt e BuOH

Fração	%AAO						CE_{50} (µg/mL)
	Concentração (µg/mL)						
	500	200	100	50	25	5	
Hexânica	50,1	24,2	19,5	11,6	5,7	3,2	489,5 ± 4,2 ^a
Diclorometano	89,3	46,9	31,8	22,9	16,7	10,9	235,1 ± 1,3 ^b
AcOEt	92,5	78,5	65,2	54,5	38,6	19,8	21,2 ± 1,2 ^c
BuOH	90,7	78,4	66,8	60,5	47,2	31,8	16,1 ± 1,4 ^{cd}

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey. ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$.

Os resultados apontam para um maior potencial antioxidante das frações AcOEt e BuOH, para as quais foram observados os menores valores de CE_{50} (Tabela 2). A fração mais ativa foi BuOH ($CE_{50} = 16,1 \pm 1,4$ µg/mL) que, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$), demonstrou atividade antioxidante comparável à apresentada pela quercetina. A fração AcOEt também demonstrou elevado potencial antioxidante ($CE_{50} = 21,2 \pm 1,2$ µg/mL), com atividade comparável à apresentada pela fração BuOH. Por sua vez,

as frações hexânica e diclorometano apresentaram elevados valores de CE_{50} (489,5 e 235,1 µg/mL, respectivamente), exibindo baixa atividade frente à redução do DPPH.

Estudos avaliando o potencial antioxidante de *Bauhinia* frente ao radical DPPH têm apontado o gênero como uma fonte rica em substâncias antioxidantes.^{18,28-31} O extrato metanólico das cascas de *B. racemosa* exibiu menor potencial antioxidante ($CE_{50} = 152,92$ µg/mL)²⁸ que as

frações AcOEt e BuOH das folhas de *B. longifolia* avaliadas neste estudo. O extrato metanólico ($CE_{50} = 31,7 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) e as frações AcOEt ($CE_{50} = 34,8 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) e BuOH ($CE_{50} = 28,8 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) das folhas de *B. galpinii*³² também exibiram atividade antioxidante menos pronunciada que a observada para as frações AcOEt e BuOH das folhas de *B. longifolia*. Considerando-se o potencial antioxidante já reconhecido dos flavonoides, a elevada atividade antioxidante apresentada pelas frações AcOEt e BuOH das folhas de *B. longifolia* deve estar correlacionada à presença dos derivados da quercetina que compõe ambas as frações e que apresentam uma ou mais hidroxilas fenólicas livres, um dos fatores estruturais determinante para a atividade antioxidante de fenóis.^{33,34}

3.3. Teor de fenóis totais

O teor de fenóis das frações hexânica, diclorometano, AcOEt e BuOH foi determinado através do método de quantificação espectrofotométrica utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste de uma mistura dos ácidos

fosfomolibídico e fosfotungstístico, de coloração amarela, que na presença de substâncias redutoras, como os compostos fenólicos, sofre redução com conseqüente mudança da coloração da solução, cuja absorbância é então medida em aparelho espectrofotômetro.³⁵

O teor de fenóis totais de cada fração foi calculado a partir da equação obtida da curva de calibração, utilizando-se soluções de ácido gálico nas concentrações de 10-200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5) e expresso em μg de equivalente de ácido gálico por mg de extrato (μg EAG/ mg de extrato).

A análise do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu revelou um elevado teor de compostos fenólicos para as frações AcOEt e BuOH (Tabela 3), conforme era esperado, já que ambas as frações são compostas basicamente por flavonoides derivados da quercetina. A fração butanólica apresentou o maior teor de fenóis totais ($422,4 \pm 0,7 \mu\text{g}$ EAG/ mg), seguida pela fração AcOEt ($383,8 \pm 2,1 \mu\text{g}$ EAG/ mg). Por sua vez, para as frações hexânica e diclorometano foi observado um baixo teor de fenóis totais: $23,8 \pm 2,9$ e $61,9 \pm 1,4 \mu\text{g}$ EAG/ mg , respectivamente.

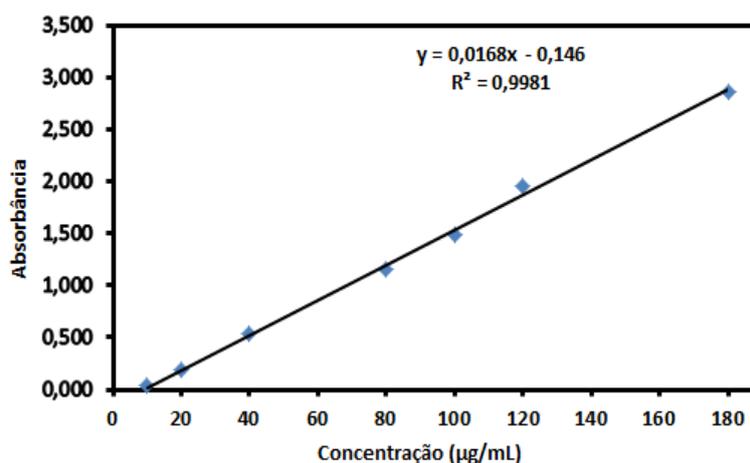


Figura 5. Curva de regressão linear do ácido gálico

Conforme apresentado na Tabela 3, as frações com maior atividade antioxidante (AcOEt e BuOH), apresentaram o maior teor de fenóis totais, sugerindo uma relação

direta entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante observada para tais frações. Estudos têm demonstrado uma relação direta entre a atividade antioxidante

e o teor de fenóis totais de espécies vegetais diversas.³⁶⁻³⁸ Muitos dos efeitos farmacológicos dos flavonoides são relacionados ao seu potencial antioxidante, que resulta de sua capacidade sequestradora de radicais livres, quelante de íons metálicos

e/ou sinérgica com outros antioxidantes.³⁹ Incluindo a atividade hipoglicemiante atribuída às espécies de *Bauhinia*, que em muitas das vezes está diretamente associada à atividade antioxidante.^{15,40}

Tabela 3. Teor de fenóis totais e CE₅₀ das frações hexânica, diclorometano, AcOEt e BuOH das folhas de *B. longifolia*

Fração	Fenóis totais (µg EAG/mg)	CE ₅₀ (µg/mL)
Hexânica	23,8 ± 2,9 ^a	489,5 ± 4,2 ^a
Diclorometano	61,9 ± 1,4 ^b	235,1 ± 1,3 ^b
AcOEt	383,8 ± 2,1 ^c	21,2 ± 1,2 ^c
BuOH	422,4 ± 0,7 ^d	16,1 ± 1,4 ^{cd}
Quercetina	-	3,59 ± 1,2 ^d

Dados expressos como média ± desvio padrão, $n = 3$. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey. ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$.

4. Conclusões

O estudo fitoquímico das folhas de *B. longifolia* levou à obtenção da quercetina e de quatro derivados monoglicosídeos. Embora muito comuns no gênero, derivados do canferol não foram detectados nas folhas de *B. longifolia*, que demonstrou, portanto, composição química diferente de grande parte das espécies do gênero. A presença de flavonoides derivados de uma única aglicona, revela a simplicidade da composição foliar dos flavonoides de *B. longifolia*. Embora *Bauhinia* seja um gênero muito estudado, *B. longifolia* conta com poucos estudos publicados e pela primeira vez o potencial antioxidante desta espécie foi avaliado, revelando uma elevada atividade antioxidante exercida pelas frações AcOEt e BuOH, com esta última exibindo atividade comparável à apresentada pela quercetina, controle positivo utilizado. Este é o primeiro relato de estudo fitoquímico de *B. longifolia* cultivada em área de Cerrado e pela primeira

vez os monoglicosídeos avicularina, hiperina e isoquercitrina são reportados para esta espécie. Os resultados sugerem as folhas de *B. longifolia* como uma fonte interessante de substâncias fenólicas com potencial antioxidante.

Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Vaz, A. M. S. F.; Tozzi, A. M. G. A. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **2005**, *28*, 477. [CrossRef]
- Silva, K. L. da.; Cechinel-Filho, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e

- potencial farmacológico. *Química Nova* **2002**, *25*, 449. [[CrossRef](#)]
- ³ Almeida, E. R.; Guedes, M. C.; Albuquerque, J. F. C.; Xavier, H. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. *Fitoterapia* **2006**, *77*, 276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Lorenzi, H.; Matos, F. J.; *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*, 2^a ed., Nova Odessa: São Paulo, 2002.
- ⁵ Cechinel-Filho, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. *Phytotherapy Research* **2009**, *23*, 1347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Duarte-Almeida, J. M.; Negri, G.; Salatino, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2004**, *32*, 747. [[CrossRef](#)]
- ⁷ Zhao, Y. Y.; Cui, C. B.; Cai, B.; Han, B.; Sun, Q. S. A new phenanthraquinone from the stems of *Bauhinia variegata*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2005**, *7*, 835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Boonpong, S.; Puangsombat, P.; Baramée, A.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Kittakoop, P.; Nopichai, S.; Thongon, N.; Charoenchai, P.; Thebtharanonth, Y. Bauhinioxepins A and B: New antimycobacterial dibenzo[*b,f*]oxepins from *Bauhinia saccocalyx*. *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 175. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Pettit, G. R.; Numata, A.; Iwamoto, C.; Usami, Y.; Yamada, T.; Ohishi, H.; Cragg, G. M. Antineoplastic agents 551. Isolation and structures of bauhiniastatins of *Bauhinia purpurea*. *Journal of Natural Products* **2006**, *69*, 323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Maia-Neto, M.; Andrade-Neto, M.; Braz-Filho, R.; Lima, M.A.S.; Silveira, E. R. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochemical Systematics and Ecology* **2008**, *36*, 227. [[CrossRef](#)]
- ¹² Yadava, R. N.; Tripathi, P. A novel flavone glycoside from the stem of *Bauhinia purpurea*. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 88. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Reddy, M. V. B.; Reddy, M. K.; Gunasekar, D.; Caux, C.; Bodo, B. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia purpurea*. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Wu, Z. B.; Zhao, Y. Y.; Yang, X. W.; Liang, H. Flavonoids from *Bauhinia glauca* subsp. *Pernervorsa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2009**, *57*, 628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Farag, M. A.; Sakna, S. T.; El-Fiky, N. M.; Shabana, M. M. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry* **2015**, *119*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Pizzolatti, M. G.; Cunha Junior, A.; Szpoganicz, B.; Sousa, E.; Braz-Filho, R.; Schripsema, J. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova* **2003**, *27*, 466. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Da Silva, E. G.; Behr, G. A.; Zanotto-Filho, A.; Lorenzi, R.; Pasquali, M. A. B.; Ravazolo, L. G.; Bordignon Junior, C. L.; Silva, F. A.; Aboy, A. L.; Bassani, V. L.; Henriques, A. T.; Reginatto, F. H.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J. C. F. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* extracts linked to their polyphenol content. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2007**, *30*, 1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Souza, C. R. F.; Georgetti, S. R.; Salvador, M. J.; Fonseca, M. J. V.; Oliveira, W. P. Antioxidant activity and physical-chemical properties of spray and spouted bed dried extracts of *Bauhinia forficata*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *45*, 209. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Prabha, P. M.; Kamalakkannan, V.; Kumaran, K. S. G. A.; Sambathkumar, R. Antioxidant and hepatoprotective activities of ethanolic root extract of *Bauhinia variegata* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2014**, *3*, 92. [[Link](#)]
- ²⁰ Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* **2012**, *130*, 1036. [[CrossRef](#)]

- ²¹ Chatatikun, M.; Chiabchalard, A. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2013**, *5*, 97. [Link]
- ²² Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* **1995**, *28*, 25. [CrossRef]
- ²³ Kenny, O.; Smyth, T. J.; Hewage, C. M.; Brunton, N.P. Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 4295. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Estrada, O.; Hasegawa, M.; Gonzalez-Mujica, F.; Motta, N.; Perdomo, E.; Solorzano, A.; Mendez, J.; Mendez, B.; Zea, G. Evaluation of flavonoids from *Bauhinia megalandra* leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. *Phytotherapy Research* **2005**, *19*, 859. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Kaewamatawong, R.; Kitajima, M.; Kogure, N.; Takayama, H. Flavonols from *Bauhinia malabarica*. *Journal of Natural Medicines* **2008**, *62*, 364. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Shantha, T. R.; Reddy, M. P.; Rao, V. R.; Bharthi, V.; Kumar, R. K.; Venkateswarlu, G. Pharmacognostic and preliminary phytochemical studies on the flowers of kovidara: *Bauhinia purpurea* L. *Journal of Drug Research in Ayurvedic Sciences* **2015**, *1*, 47. [Link]
- ²⁷ Chen, Z.; Bertin, R.; Frolidi, G. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH-assay using several statistical programs. *Food Chemistry* **2013**, *138*, 414. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Kumar, R. S.; Sivakumar, T.; Sunderam, R. S.; Gupta, M.; Mazumdar, U.K.; Gomathi, P.; Rajeshwar, Y.; Saravanan, S.; Kumar, M.S.; Muruges, K.; Kumar, K. A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2005**, *38*, 1015. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Braca, A.; Tommasi, N.; Bari, L. Di.; Pizza, C.; Politi, M.; Morelli, I. Antioxidant principles of *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products* **2001**, *64*, 892. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Nascimento, J. C.; Lage, L. F. O.; Camargos, C. R. D.; Amaral, J. C.; Costa, L. M.; Sousa, A. N.; Oliveira, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas de *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Farmácia* **2011**, *92*, 327. [Link]
- ³¹ Rajani, G. P.; Ashok, P. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. *Indian Journal of Pharmacology* **2009**, *41*, 227. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Aderogba, M. A.; McGaw, L. J.; Ogundaini, A. O.; Eloff, J. N. Antioxidant activity and cytotoxicity study of the flavonol glycosides from *Bauhinia galpinii*. *Natural Product Research* **2007**, *21*, 591. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Rice-Evans, C.A.; Miller, M. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **1996**, *20*, 933. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Banjarnahor, S.D.S.; Artanti, N. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia* **2014**, *23*, 239. [Link]
- ³⁵ Cicco, N.; Lanorte, M. T.; Paraggio, M.; Viggiano, M.; Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* **2009**, *91*, 107. [CrossRef]
- ³⁶ Silva, E. M.; Souza, J. N. S.; Rogez, H.; Rees, J. F.; Larondelle, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1012. [CrossRef]
- ³⁷ Habermann, E.; Imatomi, M.; Pontes, F. C.; Gualtieri, S. C. J. Antioxidant activity and phenol content of extracts of bark, stems, and young and mature leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. *Brazilian Journal of Biology* **2016**, *76*, 898. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁸ Piluzza, G.; Bullitta, S. Correlations between phenolic content and antioxidant

properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean área. *Pharmaceutical Biology* **2011**, *49*, 240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³⁹ Silva, M. M.; Santos, M. R.; Caroco, G.; Rocha, R.; Justino, G.; Mira, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radical*

Research **2002**, *36*, 1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁴⁰ Souza, E. De.; Zanatta, L.; Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, T. B.; Pizzolatti, M. G.; Szpoganicz, B.; Silva, F. R. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O- α -dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]