



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Carolina Miranda Gasparetto**

**Propriedades Biológicas e Toxicológicas de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**

**Juiz de Fora  
2014**

**Carolina Miranda Gasparetto**

**Propriedades Biológicas e Toxicológicas de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvana Alves  
Coorientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa  
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Meneghin Mendonça

**Juiz de Fora  
2014**

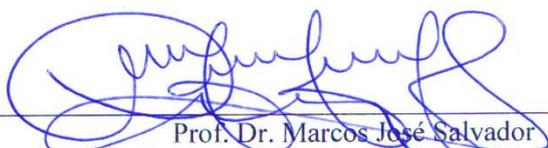
**Propriedades biológicas e toxicológicas de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**

**Carolina Miranda Gasparetto**

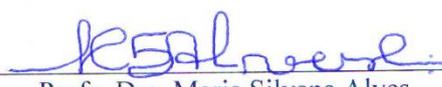
**ORIENTADOR (A):  
Profa. Dra. Maria Silvana Alves**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28/07/2014

  
Prof. Dr. Marcos José Salvador  
Universidade Estadual de Campinas

  
Profa. Dra. Elita Scio Fontes  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
Profa. Dra. Maria Silvana Alves  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gasparetto, Carolina Miranda.

Propriedades Biológicas e Toxicológicas de Bauhinia forficata Link (Fabaceae) / Carolina Miranda Gasparetto. -- 2014.

101 f. : il.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. Bauhinia forficata. 2. Fabaceae. 3. Antioxidantes. 4. Antibacterianos. 5. Genotoxicidade. I. Alves, Maria Silvana, orient. II. Título.

Aos meus pais, Lúcia e Marco Antonio, e ao Henrique, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha querida família, pelo apoio, carinho e incentivo nos momentos mais difíceis e ao Henrique, pelo amor, companheirismo, inspiração e (muita) paciência.

À Faculdade de Farmácia e aos Laboratórios de Farmacologia de Produtos Naturais e de Bioatividade Celular e Molecular dessa Unidade, pela oportunidade de realização desse estudo.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelo incentivo à qualificação de seus servidores por meio do Programa de Apoio à Qualificação (PROQUALI) da Pró-Reitoria de Recursos Humanos (PRORH).

Ao Laboratório de Nutrigenômica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), e à Mestre Carla da Silva Machado, pela parceria na realização dos experimentos de genotoxicidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos aportes financeiros.

Aos meus orientadores, Dra. Maria Silvana Alves, Dr. Leonardo Meneghin Mendonça e Dr. Orlando Vieira de Sousa, pela oportunidade, dedicação, paciência, profissionalismo e toda sabedoria transmitida.

Aos bolsistas de Iniciação Científica modalidades PIBIC e BIC e aos colegas do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, pela amizade, colaboração nos experimentos e nas “discussões científicas” e estímulo, em especial a Dalyara, Érika, Felipe, Isabela, Jucélia, Kamilla, Laura, Lucas, Marina, Pedro, Tonton, Vanessa e William.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Farmácia, pelos ensinamentos, aos colegas Técnicos-Administrativos em Educação, Éder, Jésus e Louise, pela convivência, e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desse estudo.

## RESUMO

*Bauhinia forficata* Link (Fabaceae), conhecida como pata-de-vaca, é uma planta medicinal nativa da América do Sul, tradicionalmente usada como hipoglicemiante, diurética, hipocolesterolêmica e no tratamento de cistite, parasitoses intestinais, elefantíase e outros distúrbios orgânicos. Essas disfunções estão associadas ao estresse oxidativo e dano celular. Os principais metabólitos especiais presentes nesta espécie são as substâncias fenólicas, em particular os flavonoides. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e genotóxica das folhas de *B. forficata*, bem como determinar o conteúdo de fenóis e flavonoides totais. O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração estática em etanol, seguido de partição líquido/líquido para obtenção do extrato etanólico (EE) e das frações em hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e butanol (FB). Os teores de fenóis e flavonoides totais foram determinados por espectrofotometria utilizando as curvas de calibração do ácido gálico e da rutina, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), poder de redução do ferro e cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. A atividade antibacteriana foi investigada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>) pelo método de microdiluição em caldo segundo recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) frente a sete amostras de referência ATCC. Em seguida, procedeu-se ao estabelecimento do efeito farmacológico bactericida ou bacteriostático e à determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). O potencial genotóxico foi avaliado pelo ensaio do cometa utilizando células HepG2. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão, quando pertinente. Os dados foram submetidos à Análise de Variância seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os teores de fenóis e flavonoides totais variaram de  $9,20 \pm 0,87$  a  $87,35 \pm 0,92$  mg/g em equivalentes de ácido gálico e de  $2,51 \pm 0,06$  a  $56,76 \pm 0,81$  mg/g em equivalentes de rutina, respectivamente. Os valores das Concentrações Efetivas 50% obtidos nos ensaios do DPPH• e poder de redução do ferro foram de  $27,95 \pm 0,33$  a  $193,62 \pm 1,12$   $\mu$ g/mL e de  $21,12 \pm 0,52$  a  $328,45 \pm 3,23$   $\mu$ g/mL, respectivamente. A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica obtida pelo ensaio do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico variou de  $26,80 \pm 2,26$  a  $67,07 \pm 1,48$ , de  $36,30 \pm 5,38$  a  $73,66 \pm 3,91$  e de  $48,70 \pm 5,08$  a  $81,93 \pm 3,45$  nas concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu$ g/mL, nessa ordem. A FA foi ativa frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538 testadas, com valores de CIM<sub>100</sub> e CBM de 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, e de 5 mg/mL e  $> 5$  mg/mL, respectivamente, revelando efeito bacteriostático. O EE induziu dano genético significativo às células HepG2 pelo ensaio do cometa nas concentrações de 125 e 250  $\mu$ g/mL. Os resultados desse estudo indicam que *B. forficata* possui substâncias fenólicas, incluindo flavonoides, demonstrando atividades antioxidante e antibacteriana. O dano genético revelado pelo EE requer estudos adicionais para a confirmação de seu potencial genotóxico.

**Palavras-chave:** *Bauhinia forficata*. Fabaceae. Antioxidantes. Antibacterianos. Genotoxicidade.

## ABSTRACT

*Bauhinia forficata* Link (Fabaceae), known as "pata-de-vaca", is a medicinal plant native in South America, traditionally used as hypoglycemic, diuretic, hypocholesterolemic, and in the treatment of cystitis, intestinal parasites, elephantiasis and other organic disturbs. These disorders are associated with oxidative stress and cellular damage. The major secondary metabolites present in this species are phenolic compounds, particularly flavonoids. In this context, the aims of this study were to evaluate the antioxidant, antibacterial and genotoxic activities of *B. forficata* leaves and to determine the total phenols and flavonoids contents. Dried and powdered plant material was subjected to static maceration in ethanol followed by liquid/liquid partition to obtain the ethanol extract (EE) and the hexane (HF), dichloromethane (DF), ethyl acetate (EF) and butanol (BF) fractions. The total phenols and flavonoids contents were determined by spectrophotometry using gallic acid and rutin calibration curves, respectively. The antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, the ferric reducing power and the  $\beta$ -carotene bleaching assays. The antibacterial activity was investigated by determining the 100% Minimal Inhibitory Concentration (MIC<sub>100</sub>) using the broth microdilution according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations against seven ATCC reference strains. After that, the bactericidal or bacteriostatic pharmacological effect was established and the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) was also determined. The genotoxic potential was assessed by the comet assay using HepG2 cells. Analyses were performed in triplicate and the results presented as mean  $\pm$  standard deviation, when appropriate. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test ( $p < 0.05$ ). The total phenolic and flavonoid contents ranged from  $9.20 \pm 0.87$  to  $87.35 \pm 0.92$  mg/g gallic acid equivalents, and from  $2.51 \pm 0.06$  to  $56.76 \pm 0.81$  mg/g rutin equivalents, respectively. The Effective Concentration 50% values in the DPPH and ferric reducing power assays were  $27.95 \pm 0.33$  to  $193.62 \pm 1.12$   $\mu$ g/mL, and  $21.12 \pm 0.52$  to  $328.45 \pm 3.23$   $\mu$ g/mL, respectively. The percentage inhibition of lipid peroxidation obtained by  $\beta$ -carotene bleaching method ranged from  $26.80 \pm 2.26$  to  $67.07 \pm 1.48$ ,  $36.30 \pm 5.38$  to  $73.66 \pm 3.91$  and  $48.70 \pm 5.08$  to  $81.93 \pm 3.45$  at 250, 500 and 1000  $\mu$ g/mL concentrations, in that order. The EF was active against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and ATCC 6538, with MIC<sub>100</sub> and MBC values of 2.5 mg/mL and 5 mg/mL, and 5 mg/mL and  $> 5$  mg/mL, respectively, showing bacteriostatic effect. The EE induced significant genetic damage to HepG2 cells by the comet assay at concentrations of 125 and 250  $\mu$ g/mL. The results of this study indicate that *B. forficata* contains phenolic compounds, including flavonoids, possessing antioxidant and antibacterial effects. The genetic damage revealed by EE requires additional studies to confirm its genotoxic potential.

**Keywords:** *Bauhinia forficata*. Fabaceae. Antioxidants. Anti-bacterial Agents. Genotoxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo das vias biossintéticas do metabolismo secundário .....	21
Figura 2 – Distribuição geográfica mundial de <i>Bauhinia forficata</i> .....	24
Figura 3 – Distribuição geográfica de <i>Bauhinia forficata</i> no Brasil .....	25
Figura 4 – Fotografia das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> .....	26
Figura 5 – Imagens das flores, frutos e sementes de <i>Bauhinia forficata</i> .....	26
Figura 6 – Estrutura química do radical DPPH• e reação de estabilização com um antioxidante .....	34
Figura 7 – Sistema de cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico na presença de antioxidante. ....	35
Figura 8 – Fotografia da árvore de <i>Bauhinia forficata</i> localizada no distrito de Paula Lima, Juiz de Fora, Minas Gerais.....	46
Figura 9 – Fotografia da obtenção do extrato de <i>Bauhinia forficata</i> por maceração estática seguida de filtração.....	47
Figura 10 – Esquema das partições sucessivas a partir do extrato etanólico das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> .....	48
Figura 11 – Imagem ilustrativa das microplacas 1 e 2 utilizadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM <sub>100</sub> ) por meio do método de microdiluição em caldo .....	61
Figura 12 – Imagem ilustrativa do procedimento de diluição seriada realizada nos poços de A a H de uma microplaca .....	62
Figura 13 – Imagem ilustrativa do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e avaliação do efeito farmacológico.....	64
Figura 14 – Fotomicrografias representativas das cinco classes de dano de nucleoides observadas no ensaio do cometa.....	66
Figura 15 – Curva de calibração do ácido gálico .....	68
Figura 16 – Curva de calibração da rutina.....	68
Figura 17 – Decaimento da absorbância em função do tempo pelo método da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para as substâncias de referência e amostras na concentração de 250 $\mu$ g/mL .....	71

Figura 18 – Decaimento da absorvância em função do tempo pelo método da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para as substâncias de referência e amostras na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ .....	72
Figura 19 – Decaimento da absorvância em função do tempo pelo método da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para as substâncias de referência e amostras na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ .....	72
Figura 20 – Índice de dano calculado para cada tratamento realizado no ensaio do cometa ...	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alíquotas dos reagentes para a construção da curva de calibração do ácido gálico .....	49
Tabela 2 – Alíquotas dos reagentes para a determinação de fenóis solúveis totais em <i>Bauhinia forficata</i> .....	50
Tabela 3 – Alíquotas dos reagentes para a construção da curva de calibração da rutina .....	51
Tabela 4 – Alíquotas dos reagentes para o doseamento de flavonoides totais em <i>Bauhinia forficata</i> .....	52
Tabela 5 – Soluções-estoque e diluições das amostras e substâncias de referência para o ensaio do DPPH•.....	53
Tabela 6 – Alíquotas dos reagentes para a reação de sequestro do radical DPPH•.....	54
Tabela 7 – Alíquotas das soluções-estoque para o ensaio do poder de redução e concentração final no tubo de reação.....	56
Tabela 8 – Concentrações das soluções-estoque e diluições para o ensaio do $\beta$ -caroteno.....	57
Tabela 9 – Preparo das soluções-estoque para o teste de microdiluição em caldo .....	60
Tabela 10 – Massa e rendimento total das frações obtidas por meio da partição do extrato etanólico de <i>Bauhinia forficata</i> .....	67
Tabela 11 – Teor de fenóis e flavonoides totais em mg/g equivalentes de ácido gálico e rutina .....	69
Tabela 12 – Resultados de Concentração Efetiva 50% pelos ensaios do DPPH• e poder de redução.....	70
Tabela 13 – Resultados da porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I) pelo ensaio do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	73
Tabela 14 – Valores de Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM <sub>100</sub> ) determinados por microdiluição em caldo para amostras .....	74
Tabela 15 – Valores de Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM <sub>100</sub> ) determinados por microdiluição em caldo para agentes antibacterianos .....	75
Tabela 16 – Efeito farmacológico da fração em acetato de etila de <i>Bauhinia forficata</i> .....	75
Tabela 17 – Viabilidade celular avaliada pela técnica de exclusão por azul de tripan.....	76
Tabela 18 – Distribuição das classes de dano ao DNA observadas nos tratamentos realizados pelo ensaio do cometa.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	Porcentagem de Atividade Antioxidante
%I	Porcentagem de Inibição
(HO•)	Radical Hidroxila
(O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> )	Radical Superóxido
(RO•)	Radical Alcoxila
(ROO•)	Radical Peroxila
a.C.	Antes de Cristo
ABTS• <sup>+</sup>	Radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato)
AG	Ácido Gálico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de Alumínio
AMH	Ágar Müeller-Hinton
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLOR	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
CTT	Cloreto de Trifeniltetrazólio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH•	Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazila
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
EE	Extrato Etanólico

ERC's	Espécies Reativas de Cloro
ERE's	Espécies Reativas de Enxofre
ERN's	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fração em Acetato de Etila
FB	Fração em <i>n</i> -Butanol
FD	Fração em Diclorometano
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FH	Fração em <i>n</i> -Hexano
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ID	Índice de Dano
IPP	Isopentenil Pirofosfato
MT	Medicina Tradicional
MTC	Medicina Tradicional e Complementar
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NaOH	Hidróxido de Sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação
REA	Relações Estrutura-Atividade ( <i>Structure-Activity Relationships – SAR</i> )
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações Por Minuto
SE	Solução-estoque
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	Ácido Tiobarbitúrico ( <i>Thiobarbituric Acid</i> )
UV	Radiação Ultravioleta

**LISTA DE SÍMBOLOS**

%	Porcentagem
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
°C	Grau Celsius
°GL	Grau Gay Lussac
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
A	Ampere
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
$\text{Fe}^{2+}$	Íon Ferroso
$\text{Fe}^{3+}$	Íon Férrico
G	Gramma
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
t	Tempo
V	Volt
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1	METABOLISMO ESPECIAL	19
2.1.1	Conceito, importância e vias biossintéticas	19
2.2	CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL OBJETO DO ESTUDO	22
2.2.1	A família Fabaceae	22
2.2.2	O gênero <i>Bauhinia</i>	23
2.2.3	A espécie <i>Bauhinia forficata</i> Link.	24
2.2.4	Propriedades medicinais de <i>Bauhinia forficata</i> Link	27
2.3	ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE	30
2.3.1	Métodos utilizados na investigação da atividade antioxidante de produtos naturais	33
2.3.1.1	Sequestro do radical livre estável DPPH•	33
2.3.1.2	Poder de redução	34
2.3.1.3	Cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico	34
2.4	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	36
2.4.1	Métodos utilizados para investigação da atividade antimicrobiana em produtos naturais	37
2.5	TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS	40
2.5.1	Genotoxicidade de produtos naturais	41
2.5.2	O ensaio do cometa para a investigação da genotoxicidade de produtos naturais	42
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
3.1	GERAL	45
3.2	ESPECÍFICOS	45
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
4.1	COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	46
4.2	EXTRAÇÃO	47
4.3	PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO	47
4.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS SOLÚVEIS TOTAIS	49

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	51
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	53
4.6.1 Método do Sequestro do Radical DPPH•.....	53
4.6.2 Método do Poder de Redução .....	55
4.6.3 Teste da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	57
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	58
4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM <sub>100</sub> ).....	59
4.7.2 Determinação do Efeito Bactericida ou Bacteriostático e da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	63
4.8 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE.....	64
4.8.1 Linhagem celular e condições de cultura.....	64
4.8.2 Ensaio de eletroforese em gel de célula única (Ensaio do Cometa).....	65
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
5.1 TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS .....	67
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	69
5.2.1 Métodos do Sequestro do Radical DPPH• e do Poder de Redução .....	69
5.2.2 Método da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	70
5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	74
5.4 GENOTOXICIDADE.....	76
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A – Resumo do trabalho científico intitulado "Antioxidant Activity of <i>Bauhinia forficata</i> Link (Fabaceae) using DPPH, Ferric Reducing Antioxidant Power and <math>\beta</math>-carotene Bleaching assays", a ser apresentado na forma de pôster no 62<sup>nd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - GA2014, 31 de agosto a 04 de setembro de 2014, Guimarães, Portugal.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO B – Resumo do trabalho científico intitulado "Antibacterial Activity Assessment of <i>Bauhinia forficata</i> Link (Fabaceae)", a ser apresentado oralmente no 23<sup>o</sup> Italo-Latinamerican, Asian &amp; African Congress of Ethnomedicine - SILAE 2014, 07 a 12 de setembro de 2014, Marsala, Itália. ....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, os seres humanos têm contado com a natureza para atender as suas necessidades básicas de alimentos, abrigos, roupas, meios de transporte, fertilizantes, aromas, fragrâncias e, não menos importante, medicamentos. As plantas, em particular, formam a base de sofisticados sistemas tradicionais de medicina existentes há milhares de anos e continuam a suprir a humanidade com novos remédios. Os primeiros registros, que datam de cerca de 2600 a.C., documentam o uso, na Mesopotâmia, de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas. Esses incluem espécies dos gêneros *Cedrus* (cedro) e *Commiphora* (mirra), assim como as espécies *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e *Papaver somniferum* (papoula), todas usadas até os dias de hoje no tratamento de doenças. Outro registro bastante conhecido é o Papiro de Ebers, um tratado da medicina egípcia datado de aproximadamente 1500 a.C., contendo mais de 700 fórmulas, principalmente de origem vegetal. Da mesma forma, documentos do sistema ayurvético indiano e da medicina chinesa datados de cerca de 1000 a.C., prescrevem o uso das plantas contra diversas enfermidades (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Em fevereiro de 2013, durante a Conferência Internacional sobre Medicina Tradicional (MT) para os países do Sudeste Asiático, a Diretora Geral da Organização Mundial da Saúde (OMS), Dra. Margaret Chan, afirmou que, para milhões de pessoas, a Medicina Tradicional e Complementar (MTC) é a principal e, por vezes, a única fonte de cuidados à saúde. Essa é uma alternativa próxima das casas, acessível e barata, sendo na maioria das vezes culturalmente aceita e confiável (CHAN, 2013). De acordo com a OMS, o uso da MT continua a ser uma prática disseminada nos países em desenvolvimento, enquanto que a aplicação da Medicina Complementar e Alternativa (MTC), incluindo fitoterápicos utilizados como produtos farmacêuticos (medicamentos e cosméticos), alimentos funcionais e outros, vem aumentando rapidamente em países desenvolvidos. Em muitos países em desenvolvimento, particularmente nas áreas rurais, o uso generalizado da MTC pode ser atribuído principalmente à sua maior acessibilidade em relação à Medicina Convencional. Entretanto, apesar de ser uma importante alternativa dos cuidados à saúde, muitas vezes é uma prática subestimada (OMS, 2013).

Muitos países têm gradualmente aceitado que MTC de qualidade, segurança e eficácia comprovadas contribui com a saúde e o bem-estar dos indivíduos, assim como com a maior abrangência de seus sistemas de saúde. Desde 1999, observa-se um avanço mundial em relação às políticas e regulamentações nacionais sobre medicamentos à base de plantas, incluindo o aumento no número de programas universitários na área (OMS, 2013).

No Brasil, a maior contribuição e concretização destas ações de natureza política, técnica, econômica, social e cultural veio em 2006, com a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), por meio de diretrizes para prevenção, promoção e recuperação da saúde com qualidade, eficácia, eficiência e segurança (BRASIL, 2006). Sob a ótica das plantas medicinais e fitoterapia, particularmente a elaboração da Relação Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicas (RENISUS) e a instituição da "Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos" denotam a importância do fortalecimento na política de incentivo ao uso dos fitoterápicos no país (BRASIL, 2009).

Com base em observações empíricas e folclóricas, os produtos naturais foram os primeiros, e por um longo tempo, os únicos medicamentos disponíveis para a humanidade. Apesar de permanecerem como cuidado de saúde primária em todo o mundo, eles têm sido largamente suplantados por medicamentos puramente sintéticos e industrializados. Entretanto, a exploração contínua de produtos naturais ainda se justifica como vantajosa, principalmente porque as moléculas produzidas pela natureza possuem peculiaridades dificilmente alcançadas pela química sintética e, também, porque são passíveis de aperfeiçoamento em termos de eficácia ou de seletividade para alcançar propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas ideais (GANESAN, 2008).

Embora algumas propriedades terapêuticas atribuídas às espécies vegetais tenham sido comprovadas, o tratamento com plantas medicinais é fundamentado principalmente em resultados empíricos de centenas de milhares de anos (GURIB-FAKIM, 2006). De acordo com Rodrigues (2013, p. 7), "o grande desafio é agregar à aplicação popular/empírica das espécies vegetais no tratamento das diversas doenças o conhecimento acadêmico/científico desse uso, conferindo a ele as bases sustentáveis e seguras de sua utilização". Em um artigo de revisão elaborado por Koehn e Carter (2005), esses autores discorreram sobre os crescentes avanços tecnológicos que contribuíram para o melhor entendimento dessas questões, juntamente com expectativas não concretizadas de estratégias atuais de *lead-generation*, renovando, dessa forma, o interesse pela busca de novos fármacos a partir de produtos naturais.

Os conceitos básicos de especificidade, reversibilidade e desenvolvimento de taquifilaxia preconizados por Paul Ehrlich, combinados com o advento da estrutura molecular e sua elucidação, evoluíram para os estudos das Relações Estrutura-Atividade (REA ou do inglês *structure-activity relationships* - SAR) como meio de aprimorar a ação do fármaco (RANKOVIC; MORPHY, 2010). Estudos REA, portanto, vêm contribuindo para o melhor entendimento de atividades biológicas de substâncias isoladas e purificadas. Recentemente,

Yuenyongsawad e colaboradores (2013) demonstraram potente atividade contra células tumorais de duas substâncias isoladas de galhos de *Bauhinia strychnifolia*, uma espécie diferente da que foi objeto do presente estudo, sugerindo que esse vegetal pode ser uma fonte promissora de novas moléculas para o tratamento do câncer.

Entre as diversas plantas de interesse medicinal mundialmente disseminadas, inclusive as da biodiversidade brasileira, encontram-se aquelas pertencentes ao gênero *Bauhinia* (Fabaceae), que contém cerca de 300 espécies distribuídas nas áreas tropicais do planeta (CECHINEL FILHO, 2009; VAZ; TOZZI, 2005). Plantas desse gênero são amplamente utilizadas na forma de chás e outras preparações para o tratamento de infecções e processos dolorosos, bem como no combate à elefantíase, à diarreia e, principalmente, à diabetes. Diversas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas à *Bauhinia*, incluindo atividades anti-inflamatória, analgésica, antimalárica, antimicrobiana, antirreumática, antioxidante, citotóxica, diurética, depurativa, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, hepatoprotetora e larvicida (BOONPHONG et al., 2007; FERRERES et al., 2012; GÓIS et al., 2013; MENEZES et al., 2007; MIYAKE; AKISUE; AKISUE, 1986; PIZZOLATTI et al., 2003; SARTORELLI; CORREA, 2007; SAYAGO et al., 2013; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; VASCONCELOS et al., 2004; YAHYA et al., 2013).

Diversas classes de substâncias têm sido detectadas no gênero *Bauhinia*, muitas delas de interesse medicinal, como flavonoides, terpenoides, esteroides, triterpenos, saponinas, óleo essencial, alcaloides, taninos e quinonas (KUMAR; CHANDRASHERKAR, 2011; PAHWA et al., 2010; RHAMA; MADHAVAN, 2012; SALATINO et al., 1999; SHARMA et al., 2013; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; THENMOZHI; MANIAN; PAULSAMY, 2012; UDDIN; SATTAR; RAUF, 2012), predominando os glicosídeos esteroídicos, os triterpenos, as lactonas triterpênicas e os flavonoides (CECHINEL FILHO, 2009).

A *Bauhinia forficata* Link, considerada pela população rural brasileira como a "pata-de-vaca verdadeira", é a espécie mais estudada das plantas do gênero. *B. forficata* é largamente empregada na medicina popular como hipoglicemiante, diurética, hipocolesterolêmica e também utilizada no tratamento contra cistites, parasitoses intestinais e elefantíase (LORENZI; MATOS, 2008; OLIVEIRA; SAITO, 1989). Apesar do amplo uso popular desta planta, seus principais constituintes químicos e algumas atividades biológicas só foram identificados nas últimas décadas (ARIGONY, 2005; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). Contudo, apesar das pesquisas já realizadas, ainda são poucos os dados científicos sobre a sua atividade antibacteriana assim como seus possíveis efeitos tóxicos, visto que as investigações realizadas até o presente momento focaram prioritariamente sua propriedade antidiabética.

Neste contexto, a busca por substâncias ativas para o tratamento de infecções e processos dolorosos (por exemplo, cistites e outras desordens microbianas decorrentes principalmente de complicações de diabetes) e distúrbios gastrointestinais incluindo diarreias, representa uma estratégia central e inovadora para o estabelecimento de evidências científicas de usos tradicionais frequentes desta espécie vegetal.

A presente proposta refere-se ao desenvolvimento de pesquisa sobre potenciais efeitos antibacterianos e tóxicos de *B. forficata*. Os resultados poderão fornecer dados científicos para corroborar o conhecimento empírico da utilização dessa planta, subsidiando dados para a avaliação do risco/benefício em termos de eficácia terapêutica e segurança de seu uso. Para o alcance desses objetivos, foi proposto um elenco de metodologias científicas que incluem ferramentas básicas de extração, bem como testes para investigação das atividades antioxidante e antibacteriana e avaliação do efeito genotóxico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 METABOLISMO ESPECIAL

#### 2.1.1 Conceito, importância e vias biossintéticas

Em contraste com as vias metabólicas primárias, que executam funções metabólicas essenciais e, normalmente incontestáveis, o conceito de vias metabólicas secundárias compreendeu, inicialmente, aqueles processos que não estão diretamente relacionados com o crescimento e o desenvolvimento do organismo, ou seja, que não possuem finalidades evidentes nas suas funções primárias (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; NEILSON et al., 2013).

Esses produtos do metabolismo secundário, conhecidos como metabólitos secundários ou especiais, têm uma distribuição muito mais limitada na natureza em comparação com os do metabolismo primário, sendo encontrados apenas em grupos de organismos específicos, como bactérias, algas, corais, esponjas, plantas e animais inferiores e, muito raramente, são produzidos por animais superiores (DEWICK, 2009; MAPLESTONE; STONE; WILLIAMS, 1992).

Historicamente, essas substâncias receberam pouca atenção da maioria dos botânicos, chegando a serem consideradas como resíduos do metabolismo primário sem valor biológico significativo (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; DEWICK, 2009; VERPOORTE, 1998). Assim, uma definição clássica para metabólitos especiais oriunda desse pensamento seria aquela que os define como substâncias produzidas naturalmente que não desempenham um papel explícito no organismo produtor (MAPLESTONE; STONE; WILLIAMS, 1992).

Durante muitos anos, a função dessas substâncias e os benefícios para o organismo produtor mantiveram-se desconhecidos. Entretanto, hoje se sabe que os metabólitos especiais atuam na sobrevivência e adaptação das plantas em seu meio ambiente, tendo claramente definidas as funções de defesa contra herbívoros, micro-organismos, outras plantas e radiação ultravioleta (UV), bem como de sinalização, atraindo animais polinizadores e dispersores de sementes (BOURGAUD et al., 2001; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; MAPLESTONE; STONE; WILLIAMS, 1992; VERPOORTE, 1998; WINK, 2003).

A fim de se defenderem contra herbívoros, plantas concorrentes e patógenos, as espécies vegetais desenvolveram uma diversidade de metabólitos que apresentam uma grande variedade de propriedades farmacológicas e toxicológicas (BOURGAUD et al., 2001;

DEWICK, 2009; WINK, 2013). Interessantes aplicações médicas têm sido relatadas para essas substâncias, tais como agentes antibacterianos, anti-helmínticos, antiprotozoários, antivirais, antitumorais, imunossuppressores, antioxidantes, na redução do colesterol e contra o envelhecimento. Funções inesperadas para os metabólitos especiais estão sendo continuamente desvendadas e, assim, essas substâncias continuam demonstrando benefícios para a medicina atual e se apresentando como uma grande promessa para o futuro (SINHA; BISWAS; MUKHERJEE, 2011; VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

Os metabólitos especiais abrangem um grupo diversificado de mais de 200.000 substâncias já identificadas. A sua composição e concentração pode variar a nível individual e populacional, assim como em diferentes estágios de desenvolvimento e tipos de tecidos. Em adição à variabilidade genética, os metabólitos especiais podem também diferir em resposta a uma gama de fatores ambientais (NEILSON et al., 2013; VERPOORTE, 1998; WINK, 2003), como sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação UV, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007, VERPOORTE, 1998). Por outro lado, aparentemente, a distribuição dessas substâncias tem algum valor para a quimiotaxonomia, visto que certos grupos de metabólitos especiais prevalecem dentro de determinados gêneros ou até mesmo famílias, constituindo-se em importantes marcadores taxonômicos (WINK, 2003).

As vias biossintéticas dos metabólitos especiais consistem de várias etapas extensas e complexas, catalisadas por diversas enzimas e, ainda, são em grande parte desconhecidas (ZHOU; ZHONG, 2011). A imensa diversidade estrutural dessas substâncias tem origem em derivados do metabolismo primário que combinam entre si para a produção do esqueleto de carbono e nitrogênio dos metabólitos especiais. Esses derivados dos processos fundamentais de fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs, conhecidos como blocos de construção, estão presentes em número limitado e suas unidades comuns podem ser percebidas nas mais diversas estruturas do metabolismo especial, incluindo ligninas, cumarinas, flavonoides, isoflavonoides, quinonas, terpenos, esteroides e alcaloides (DEWICK, 2009).

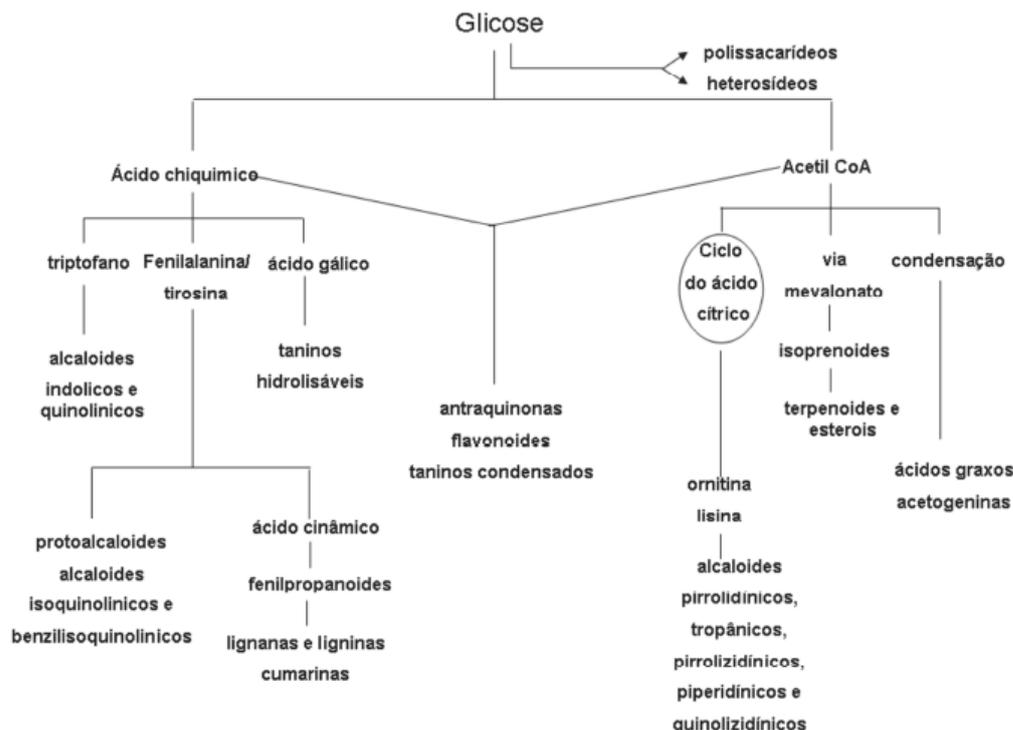
Uma classificação para os metabólitos especiais se baseia na sua origem biossintética, que os divide em três principais grupos: terpenoides, alcaloides e substâncias fenólicas. Os terpenoides são derivados de um precursor comum que possui cinco carbonos, o isopentenil pirofosfato (IPP). Os alcaloides são biossintetizados principalmente a partir de aminoácidos, podendo dispor de um ou mais átomos de nitrogênio em suas estruturas. As substâncias

fenólicas, por sua vez, são formadas pela via do chiquimato ou por via mista (chiquimato e acetato/malonato) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Como pode ser visualizado na Figura 1, a origem dos metabólitos especiais ocorre a partir de dois principais metabólitos da glicose, o ácido chiquímico e o acetil CoA, que dão nome às vias metabólicas por eles conduzidas. Assim, a via do ácido chiquímico, ou do chiquimato, origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos especiais aromáticos (alguns alcaloides e fenilpropanoides), e o ácido gálico, unidade formadora dos taninos hidrolisáveis. Já os derivados da via do acetil CoA, ou acetato, são classificados de acordo com a via metabólica posterior, sejam elas as vias do ciclo do ácido cítrico, do mevalonato e de produtos da condensação do acetato. Adicionalmente, alguns metabólitos especiais podem resultar da combinação de produtos de ambas as vias chiquimato e malonato, como é o caso das antraquinonas, dos flavonoides e dos taninos condensados (SANTOS, 2007).

Embora estejam representados na Figura 1, os polissacarídeos não são classificados como metabólitos especiais, mas constituem uma importante classe de produtos naturais e as unidades de açúcar podem aparecer ligadas às agliconas (metabólitos especiais na forma livre), formando o que se denomina de heterosídeos (SANTOS, 2007).

Figura 1 – Esquema representativo das vias biossintéticas do metabolismo secundário



Fonte: SANTOS, 2007.

## 2.2 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL OBJETO DO ESTUDO

### 2.2.1 A família Fabaceae

A família Fabaceae, também denominada Leguminosae, família do feijão, da ervilha ou das leguminosas, é a terceira maior das angiospermas, superada apenas pela das orquídeas (Orchidaceae) e do girassol (Asteraceae). Variando em hábito a partir de árvores de grande porte até ervas anuais, essa família é cosmopolita na distribuição e bem representada em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo. A Fabaceae apresenta morfologias diversas para folhas e flores. Entretanto, o fruto, também chamado legume ou vagem, é a principal característica unificadora da família ([http://www http://tolweb.org/Fabaceae/21093](http://www.tolweb.org/Fabaceae/21093). Acesso em: 09 mai. 2014).

Tradicionalmente, a família Fabaceae tem sido dividida em três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae), compreendendo atualmente 745 gêneros e mais de 19.500 espécies. Com tamanha dimensão, não surpreende a enorme diversidade de metabólitos especiais produzidos. A característica da biologia das leguminosas é a fixação do nitrogênio atmosférico, principalmente através da associação simbiótica com bactérias, como as do gênero *Rhizobium*, presentes nos nódulos das raízes. Essa característica resulta na capacidade das leguminosas em produzir mais metabólitos contendo nitrogênio do que outras plantas não fixadoras desse elemento químico. Por outro lado, comparadas a outras famílias, as espécies de Fabaceae produzem menos mono-, sesqui- e diterpenos ([http://www http://tolweb.org/Fabaceae/21093](http://www.tolweb.org/Fabaceae/21093). Acesso em: 09 mai. 2014; WINK, 2013).

Entre as principais substâncias de nitrogênio das leguminosas estão alcaloides (quinolizidínicos, pirrolizidínicos, indolizidínicos, piperidínicos, piridínicos, pirrolidínicos, indólicos simples, derivados alcaloides do gênero *Erythrina*, isoquinolínicos simples e imidazolínicos), aminas (derivados de poliaminas, feniletilamina, tiramina e triptamina), aminoácidos não-proteicos, glicosídeos cianogênicos e peptídeos (lectinas, inibidores de tripsina, peptídeos antimicrobianos e ciclotídeos). Metabólitos especiais sem nitrogênio são as substâncias fenólicas (fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonas, catequinas, antocianinas, taninos, lignanas, cumarinas e furanocumarinas), policetídeos (antraquinonas) e terpenoides (principalmente triterpenoides, saponinas esteroidais e tetraterpenos) (WINK, 2013).

A maioria dos metabólitos especiais da família Fabaceae apresenta alguma atividade biológica, farmacológica ou toxicológica. Muitos alcaloides são neurotoxinas ou

neuromoduladores, exibindo atividade psicotrópica, decorrendo no uso de algumas leguminosas como drogas alucinógenas. Polifenóis, incluindo taninos, possuem a habilidade de formar múltiplas ligações de hidrogênio e até iônicas com proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), apresentando diversas atividades farmacológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiviral. Furanocumarinas possuem a capacidade de formar ligações covalentes com bases do DNA e, assim, apresentam pronunciadas propriedades antimicrobianas e mutagênicas contra alvos de animais e de micro-organismos. O caráter anfifílico de saponinas possibilita a formação de poros nas membranas celulares e até a lise das células quando essas substâncias estão em maior concentração (WINK, 2013).

Inúmeras espécies de leguminosas são cultivadas em todo o mundo como plantas ornamentais, cercas vivas, aglutinantes de solo, na adubação verde, forragem para o gado, alimentos para os seres humanos, em reflorestamento, produção de papel e madeira e como fontes de produtos químicos, óleos e medicamentos. Usadas tradicionalmente na medicina popular, também demonstram importância na terapêutica moderna (<http://www.tolweb.org/Fabaceae/21093>. Acesso em: 09 mai. 2014).

### 2.2.2 O gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) é muito amplo, contendo cerca de 300 espécies distribuídas nas áreas tropicais do planeta (VAZ; TOZZI, 2005). As plantas desse gênero são comumente conhecidas como "pata-de-vaca" devido ao formato de suas folhas (CECHINEL FILHO, 2009). Suas espécies apresentam porte arbóreo ou arbustivo, frutos tipo legumes achatados e deiscentes, folhas fendidas ao meio formando dois lobos ou folíolos e flores zigomorfas dispostas em racemos axilares, que variam de cor conforme a espécie ou subespécie (LUSA; BONA, 2009).

As espécies de *Bauhinia* têm potencial ornamental pelo atrativo de suas flores (FARIA et al., 2004; TORRES-COLIN; STEFANO; CAN, 2009) possuindo também aplicações medicinais, alimentícias e madeireiras (TORRES-COLIN; STEFANO; CAN, 2009). Essas plantas são utilizadas na medicina popular de várias regiões do mundo, como África, Ásia e Américas Central e do Sul, no tratamento de diversas enfermidades (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Entre os numerosos relatos de uso popular das espécies de *Bauhinia*, podemos destacar o emprego como adstringente, analgésico, antimicrobiano, antioxidante, antiparasitário, antirreumático, hipocolesterolêmico, diurético, antídoto para venenos e picadas de escorpião,

além da utilização contra asma, distúrbios gastrointestinais, úlceras e feridas, dor e inflamação e, principalmente, diabetes (AHMED et al., 2012; CECHINEL FILHO, 2009; COELHO; SILVA, 2000; FARIA et al., 2004; MENEZES et al., 2007; SARTORELLI; CORREA, 2007; SEMWAL; SHARMA, 2011; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; VASCONCELOS et al., 2004).

### 2.2.3 A espécie *Bauhinia forficata* Link

A espécie *Bauhinia forficata* Link pertence à seção Pauletia (Cav.) DC e família Fabaceae (Leguminosae, Jussieu) (VAZ; TOZZI, 2005). A sinonímia mais comumente encontrada para *B. forficata* é *Bauhinia candicans* Bentham (OLIVEIRA et al., 2005). Popularmente, é conhecida como pata-de-vaca, pata-de-vaca verdadeira, unha-de-vaca, casco-de-vaca, pata-de-boi, unha-de-boi, unha-de-boi-de-espinho, bauínia, miriró, mororó, entre outros. É uma árvore espinhenta, semidecídua, de copa aberta, com tronco um pouco canelado e de cor clara, medindo de 5 a 9 m de altura (LORENZI; MATOS, 2008; SILVA et al., 2003).

*B. forficata* é uma espécie nativa da América do Sul, com distribuição na Argentina, Bolívia, Paraguai, Peru, Uruguai e predominantemente no Brasil (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição geográfica mundial de *Bauhinia forficata*



Os países onde a espécie *Bauhinia forficata* é encontrada são mostrados em tons de verde, variando da tonalidade mais clara (grau 1) para a mais escura (grau 5) de acordo com o grau de ocorrência. Fonte: Adaptado de <http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=4&lookupid=13027281>. Acesso em: 13 jun. 2014.

No Brasil, esta espécie é encontrada nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, entre os Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Figura 3). *B. forficata* habita nas florestas Atlântica, higrófila no sul da Bahia e de tabuleiro no Espírito Santo. Também é vista em vegetação secundária (capoeira), beiras de estradas, pastos e plantações de cacau (VAZ; TOZZI, 2005; <http://www.reflora.jbrj.gov.br>. Acesso em: 13 jun. 2014).

Figura 3 – Distribuição geográfica de *Bauhinia forficata* no Brasil



Os Estados brasileiros onde a espécie *Bauhinia forficata* é encontrada são mostrados em cores. Os tons em laranja correspondem aos Estados do Nordeste, os em vermelho aos do Sudeste e os em azul aos do Sul. Fonte: Adaptado de <http://www.reflora.jbrj.gov.br>. Acesso em: 13 jun. 2014.

As folhas de *B. forficata* apresentam-se divididas em dois lobos, os quais atingem o terço superior ou, com mais frequência, a metade do comprimento total da folha, que chega a ser de 7 a 12 cm de comprimento (Figura 4). O ápice dos lobos é agudo ou acuminado e a margem foliar lisa. A lâmina foliar tem consistência membranácea e a superfície lisa ou ligeiramente pubescente (coberta por pelos finos, curtos e macios) na face dorsal. As folhas apresentam nervação palmada, constituída de 9 a 11 nervuras que curvam para o ápice. Os pecíolos medem de 2,5 a 3,5 cm e apresentam duas estípulas [apêndices laminares (folhas modificadas) geralmente aos pares, na base das folhas, com função de proteção] em sua base, que se transformam em espinhos (MIYAKE; AKISUE; AKISUE, 1986).

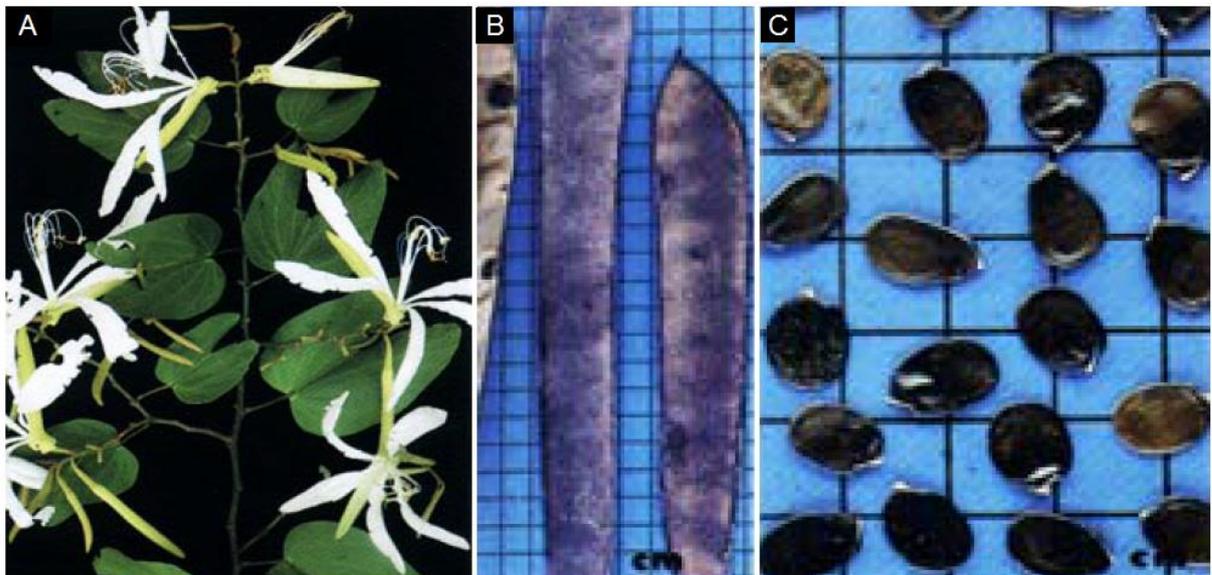
Figura 4 – Fotografia das folhas de *Bauhinia forficata*



Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

As flores são brancas em tamanhos variados, possuindo característico cálice tortuoso. As pétalas brancas são em número de cinco, largo-lineares duas vezes mais longas que as sépalas, obtusas no ápice e de base contraída em forma de unha (Figura 5A). Os frutos são do tipo legume perfeito, de 15 a 25 cm de comprimento, de coloração escura, amarronzada quando na época da abertura (Figura 5B). As sementes, achatadas e de coloração escura, possuem contorno subovalado e uma linha esbranquiçada que delimita sua forma (Figura 5C) (ARIGONY, 2005).

Figura 5 – Imagens das flores, frutos e sementes de *Bauhinia forficata*.



As letras correspondem à: A: flores; B: frutos; C: sementes de *Bauhinia forficata*. Fonte: LORENZI; MATOS, 2008.

#### 2.2.4 Propriedades medicinais de *Bauhinia forficata* Link

A infusão ou decocto das folhas, cascas e flores de *B. forficata* é largamente empregada na medicina popular principalmente como hipoglicemiante, diurético e hipocolesterolêmico, mas também existem relatos de uso contra cistites, parasitoses intestinais e elefantíase (LORENZI; MATOS, 2008; OLIVEIRA; SAITO, 1989). Assim, dentro do gênero *Bauhinia*, essa espécie é a que apresenta maior número de estudos relativos à atividade hipoglicemiante, visto seu grande consumo na forma de chás bem como de fitoterápicos disponíveis no comércio para o tratamento da diabetes (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

As duas propriedades diretamente relacionadas com a diabetes (hipoglicemiante e diurético) têm atraído a atenção dos pesquisadores, resultando em diversos estudos farmacológicos sobre a atividade hipoglicemiante das folhas de *B. forficata* em diferentes modelos *in vivo* (CUNHA et al., 2010; CURCIO et al., 2012; DAMASCENO et al., 2004; LINO et al., 2004; MENEZES et al., 2007; PEPATO et al., 2002; PEPATO et al., 2004; PEPATO et al., 2010; SILVA et al., 2002; VOLPATO, 2001; VOLPATO et al., 2008). Entretanto, desde os estudos mais antigos, como os relatados por Juliane em 1929 e 1931, até os mais atuais, os resultados parecem ser discrepantes e a comprovação científica da atividade hipoglicemiante da pata-de-vaca e seu mecanismo de ação continuam indeterminados (CECHINEL FILHO, 2009; CURCIO et al., 2012; JORGE et al., 2004).

Na busca pela caracterização da(s) substância(s) responsável(is) pela atividade hipoglicemiante de *B. forficata*, foram identificados alguns de seus principais constituintes, destacando-se a predominância de flavonoides glicosilados derivados do canferol e da quercetina (FERRERES et al., 2012; PIZZOLATTI et al., 2003; SALGUEIRO et al., 2013; SILVA, K. L. et al., 2000). Assim, diferentes autores têm proposto o flavonoide canferitrina (canferol-3,7-di-*O*-ramnosídeo) como um marcador químico para esta espécie (ENGEL et al., 2008; SILVA, K. L. et al., 2000) e, com base nisso, algumas tentativas foram feitas para atribuir os efeitos hipoglicemiantes de *B. forficata* a esse constituinte (JORGE et al., 2004; SOUZA et al., 2004). Entretanto, nos últimos anos, algumas pesquisas mostraram a ausência de canferitrina em algumas amostras de *B. forficata*, sejam elas comerciais ou cultivadas, levando a crer que essa substância não pode ser considerada como um marcador químico para todas as variedades dessa planta medicinal (FERRERES et al., 2012; MARQUES et al., 2013).

Apesar da predominância dos flavonoides (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002), estudos demonstraram a presença de outras classes de substâncias em *B. forficata*, dentre elas alcaloides, taninos, mucilagens, óleo essencial, triterpenos, saponinas, esteroides e outras de

natureza fenólica (DUARTE-ALMEIDA; NEGRI; SALATINO, 2004; MARQUES et al., 2012; MIYAKE; AKISUE; AKISUE, 1986; SARTORELLI; CORREA, 2007).

Outras propriedades de *B. forficata* têm sido investigadas. Vasconcelos e colaboradores (2004) testaram o extrato dessa espécie vegetal contra as mudanças fisiológicas induzidas pelo envenenamento de *Tityus serrulatus*, embora tenham concluído que o uso desse extrato deva ser evitado no tratamento de envenenamento por esse escorpião. Por outro lado, Oliveira e colaboradores (2005) encontraram resultados promissores do extrato aquoso contra envenenamento por *Bothrops* e *Crotalus*, sugerindo ação inibidora de proteases envolvidas em distúrbios da coagulação sanguínea induzidos por venenos dessas serpentes.

Arigony (2005) observou bons resultados de atividade antiedematogênica *in vivo* no modelo de edema de pata de rato induzido pela carragenina, mas não verificou atividade anticolinesterásica por autobiografia ao testar três substâncias isoladas de *B. forficata*.

A presença de óleo essencial em *B. forficata* estimulou os estudos de Duarte-Almeida, Negri e Salatino, em 2004, e de Sartorelli e Correa, em 2007. As pesquisas desses autores concordaram na predominância de sesquiterpenos, mas divergiram em relação à presença e proporção de vários componentes.

Apesar de algumas substâncias terem sido identificadas e propriedades biológicas reconhecidas, até o presente momento, estudos sobre o potencial antibacteriano e tóxico de *B. forficata* são escassos na literatura.

Em relação à atividade antimicrobiana, Silva e Cechinel Filho (2002) descreveram, em um artigo de revisão, ausência de atividade antifúngica de extratos obtidos das folhas, caules e cascas de *B. forficata* frente a amostras de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, mas ação contra diferentes fungos dermatófitos. O extrato em acetato de etila dos caules apresentou CIM de 750 µg/mL frente a *Epidermophyton floccosum* e o extrato em hexano das cascas, CIM < 1000 µg/mL frente a *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *E. floccosum*. A melhor atividade observada foi do extrato em diclorometano das cascas, com CIM de 500 µg/ml frente a *T. rubrum* e *E. floccosum*.

A partir de extratos aquosos de diferentes órgãos vegetais (folha, caule, fruto e semente) de *B. forficata*, Luján e Corral (2008) realizaram o teste de difusão empregando amostras nosocomiais de *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oxacilina sensível e *C. albicans*, encontrando atividade somente frente a *M. luteus* e *S. aureus*, determinada pelos halos de inibição de 9 mm

e 14 mm para a semente, respectivamente, e de 20 mm para o fruto e 25 mm para o caule, ambos frente a *M. luteus*.

Rocha (2012) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *B. forficata* pelos métodos da difusão e da microdiluição frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922. O método da difusão não demonstrou atividade frente aos três micro-organismos avaliados. Por outro lado, o método da microdiluição revelou ação do extrato frente a *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATC 29212, com valores de CIM de 12,5 mg/mL para ambos.

O estudo mais recente de atividade antimicrobiana de *B. forficata* encontrado na literatura é o de Alves (2013), que avaliou o extrato hidroalcoólico das cascas dessa espécie por meio do método da microdiluição, encontrando valores de CIM maiores que 2,0 mg/mL para *Streptococcus mutans* ATC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10557, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. faecalis* ATCC 29212, e de 15,62 µg/mL para *C. albicans*.

Em relação ao potencial tóxico de *B. forficata*, alguns estudos foram encontrados na literatura. Pepato e colaboradores (2004) avaliaram a toxicidade do tratamento por um mês com decocto aquoso das folhas de *B. forficata* de ratos não-diabéticos e com diabetes induzida pela estreptozotocina através de marcadores enzimáticos. Os resultados demonstraram que o decocto não produziu efeitos tóxicos mensuráveis pelos marcadores utilizados. Anos mais tarde, esse mesmo grupo de pesquisa (PEPATO et al., 2010) testou os efeitos em marcadores fisiológicos, bioquímicos e de toxicidade do extrato hidroalcoólico, concentrado e dissolvido em sílica coloidal, em ratos com diabetes promovida pela mesma substância indutora. Esses autores observaram uma mudança nas atividades enzimáticas e sinais de toxicidade hepática no grupo tratado com o extrato, possivelmente devido à ação dos metabólitos secundários da planta ou à interação desses constituintes com o veículo utilizado (sílica coloidal).

Volpato e colaboradores (2008) investigaram os efeitos do tratamento oral do extrato aquoso das folhas de *B. forficata* na evolução materna sob biomarcadores de estresse oxidativo e incidência de anomalia fetal em ratas prenhas não-diabéticas e com diabetes induzida por estreptozotocina. Os resultados desse estudo demonstraram que, nas condições do ensaio, o extrato aquoso não foi tóxico, mas também não conseguiu modificar a hiperglicemia materna, a taxa de gravidez e o desenvolvimento placentário-fetal quando esses ratos foram tratados durante a gestação. Entretanto, o tratamento utilizado contribuiu para a manutenção da concentração de glutatona no grupo diabético semelhante aos grupos não-diabéticos, sugerindo relação com a diminuição na incidência de anomalias viscerais.

Em outra linha de pesquisa, Lim e colaboradores (2006) isolaram e identificaram das folhas de *B. forficata* uma substância denominada HY52, que apresentou efeito inibitório na viabilidade de células HeLa (linhagem celular de adenocarcinoma cervical humano) por meio da indução de apoptose e controle do ciclo celular através da inibição seletiva de uma quinase, demonstrando um possível efeito antitumoral desse fitoconstituente.

Recentemente, Düsman e colaboradores (2013) avaliaram a toxicidade do extrato aquoso das partes aéreas de *B. forficata*, na concentração de 4,65 g/L, em células de medula óssea de ratos Wistar. Esses autores observaram que esse extrato não apresentou citotoxicidade, visto que não houve alteração no índice mitótico das células em comparação com o controle negativo. Além disso, os tratamentos com o extrato aquoso reduziram os danos cromossômicos induzidos pela ciclofosfamida, demonstrando potencial antígeno-tóxico.

### 2.3 ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE

A oxidação é fundamental na vida aeróbica e, sendo assim, é natural a produção dos radicais livres, também conhecidos como espécies reativas (ER's) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Nas células, as ER's são naturalmente produzidas durante o metabolismo oxidativo por peroxissomos e enzimas [particularmente as do complexo P450, xantina oxidase e complexos de oxidases de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH)] (SOSA et al., 2013). Essas substâncias também podem ser formadas durante alguma disfunção biológica e em processos inflamatórios, ou serem originadas de fontes externas, como compostos químicos (poluentes ambientais, cigarro, álcool, drogas, pesticidas, ozônio), radiação UV, alimentos e exercícios (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

ER's são átomos, moléculas ou íons altamente instáveis que podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com o principal átomo envolvido em sua estrutura, sejam eles: espécies reativas de oxigênio (ERO's), espécies reativas de nitrogênio (ERN's), espécies reativas de enxofre (ERE's) e espécies reativas de cloro (ERC's). Dentre todas as substâncias derivadas do metabolismo oxidativo, as ERO's são as mais abundantemente produzidas, compreendendo espécies radiculares, como hidroxila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) e alcóxila ( $\text{RO}^{\bullet}$ ), e não-radicalares, como oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SOSA et al., 2013). A instabilidade da molécula das ER's é devida à existência de elétrons desemparelhados em sua estrutura, que as tornam ativas

em reações químicas com outras moléculas através de diferentes mecanismos, como doação de elétron, aceitação de elétron ou de hidrogênio, por reações de adição, ou por reações de acoplamento com outros radicais (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

As reações promovidas pelas ER's nos substratos biológicos podem ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os principais alvos são proteínas, DNA, ácido ribonucleico (RNA), açúcares e lipídios (CAROCHO; FERREIRA, 2013). A oxidação do DNA pode alterar a posição de suas bases nitrogenadas, sendo esse um processo básico para a ocorrência de mutação e carcinogênese. Se a oxidação ocorrer nos aminoácidos de uma enzima, essa pode ter sua atividade alterada ou perdida. Se a reação ocorrer, por sua vez, numa membrana celular, a oxidação de lipídios pode interferir nos transportes ativo e passivo normais ou ocasionar a ruptura da membrana, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue pode facilitar o acúmulo dessas substâncias nas paredes das artérias e veias, provocando aterosclerose, podendo ocasionar trombose, infarto ou acidente vascular encefálico (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O dano causado pelas ER's para a célula não depende apenas de sua concentração intracelular, mas também do equilíbrio entre a produção dessas espécies e a defesa antioxidante. Quando o equilíbrio pró-oxidante/ antioxidante é perdido, seja pelo aumento da produção de ER's ou pela diminuição da ação dos antioxidantes, é gerado o estresse oxidativo, alterando e danificando moléculas intracelulares. Sob o ponto de vista biomédico, o estresse oxidativo desempenha um papel central em diferentes condições fisiopatológicas, como as doenças degenerativas (Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica), doenças inflamatórias (artrite reumatoide), doenças cardiovasculares (aterosclerose, distrofia muscular), alergias, disfunções do sistema imunológico, *Diabetes mellitus*, envelhecimento e câncer (BIANCHI; ANTUNES, 1999; CAROCHO; FERREIRA, 2013; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; SOSA et al., 2013).

O excesso de ER's no organismo pode ser balanceado pelos antioxidantes, que compreendem enzimas ou micromoléculas produzidas pelo corpo (endógenos) ou adquiridas pela dieta (exógenos) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Em 1995, Halliwell e Gutteridge definiram os antioxidantes como "qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo". Posteriormente, essa definição foi ampliada para "qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo de uma molécula alvo" (HALLIWELL, 2007). Khlebnikov e colaboradores (2007) aprofundaram esse conceito

declarando antioxidantes como "qualquer substância que diretamente sequestra ERO's ou indiretamente age na regulação da defesa antioxidante ou inibe a produção de ERO's".

Embora o termo antioxidante originalmente se referisse à moléculas que previnem o consumo de oxigênio por tecidos humanos, ele evoluiu para se referir à prevenção de sistemas oxidativos como um todo. Um antioxidante é uma molécula ou espécie que retarda ou previne a oxidação de outra molécula, e, assim, pode ser considerado um redutor. Entretanto, nem todo redutor é necessariamente antioxidante. "Redutor" e "oxidante" são termos químicos (redox), enquanto "antioxidante" e "pró-oxidante" envolvem uma específica referência a sistemas biológicos (CRAFT et al., 2012).

Os mecanismos de defesa celular contra as ER's podem ser diretos ou indiretos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Assim, os antioxidantes podem ser classificados como primários, que ativamente inibem reações de oxidação, ou secundários, que a inibem indiretamente por mecanismos como sequestro de oxigênio, ligando à pró-oxidantes (CRAFT et al., 2012). A atividade antioxidante pode ocorrer através de várias vias: 1) por inibição das reações de oxidação dos radicais livres; 2) por interrupção da propagação da reação em cadeia; 3) por supressão do oxigênio singlete; 4) por sinergismo com outros antioxidantes; 5) como agentes redutores, convertendo hidroperóxidos em estruturas estáveis; 6) como quelantes de metais, convertendo metais pró-oxidantes (derivados do ferro e cobre) em produtos estáveis; e 7) por inibição de enzimas pró-oxidantes (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

A segurança do uso de antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia, cosmética ou farmacêutica tem sido questionada, estimulando a busca por substâncias com propriedades antioxidantes de ocorrência natural (MAESTRI et al., 2006). Na natureza existe uma imensa variedade de antioxidantes que se diferenciam quanto à composição, propriedades físicas e químicas e mecanismos e sítios de ação. São eles as enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase), as substâncias de alto peso molecular (albumina, transferrina), as de baixo peso molecular (tocoferol, quininas, bilirrubina, ácido úrico e alguns polifenóis), os minerais (selênio, cobre, manganês, zinco), as vitaminas (A, C e E), e também as plantas (GUPTA; SHARMA, 2006). A atividade antioxidante das espécies vegetais pode ser atribuída principalmente à presença de vitaminas, flavonoides e polifenóis (GUPTA; SHARMA, 2006). As substâncias fenólicas, em particular, são reconhecidamente importantes em oferecer estabilidade contra a oxidação por meio de grupos lipofílicos, como os tocoferóis, ou hidrofílicos, como os fenólicos simples, os ácidos fenólicos, as antocianinas, os flavonoides e os taninos (MAESTRI et al., 2006).

### 2.3.1 Métodos utilizados na investigação da atividade antioxidante de produtos naturais

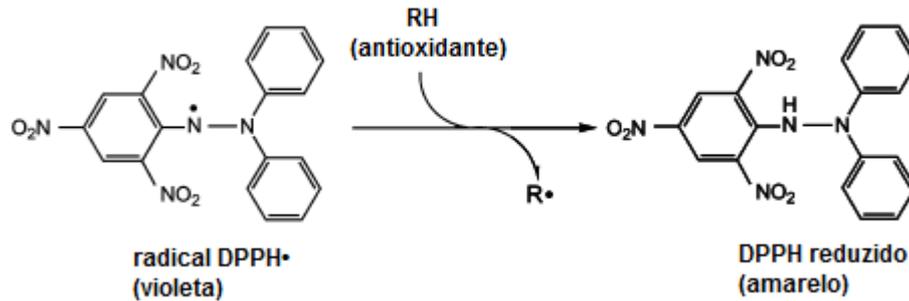
Considerando-se a complexidade envolvida na ação *in vivo* dos antioxidantes, diferentes metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas para estimar a capacidade dos antioxidantes e suas misturas complexas em interagir com ER's. Esses ensaios são baseados em diferentes estratégias e fornecem diferentes informações sobre a interação entre as ER's e as substâncias testadas. Os métodos podem avaliar o sequestro de um radical, como o DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), o superóxido, o óxido nítrico e o ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato)], o poder de redução de íons metálicos, como o Fe<sup>3+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, ou a inibição da oxidação lipídica, como o método do ácido tiobarbitúrico (TBA) e o da cooxidação do β-caroteno/ácido linoleico (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Assim, a atividade antioxidante de uma amostra de interesse não pode ser concluída com base em um único modelo de teste. Pesquisas multifacetadas sequenciais são altamente recomendadas, incluindo testes com diferentes fundamentos (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; CAROCHO; FERREIRA, 2013; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

#### 2.3.1.1 Sequestro do radical livre estável DPPH•

O ensaio do sequestro do radical DPPH• foi primeiramente descrito por Blois em 1958, tendo sofrido pequenas modificações por numerosos pesquisadores. É um dos ensaios mais empregados na determinação da capacidade antioxidante de extratos ou substâncias de plantas (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011). Esse ensaio avalia a capacidade de uma substância ou uma mistura, em solução, reduzir o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila para 2,2-difenil-1-picrilhidrazina pela transferência de um átomo de hidrogênio. Essa reação de redução é percebida visualmente pela alteração da coloração da solução de violeta para amarela e detectada colorimetricamente em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm (Figura 6). A atividade antioxidante é medida pela diminuição na intensidade da absorção, sendo que quanto menor o valor da leitura obtida, maior a atividade antioxidante da amostra. Usualmente, a leitura é realizada após um tempo de incubação fixado (30 minutos ou menos), não sendo considerados dados cinéticos (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; CAROCHO; FERREIRA, 2013; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Figura 6 – Estrutura química do radical DPPH• e reação de estabilização com um antioxidante



Fonte: Adaptado de MOON; SHIBAMOTO, 2009.

O DPPH• é caracterizado como um radical livre estável em virtude da deslocalização de um elétron livre ao longo da sua estrutura. Assim, a molécula não sofre dimerização, como seria o caso da maioria dos outros radicais livres, instáveis. A deslocalização do elétron também é responsável pela cor violeta escura e pela absorção em solução de etanol de 517 nm (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

O método do DPPH• é rápido, simples (não envolve muitas etapas ou reagentes) e barato em comparação com outros modelos desse tipo (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013) e, por isso, tem sido o procedimento de avaliação da atividade antioxidante mais usado em estudos preliminares (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

### 2.3.1.2 Poder de redução

O ensaio do poder de redução, ou capacidade redutora total, mede a capacidade de uma amostra doar elétron ao ferro, transformando Fe<sup>3+</sup> em Fe<sup>2+</sup>. Esse ensaio, descrito por Oyaizu em 1986, foi originalmente aplicado ao plasma e hoje é utilizado para diversas amostras. A coloração amarela inicial da solução contendo antioxidante e ferricianeto de potássio muda para azul e é analisada por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm. Quanto maior a absorbância obtida, maior o poder de redução da amostra (CAROCHO; FERREIRA, 2013; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

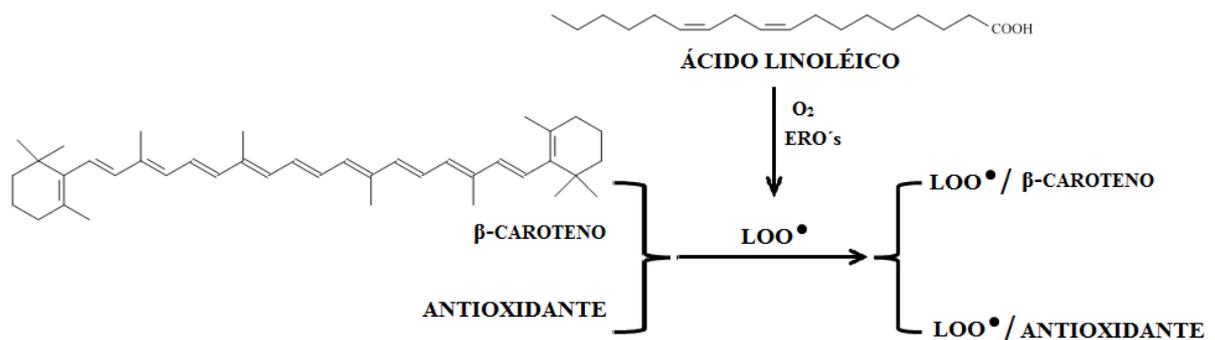
### 2.3.1.3 Cooxidação do β-caroteno/ácido linoleico

Dentre as diversas técnicas utilizadas para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* de substâncias naturais e sintéticas, destaca-se o sistema de cooxidação do β-caroteno/

ácido linoleico, originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1970). Esse método, amplamente empregado em amostras de alimentos, bebidas, extratos de plantas e substâncias isoladas, dispõe de um modelo de substrato lipídico (ácido linoleico) em forma de emulsão, se caracterizando por estar mais próximo dos ensaios *in vivo* do que os testes do sequestro do radical livre DPPH• e do poder de redução (ALVES et al., 2010; KOLEVA et al., 2002).

Esta técnica avalia a capacidade de uma substância ou mistura inibir ou prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno através do sequestro dos radicais livres produzidos na oxidação do ácido linoleico (Figura 7). A reação é monitorada em espectrofotômetro, em comprimento de onda próximo a 470 nm, com leitura imediata e em intervalos de 15 minutos, até o tempo total de 2 horas (ALVES et al., 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Figura 7 – Sistema de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico na presença de antioxidante.



Fonte: Adaptado de MOON; SHIBAMOTO, 2009.

Os radicais livres são gerados pela reação do  $O_2$ , presente no meio reacional através da água saturada com oxigênio atmosférico, com o ácido linoleico. Esses radicais peroxila formados são capazes de reagir com o  $\beta$ -caroteno, diminuindo a quantidade dessa substância na solução teste, verificada pelo clareamento da solução. Se a amostra testada for um antioxidante, ela competirá com o  $\beta$ -caroteno pelo radical peroxila, retardando o branqueamento da solução (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Os resultados obtidos podem ser comparados com padrões sintéticos ou naturais (ALVES et al., 2010).

O método da cooxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é uma técnica simples, sensível e permite a determinação do potencial antioxidante de substâncias termossensíveis, visto que não utiliza altas temperaturas. Duarte-Almeida e colaboradores (2006) adaptaram a técnica para microplacas com leituras automatizadas. Essa alteração garantiu maior precisão e

redução no gasto de tempo e reagentes, se tornando uma vantajosa ferramenta (ALVES et al., 2010).

#### 2.4 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

No contexto microbiológico, dados da OMS mostram que as doenças infecciosas são uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsáveis por aproximadamente 50% de todas as mortes em países tropicais. Doenças infecciosas e parasitárias seguem como a principal causa de mortalidade infantil na maioria dos países em desenvolvimento. Embora possa não ser surpreendente ver essas estatísticas nos países em desenvolvimento, as taxas de mortalidade por doenças infecciosas também estão aumentando em países desenvolvidos, principalmente quando associadas ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), ocasionando mais de 20% das mortes nas Américas (MAHADY et al., 2008).

Os principais fatores que contribuem para a carga global de doenças infecciosas são a pandemia de HIV/AIDS, o surgimento de micro-organismos até então desconhecidos e a resistência aos antimicrobianos (MAHADY et al., 2008). A maioria dos agentes antimicrobianos utilizados atualmente foi desenvolvida entre 1940 e 1960 e o uso generalizado desses medicamentos melhorou consideravelmente a saúde pública nos últimos sessenta anos. Entretanto, a eficácia do tratamento com antibióticos está diminuindo rapidamente em consequência do aumento contínuo da frequência de bactérias que desenvolvem resistência aos antibacterianos (MACLEAN et al., 2010; ZHOU et al., 2012).

A evolução da resistência a antibióticos pode ser considerada um caso relativamente simples de adaptação por seleção natural. Alguns dos principais parâmetros que determinam a oportunidade de populações bacterianas em desenvolver resistência a antibióticos são: a taxa de fornecimento de resistência e mutações compensatórias por mutação espontânea ou transferência horizontal de genes; e os efeitos da aptidão de resistência e mutações compensatórias, tanto na presença quanto na ausência de antibióticos (MACLEAN et al., 2010; ZHOU et al., 2012). Os micro-organismos parecem ser capazes de desenvolver mecanismos de resistência a novas drogas, o mais rapidamente, à medida que elas são introduzidas (MAHADY et al., 2008). Assim, cada antimicrobiano possui um tempo de vida útil quanto à sua eficácia terapêutica (SHER, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento de resistência aos antibióticos representa atualmente um problema para a saúde humana, diminuindo o arsenal terapêutico efetivo disponível, o que reforça a necessidade contínua de identificação de novas entidades químicas com ação antimicrobiana e métodos de triagem mais simples (ZHOU et al., 2012).

Um grande número de fármacos capazes de matar ou inibir o crescimento microbiano foi descoberto a partir de origens naturais, e esses produtos continuam a fornecer novas e importantes pistas contra diversos alvos farmacológicos. A pesquisa atual na descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais envolve uma abordagem multifacetada combinando técnicas botânicas, fitoquímicas, biológicas e moleculares (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Duarte (2006) relata o aumento do número de publicações indexadas sobre atividade antimicrobiana de produtos naturais no mundo entre os anos de 1994 e 2004, destacando a maior participação da América Latina, em especial o Brasil, em comparação com as outras regiões do mundo. Entretanto, alerta que esse número ainda é pequeno quando se considera o universo de espécies vegetais conhecidas, e por não incluir resultados de divulgações locais, que geralmente não são publicados.

#### **2.4.1 Métodos utilizados para investigação da atividade antimicrobiana em produtos naturais**

A busca por substâncias químicas com atividade farmacológica é constante e várias pesquisas têm sido desenvolvidas e direcionadas ao descobrimento de agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e produtos naturais para aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos (OSTROSKY et al., 2008; ZHOU et al., 2012).

Atualmente estão disponíveis diversas técnicas para avaliar as atividades antimicrobianas em produtos naturais, tais como os métodos de difusão, de diluição, técnicas espectroscópicas de fluorescência, a bioautografia em camada delgada e modelos de infecção animal (CHOMA; GRZELAK, 2011; KLANČNIK et al., 2010; OSTROSKY et al., 2008; VALGAS et al., 2007; WILKINSON, 2006; ZHOU et al., 2012).

Os métodos mais comumente utilizados para a triagem da atividade antimicrobiana de extratos de plantas compreendem os ensaios de difusão e de diluição em caldo. Outro teste muito usado é a bioautografia, que combina Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com um bioensaio *in situ* e, portanto, permite que o pesquisador localize as substâncias ativas presentes em uma amostra (CHOMA; GRZELAK, 2011; WILKINSON, 2006). Apesar da

existência de metodologias tecnologicamente mais modernas, esses ensaios, quando adequadamente realizados, apresentam uma boa aplicabilidade em triagens de rotina para avaliação da atividade antimicrobiana (ZHOU et al., 2012).

O método de difusão, também chamado de difusão em placas ou teste de Kirby e Bauer, é conhecido como uma técnica qualitativa, uma vez que esse ensaio somente indica a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana (VALGAS et al., 2007). Esse método relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento de um determinado micro-organismo semeado em um meio de cultura sólido com a concentração de uma substância (ou extrato) presente no meio (OSTROSKY et al., 2008; WILKINSON, 2006).

O método envolve a preparação de uma placa de Petri com ágar, na qual um inóculo bacteriano, em uma concentração padronizada, é distribuído por toda a superfície do ágar solidificado com o auxílio de um cotonete de algodão estéril (*swab*) (VALGAS et al., 2007; WILKINSON, 2006). A substância de ensaio, também preparada em uma concentração padronizada, é, então, aplicada no centro da placa, que será incubada por algumas horas (WILKINSON, 2006; ZHOU et al., 2012). Após o tempo de incubação, a substância que for ativa contra a bactéria testada terá se difundido pelo ágar e inibido o seu crescimento ao redor do local de aplicação. A área na qual não é observado crescimento microbiano é conhecida como halo ou zona de inibição (ZHOU et al., 2012).

O halo de inibição de crescimento é tipicamente medido em milímetros (VALGAS et al., 2007), e essa dimensão permite a classificação dos micro-organismos como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes (OSTROSKY et al., 2008). Alguns autores utilizam um sistema de classificação em cruces (+, ++ e +++) para indicar os níveis de atividade (leve, moderada e forte, respectivamente), porém, sem qualquer referência a critérios padronizados (WILKINSON, 2006). Em todos os casos, a avaliação é comparada frente a um padrão de referência (controle positivo) (OSTROSKY et al., 2008; VALGAS et al., 2007; WILKINSON, 2006) ou com valores de literatura de produtos químicos isolados ou extratos semelhantes (WILKINSON, 2006).

Alguns aspectos do método de difusão podem variar de acordo com o micro-organismo e a amostra testados. A aplicação da substância/extrato pode ser por meio de discos de papel de filtro, cilindros de aço inoxidável, cilindros de vidro ou por perfuração no ágar, variando, conseqüentemente, o volume total aplicado, e o tempo de incubação pode ser de 14 a 48 horas, geralmente à temperatura de 35° a 37°C (OSTROSKY et al., 2008).

Uma das principais críticas desse método é que ele se baseia na capacidade do extrato se difundir através do ágar, criando potencialmente um gradiente de concentração de

substâncias ativas. Visto que o ágar possui uma base aquosa, os extratos com solubilidade limitada em meios aquosos podem não refletir a verdadeira atividade antibacteriana, como é o caso dos óleos essenciais (WILKINSON, 2006).

O método de diluição avalia a relação entre o crescimento visível do micro-organismo desafiado e a concentração da substância (ou extrato) ensaiada e, portanto, fornece resultados quantitativos (OSTROSKY et al., 2008). O valor da concentração inibitória mínima (CIM) é definido como a menor concentração de uma substância capaz de inibir completamente o crescimento de um micro-organismo e, geralmente, é expresso em miligramas por mililitros (VALGAS et al., 2007; ZHOU et al., 2012).

Não existe um procedimento universal que seja aplicável a todos os tipos de produtos naturais e, portanto, diferentes estudos apresentam aspectos variáveis como tempo de incubação, utilização de meio sólido ou líquido, realização em micro ou macroescala e interpretação dos resultados (DUARTE, 2006; KLANČNIK et al., 2010). Porém, o método de diluição é rápido e não envolve a utilização de equipamentos sofisticados, podendo ser realizado em qualquer laboratório com instalações básicas para o trabalho microbiológico (WILKINSON, 2006) e, ainda, é um procedimento padronizado para a determinação quantitativa de antibióticos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Assim, é um dos métodos de triagem mais utilizados na pesquisa de produtos naturais com propriedade antimicrobiana (ZHOU et al., 2012).

O procedimento de ensaio de microdiluição em caldo envolve diluições em série do produto natural, suspensão do inóculo microbiano em uma densidade padrão, meio de cultura líquido e placa de microtitulação de 96 poços. Em cada placa utiliza-se ainda um controle negativo, um controle do crescimento e um controle positivo (antimicrobiano padrão) para permitir a avaliação dos resultados (OSTROSKY et al., 2008).

Para a interpretação dos resultados, a turvação do meio pode ser observada visualmente ou medida por espectrofotômetro. A utilização de um indicador de viabilidade celular, como os sais de tetrazólio, tem demonstrado melhora na detecção do crescimento microbiano, onde a variação de cor é mais facilmente identificada com uma menor densidade celular do micro-organismo (KLANČNIK et al., 2010; VALGAS et al., 2007; WILKINSON, 2006).

O método da bioautografia se assemelha ao método de difusão em ágar por seus procedimentos e característica qualitativa. Assim como na difusão, a finalidade da bioautografia é a observação de zonas de inibição do crescimento bacteriano, indicativas de atividade antibacteriana. A diferença é que, na bioautografia, as substâncias testadas devem ser

primeiramente separadas por cromatografia em papel ou CCD para, em seguida, se difundirem através do ágar (WILKINSON, 2006). A bioautografia pode ser classificada em três tipos: contato, direta e por imersão (ou sobreposição) (CHOMA; GRZELAK, 2011).

Embora a bioautografia tenha a vantagem de combinar a separação dos componentes do extrato com a identificação simultânea das frações bioativas, esse ensaio não é adequado quando se pretende detectar uma atividade resultante do sinergismo entre duas ou mais substâncias (WILKINSON, 2006), como no caso de misturas, extratos ou frações semipurificadas.

Os testes de difusão em disco e de diluição em caldo, estabelecidos como padrão pelo CLSI e aceitos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), são os métodos de triagem mais utilizados na pesquisa de agentes antimicrobianos oriundos de produtos naturais (ZHOU et al., 2012). De acordo com o *Draft Guidance* intitulado "Guidance for Industry - Microbiological Data for Systemic Antibacterial Drug Products - Development, Analysis, and Presentation", publicado pelo FDA em 2009, dois parâmetros essenciais devem ser observados: 1) a atividade de um medicamento antibacteriano, incluindo seus componentes e metabólitos ativos, deve ser avaliado frente a um painel de micro-organismos que sejam potenciais agentes patogênicos; e 2) o medicamento antibacteriano em desenvolvimento, bem como agentes antimicrobianos de comparação, devem ser testados pelos métodos de difusão em disco e de diluição.

## 2.5 TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS

Durante a última metade do século XX a prática da fitoterapia se generalizou por todo o mundo devido, em parte, ao reconhecimento do significativo poder de cura dos sistemas médicos tradicionais, em seu estado natural ou como fonte de novos fármacos, bem como pelo desapontamento da população com o alto custo dos tratamentos alopáticos e seus efeitos adversos. No mundo ocidental, em particular, o conceito de que "natural" é melhor do que "químico" ou "sintético" levou à evolução da fitoterapia neo-ocidental, que é a base de uma indústria cada vez maior. Muitos medicamentos à base de plantas são promovidos como seguros e eficazes, levando à sua utilização profilática para manter, melhorar a saúde ou prevenir certas doenças (ELVIN-LEWIS, 2001).

O uso de plantas na medicinal tradicional frequentemente é considerado seguro, visto que muitos efeitos adversos não estão bem documentados (ELGORASHI et al., 2002). Mas o

simples uso tradicional não é garantia de segurança; algumas plantas podem causar efeitos deletérios à saúde de quem as consome (ERNST, 1998). Muitas das plantas utilizadas na medicina tradicional têm um sólido suporte científico no que diz respeito à sua eficácia. No entanto, estudos têm levantado questionamentos sobre a segurança dessas plantas e a sua utilização continuada (ELGORASHI et al., 2002).

A utilização de algumas plantas medicinais tem sido associada diretamente à toxicidade cardíaca, pulmonar, renal, hematológica, hepática, endócrina, materno-fetal, neurológica e psiquiátrica, e ainda, a possíveis efeitos mutagênicos e carcinogênicos (ERNST, 1998; TOVAR; PETZEL, 2009). Adicionalmente, prejuízos à saúde podem ocorrer devido a erros de identificação botânica, adulteração ou contaminação do material vegetal, subnotificação das reações adversas e interações com outros produtos à base de plantas ou com fármacos (ERNST, 1998; JORDAN; CUNNINGHAM; MARLES, 2010).

Assim, o emprego de plantas, seus extratos ou substâncias isoladas para fins terapêuticos requer a avaliação prévia de seu potencial toxicológico, já que os produtos do metabolismo secundário das plantas, em geral, são sintetizados como defesas químicas contra micro-organismos e herbívoros podendo, portanto, afetar outros organismos (KATO et al., 2012).

Recentemente tem havido um considerável interesse da investigação dos efeitos citotóxico, genotóxico, mutagênico, carcinogênico ou teratogênico das plantas medicinais com a finalidade de estabelecer a segurança do uso pela população (RESENDE et al., 2012; STURBELLE et al., 2010). Carcinogenicidade e mutagenicidade estão entre os efeitos toxicológicos que causam maior preocupação para a saúde humana (RESENDE et al., 2012).

### **2.5.1 Genotoxicidade de produtos naturais**

Vários agentes endógenos ou exógenos são capazes de induzir danos ao DNA, interferindo na sua estabilidade e dificultando os processos de replicação e transcrição em nível celular. Entretanto, os mecanismos de reparo do DNA são capazes de eliminar a maioria dessas lesões, de modo a proteger o material genético contra danos e garantir a fiel transmissão da informação genética de uma geração a outra. Essas estratégias reparam bases modificadas, ligações cruzadas e quebra de cadeia dupla por mecanismos como reparo de excisão de bases, reparo de excisão de nucleotídeos, inversão direta, quebra de fita dupla, reparo de incompatibilidade e fotorreativação. Além disso, essas vias são articuladas com outras funções celulares, em particular, transcrição genética e ciclo celular (TUTEJA; TUTEJA, 2001).

Se a lesão ao DNA não é corrigida pelos mecanismos de reparo, o resultado é a mutação, que pode levar a consequências nocivas (como degeneração de tecidos, envelhecimento e câncer) ou, raramente, vantajosas (como resistência) ao organismo e a seus descendentes. Exemplos de alterações moleculares incluem a formação de adutos de DNA e quebras no DNA, mutação em genes, aberrações cromossômicas, aneuploidia e mudanças nos padrões de metilação do DNA. Danos ao DNA incluem a eliminação de bases, dímeros de pirimidina, ligações cruzadas, ruptura dos filamentos e modificação de bases, como alquilação e oxidação. Em geral, o acúmulo desses danos leva à instabilidade genômica ou estresse genotóxico, provocando deterioração da função celular (IARC, 2006; TUTEJA et al., 2009).

Os agentes genotóxicos podem ser definidos como aqueles que interagem com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função. Eles podem ser de origem endógena ou exógena (ambientais). Entre os agentes exógenos estão as radiações, os agentes alquilantes e os produtos naturais. Os endógenos abrangem principalmente as ER's (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

ERO's geradas tanto endogenamente pelos processos metabólicos naturais do organismo, quanto exogenamente por substâncias pró-oxidantes, podem atacar quase todos os componentes celulares, induzindo a vários tipos de danos ao DNA e, assim, causando estresse genotóxico (TUTEJA; TUTEJA, 2001; TUTEJA et al., 2009). A peroxidação lipídica, além de alterar a estrutura e a função de membranas celulares, também pode causar dano ao DNA pela indução da formação de adutos (TUTEJA et al., 2009).

Há vários relatos de plantas, seus extratos e substâncias isoladas que exibem efeitos mutagênicos ou genotóxicos (CAVALCANTI et al., 2006; EDZIRI et al., 2011; ELGORASHI et al., 2003; SANTOS et al., 2012; SCHIMMER; HAFELE; KRIIGER, 1998). Plantas que claramente exibem propriedades mutagênicas devem ser consideradas como potencialmente perigosas e, assim, requerem mais pesquisas antes de serem recomendadas para uso contínuo. Por outro lado, embora potencialmente perigosa, a propriedade mutagênica das plantas também pode representar uma importante aplicação no combate ao câncer, visto que muitos agentes antitumorais são mutagênicos (ELGORASHI et al., 2002; MACÊDO et al., 2008; SANTOS et al., 2012).

## **2.5.2 O ensaio do cometa para a investigação da genotoxicidade de produtos naturais**

Testes de toxicologia genética são um componente básico da avaliação pré-clínica de segurança de novos fármacos, normalmente realizados no início do desenvolvimento de um

fármaco, possuindo o objetivo de identificar risco potencial de mutagenicidade e carcinogenicidade das substâncias (WITTE et al., 2007).

Danos ao DNA geralmente demonstram uma forte correlação com eventos mutagênicos e carcinogênicos. As complexas etapas que levam à carcinogênese provavelmente incluem iniciação, promoção e transformação por agentes genotóxicos (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

Um ensaio bastante empregado na avaliação do potencial genotóxico de produtos químicos é o ensaio do cometa. Também chamado de ensaio em gel de célula única ou eletroforese em microgel, o ensaio do cometa foi inicialmente introduzido por Östling e Johanson em 1984 como uma técnica microeletroforética para a visualização direta de danos ao DNA em células individuais. Nesse método, células são incorporadas num fino gel de agarose, colocadas sobre uma lâmina de microscópio, lisadas, submetidas à eletroforese e coradas com um corante fluorescente capaz de se ligar ao DNA. A ação de substâncias genotóxicas causadoras de danos ao DNA resulta na alteração da estrutura normal do material genético fortemente compactada, causando relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao anodo. As imagens resultantes, denominadas como “cometas” por sua aparência, são medidas para determinar a extensão do dano ao DNA (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

O mecanismo básico, como sugerido por Östling e Johanson, é que o DNA é organizado em estruturas enoveladas que, quando relaxadas por rupturas dos filamentos no DNA, podem ser alongadas pela eletroforese. Anos depois, Singh e colaboradores (1988) utilizaram condições alcalinas na eletroforese para analisar danos ao DNA causados por tratamentos com raios X e peróxido de hidrogênio. Essa versão do ensaio aumentou substancialmente a sensibilidade para a identificação de agentes genotóxicos, tornando-o uma ferramenta básica para pesquisadores interessados em áreas de pesquisa que variam do biomonitoramento humano e ambiental aos processos de reparo do DNA para toxicologia genética (KLAUDE et al., 1996; TICE et al., 2000).

O ensaio do cometa é uma técnica relativamente simples, rápida e sensível para a análise de danos ao DNA. Esse ensaio é essencialmente útil para fins de triagem, pois são necessárias quantidades relativamente pequenas da substância teste. Uma grande vantagem do ensaio em relação aos métodos citogenéticos clássicos é que não é necessária a proliferação de células para a avaliação de um potencial genotóxico e, portanto, pode ser usado qualquer tipo de célula eucariota no ensaio (WITTE et al., 2007). Outras vantagens do método são: os dados são recolhidos em nível de células individuais; é necessário um pequeno número de células; dentro de algumas horas são obtidos dados simples e de baixo custo; tem a vantagem particular

de que, como um ensaio de uma única célula, pode determinar respostas não uniformes dentro de uma população mista (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

O dano ao DNA detectado pelo ensaio do cometa pode surgir através de vários mecanismos, incluindo quebra de fitas duplas e simples de DNA, ligações cruzadas entre cadeias, sítios instáveis alcalinos e sítios de excisão incompletamente reparados presentes no momento da lise (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral investigar as atividades antioxidante e antibacteriana do extrato etanólico e das frações em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *B. forficata* Link (Fabaceae), assim como os potenciais efeitos genotóxicos do extrato etanólico, com o intuito de corroborar com seu uso tradicional e oferecer subsídio científico para novas opções terapêuticas medicinais seguras e eficazes.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Obter o extrato das folhas de *B. forficata* através da maceração com etanol;
- Obter frações das folhas de *B. forficata* através da partição líquido/líquido do extrato etanólico com solventes de diferentes polaridades;
- Determinar os teores de substâncias fenólicas totais e flavonoides totais do extrato e frações das folhas de *B. forficata*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de *B. forficata* por meio dos métodos do sequestro do radical livre DPPH•, poder de redução do ferro e cooxidação do  $\beta$ -caroteno;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato e frações das folhas de *B. forficata* frente a diferentes cepas bacterianas de referência;
- Determinar o efeito bactericida ou bacteriostático das CIM<sub>100</sub> estabelecidas
- Avaliar a indução de danos genéticos pelo extrato etanólico das folhas de *B. forficata* por meio do ensaio do cometa em células HepG2;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Partes aéreas (folhas e galhos) de *B. forficata* (Figura 8) foram coletadas entre 9:00 e 10:00 horas do dia 19/04/2013, no distrito de Paula Lima (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). Uma exsicata foi depositada como material testemunho no Herbário Leopoldo Krieger (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) e identificada pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena sob número CESJ 58873. A amostra foi selecionada pela retirada de material estranho e deteriorado, e mantida em estufa de ventilação forçada à temperatura de  $40^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por cerca de sete dias. Após secagem, retiraram-se os galhos e as folhas foram trituradas em moinho de facas industrial para posterior extração.

Figura 8 – Fotografia da árvore de *Bauhinia forficata* localizada no distrito de Paula Lima, Juiz de Fora, Minas Gerais



Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

## 4.2 EXTRAÇÃO

Dois quilogramas de folhas trituradas foram imediatamente submetidos à extração com etanol 95°GL grau analítico pela técnica de maceração estática com remaceração à temperatura ambiente, utilizando-se a proporção de dois litros de solvente para quinhentos gramas de material vegetal. A cada três dias o extrato obtido foi filtrado em papel de filtro comum (Figura 9) e, após, concentrado à pressão reduzida e temperatura não superior a 50°C utilizando-se evaporador rotatório. O solvente e a água remanescentes do extrato concentrado foram evaporados em banho-maria a  $40^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$  e/ou em dessecador com sílica até observação de massa constante para obtenção do extrato etanólico (EE).

Figura 9 – Fotografia da obtenção do extrato de *Bauhinia forficata* por maceração estática seguida de filtração



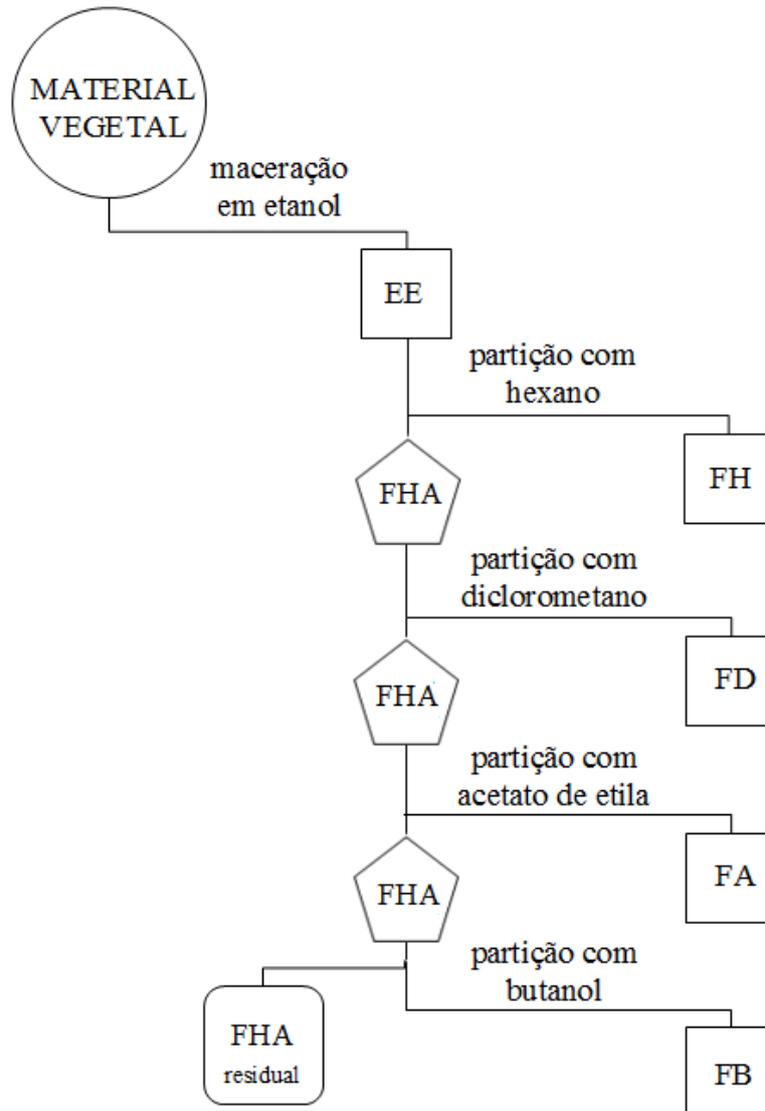
Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

## 4.3 PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O EE foi ressuspendido em solução de etanol:água (1:9) e submetido a sucessivas partições líquido/líquido (Figura 10) com solventes orgânicos em polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, todos de grau analítico), com o intuito de se realizar um fracionamento do extrato de acordo com a polaridade. Semelhantemente ao preparo do extrato etanólico, cada fração proveniente das partições foi filtrada, concentrada em

evaporador rotatório (à pressão reduzida e temperatura não superior a 50°C) e permaneceu em banho-maria (40° ± 5°C) e/ou dessecador até serem obtidas as frações em *n*-hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB) (massa constante).

Figura 10 – Esquema das partições sucessivas a partir do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia forficata*



EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol; FHA: fração hidroalcoólica. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS SOLÚVEIS TOTAIS

A quantificação do teor de fenóis solúveis totais foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (1927) descrito por Singleton e colaboradores (1999).

A partir de uma solução-estoque (SE) do padrão ácido gálico (AG) a 1 mg/mL em água deionizada, foram preparadas seis diluições em água deionizada nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL. A tubos de ensaio, foram adicionados, em triplicata, 1 mL de cada diluição de AG e 5 mL de solução do Reagente de Folin-Ciocalteu diluída 1:10 em água deionizada. A mistura foi agitada vigorosamente e, após 1 minuto e antes de 8 minutos, foram adicionados 4 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% em água deionizada. Um branco foi preparado nas mesmas condições das amostras, contendo 1 mL de água deionizada e os mesmos volumes das soluções do Reagente de Folin-Ciocalteu e do carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Tabela 1). Após duas horas à temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de duplo feixe no comprimento de onda de 764 nm, utilizando o branco para zerar o equipamento.

Tabela 1 – Alíquotas dos reagentes para a construção da curva de calibração do ácido gálico

Tubo	Diluição AG	Água deionizada	Folin-Ciocalteu	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Concentração final
A	1 mL de 10 µg/mL	—	5 mL	4 mL	1 µg/mL
B	1 mL de 20 µg/mL	—	5 mL	4 mL	2 µg/mL
C	1 mL de 30 µg/mL	—	5 mL	4 mL	3 µg/mL
D	1 mL de 40 µg/mL	—	5 mL	4 mL	4 µg/mL
E	1 mL de 50 µg/mL	—	5 mL	4 mL	5 µg/mL
F	1 mL de 60 µg/mL	—	5 mL	4 mL	6 µg/mL
Branco	—	1 mL	5 mL	4 mL	—

AG: ácido gálico. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

A curva de calibração do padrão AG foi construída a partir da média das leituras das absorbâncias obtidas de cada concentração através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>).

Foram preparadas SE's do EE e das frações FH, FD, FA e FB na concentração de 10 mg/mL, utilizando água deionizada como solvente e banho ultrassônico com aquecimento por 30 minutos. As SE's foram filtradas em papel de filtro para retirada de material insolúvel. Diluições das SE's no mesmo solvente foram preparadas na concentração de 100 µg/mL para FA e 1000 µg/mL para EE, FH, FD e FB. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas, em triplicata, para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos para o padrão ácido gálico. Foi preparado, em adição, um branco para amostra, contendo os mesmos reagentes, com exceção da solução do Reagente de Folin-Ciocalteu (Tabela 2). Após duas horas à temperatura ambiente, foi realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda igual a 764 nm, utilizando o branco para zerar o equipamento.

Tabela 2 – Alíquotas dos reagentes para a determinação de fenóis solúveis totais em *Bauhinia forficata*

Tubo	Amostra	Água deionizada	Folin-Ciocalteu	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Concentração final
EE	1 mL de 1000 µg/mL	—	5 mL	4 mL	100 µg/mL
FH	1 mL de 1000 µg/mL	—	5 mL	4 mL	100 µg/mL
FD	1 mL de 1000 µg/mL	—	5 mL	4 mL	100 µg/mL
FA	1 mL de 100 µg/mL	—	5 mL	4 mL	10 µg/mL
FB	1 mL de 1000 µg/mL	—	5 mL	4 mL	100 µg/mL
Branco EE	1 mL de 1000 µg/mL	1 mL	—	4 mL	—
Branco FH	1 mL de 1000 µg/mL	1 mL	—	4 mL	—
Branco FD	1 mL de 1000 µg/mL	1 mL	—	4 mL	—
Branco FA	1 mL de 100 µg/mL	1 mL	—	4 mL	—
Branco FB	1 mL de 1000 µg/mL	1 mL	—	4 mL	—

EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

O teor de fenóis solúveis totais foi calculado a partir da equação da reta da curva de calibração do ácido gálico e expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg/g EAG). Os resultados foram representados como média ± desvio-padrão entre as triplicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism®, versão 5.01, considerando valores de  $p < 0,05$  estatisticamente significativos.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação do teor de flavonoides totais foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) de acordo com o método descrito por Sobrinho e colaboradores (2008).

Foi preparada uma SE do padrão rutina 0,5 mg/mL em metanol. A tubos de ensaio, foram adicionadas, em triplicata, diferentes alíquotas de SE de rutina, 120  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial, 2 mL de solução de piridina 20% em metanol, 500  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de alumínio 8% em metanol e água destilada em q.s.p. 5 mL. Foi preparado um branco para cada concentração de rutina contendo metanol, SE, ácido acético e água (Tabela 3). Após 30 minutos à temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de duplo feixe no comprimento de onda de 410 nm, utilizando água destilada para zerar o equipamento.

Tabela 3 – Alíquotas dos reagentes para a construção da curva de calibração da rutina

Tubo	SE rutina	Ácido acético	Piridina	$\text{AlCl}_3$	Metanol	Água destilada	Concentração final
A	80 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	2 mL	500 $\mu\text{L}$	—	2300 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{g/mL}$
B	120 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	2 mL	500 $\mu\text{L}$	—	2260 $\mu\text{L}$	12 $\mu\text{g/mL}$
C	160 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	2 mL	500 $\mu\text{L}$	—	2220 $\mu\text{L}$	16 $\mu\text{g/mL}$
D	200 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	2 mL	500 $\mu\text{L}$	—	2180 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{g/mL}$
E	240 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	2 mL	500 $\mu\text{L}$	—	2140 $\mu\text{L}$	24 $\mu\text{g/mL}$
F	280 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	2 mL	500 $\mu\text{L}$	—	2100 $\mu\text{L}$	28 $\mu\text{g/mL}$
G	320 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	2 mL	500 $\mu\text{L}$	—	2060 $\mu\text{L}$	32 $\mu\text{g/mL}$
Branco A	80 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	—	—	2,5 mL	2300 $\mu\text{L}$	—
Branco B	120 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	—	—	2,5 mL	2260 $\mu\text{L}$	—
Branco C	160 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	—	—	2,5 mL	2220 $\mu\text{L}$	—
Branco D	200 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	—	—	2,5 mL	2180 $\mu\text{L}$	—
Branco E	240 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	—	—	2,5 mL	2140 $\mu\text{L}$	—
Branco F	280 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	—	—	2,5 mL	2100 $\mu\text{L}$	—
Branco G	320 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	—	—	2,5 mL	2060 $\mu\text{L}$	—

SE: solução-estoque. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

A curva de calibração do padrão rotina foi construída a partir da média das leituras das absorvâncias obtidas de cada diluição através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o  $R^2$ .

SE's do EE e das frações FH, FD, FA e FB foram preparadas na concentração de 5 mg/mL, utilizando metanol como solvente e banho ultrassônico com aquecimento por 30 minutos. Essas soluções foram semipurificadas com clorofórmio, adicionando-se a tubos de ensaio 10 mL de SE, 4 mL de clorofórmio e 6 mL de água destilada. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos para acelerar o processo de separação de fases. A fase orgânica foi descartada e a hidroalcoólica utilizada para o ensaio de flavonoides totais.

Alíquotas de 1 mL da fase hidroalcoólica do extrato e frações foram transferidas para outros tubos de ensaio, aos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos para o padrão rotina, inclusive para os brancos (Tabela 4), seguindo da leitura espectrofotométrica após 30 minutos em comprimento de onda igual a 410 nm, utilizando água destilada para zerar o equipamento.

Tabela 4 – Alíquotas dos reagentes para o doseamento de flavonoides totais em *Bauhinia forficata*

Tubo	SE	Ácido acético	Piridina	AlCl <sub>3</sub>	Metanol	Água destilada	Concentração final (µg/mL)
EE	1 mL	120 µl	2 mL	500 µL	—	1380 µL	1000 µg/mL
FH	1 mL	120 µl	2 mL	500 µL	—	1380 µL	1000 µg/mL
FD	1 mL	120 µl	2 mL	500 µL	—	1380 µL	1000 µg/mL
FA	1 mL	120 µl	2 mL	500 µL	—	1380 µL	1000 µg/mL
FB	1 mL	120 µl	2 mL	500 µL	—	1380 µL	1000 µg/mL
Branco EE	1 mL	120 µl	—	—	2,5 mL	1380 µL	—
Branco FH	1 mL	120 µl	—	—	2,5 mL	1380 µL	—
Branco FD	1 mL	120 µl	—	—	2,5 mL	1380 µL	—
Branco FA	1 mL	120 µl	—	—	2,5 mL	1380 µL	—
Branco FB	1 mL	120 µl	—	—	2,5 mL	1380 µL	—

SE: solução-estoque; EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

O teor de flavonoides totais foi calculado a partir da equação da reta da curva de calibração da rotina e expressos em miligramas equivalentes de rotina por grama de amostra

(mg/g ER). Os resultados foram representados como média  $\pm$  desvio-padrão entre as triplicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 5.01, considerando valores de  $p < 0,05$  estatisticamente significativos.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.6.1 Método do Sequestro do Radical DPPH•

O sequestro do radical DPPH• foi determinado pelo método de Blois (1958) adaptado por Mensor e colaboradores (2001).

SE's das amostras (EE, FH, FD, FA e FB) e referências (rutina e ácido ascórbico) foram preparadas utilizando etanol como solvente e banho ultrassônico com aquecimento por 30 minutos para solubilização nas seguintes concentrações: EE a 2,5 mg/mL, FH e FD a 5,0 mg/mL, FA a 1,0 mg/mL, FB a 2 mg/mL e referências a 0,5 mg/mL. A partir das SE's, foram realizadas sete diluições em etanol para as amostras e referências em diferentes concentrações (Tabela 5).

Tabela 5 – Soluções-estoque e diluições das amostras e substâncias de referência para o ensaio do DPPH•

Amostra ou Referência	EE	FH	FD	FA	FB	Rutina	Ácido ascórbico
	20	20	20	10	20	4	3
	35	50	50	15	30	8	5
Concentração das	50	80	80	20	40	12	7
diluições	65	110	110	25	50	16	9
( $\mu\text{g/mL}$ )	80	140	140	30	60	20	11
	95	170	170	35	70	24	13
	110	200	200	40	80	28	15

EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Para a reação de sequestro do radical DPPH•, foram adicionados a tubos de ensaio, em triplicata, 1 mL de solução 0,3 mM de DPPH em etanol e 2,5 mL de cada diluição de amostra ou referência. Foram preparados também brancos para cada concentração de amostra ou referência, contendo 1 mL de etanol e 2,5 mL da diluição. Uma mistura de solução de DPPH (1 mL) e etanol (2,5 mL) foi usada como controle (Tabela 6).

Tabela 6 – Alíquotas dos reagentes para a reação de sequestro do radical DPPH•

Tubo	Diluição	Etanol	DPPH
Controle	___	2,5 mL	1 mL
Amostra ou referência	2,5 mL	___	1 mL
Branco amostra ou referência	2,5 mL	1 mL	___

Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Após 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro de duplo feixe no comprimento de onda de 518 nm, utilizando etanol para zerar o equipamento. Os valores das absorvâncias foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \left[ \frac{(A \text{ amostra} - A \text{ branco}) \times 100}{A \text{ controle}} \right]$$

Onde  $A_{\text{amostra}}$ ,  $A_{\text{branco}}$  e  $A_{\text{controle}}$  correspondem às absorvâncias da amostra (ou da referência), do branco (da amostra ou da referência) e do controle, respectivamente.

Foram construídos Gráficos para cada uma das triplicatas das referências e das amostras, onde a abscissa correspondeu à concentração final no tubo de reação (em  $\mu\text{g/mL}$ ), e a ordenada à AA%, e calculadas as equações e o  $R^2$  através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os valores da concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ), que representam a concentração na qual a atividade antioxidante corresponde a 50%, foram calculados em  $\mu\text{g/mL}$ , substituindo-se o y da equação por 0,5. Os resultados foram representados como média  $\pm$  desvio-padrão entre as triplicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism®, versão 5.01, considerando valores de  $p < 0,05$  estatisticamente significativos.

#### 4.6.2 Método do Poder de Redução

O poder de redução ou poder antioxidante de redução do ferro foi determinado pelo método descrito por Oyaizu (1986) com pequenas modificações.

SE's das amostras (EE, FH, FD, FA e FB) e referências (rutina e ácido ascórbico) foram preparadas utilizando água destilada como solvente e banho ultrassônico com aquecimento por 30 minutos para solubilização. As soluções preparadas foram filtradas em papel de filtro para remoção de material insolúvel. As concentrações das SE's foram as seguintes: EE a 5,0 mg/mL, FH e FD a 10,0 mg/mL, FA a 1,0 mg/mL, FB a 2,5 mg/mL e referências a 0,5 mg/mL.

Diferentes alíquotas das SE's (Tabela 7) foram transferidas para tubos de ensaio, em triplicata, aos quais foram adicionados 3 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,6), 3 mL de solução de ferricianeto de potássio 1% e água destilada em q.s.p. 7 mL. Os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C por 20 minutos e, posteriormente, foram adicionados 3 mL de solução de ácido tricloroacético 10%. Após homogeneização, foi retirada uma alíquota de 2 mL para outros tubos de ensaio, aos quais se adicionou 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de cloreto férrico 0,1%. Um branco foi preparado nas mesmas condições das amostras e referências, contendo os mesmos reagentes, porém com água destilada ao invés de SE.

As leituras das absorbâncias foram realizadas imediatamente em espectrofotômetro de duplo feixe no comprimento de onda de 700 nm, utilizando água destilada para zerar o equipamento.

Tabela 7 – Alíquotas das soluções-estoque para o ensaio do poder de redução e concentração final no tubo de reação

Amostra ou referência	EE	FH	FD	FA	FB	Rutina	Ácido ascórbico	Tubo
Volume de SE ( $\mu\text{L}$ )	350	400	100	100	300	75	25	A
	450	500	250	250	400	150	75	B
	550	600	400	400	500	225	125	C
	650	700	550	550	600	300	175	D
	750	800	700	700	700	375	225	E
	850	900	850	850	800	450	275	F
	950	1000	1000	1000	900	525	325	G
Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )	70	160	40	4	30	3	0,5	A
	90	200	100	10	40	6	1,5	B
	110	240	160	16	50	9	2,5	C
	130	280	220	22	60	12	3,5	D
	150	320	280	28	70	15	4,5	E
	170	360	340	34	80	18	5,5	F
	190	400	400	40	90	21	6,5	G

SE: solução-estoque; EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Foram construídos Gráficos para cada uma das triplicatas das amostras e das referências, onde a abscissa correspondeu à concentração final no tubo de reação (em  $\mu\text{g/mL}$ ), e a ordenada à absorbância corrigida pelo branco, e calculadas as equações e o  $R^2$  através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os valores da  $CE_{50}$ , que representam a concentração na qual a absorbância corresponde a 50% ou 0,500, foram calculados em  $\mu\text{g/mL}$ , substituindo-se o  $y$  da equação por 0,5. Os resultados foram representados como média  $\pm$  desvio-padrão entre as triplicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 5.01, considerando valores de  $p < 0,05$  estatisticamente significativos.

### 4.6.3 Teste da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante pelo teste da cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizada pelo método descrito por Koleva et al. (2002).

Foi preparada uma solução de  $\beta$ -caroteno (1,0 mg) em clorofórmio (5,0 mL). Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1 mL dessa solução, 25  $\mu$ L de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado à vácuo em Rotavapor, à temperatura de 40°C. Em seguida, foram adicionados ao balão, lentamente e sob agitação constante, 50 mL de água destilada oxigenada por borbulhamento de ar por 15 minutos. A emulsão obtida ( $\beta$ -caroteno/ácido linoleico) foi preparada imediatamente antes do experimento.

SE's das amostras de *B. forficata* (EE, FH, FD, FA e FB) e das referências [hidroxitolueno butilado (BHT), rutina e quercetina] foram preparadas utilizando etanol como solvente e banho ultrassônico com aquecimento por 30 minutos nas seguintes concentrações: amostras a 2,5 mg/mL e referências a 0,1 mg/mL. A partir das SE's, foram preparadas diluições em etanol de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8 – Concentrações das soluções-estoque e diluições para o ensaio do  $\beta$ -caroteno

Amostra ou referência	EE	FH	FD	FA	FB	BHT	Rutina	Quercetina
Concentração	250	250	250	250	250			
diluições	500	500	500	500	500	25	25	25
( $\mu$ g/mL)	1000	1000	1000	1000	1000			

EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

A cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços, foram adicionados 250  $\mu$ L da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e 30  $\mu$ L da diluição das amostras ou referências. O branco constituiu-se em 280  $\mu$ L de etanol e o controle negativo em 250  $\mu$ L da emulsão acrescidos de 30  $\mu$ L de etanol. Amostras, referências, branco e controle negativo foram testados em triplicata.

Foram realizadas leituras das absorbâncias em leitor de microplacas no comprimento de onda 492 nm imediatamente ( $t_0$ ) e em intervalos de 15 minutos até 105 minutos ( $t_{105}$ ), obtendo-se ao final oito leituras ( $t_0$ ,  $t_{15}$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{45}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{75}$ ,  $t_{90}$  e  $t_{105}$ ). Durante os intervalos, a placa foi incubada em banho-maria a 50°C.

A partir das leituras obtidas, foram construídos Gráficos do decaimento da absorbância em função do tempo e determinada a porcentagem de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno, ou porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I) pela seguinte equação:

$$\%I = \left[ \frac{(A \text{ controle } t0 - A \text{ controle } t105) - (A \text{ amostra } t0 - A \text{ amostra } t105)}{(A \text{ controle } t0 - A \text{ controle } 105)} \right] \times 100$$

Onde *A controle* corresponde à absorbância do controle negativo e *A amostra* ao extrato (EE), frações (FH, FD, FA e FB) e referências (BHT, rutina e quercetina) nos tempos 0 ( $t_0$ ) e 105 ( $t_{105}$ ). Os resultados da %I foram representados como média  $\pm$  desvio-padrão entre as triplicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 5.01, considerando valores de  $p < 0,05$  estatisticamente significativos.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>) empregando o método de microdiluição em caldo, segundo as recomendações descritas nos documentos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012, 2013).

Para os procedimentos microbiológicos foram utilizadas amostras de referência, da *American Type Culture Collection* (ATCC), na segunda passagem, obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. Foram testadas as seguintes amostras representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos:

- *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 10536<sup>TM</sup>);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 9027<sup>TM</sup>);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>TM</sup>);
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC<sup>®</sup> 13311<sup>TM</sup>);
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* (ATCC<sup>®</sup> 10708<sup>TM</sup>);
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC<sup>®</sup> 6538<sup>TM</sup>);
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC<sup>®</sup> 29213<sup>TM</sup>);

Durante o texto, os termos adotados para referenciar as cepas descritas anteriormente serão, na mesma ordem, os seguintes:

- *E. coli* ATCC 10536;
- *P. aeruginosa* ATCC 9027;
- *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- *S. typhimurium* ATCC 13311;
- *S. enterica* ATCC 10708;
- *S. aureus* ATCC 6538;
- *S. aureus* ATCC 29213;

As cepas bacterianas de referência foram armazenadas como suspensões densas em solução contendo leite desnatado a 10% (p/v) acrescido de glicerol a 10% (v/v) (solução LDG). A suspensão de cada amostra foi preparada diretamente em 1,0 mL de solução LDG distribuída previamente em microtubos plásticos próprios para congelamento. Após o crescimento por 24 horas, os tubos foram mantidos a 20°C negativos e retirados no dia do preparo do inóculo a ser utilizado nos testes de atividade antibacteriana.

#### **4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>)**

Para a determinação da CIM<sub>100</sub> foi utilizado o método de microdiluição em caldo conforme preconizado pelo CLSI (CLSI, 2012) com pequenas adaptações.

As SE's das amostras (EE, FH, FD, FA e FB) e dos agentes antibacterianos (ampicilina e cloranfenicol) foram preparadas com os sistemas solvente/diluyente demonstrados na Tabela 9. Os solventes e diluentes usados no preparo das SE's dos agentes antibacterianos foram os preconizados pelo CLSI (CLSI, 2013). Já no preparo das SE's das amostras, água destilada foi escolhida por ser o solvente universal e dimetilsulfóxido (DMSO) por demonstrar boa solubilidade em todas as amostras, respeitando-se o limite preconizado pelo CLSI de 1% de DMSO no poço da microplaca (CLSI, 2013).

Tabela 9 – Preparo das soluções-estoque para o teste de microdiluição em caldo

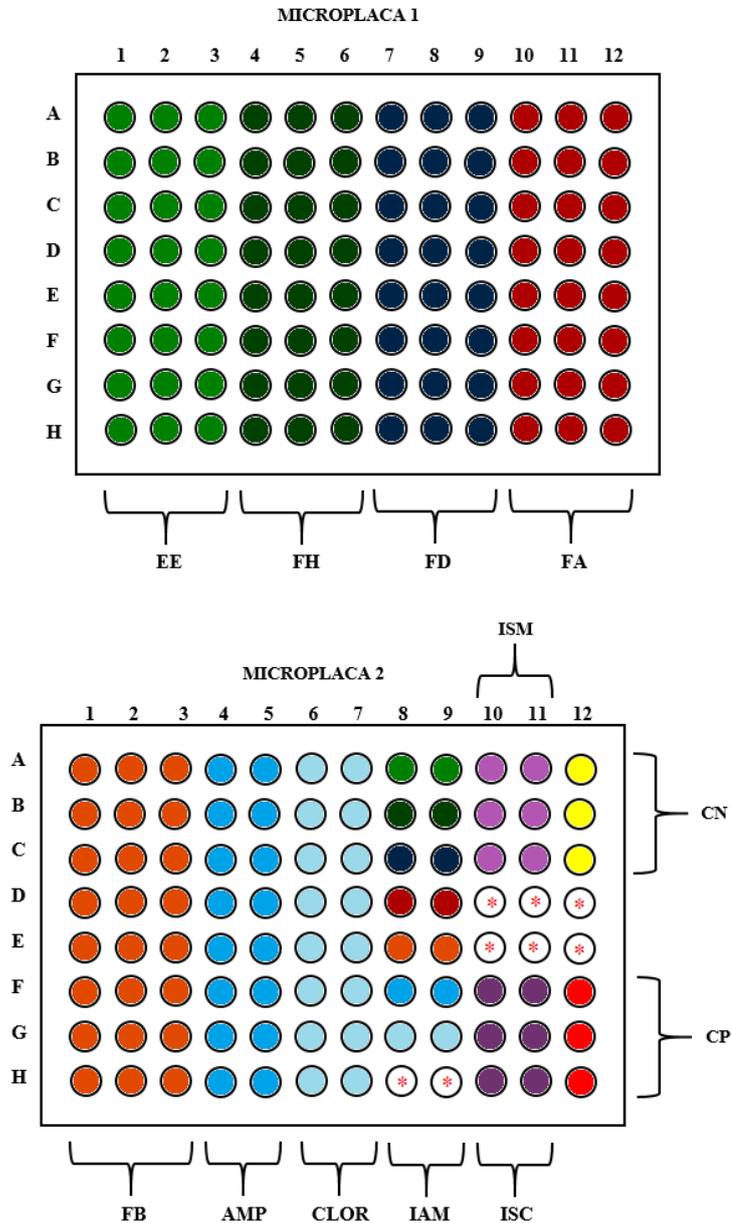
	Solvente	Diluyente	Concentração final (mg/mL)
Amostras	DMSO	Água destilada estéril	12,5
Ampicilina	Tampão fosfato 0,1 M pH 8,0	Tampão fosfato 0,1 M pH 6,0	1,25
Cloranfenicol	Etanol 95%	Água destilada estéril	1,25

Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

As cepas bacterianas de referência foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton (AMH) através da técnica de esgotamento em superfície. Após a semeadura, essas culturas foram incubadas a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, por 16 a 18 horas. Para o preparo das suspensões bacterianas utilizadas no teste, cinco Unidades Formadoras de Colônia (UFC) desta placa foram transferidas para um tubo de ensaio com tampa de rosca contendo 4 mL de solução salina estéril (0,85 a 0,90% de NaCl) e comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland (CLSI, 2012).

Para a realização do teste, foram utilizadas duas microplacas de 96 poços (microplacas 1 e 2) para cada cepa bacteriana de referência. A microplaca 1 continha as amostras EE, FH, FD e FA, e a microplaca 2, a amostra FB, os agentes antibacterianos (ampicilina e cloranfenicol) e os controles do teste (Figura 11).

Figura 11 – Imagem ilustrativa das microplacas 1 e 2 utilizadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>) por meio do método de microdiluição em caldo



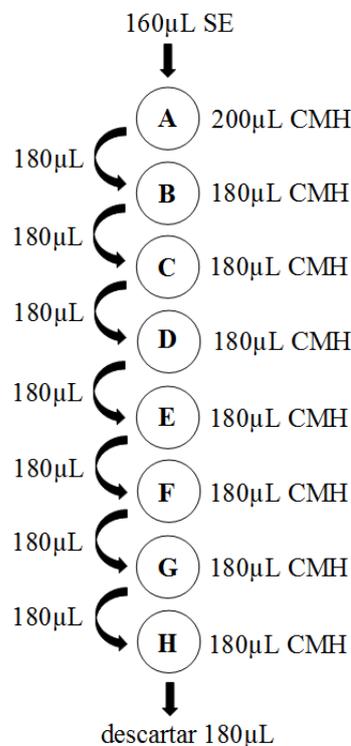
EE: extrato etanólico, FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol; AMP: ampicilina; CLOR: cloranfenicol; IAM: interferência das amostras sobre o meio; ISM: interferência dos solventes sobre o meio; ISC: interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o crescimento; CN: controle negativo; CP: controle positivo; \*: poço vazio.

Fonte: Adaptado de TEMPONI, 2012.

Para a realização do teste com as amostras e os agentes antibacterianos, foram realizadas diluições seriadas diretamente nas microplacas (Figura 12), obtendo-se concentrações de 39,06 µg/mL a 5 mg/mL e 3,91 a 500 µg/mL, respectivamente. Para isso,

foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de caldo Müeller-Hinton (CMH) aos poços da fileira A e 180  $\mu\text{L}$  de CMH aos demais poços (fileiras B a H). Em seguida, foram adicionados 160  $\mu\text{L}$  das SE's aos poços contendo 200  $\mu\text{L}$  de CMH. Após homogeneização, foram transferidos 180  $\mu\text{L}$  da fileira A para a B, e assim sucessivamente até a fileira H. Dos poços da fileira H foram descartados 180  $\mu\text{L}$ , remanescendo 180  $\mu\text{L}$  em todos os poços. O volume final foi completado para 200  $\mu\text{L}$  com 20  $\mu\text{L}$  das suspensões bacterianas previamente padronizadas.

Figura 12 – Imagem ilustrativa do procedimento de diluição seriada realizada nos poços de A a H de uma microplaca



SE: solução-estoque; CMH: caldo Müeller-Hinton. Fonte: Adaptado de TEMPONI, 2012.

Os controles do teste foram preparados da seguinte forma:

- Interferência das amostras sobre o meio: 200  $\mu\text{L}$  de CMH, 180  $\mu\text{L}$  da SE, homogeneização e descarte de 180  $\mu\text{L}$ ;
- Interferência dos sistemas solvente/diluyente sobre o meio: 200  $\mu\text{L}$  de CMH, 180  $\mu\text{L}$  do solvente SE, homogeneização e descarte de 180  $\mu\text{L}$ ;
- Interferência dos solventes sobre o crescimento: 200  $\mu\text{L}$  de CMH, 180  $\mu\text{L}$  do solvente, homogeneização, descarte de 180  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana;

- Controle negativo: 180  $\mu$ L de CMH e 20  $\mu$ L de salina estéril;
- Controle positivo: 180  $\mu$ L de CMH e 20  $\mu$ L da suspensão bacteriana.

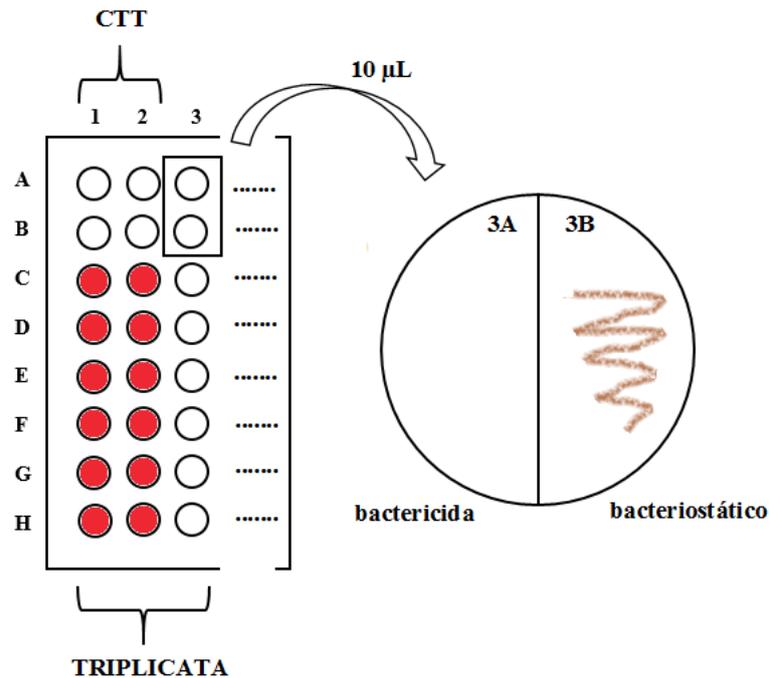
Os testes das amostras, agentes antibacterianos e controles foram realizados simultaneamente. Após incubação por 16 a 20 horas, a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, foi realizada a leitura das microplacas pela observação da presença ou ausência de turbidez indicativa de crescimento bacteriano. Para melhor visualização dos resultados, foram adicionados 10  $\mu$ L de solução de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 1 mg/mL sobre todos os poços de duas das triplicatas ou uma das duplicatas de cada amostra, composto de referência e controle e, em seguida, incubou-se as microplacas por mais 30 minutos. Após incubação, os poços que apresentaram coloração avermelhada indicaram crescimento bacteriano e os que mantiveram a cor original, ausência de crescimento. A CIM<sub>100</sub> foi, então, determinada como a menor diluição que apresentou 100% de inibição da cepa testada.

#### **4.7.2 Determinação do Efeito Bactericida ou Bacteriostático e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com o método descrito por Andrews (2001).

A partir das colunas das microplacas do ensaio anterior que não receberam solução de CTT, foram retiradas alíquotas de 10  $\mu$ L dos poços correspondentes àqueles onde não foi observado crescimento bacteriano. Essas alíquotas foram, então, estriadas em placas de Petri contendo AMH previamente identificadas com os poços de origem na microplaca (Figura 13). Após incubação por 18 a 20 horas em aerobiose em estufa a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , foi observada a presença ou ausência de crescimento de colônias. Assim, as concentrações do extrato ou frações que permitiram o desenvolvimento bacteriano no AMH foram definidas como bacteriostáticas e as que não permitiram o crescimento, bactericidas.

Figura 13 – Imagem ilustrativa do procedimento para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e avaliação do efeito farmacológico



CTT: Cloreto de trifeniltetrazólio. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

Os estudos de genotoxicidade foram realizados em parceria com o Laboratório de Nutrigenômica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto.

##### 4.8.1 Linhagem celular e condições de cultura

Foi utilizada a linhagem celular HepG2, isolada de um hepatocarcinoma humano, obtida da ATCC. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>, em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C. As culturas foram mantidas em meio DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino e mistura de antibióticos penicilina/estreptomicina 1%. O meio de cultura foi renovado a cada dois ou três dias, e o repique das culturas realizado quando as células atingiram uma confluência entre 80 a

90%. As células utilizadas nos experimentos estavam entre a 3<sup>a</sup> e a 9<sup>a</sup> passagem após o descongelamento.

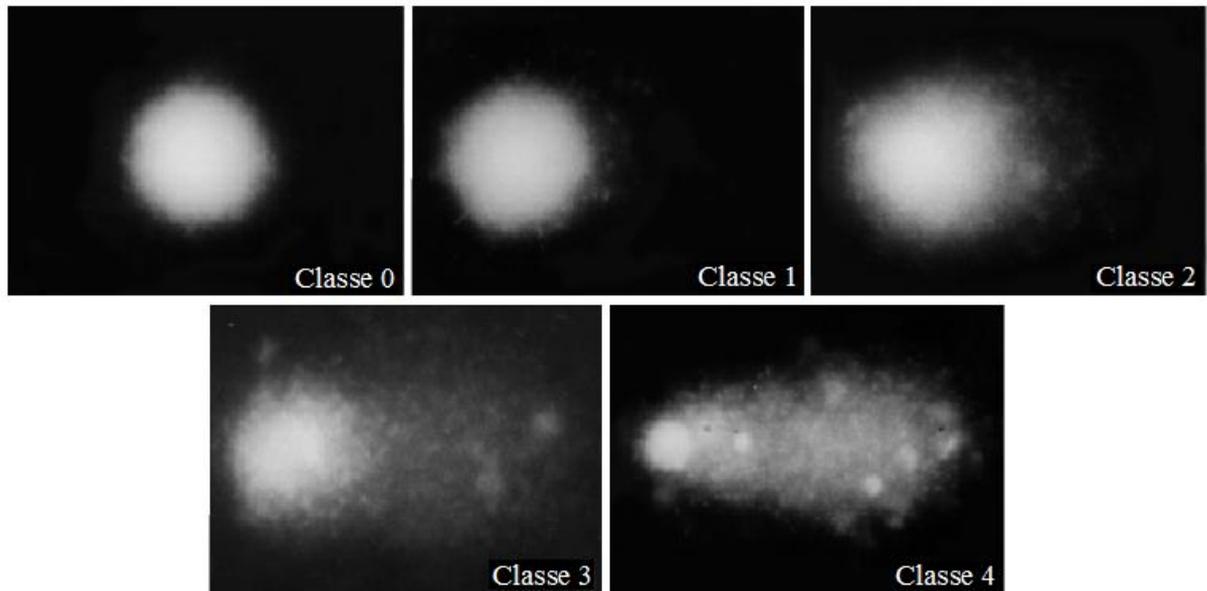
#### **4.8.2 Ensaio de eletroforese em gel de célula única (Ensaio do Cometa)**

As células HepG2 foram tratadas com três diferentes concentrações do EE (25, 125 e 250 µg/mL) e incubadas por 3 horas. Após o tempo de tratamento, a viabilidade celular das culturas foi avaliada pela técnica de exclusão por azul de tripan. Foram submetidas ao ensaio do cometa apenas os tratamentos que apresentaram viabilidade celular superior a 70%. Também foi realizado o controle negativo contendo meio de cultura sem EE, nas mesmas condições descritas para o tratamento.

O ensaio do cometa foi realizado segundo a metodologia proposta por Singh e colaboradores (1988) e Tice e colaboradores (2000). Para a realização do ensaio foram homogeneizados 20 µL de suspensão celular e 80 µL de agarose com baixo ponto de fusão, e adicionados 60 µL dessa mistura sobre uma lâmina preparada com agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram cobertas com lamínulas e armazenadas a 4°C por 20 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mergulhadas na solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris adicionado de 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO, pH 10) recém-preparada por 24 horas. Após a lise, as lâminas foram imersas em solução alcalina por 20 minutos a 4°C. Após esse período, as lâminas foram submetidas à eletroforese, conduzida em solução alcalina (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos com voltagem e amperagem constantes (25V/300mA). Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos e mantidas em temperatura ambiente até a secagem. Depois de secarem a temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 2 minutos.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídio (20 µg/mL) e examinadas em microscópio de fluorescência, usando filtro 516 – 560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 40X. A análise “duplo-cego” se baseou na observação visual das lâminas e caracterização dos nucleoides em cinco classes (Figura 14), de acordo com o tamanho e a intensidade da cauda, correspondendo à classe 0 nenhum dano detectável e à classe 4 o dano máximo. Em cada lâmina foram analisados aleatoriamente 100 nucleoides.

Figura 14 – Fotomicrografias representativas das cinco classes de dano de nucleoides observadas no ensaio do cometa



Nucleoides apresentados em aumento de 200 x. Fonte: Adaptado de SILVA, J. et al., 2000.

Para cada tratamento com o extrato, bem como para o controle negativo, foram realizados três experimentos com duas lâminas cada, totalizando 6 lâminas por tratamento. Após a leitura das lâminas, foi calculado o Índice de Dano (ID) de cada experimento conforme a seguinte equação:

$$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$$

Onde  $n_0$ ,  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$ , e  $n_4$  correspondem à média (entre as duas lâminas de cada experimento) do número de nucleoides classificados como 0, 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

O ID de cada tratamento foi representado como média  $\pm$  desvio-padrão entre os três experimentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 5.01, considerando valores de  $p < 0,05$  estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

As folhas de *B. forficata* foram submetidas à maceração até a obtenção de 100 g de extrato etanólico (EE). O EE assim obtido foi ressuspenso em etanol: água (1:9) e submetido à partição líquido/líquido com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol para obtenção das frações. Para isso, foram utilizados 78,36 g do EE em três partições. A massa e o rendimento totais das frações obtidas nos três processos de partição líquido/líquido são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Massa e rendimento total das frações obtidas por meio da partição do extrato etanólico de *Bauhinia forficata*

Fração	Massa (em gramas)	Rendimento (em porcentagem)
FH	24,12	30,78
FD	5,41	6,90
FA	3,58	4,57
FB	20,55	26,22

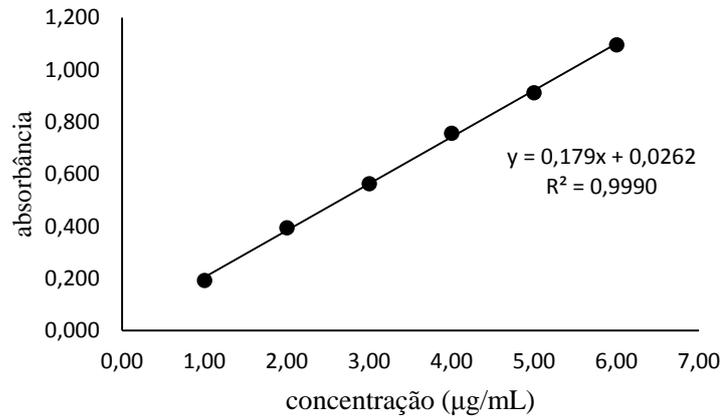
FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

### 5.1 TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os teores de fenóis solúveis e flavonoides totais do EE e das frações FH, FD, FA e FB foram calculados a partir das curvas de calibração do ácido gálico e da rutina, respectivamente. Substituindo-se o valor da absorbância da amostra no *y* da equação da reta, foi obtida uma concentração que, considerando o fator de diluição nas etapas do ensaio, foi ajustada em miligramas equivalentes de ácido gálico, ou de rutina, por grama de amostra (mg/g EAG ou mg/g ER).

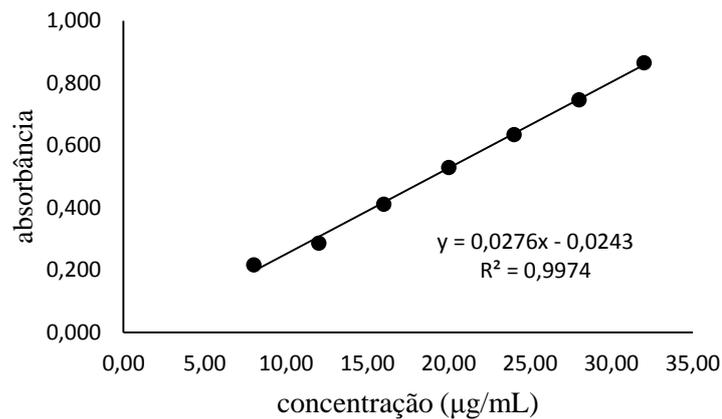
As curvas de calibração do ácido gálico e da rutina são mostradas nas Figuras 15 e 16. Após análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtiveram-se as equações da reta dos padrões, sendo  $y = 0,179x + 0,0262$ , com  $R^2 = 0,9990$  para o ácido gálico, e  $y = 0,0276x - 0,0243$  com  $R^2 = 0,9974$  para a rutina.

Figura 15 – Curva de calibração do ácido gálico



Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Figura 16 – Curva de calibração da rutina



Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Os teores de fenóis solúveis e flavonoides totais em *B. forficata* são apresentados na Tabela 11. Os valores variaram de 9,20 a 87,35 mg/g EAG e de 2,51 a 56,76 mg/g ER, respectivamente, e foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Entre todas as amostras analisadas, observa-se que FH revelou o menor teor de fenóis e flavonoides. Por outro lado, a FA foi a mais rica em substâncias fenólicas e flavonoides em relação às demais amostras testadas.

Tabela 11 – Teor de fenóis e flavonoides totais em mg/g equivalentes de ácido gálico e rutina

Extrato ou fração	Teor de fenóis solúveis totais	Teor de flavonoides totais
	(mg/g EAG)	(mg/g ER)
EE	28,95 ± 0,08	20,22 ± 0,62
FH	9,20 ± 0,87	2,51 ± 0,06
FD	11,53 ± 0,23	3,74 ± 0,61
FA	87,35 ± 0,92	56,76 ± 0,81
FB	34,30 ± 1,02	17,47 ± 0,14

FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Os valores correspondem à média ± desvio-padrão. As médias são diferentes entre si em cada ensaio após análise de variância ANOVA seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

## 5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.2.1 Métodos do Sequestro do Radical DPPH• e do Poder de Redução

A atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *B. forficata* foi avaliada pelos métodos do sequestro do radical livre DPPH• e do poder de redução ou poder antioxidante de redução do ferro. Os valores da CE<sub>50</sub> das amostras (EE, FH, FD, FA e FB) e das referências (rutina e ácido ascórbico) em ambos os testes foram calculados a partir da equação da reta, construída através da análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, substituindo-se o valor de *y* por 0,5.

A Tabela 12 apresenta os valores da CE<sub>50</sub> das amostras e referências testadas pelos dois métodos. No ensaio do DPPH•, as amostras de *B. forficata* apresentaram um valor de CE<sub>50</sub> entre 27,95 ± 0,33 e 193,62 ± 1,12 µg/mL, correspondendo o menor valor à FA e o maior, à FH. Já no ensaio do poder de redução, os valores de CE<sub>50</sub> das amostras variaram de 21,12 ± 0,52 a 328,45 ± 3,23 µg/mL, sendo o primeiro referente à FA e o segundo, à FD. Dessa forma, FA demonstrou os melhores resultados entre os dois métodos, visto que quanto menor o valor da CE<sub>50</sub>, maior atividade antioxidante. Todos os valores foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tabela 12 – Resultados de Concentração Efetiva 50% pelos ensaios do DPPH• e poder de redução

Amostra ou referência	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	
	DPPH•	Poder de redução
Rutina	9,45 ± 0,01	8,96 ± 0,05
Ácido ascórbico	6,03 ± 0,02	3,91 ± 0,06
EE	84,56 ± 0,26	85,07 ± 2,12
FH	193,62 ± 1,12	289,06 ± 2,30
FD	125,01 ± 0,48	328,45 ± 3,23
FA	27,95 ± 0,33	21,12 ± 0,52
FB	75,17 ± 0,74	51,01 ± 0,50

CE<sub>50</sub>: concentração efetiva 50%; EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Os valores correspondem à média ± desvio padrão. As médias são diferentes entre si em cada ensaio após ANOVA seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

### 5.2.2 Método da cooxidação do β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante de *B. forficata* também foi avaliada pelo ensaio da cooxidação do β-caroteno/ácido linoleico. Nesse ensaio, observa-se o decaimento das absorvâncias em função do tempo em decorrência da oxidação do β-caroteno. Quanto menor o decaimento, menor a oxidação do β-caroteno e, assim, maior a inibição da peroxidação lipídica.

As Figuras 17, 18 e 19 mostram a média (triplicata) dos valores das leituras das absorvâncias obtidas nos tempos  $t_0$ ,  $t_{15}$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{45}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{75}$ ,  $t_{90}$  e  $t_{105}$  para as amostras (EE, FH, FD, FA e FB) nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL, nessa ordem. Também são ilustradas nessas três Figuras as referências (BHT, rutina e quercetina), correspondendo em todas à concentração única de 25 µg/mL, bem como o controle negativo (CN).

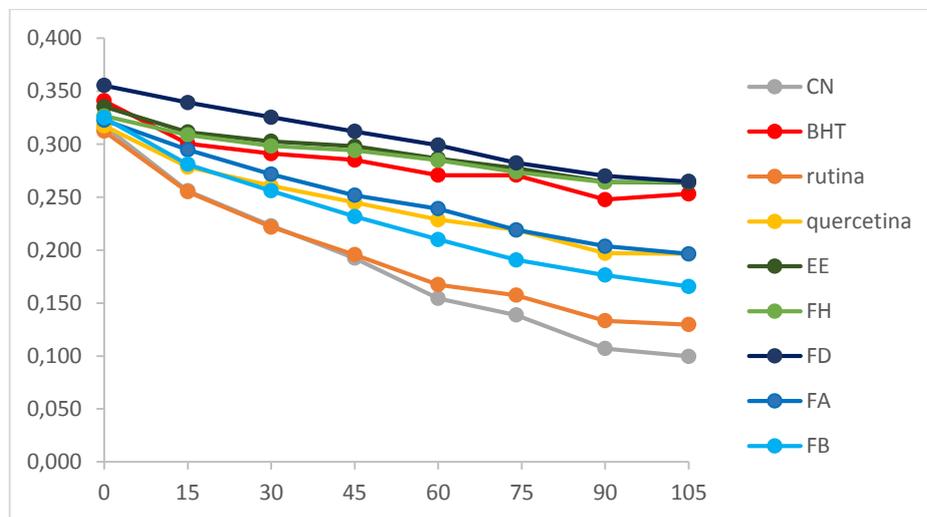
Pela análise das Figuras, observa-se que, entre as referências, BHT foi a que apresentou o menor decaimento, demonstrando grande atividade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica. A rutina, por outro lado, foi a que demonstrou o maior decaimento, expressando fraco potencial através desse ensaio.

Na concentração de 250 µg/mL (Figura 17), nota-se que as amostras EE, FH e FD apresentaram os menores decaimentos, de forma equivalente ao BHT. FA e FB demonstraram maior decaimento, semelhantemente às outras referências.

Na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 18), o padrão entre as amostras se alterou, visto que FD, EE e FH apresentaram os menores decaimentos, nessa ordem, inclusive em relação ao BHT.

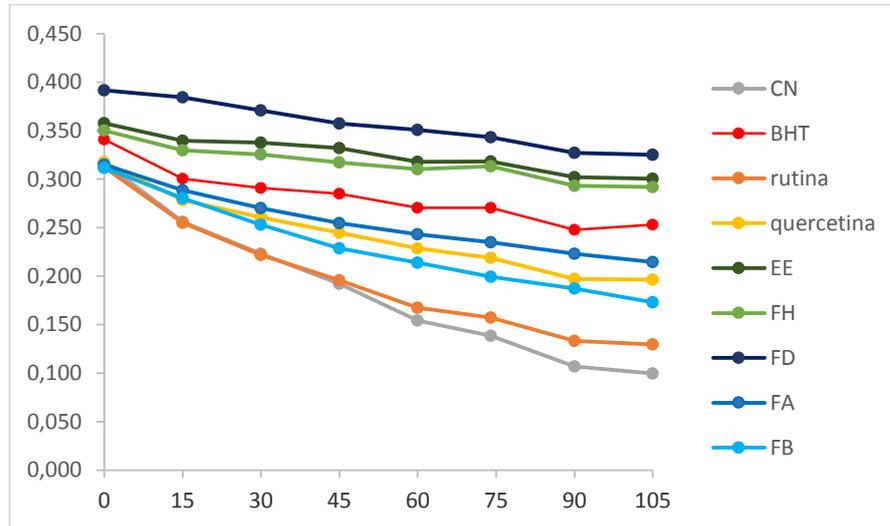
Na maior concentração testada, de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19), apenas a FB entre as amostras apresentou maior decaimento em relação ao BHT, ou seja, todas as demais exibiram grande inibição da peroxidação lipídica.

Figura 17 – Decaimento da absorbância em função do tempo pelo método da cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para as substâncias de referência e amostras na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$



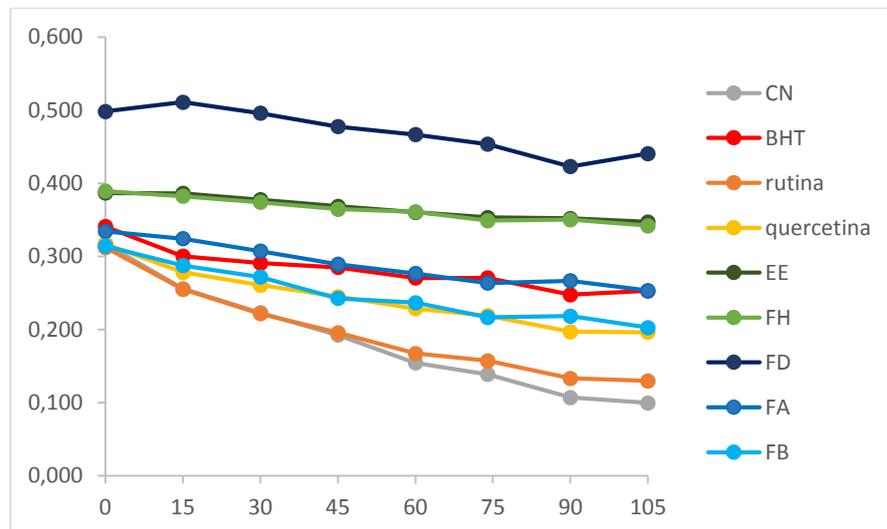
Os valores correspondem à média das absorbâncias lidas em triplicata. CN: controle negativo; EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Figura 18 – Decaimento da absorbância em função do tempo pelo método da cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para as substâncias de referência e amostras na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$



Os valores correspondem à média das absorbâncias lidas em triplicata. CN: controle negativo; EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Figura 19 – Decaimento da absorbância em função do tempo pelo método da cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para as substâncias de referência e amostras na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$



Os valores correspondem à média das absorbâncias lidas em triplicata. CN: controle negativo; EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

A Tabela 13 apresenta os resultados da porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I) para amostras e referências nas concentrações testadas. Entre as substâncias de

referência, todas testadas apenas na concentração de 25 µg/mL, BHT foi o que apresentou maior inibição com  $67,23 \pm 2,07$ , seguido da quercetina e, por último, a rutina, com %I de  $14,55 \pm 2,00$ . Entre as amostras, na menor concentração testada, de 250 µg/mL, os maiores valores de %I foram da FH e do EE, seguidos por FD, FA e FB. Nessa concentração, FH e EE foram estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ) entre si e entre o BHT, e FA também não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a quercetina. Na concentração intermediária, de 500 µg/mL, EE, FH e FD apresentaram %I próximos a 70%, cujos valores foram semelhantes ( $p < 0,05$ ) ao do BHT. FA demonstrou inibição da peroxidação lipídica superior à da quercetina e FB apresentou um valor de %I estatisticamente semelhante ( $p < 0,05$ ) a essa substância de referência. Na maior concentração testada para as amostras, de 1000 µg/mL, EE e FH se destacaram com percentuais de inibição em torno de 80%, cujos valores de %I foram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) superiores ao do BHT (25 µg/mL), ao passo que FD e FA mostraram resultados estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ) à essa referência e FB à quercetina (25 µg/mL).

Tabela 13 – Resultados da porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I) pelo ensaio do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Amostra ou Referência	% I			
	25 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
EE	ND	$67,07 \pm 1,48^a$	$73,66 \pm 3,91^a$	$81,93 \pm 3,45^c$
FH	ND	$71,52 \pm 0^a$	$73,20 \pm 2,26^a$	$78,26 \pm 1,59^c$
FD	ND	$58,35 \pm 2,61$	$69,53 \pm 2,12^a$	$73,51 \pm 3,71^{a,c}$
FA	ND	$41,96 \pm 2,31^b$	$53,91 \pm 1,91$	$62,79 \pm 2,43^a$
FB	ND	$26,80 \pm 2,26$	$36,30 \pm 5,38^b$	$48,70 \pm 5,08^b$
BHT	$67,23 \pm 2,07^a$	ND	ND	ND
Rutina	$14,55 \pm 2,00$	ND	ND	ND
Quercetina	$44,41 \pm 3,02^b$	ND	ND	ND

%I: porcentagem de inibição; EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol; ND: não determinado. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão. Letras iguais associam amostras ou referências cujas médias não foram diferentes entre si após análise de variância ANOVA seguida do pós-teste de Tukey para  $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

### 5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os valores de Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>), obtidos pelo método da microdiluição em caldo, do EE e das frações FH, FD, FA e FB de *B. forficata* e dos agentes antibacterianos estão representados nas Tabelas 14 e 15, respectivamente. Nas condições do ensaio, apenas a FA apresentou atividade, inibindo o crescimento bacteriano das duas cepas de *S. aureus* testadas. EE e demais frações (FH, FD e FB) apresentaram valor de CIM<sub>100</sub> maior que 5 mg/mL frente a todos os micro-organismos testados. Os agentes antibacterianos apresentaram valores de CIM<sub>100</sub> compatíveis com o preconizado pelo documento M100-S23 do CLSI (2013). Os controles do teste não demonstraram interferência nos resultados.

Tabela 14 – Valores de Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>) determinados por microdiluição em caldo para amostras

Micro-organismo	CIM <sub>100</sub> (mg/mL)				
	EE	FH	FD	FA	FB
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 5	> 5	> 5	2,5	> 5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	> 5	> 5	> 5	5	> 5
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>S. enterica</i> ATCC 10708	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>E. coli</i> ATCC 10536	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5

EE: extrato etanólico; FH: fração em *n*-hexano; FD: fração em diclorometano; FA: fração em acetato de etila; FB: fração em *n*-butanol. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Tabela 15 – Valores de Concentração Inibitória Mínima 100% (CIM<sub>100</sub>) determinados por microdiluição em caldo para agentes antibacterianos

Micro-organismo	CIM <sub>100</sub> (µg/mL)	
	AMP	CLOR
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	≤ 3,91 <sup>a</sup>	7,81 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	≤ 3,91	≤ 3,91
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	7,81	≤ 3,91
<i>S. enterica</i> ATCC 10708	≤ 3,91	≤ 3,91
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 500 <sup>c</sup>	> 500 <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	> 500	125
<i>E. coli</i> ATCC 10536	≤ 3,91 <sup>d*</sup>	≤ 3,91 <sup>d*</sup>

AMP: ampicilina; CLOR: cloranfenicol. Os valores da CIM<sub>100</sub> dos agentes antibacterianos estão de acordo com o estabelecido pelo CLSI (2013), onde a: 0,5 a 2; b: 2 a 16; c: não responde; d: 2 a 8. \*: Valores de CIM<sub>100</sub> estabelecidos pelo CLSI (2013) para *E. coli* ATCC 25922. Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

Alíquotas dos poços das concentrações da FA que inibiram o crescimento bacteriano no ensaio de microdiluição em caldo foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton para avaliar se o efeito foi bactericida ou bacteriostático (Tabela 16) e, assim, determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM). A Tabela 16 mostra que os valores de CIM<sub>100</sub> para as duas cepas de *S. aureus* refletiram efeito bacteriostático. Dessa forma, os valores de CBM contra *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* ATCC 6538 foram de 5 mg/mL e > 5 mg/mL, respectivamente.

Tabela 16 – Efeito farmacológico da fração em acetato de etila de *Bauhinia forficata*

Micro-organismo	Concentração (mg/mL)	Efeito
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2,5	Bacteriostático
	5	Bactericida
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5	Bacteriostático
	> 5	Bactericida

Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

## 5.4 GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade do EE das folhas de *B. forficata* foi avaliada através do ensaio do cometa em condições alcalinas utilizando células HepG2. Apenas as células com viabilidade superior a 70% após tratamento e incubação foram submetidas ao ensaio. A Tabela 17 apresenta os resultados da viabilidade celular avaliada pela técnica de exclusão por azul de tripan para o controle negativo (CN) e tratamentos com EE nas três concentrações testadas (25, 125 e 250 µg/mL).

Tabela 17 – Viabilidade celular avaliada pela técnica de exclusão por azul de tripan

Tratamento	Viabilidade (em %)
CN	96
EE 250 µg/mL	92
EE 125 µg/mL	98
EE 25 µg/mL	97

CN: controle negativo; EE: extrato etanólico.

Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

A Tabela 18 apresenta a distribuição das classes de dano observadas nas três concentrações testadas com o EE (25, 125 e 250 µg/mL) e no controle negativo (CN). Os dados do CN revelam o predomínio de nucleoides das classes 0 e 1, representando cerca de 80%. Da mesma forma, na menor concentração testada para o extrato (25 µg/mL), há a prevalência de nucleoides nessas duas classes, correspondendo a mais de 70% do total de nucleoides. Na concentração intermediária (125 µg/mL), a proporção de nucleoides nas classes 0 e 1 diminui para menos de 20%, predominando as classes 2 e 3, representando quase 75%. Na maior concentração (250 µg/mL), observa-se um baixo percentual de nucleoides nas classes 0 e 1 (cerca de 2%) e um predomínio das classes 3 e 4, correspondendo juntas a cerca de 80%. Assim, os resultados dos tratamentos com o EE revelam um aumento das classes de danos ao DNA à medida que a concentração é aumentada.

Tabela 18 – Distribuição das classes de dano ao DNA observadas nos tratamentos realizados pelo ensaio do cometa

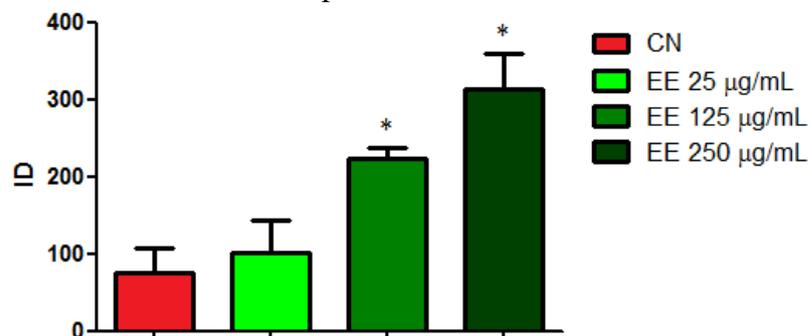
Tratamento	Classe de dano				
	0	1	2	3	4
CN	43,83 ± 37,14	40,17 ± 22,73	12,83 ± 12,75	2,83 ± 3,33	0,17 ± 0,29
EE 25 µg/mL	47,94 ± 27,96	23,50 ± 2,60	13,44 ± 10,36	10,22 ± 9,75	4,89 ± 5,36
EE 125 µg/mL	2,13 ± 1,55	15,00 ± 6,27	49,92 ± 13,14	24,42 ± 15,34	9,04 ± 5,55
EE 250 µg/mL	0,22 ± 0,38	1,67 ± 2,08	14,33 ± 20,65	34,44 ± 11,04	45,00 ± 32,60

CN: controle negativo; EE: extrato etanólico. Resultados expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

A Figura 20 apresenta os resultados do cálculo do Índice de Dano (ID) para cada tratamento. Os valores de ID do CN e da menor concentração do extrato testada (25µg/mL) foram de  $75,00 \pm 55,97$  e  $100,61 \pm 73,81$ , respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Já nas outras concentrações do extrato, os valores de ID foram de  $224,25 \pm 27,77$  para o tratamento com 125 µg/mL de EE, e de  $313,67 \pm 79,60$  para o tratamento de 250 µg/mL, ambos apresentando diferença estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN.

Figura 20 – Índice de dano calculado para cada tratamento realizado no ensaio do cometa



ID: índice de dano; CN: controle negativo; EE: extrato etanólico. \*: diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao CN. Análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey.

Fonte: ELABORADO PELOS PRÓPRIOS AUTORES, 2014.

## 6 DISCUSSÃO

Um método adequado para a investigação de propriedades químicas e farmacológicas/toxicológicas de plantas medicinais consiste no preparo de um extrato bruto em metanol ou etanol, visando a extração de um grande número de substâncias e sua posterior partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, baseado no fracionamento das substâncias através de suas polaridades. A identificação inicial de possível atividade farmacológica/toxicológica no extrato bruto ou em alguma fração direciona os estudos para um futuro isolamento e identificação de compostos ativos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Assim, o presente estudo teve como objetivos investigar preliminarmente as atividades antioxidante e antibacteriana do extrato etanólico (EE) e das frações em *n*-hexano (FH), em diclorometano (FD), em acetato de etila (FA) e em *n*-butanol (FB) das folhas de *B. forficata*, determinar o conteúdo total de substâncias fenólicas e flavonoídicas no EE e nas frações FH, FD, FA e FB e, finalmente, avaliar o potencial genotóxico do EE.

A quantificação de fenóis totais em equivalentes de ácido gálico (EAG) e de flavonoides totais em equivalentes de rutina (ER) demonstrou que o EE e as frações FH, FD, FA e FB das folhas de *B. forficata* são ricos nessas classes de metabólitos especiais, com valores variando de  $9,20 \pm 0,87$  a  $87,35 \pm 0,92$  mg/g EAG e de  $2,51 \pm 0,06$  a  $56,76 \pm 0,81$  mg/g ER, destacando-se a FA com os maiores teores, sendo que  $FB > EE > FD > FH$ , com FH apresentando o menor conteúdo de fenóis e flavonoides. A diferença de resultados observada entre as amostras pode ser explicada pela polaridade dos solventes usados na extração, que determina diferentes composições dos extratos produzidos com base na solubilidade das substâncias neles presentes (AZMIR et al., 2013). Pelo tipo de extração utilizada, substâncias fenólicas, em especial os flavonoides, devem prevalecer nas frações em acetato de etila e butanol (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), o que corrobora o presente achado. Em um estudo semelhante, Thenmozhi e colaboradores (2012) determinaram o conteúdo total de fenóis e flavonoides nos extratos em acetona/água (70/30, v/v) e em metanol/água (50/50, v/v) em diferentes partes vegetais de *Bauhinia tomentosa* e *Bauhinia malabrica*. Nas folhas, o conteúdo total de substâncias fenólicas e de flavonoides totais variou de  $6 \pm 0,4$  a  $49 \pm 0,1$  mg/g EAG e de  $5,8 \pm 0,4$  a  $20,5 \pm 2$  mg/g ER, respectivamente. O maior conteúdo dessas substâncias entre todas as amostras avaliadas foi encontrado principalmente nos extratos de acetona 70%, demonstrando a estrita relação entre a polaridade do solvente e a composição do extrato (THENMOZHI; MANIAN; PAULSAMY, 2012).

Estudos referentes à composição fitoquímica de *B. forficata* demonstram a presença marcante de flavonoides glicosilados nessa espécie (FERRERES et al., 2012; PINHEIRO et al., 2006; PIZZOLATTI et al., 2003), sendo que essa classe de substâncias fenólicas também predomina no gênero (CECHINEL FILHO, 2009; SALATINO et al., 1999). Em uma pesquisa recente, Ferreres e colaboradores (2012) identificaram 39 flavonoides em amostras autênticas e comerciais de *B. forficata*, sendo os derivados do canferol os mais representativos entre as amostras autênticas, e os da quercetina entre as comerciais.

As substâncias fenólicas são consideradas metabólitos especiais sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal do organismo, mas também em resposta a condições de estresse, como infecções, feridas, radiação UV e outras. Elas compõem um diversificado grupo de substâncias originadas pelas vias do chiquimato ou mista, incluindo fenólicos simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Existe um interesse crescente na pesquisa por substâncias fenólicas de origem vegetal, em especial os flavonoides, por causa dos diversos benefícios que essa classe de metabólitos especiais traz à saúde humana. Muitos dessas substâncias têm demonstrado possuir atividades antioxidante, antibacteriana, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antiviral, anticâncer, bem como capacidade de sequestro de radicais livres e de prevenção de doenças coronarianas e degenerativas (KUMAR; PANDEY, 2013).

Considerando os ensaios antioxidantes, EE e as frações FH, FD, FA e FB apresentaram atividade pelos diferentes mecanismos avaliados. Nos métodos do sequestro do radical DPPH• e do poder de redução do ferro, os valores da CE<sub>50</sub> variaram de 27,95 ± 0,33 a 193,62 ± 1,12 µg/mL e de 21,12 ± 0,52 a 328,45 ± 3,23 µg/mL, respectivamente. Novamente, a FA apresentou os melhores resultados entre as amostras, representados pelos menores valores de CE<sub>50</sub>, demonstrando capacidade de sequestro de radicais livres e de redução de íons Fe<sup>3+</sup>, respectivamente. No método da cooxidação do β-caroteno/ácido linoleico, os valores da %I para as amostras variaram de 26,80 ± 2,26 a 67,07 ± 1,48 na concentração de 250 µg/mL, de 36,30 ± 5,38 a 73,66 ± 3,91 na concentração de 500 µg/mL, e de 48,70 ± 5,08 a 81,93 ± 3,45 na concentração de 1000 µg/mL. Nesse ensaio, a melhor atividade observada foi para EE, FH e FD, cujas %I se mostraram estatisticamente semelhantes ou superiores à da substância de referência BHT a partir da concentração de 500 µg/mL, evidenciando a ação dessas amostras na prevenção da oxidação no meio reacional, seja inibindo a iniciação da peroxidação lipídica, ao neutralizar as ER's oriundas do meio, e/ou sua propagação, ao neutralizar os radicais formados pela oxidação dos lipídeos (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

A atividade da FA verificada nos ensaios do DPPH• e do poder de redução do ferro pode ser explicada pela presença do elevado teor de substâncias fenólicas e de flavonoides, que, reconhecidamente, possuem significativas propriedades antioxidantes e quelantes (HEIM; TAGLIAFERR; BOBILYA, 2002). Por outro lado, o potencial de FH e FD no ensaio do branqueamento do  $\beta$ -caroteno provavelmente se deve à presença de substâncias lipofílicas, visto que, nesse método, o meio reacional se trata de uma emulsão. Dessa forma, substâncias de baixa polaridade, predominantes nessas frações, encontram maior capacidade para permanecerem na interface óleo-água da emulsão, onde ocorre a peroxidação lipídica e, assim, exercem mais facilmente sua ação antioxidante; enquanto que as de maior polaridade, predominantes nas demais frações, solubilizam-se na fase aquosa, gerando diluição e consequente redução da atividade, o que fundamenta a menor atividade de FA e FB (KOLEVA et al., 2002).

A atividade antioxidante de *B. forficata* tem sido relatada em alguns estudos, demonstrando a capacidade de sequestro de radicais DPPH•, ABTS<sup>+</sup>, óxido nítrico e ânion superóxido, tal qual em outros modelos experimentais, como a inibição da atividade enzimática da mieloperoxidase e da peroxidação lipídica e de grupos SH não-proteicos em eritrócitos humanos (ARIGONY, 2005; FERRERES et al., 2012; KHALIL, PEPATO; BRUNETTI, 2008; SALGUEIRO et al. 2013). Dentro do gênero, outras espécies de *Bauhinia* também exibem elevado potencial antioxidante, como *Bauhinia microstachya* (MENEZES; SCHWARZ; SANTOS, 2004), *Bauhinia monandra* (ARGOLO et al., 2004), *Bauhinia racemosa* (KUMAR et al., 2005) e *Bauhinia variegata* (SAYAGO et al., 2013).

Em relação aos ensaios antibacterianos, foi possível detectar atividade da FA frente às duas cepas de *S. aureus* testadas, com valores de CIM<sub>100</sub> de 2,5 mg/mL e 5 mg/mL para *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* ATCC 6538, respectivamente, sendo que essas concentrações revelaram efeito farmacológico do tipo bacteriostático, com CBM de 5 mg/mL e > 5 mg/mL, nessa ordem. Essa diferença de valores de CIM<sub>100</sub> e CBM entre as duas cepas de *S. aureus* testadas, obtidos com a FA, pode ser devida a uma distinção na intensidade da expressão gênica que ambas detém, ou seja, a presença do gene de virulência que codifica a hemolisina do tipo  $\beta$ . *S. aureus* pode albergar diferentes genes de virulência que codificam enterotoxinas estafilocócicas, leucocidinas, esfoliatinas, hemolisinas, toxina 1 da síndrome do choque tóxico, alelos do gene acessório regulador (*agr*) e resistência a antibióticos, sendo que a presença ou ausência desses genes é imprescindível para determinar o potencial de virulência das cepas, existindo uma íntima relação entre virulência e resistência (SPANU et al., 2012). Conforme a descrição constante na ficha do produto da ATCC, *S. aureus* ATCC 29213 produz uma fraca

$\beta$ -hemólise em ágar-sangue de carneiro, enquanto a *S. aureus* ATCC 6538 promove clássica lise de eritrócitos, corroborando os resultados obtidos no presente estudo. Não foi observada atividade antibacteriana do EE e das frações FH, FD e FB na faixa de concentração testada, cujo limite superior foi de 5 mg/mL, frente a esses micro-organismos. Em 2008, Luján e Corral reportaram atividade do extrato aquoso das sementes de *B. forficata* através do método de difusão frente às cepas de *S. aureus* e *M. luteus* (LUJÁN; CORRAL, 2008). Posteriormente, Rocha (2012) descreveu o efeito antibacteriano do extrato hidroalcoólico obtido das folhas dessa espécie vegetal frente a *S. aureus* ATCC 25923 por microdiluição, com valores de CIM e CBM iguais a 12,5 mg/mL (ROCHA, 2012).

No que diz respeito às demais bactérias investigadas, os resultados obtidos neste estudo concordaram com os achados de Luján e Corral (2008) e de Rocha (2012), que também não detectaram atividade antibacteriana de *B. forficata* frente *E. coli* nas concentrações testadas. Adicionalmente, os resultados de CIM > 5 mg/mL obtidos com EE, FH, FD, FA e FB frente *P. aeruginosa* ATCC 27853 se assemelham com os de Alves (2013), cuja CIM foi > 2,0 mg/mL com extrato hidroalcoólico obtido das folhas desta planta medicinal.

Existe vasta literatura abordando a atividade antibacteriana com outras espécies do gênero *Bauhinia*. A atividade contra *S. aureus*, por exemplo, já foi relatada no extrato metanólico das folhas de *B. purpurea*, *Bauhinia vahli*, *Bauhinia galpini* e *Bauhinia roxburghii* (YESHWANTH, 2013), nos extratos aquoso e etanólico das folhas de *Bauhinia tomentosa* (RHAMA; MADHAVAN, 2012), no extrato metanólico das folhas de *Bauhinia purpurea* (NEGI et al., 2012), e nas frações em clorofórmio, acetato de etila e metanol das flores de *Bauhinia alba* e *Bauhinia variegata* (UDDIN; SATTAR; RAUF, 2012).

As principais substâncias responsáveis pelas atividades antimicrobianas das plantas são as de natureza fenólica, como flavonoides e taninos, os alcaloides, os terpenos, os óleos essenciais, as lecitinas e os polipeptídeos (COWAN, 1999). Supõe-se, assim, que a atividade da FA frente às cepas de *S. aureus* se deva à presença de constituintes fenólicos, principalmente dos flavonoides, de forma semelhante às observações de Savi e colaboradores (1996), que encontraram atividade da fração em acetato de etila das folhas de *Bauhinia splendens* contra *Salmonella* sp, *S. typhimurium*, *Streptococcus* sp e *S. aureus*, bem como de Dugasani e colaboradores (2010), que verificaram atividade dessa mesma fração obtida das raízes de *B. tomentosa* e *Bauhinia vahlii* frente *Proteus vulgaris* e *S. aureus*.

O mecanismo da ação antibacteriana dos flavonoides ainda não está totalmente elucidado. Acredita-se, porém, que essa atividade seja devida à atuação em múltiplos alvos celulares e não em um sítio específico (CUSHNIE; LAMB, 2005), como através de dano à

membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição do metabolismo energético, inibição da síntese da parede celular e inibição da síntese da membrana celular (CUSHNIE; LAMB, 2011). Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que, entre as cepas bacterianas utilizadas, apenas as Gram-positivas apresentaram atividade nas concentrações testadas. Esse fato pode ser devido às peculiaridades entre as paredes celulares dos micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, visto que a estrutura relativamente simples e a elevada polaridade da parede daqueles favorece a entrada de substâncias na célula, enquanto a complexidade estrutural da parede desses representa uma maior barreira para a penetração (RANG et al., 2004). Essa mesma observação já foi relatada por Negi e colaboradores (2012), que encontraram eficácia do extrato metanólico obtido das folhas de *Bauhinia purpurea* apenas frente *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, Gram-positivos, e inatividade frente *E. coli*, *Salmonella typhi* e *P. aeruginosa*, Gram-negativos.

Em relação à avaliação da genotoxicidade, foi realizado o ensaio do cometa do EE em condições alcalinas, como método de triagem, utilizando as células HepG2 como modelo de estudo. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar uma indução de dano ao DNA em relação às concentrações de extrato avaliadas. A menor concentração testada (25 µg/mL) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (CN). Entretanto, os demais tratamentos com o EE (125 e 250 µg/mL) induziram um dano significativo quando comparados ao CN ( $p < 0,05$ ).

Embora a população em geral assuma o uso de plantas medicinais como relativamente seguro, seu risco potencial tem sido reconhecido e documentado. A apresentação de dados sobre a genotoxicidade é uma condição prévia para autorização de comercialização e para registro de produtos fitoterápicos em alguns países. No contexto da regulamentação, a avaliação da segurança de um produto à base de planta pode determinar desde a inclusão de informações de segurança no rótulo até a sua retirada do mercado (ABDELMIGID, 2013).

A detecção de dano ao DNA pelo ensaio do cometa é uma indicação de genotoxicidade das substâncias-teste (MENDONÇA et al., 2010). Esse método é uma das ferramentas mais importantes para a avaliação do dano ao DNA com alta sensibilidade, podendo ser aplicado a uma grande variedade de células como método padrão na análise da segurança de novos fármacos (PIPERAKIS, 2009). Vários tipos de dano ao DNA podem ser detectados pela migração do material genético no gel de agarose submetido à eletroforese. A extensão da migração do DNA está diretamente relacionada com o nível de quebras de fita simples ou dupla e sítios álcali lábeis. Adicionalmente, é possível detectar ligações cruzadas no DNA pela observação da diminuição da migração desse ácido nucleico em comparação com células

controle, assim como quebras de fita dupla associadas com sítios de reparo por excisão incompleto (TICE et al., 2000).

As células HepG2, linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano, mantém as atividades de várias enzimas de fase I e fase II (como isoenzimas do citocromo P450, transferases, oxi-redutases), desempenhando um papel essencial na ativação/desintoxicação de pró-mutagênicos/pró-carcinogênicos. Visto que muitos agentes mutagênicos são substâncias inativas, que necessitam da conversão em espécies ativas, o uso dessa linhagem celular, que possui atividade de biotransformação endógena, reflete melhor os efeitos de substâncias genotóxicas no animal do que outros modelos *in vitro* que utilizam misturas de ativação exógena, como as frações da enzima S9 provenientes de roedores. Além disso, as células de origem humana são mais vantajosas para a detecção e a avaliação do risco de produtos ou substâncias que possam induzir danos à saúde do próprio homem (JIN et al., 2009; KNASMÜLLER et al., 1998; SALVADORI; RIBEIRO; NATARAJAN, 1993).

Düsman e colaboradores (2013) relataram ação não-citotóxica e antimutagênica em extratos aquosos obtidos por infusão das partes aéreas de *B. forficata* em um modelo *in vivo*, utilizando o ensaio do micronúcleo em células de medula óssea de ratos Wistar tratados. Semelhantemente, Pepato e colaboradores (2004) avaliaram a toxicidade do decocto das folhas de *B. forficata* através de enzimas conhecidas como marcadores de toxicidade em ratos Wistar normais e com diabetes induzida por estreptozotocina, não constando efeitos tóxicos ao tecido muscular, pâncreas, fígado ou microcirculação renal. Da mesma forma, Volpato e colaboradores (2008) investigaram o efeito da administração de extrato aquoso das folhas de *B. forficata* a ratas prenhas não-diabéticas e com diabetes induzida por estreptozotocina, concluindo que essa administração não foi teratogênica às ratas prenhas não-diabéticas e diminuiu a incidência de anomalias viscerais no grupo diabético tratado comparado diabético não tratado.

Em contrapartida, outras espécies do gênero *Bauhinia* demonstraram genotoxicidade em diferentes modelos experimentais. Santos e colaboradores (2012) avaliaram a genotoxicidade em cinco concentrações (10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) do extrato etanólico e da fração etérea das folhas de *B. platypetala* através do ensaio do cometa em células V79 (provenientes de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês). Esses autores constataram indução de dano ao DNA a partir da concentração de 50 µg/mL para o extrato etanólico, com um índice de dano máximo em torno de 180 na concentração de 200 µg/mL, e em todas as concentrações testadas para a fração etérea, com dano máximo de cerca de 100, também na maior concentração. Macêdo e colaboradores (2008) realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo* para

avaliação da genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do infuso aquoso das folhas de *B. monandra*. Nas concentrações testadas do infuso (0,8, 4, 20 e 100 µg/mL), não foi possível detectar mutagenicidade ou citotoxicidade, mas as concentrações mais elevadas induziram quebra nas ligações fosfodiéster do DNA e formação de sítios abásicos, caracterizando a genotoxicidade.

Estudos de toxicologia genética em plantas medicinais frequentemente demonstram resultados contraditórios, encontrando para o mesmo extrato ou amostra tanto a propriedade mutagênica quanto a antimutagênica. Por vezes, uma alta concentração de um extrato é antimutagênica e uma baixa concentração é mutagênica, ou vice-versa. Dessa forma, não é possível afirmar que o extrato ou a amostra possam ser recomendados ou desaconselhados para uso humano sem que antes seja realizada uma pesquisa intensa, através de metodologias diversas baseadas em diferentes mecanismos, até porque muitos medicamentos anticancerígenos são mutagênicos (VERSCHAEVE; VAN STADEN, 2008).

Com a finalidade de garantir a detecção de um potencial genotóxico, recomenda-se uma bateria de testes de genotoxicidade, visto que um resultado positivo em algum ensaio não necessariamente significa que a amostra analisada possa representar dano genotóxico ou carcinogênico ao homem, bem como reduz o risco de um resultado falso negativo (ABDELMIGID, 2013). Assim, para a confirmação da genotoxicidade do EE das folhas de *B. forficata* faz-se necessária uma avaliação por outros mecanismos, como pelo método do micronúcleo, que detecta danos cromossômicos, e do teste de Ames, que avalia mutação genética.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, foi possível obter as seguintes conclusões:

- O método da maceração em etanol seguido da partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades se mostrou adequado para a extração de substâncias ativas e investigação de efeitos biológicos e genotóxicos das folhas de *B. forficata* Link;
- O extrato etanólico e as frações em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol obtidas das folhas de *B. forficata* Link revelaram a presença de substâncias fenólicas e flavonoides totais, sendo que os maiores teores dessas duas classes de metabólitos especiais foram encontrados na fração em acetato de etila;
- O extrato etanólico e as frações em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol obtidas das folhas de *B. forficata* Link exibiram atividade antioxidante pelos diferentes mecanismos realizados, sendo a fração em acetato de etila a mais expressiva nos métodos do sequestro do radical livre DPPH• e do poder de redução do ferro, enquanto o extrato etanólico e as frações em hexano e em diclorometano expressaram o melhor potencial pela cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico;
- A fração em acetato de etila obtida das folhas de *B. forficata* Link foi ativa frente à de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* ATCC 6538, apresentando valores de CIM<sub>100</sub> e CBM de 2,5 mg/mL e 5 mg/mL e de 5 mg/mL e > 5 mg/mL, respectivamente, demonstrando efeito bacteriostático nas CIMs estabelecidas.
- A atividade antibacteriana da fração em acetato de etila observada nesse estudo é, provavelmente, devida à presença do elevado teor de substâncias fenólicas com propriedades antioxidantes.
- O extrato etanólico obtido das folhas de *B. forficata* Link induziu dano genético significativo às células HepG2 através do ensaio do cometa nas concentrações de 125 e 250  $\mu$ g/mL. Entretanto, esse resultado requer estudos adicionais para a confirmação de seu potencial genotóxico.

## REFERÊNCIAS

- ABDELMIGID, H. M. New trends in genotoxicity testing of herbal medicinal plants. In: GOWDER, S. (Ed.). **New insights into toxicity and drug testing**. InTech, 2013, cap. 5, p. 89-120.
- AHMED, A. S.; ELGORASHI, E. E.; MOODLEY, N.; MCGAWA, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 826-839, 2012.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, E. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana da *Bauhinia forficata* Linn.** 2013. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.
- ANNEGOWDA, H. V.; MORDI, M. N.; RAMANATHAN, S.; HAMDAN, M. R.; MANSOR, S. M. Effect of extraction techniques on phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea*: HPTLC determination of antioxidants. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 226-233, 2012.
- ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 229-233, 2004.
- ARIGONY, A. L. V. **Determinação Química e Biológica de *Bauhinia forficata* Link Subespécie *pruinosa* (pata-de-vaca – Leguminosae).** 2005. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- AVINASH, P.; ATTITALLA, I. H.; RAMGOPAL, M.; CH, S.; BALAJI, M. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of bark extracts of *Bauhinia purpurea*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 9160-9164, 2011.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOONPHONG, S.; PUANGSOMBAT, P.; BARAMEE, 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**, v.70, p.795-801, 2007.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares**, Brasília: Ministério da Saúde, 92 p., 2006.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, Brasília: Ministério da Saúde, 136 p., 2009.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388–392, 2006.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, v.23, p.1347-1354, 2009.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2684-2691, 2011.

CHUAH, E. L.; ZAKARIA, Z. A.; SUHAILI, Z.; ABU BAKAR, S.; DESA, M. N. M. Antimicrobial activities of plant extracts against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 6-13, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests**; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA, 2013.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300, 2000.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 148-173, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1<sup>a</sup> ed. United States of America: American Society of Plant Physiologists, 2000, p. 1250-1318.

CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, p. 37-41, 2010.

CURCIO, S. A. F.; STEFAN, L. F. B.; RANDI, B. A.; DIAS, M. A.; SILVA, R. E.; CALDEIRA, E. J. Hypoglycemic effects of an aqueous extract of *Bauhinia forficata* on the salivary glands of diabetic mice. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 493-499, 2012.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99-107, 2011.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; AGUILAR, R.; RUDGE, M. V. C. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, p. 196-201, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**: a biosynthetic approach. 3<sup>a</sup> ed. Chinchester: John Wiley & Sons Ltda, 2009. 539 p.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, 16 p., 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 747-753, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DUGASANI, S.; BALIJEPALLI, M. K.; TANDRA, S.; PICHKA, M. R. Antimicrobial activity of *Bauhinia tomentosa* and *Bauhinia vahlii* roots. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, p. 204-207, 2010.

DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; COELHO, A. C.; BALBI, T.; J.; TONIN, L. T. D.; VICENTINI, V. E. P. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 6 p., 2013.

EDZIRI, H.; MASTOURI, M.; MAHJOUR, A.; ANTHONISSEN, R.; MERTENS, B.; CAMMAERTS, S.; GEVAERT, L.; VERSCHAEVE, L. Toxic and mutagenic properties of extracts from Tunisian traditional medicinal plants investigated by the neutral red uptake, VITOTOX and alkaline comet assays. **South African Journal of Botany**, v. 77, p. 703-710, 2011.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOR, J. L. S.; MAES, A.; VAN STADEN, J.; DE KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 195-207, 2003.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141-164, 2001.

ENGEL, I. C.; FERREIRA, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MEYRE-SILVA, C. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 258-264, 2008.

ERNST, E. Harmless herbs? A review of the recent literature. **The American Journal of Medicine**, v. 104, p. 170-178, 1998.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FARIA, R. A. P. G.; ANDRADE-NETO, M.; PINTO, L. S.; CASTELLÓN, R. R.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000300015&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000300015&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em 27 jan. 2014.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v. 134, p. 894-904, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Microbiological Data for Systemic Antibacterial Drug Products – Development, Analysis, and Presentation.** Silver Spring, MD, 2009.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug Discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 306-317, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GÓIS, R. W. S.; SOUSA, L. M.; SANTIAGO, G. M. P.; ROMERO, N. R.; LEMOS, T. L. G.; ARRIAGA, A. M. C.; BRAZ-FILHO, R. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of pacharin from *Bauhinia acuruana*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2753-2757, 2013.

GUPTA, V. K.; SHARMA, S. K. Plants as natural antioxidants. **Natural Product Radicance**, v. 5, p. 326-334, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 17, p. 1-93, 2006.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v. 401, p. 1-11, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 125-126, 1995.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

JIN, X.; CHEN, Q.; TANG, S.-S.; ZOU, J.-J.; CHEN, K.-P.; ZHANG, T.; XIAO, X.-L.. Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1209-1214, 2009.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 198-216, 2010.

JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 89-96, 2004.

JYOTHI, K. S.; SESHAGIRI, M. *In vitro* activity of saponins of *Bauhinia purpurea*, *Madhuca longifolia*, *Celastrus paniculatus* and *Semecarpus anacardium* on selected oral pathogens. **Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences**, v. 9, p. 216-223, 2012.

KATO, F. H.; VIANA, N. I.; SANTINI, C. B.; SOUZA, C. G. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; TAVARES, D. C. Assessment of the *in vitro* and *in vivo* genotoxic and

antigenotoxic effects of pimaradienoic acid in mammalian cells. **Mutation Research**, v. 749, p. 87-92, 2012.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**, v. 41, p. 165-171, 2008.

KHLEBNIKOV, A. I.; SCHEPETKIN, I. A.; DOMINA, N. G.; KIRPOTINA, L. N.; QUINN, M. T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1749-1770, 2007.

KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 121-126, 2010.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, p. 185-202, 1998.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 217–233, 2011.

KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; SUNDERAM, R. S.; GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; SARAVANAN, S.; KUMAR, M. S.; MURUGESH, K.; KUMAR, K. A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1015-1024, 2005.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The ScientificWorld Journal**, v. 2013, 16 p., 2013.

KUMAR, T.; CHANDRASHEKAR, K. S. *Bauhinia purpurea* Linn: a review of its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, p. 420-431, 2001.

LIM, H.; KIM, M. K.; LIM, Y.; CHO, YOUL-HEE; LEE, CHUL-HOON. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. **Cancer Letters**, v. 233, p. 89-97, 2006.

LINO, C. S.; DIÓGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; ANDRADE NETO, M.; ALVES, R. S.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 125-127, 2004.

LÓPEZ-ALARCÓNA, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2ª ed. São Paulo, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 512 p.

LUJÁN, M. C.; CORRAL, C. P. Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de Argentina. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 42, p. 0-0, 2008.

LUSA, M. G.; BONA, C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 196-211, 2009.

MACÊDO, M. F. S.; SISENANDO, H. A. A. C. N.; QUEIROZ, J. D. F.; ARGOLO, A. C. C.; SATURNINO, A. C. R. D.; COELHO, L. C. B. B.; MEDEIROS, S. R. B. Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 509-516, 2008.

MACLEAN, R. C.; HALL, A. R.; PERRON, G. G.; BUCKLING, A. The population genetics of antibiotic resistance: integrating molecular mechanisms and treatment contexts. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 405-414, 2010.

MAESTRI, D. M.; NEPOTE, V.; LAMARQUE, A. L.; ZYGADLO, J. A. Natural products as antioxidants. In: IMPERATO, F. (ed.). **Phytochemistry: advances in research**. Kerala, India: Research Signpost, 2006. p. 105-135.

MAHADY, G. B.; HUANG, Y.; DOYLE, B. J.; LOCKLEAR, T. Natural Products as Antibacterial Agents. In: RAHMAN, A.-U. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Karachi: Elsevier, 2008. v. 35, p. 423-444

MAPLESTONE, R. A.; STONE, M. J.; WILLIAMS, D. H. The evolutionary role of secondary metabolites - a review. **Gene**, v. 115, p. 151-157, 1992.

MARQUES, G. S.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; ROLIM, L. A.; XAVIER, H. S.; NETO, P. J. R.; SOARES, L. A. L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 51-57, 2013.

- MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; ROLIM NETO, P. J. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 57-62, 2012.
- MENDONÇA, L. M.; SANTOS, G. C.; SANTOS, R. A.; TAKAHASHI, C. S.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay **Human and Experimental Toxicology**, v. 29, p. 635-643, 2010.
- MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 08-13, 2007.
- MENEZES, P. R.; SCHWARZ, E. A.; SANTOS, C. A. M. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398-400, 2004.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- MIYAKE, E. T.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca *Bauhinia forficata* Link. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 56-68, 1986.
- MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.
- MURUGAN, M.; MOHAN, V. R. Evaluation of phytochemical analysis and antibacterial activity of *Bauhinia purpurea* L. and *Hiptage benghalensis* L. Kurz. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, p. 157-160, 2011.
- NACZKA, M.; SHAHIDIB, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.
- NEGI, B. S.; DAVE, B. P.; AGARWAL, Y. K. Evaluation of antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea* leaves under *in vitro* conditions. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 360-365, 2012.
- NEILSON, E. H.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; MØLLER, B. L. Plant chemical defense: at what cost? **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 250-258, 2013.
- OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213-216, 2005.
- OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2-3-4, p. 170-196, 1989.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023**, Hong Kong, 78 p., 2013.

ORTÍZ, J. I. C. **Evaluación de la actividad biológica y fitoquímica de los extractos crudos de *Bauhinia monandra* Kurtz, (Caesalpiniaceae) de la localidad de Agua Santa, municipio Montes-Estado Sucre.** 2013. 36 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bioanálises) – Escola de Ciências, Universidad de Oriente, Cumaná, 2013.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PAHWA, S.; MAZUMDER, R.; BHATTACHARYA, S. Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity of different parts of *Bauhinia variegata* Linn. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, p. 1971-1977, 2011.

PAHWA, S.; MAZUMDER, R.; BHATTACHARYA, S.; KUMARI, S.; MAZUMDER, A.; SINGH, D. P. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of the leaves of *Bauhinia purpurea* Linn. **Ancient Science of Life**, v. 30, p. 28-32, 2010.

PAREKH, J.; KARATHIA N.; CHANDA, S. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, p. 53-56, 2006.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, p. 1-7, 2004.

PEPATO, M. T.; CONCEIÇÃO, C. Q.; GUTIERRES, V. O.; VENDRAMINI, R. C.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; BRUNETTI, I. L. Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of *Bauhinia forficata* for the treatment of experimental diabetes in rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 7165-7173, 2010.

PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 191-197, 2002.

PINHEIRO, T. S. D. B.; JOHANSSON, L. A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; BIAVATTI, M. W. Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 431-436, 2006.

PIPERAKIS, S. M. Comet assay: a brief history. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 1-3, 2009.

- PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR., A.; SZPOGANICZ, B.; DE SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, p. 466-469, 2003.
- RANKOVIC, Z; MORPHY, R. **Lead generation approaches in drug discovery**. 1. ed., New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2010. 291 p.
- RESENDE, F. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. **Molecules**, v. 17, p. 5255-5268, 2012.
- RHAMA, S.; MADHAVAN, S. Pharmacognostical and preliminary phytochemical studies on the leaf extracts of *Bauhinia tomentosa* Linn. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**; v. 2, p. 76-80, 2012.
- ROCHA, E. A. L. S. S. **Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais do semiárido brasileiro contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica**. 2012. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.
- RODRIGUES, K. C. M. **Caracterização química e investigação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória tópica de *Vernonia polyanthes* LESS (Asteraceae)**. 2013. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.
- SALATINO, A.; BLATT, C. T. T.; SANTOS, D. Y. A. C.; VAZ, A. M. S. F. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, 1999.
- SALGUEIRO, A. C. F.; LEAL, C. Q.; BIANCHINI, M. C.; PRADO, I. O.; MENDEZ, A. S. L.; PUNTEL, R. L.; FOLMER, V.; SOARES, F. A.; ÁVILA, D. S.; PUNTEL, G. O. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 81–87, 2013.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; NATARAJAN, A. T. The anticlastogenicity of  $\beta$ -carotene evaluated on human hepatoma cells. **Mutation Research**, v. 303, p. 151-156, 1993.
- SANTOS, F. J. B.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; SPEROTTO, A. R. M.; CARAMÃO, E. B.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; SAFFI, J. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platypetala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 474-482, 2012.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMOES C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 323-354.

SARTORELLI, P.; CORREA, D. S. Constituents of essential oil from *Bauhinia forficata* Link. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 468-469, 2007.

SAVI, A. O. S.; BREVIGLIERI, E.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae). **Revista de Biología Tropical**, v. 44, p. 601-603, 1996.

SAYAGO, C. T. M.; CAMARGO, V. B.; BARBOSA, F.; GULARTE, C.; PEREIRA, G.; MIOTTO, S.; CECHINEL FILHO, V.; PUNTEL, R. L.; FOLMER, V.; MENDEZ, A. Chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts from *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and *B. variegata*. **Acta Biologica Hungarica**, v. 64, p. 21-33, 2013.

SCHIMMER, O.; HAFELE, F.; KRIIGER, A. The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. **Mutation Research**, v. 206, p. 201-208, 1988.

SEMWAL, S.; SHARMA, R. K. Antibacterial sesquiterpene lactone glucoside from seed pods of *Bauhinia retusa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, p. 75-79, 2011.

SHARMA, N.; BHARDWAJ, R.; SINGH, B.; KAUR, S. Essential oil composition of *Bauhinia variegata* L. flowers. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 3604-3611, 2013.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 7, p. 717-719, 2009.

SILVA, F. R. M. B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; WILLRICH, M. A. V.; SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 33-37, 2002.

SILVA, G. M. C.; SILVA, H.; CAVALCANTI, M. L. F.; MARTINS, P. L. Autecologia *Bauhinia forficata* L. – Espécie ameaçada de extinção no ecossistema da Caatinga. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, 15 p. 2003.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 241-245, 2000.

SILVA, K. L.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Biosciences**, v. 55, p. 478-480, 2000.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, p.449-454, 2002.

- SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SINHA, S.; BISWAS, D.; MUKHERJEE, A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1521-1527, 2011.
- SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 683-689, 2008.
- SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p. 376-390, 2013.
- SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-*O*-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 829-832, 2004.
- SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 53-57, 2012.
- STURBELLE, R. T.; PINHO, D. S.; RESTANI, R. G.; OLIVEIRA, G. R.; GARCIAS, G. L.; MARTINO-ROTH, M. G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 409-415, 2010.
- TAKASHIMA, M.; HORIE, M.; SHICHIRI, M.; HAGIHARA, Y.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: A rational basis and practical application. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 1242-1252, 2012.
- TEMPONI, V. S. **Investigação do Potencial Químico e Farmacológico de *Vernonia polyantes* LESS**. Juiz de Fora, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.
- THENMOZHI, K.; MANIAN, S.; PAULSAMY, S. Preliminary phytochemical screening from different parts of *Bauhinia tomentosa* L. and *Bauhinia malabarica* Roxb. (Caesalpiniaceae). **Research and Reviews: Journal of Botanical Sciences**, v. 1, p. 11-17, 2012.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y. F. Single cell

gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORRES-COLÍN, R.; STEFANO, R. D.; CAN, L. L. El género *Bauhinia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cercideae) en la península de Yucatán (México, Belice y Guatemala). **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 80, p. 293-301, 2009.

TOVAR, R. T.; PETZEL, R. M. Herbal toxicity. **Disease-a-Month**, v. 55, p. 592-641, 2009.

TUTEJA, N.; AHMAD, P.; PANDA, B. B.; TUTEJA, R. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. **Mutation Research**, v. 681, p. 134-149, 2009.

TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Unraveling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 261-290, 2001.

UDDIN, G.; SATTAR, S.; RAUF, A. Preliminary phytochemical, *in vitro* pharmacological study of *Bauhinia alba* and *Bauhinia variegata* flowers. **Middle-East Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, p. 75-79, 2012.

VAISHNAV, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223-229, 2010.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VASCONCELOS, F.; SAMPAIO, S. V.; GARÓFALO, M. A. R.; GUIMARÃES, L. F. L.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 385-392, 2004.

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**, v. 28, p.477-491, 2005.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VERSCHA EVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 575-587, 2008.

VOLPATO, G. T. **Repercussões maternas, reprodutivas e perinatais do tratamento com extrato aquoso de folhas de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) na prenhez de ratas não-diabéticas e diabéticas**. 2001. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade estadual Paulista, Botucatu, 2001.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; RUDGE, M. V. C.; PADOVANI, C. R.; CALDERON, I. M. P. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 131-137, 2008.

WILKINSON, J. M. Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. (2006) In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. (Eds). **Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2006. p. 157-171.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation Part III: the comet assay as an alternative to *in vitro* clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, p. 21-26, 2007.

YAHYA, F.; MAMAT, S. S.; KAMAROLZAMAN, M. F. F.; SEYEDAN, A. A.; JAKIUS, K. F.; MAHMOOD, N. D.; SHAHRIL, M. S.; SUHAILI, Z.; MOHTARRUDIN, N.; SUSANTI, D.; SOMCHIT, M. N.; TEH, L. K.; SALLEH, M. Z.; ZAKARIA, Z. A. Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Bauhinia purpurea* leaves against paracetamol-induced hepatic damage in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 10 p., 2013.

YESHWANTH, M. Comparative antibacterial study in the leaves of four *Bauhinia* species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, p. 158-167, 2013.

YUENYONGSAWAD, S.; BUNLUEPUECH, K.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; TEWTRAKUL, S. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 765-769, 2013.

ZHOU, M.; LUO, H.; LI, Z.; WU, F.; HUANG, C.; DING, Z.; LI, R. Recent Advances in Screening of Natural Products for Antimicrobial Agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 15, p. 306-315, 2012.

ZHOU, X.; ZHONG, J.-J. Plant Cell Culture, Secondary Product Accumulation. In: FLICKINGER, M.C (Ed.). **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**. 7<sup>a</sup> ed. Shanghai. 2011. v. 6, p. 3883-3819.

**ANEXO A – Resumo do trabalho científico intitulado "Antioxidant Activity of *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) using DPPH, Ferric Reducing Antioxidant Power and  $\beta$ -carotene bleaching assays", a ser apresentado na forma de pôster no 62<sup>nd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research - GA2014, 31 de agosto a 04 de setembro de 2014, Guimarães, Portugal.**



**Antioxidant Activity of *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) using DPPH, Ferric Reducing Antioxidant Power and  $\beta$ -carotene Bleaching Assays**

Carolina Miranda Gasparetto<sup>1</sup>, Marina Loures Borges<sup>1</sup>, Bruna C. S. Santos<sup>1</sup>, Laura Silva Fernandes<sup>1</sup>, Glauciemar Del-Vechio-Vieira<sup>1</sup>, Leonardo Meneghin Mendonça<sup>2</sup>, Maria Silvana Alves<sup>1</sup>, Orlando V. Sousa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36036-900, Brazil; <sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Israel Pinheiro 2000 - Campus Avançado de Governador Valadares, Bairro Universitário, Governador Valadares, Minas Gerais, 35020-220, Brazil

*Bauhinia forficata* Link (Fabaceae), commonly known in Brazil as "pata-de-vaca", is a native South America tree traditionally used for the treatment of Diabetes mellitus, dyslipidemias, and other organic disturbs [1]. These dysfunctions are associated with oxidative stress and cellular damage. In addition, the major phytochemical group of secondary metabolites presents in this specie is phenolic compounds, particularly flavonoids [2]. Keeping in this view, the current study investigated the antioxidant activity of ethanol extract (EE) and hexane (HF), dichloromethane (DF), ethyl acetate (EAF) and butanol (BF) fractions obtained from *B. forficata* leaves. The antioxidant activity was assessed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and  $\beta$ -carotene bleaching assays [3,4]. As reference substances, rutin and ascorbic acid (AA) were used in DPPH and FRAP assays, and butylated hydroxytoluene (BHT), rutin and quercetin in  $\beta$ -carotene bleaching method. Tests were performed in triplicate. Results were expressed as mean  $\pm$  S.D. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). In the DPPH and FRAP assays, all results showed statistically significant difference, possessing  $EC_{50}$  values ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ranging from  $27.95 \pm 0.33$  (EAF) to  $193.62 \pm 1.12$  (HF) for DPPH assay, and from  $21.12 \pm 0.52$  (EAF) to  $328.45 \pm 3.23$  (DF) for FRAP test, respectively. In the  $\beta$ -carotene bleaching method, the percentage inhibition of lipid peroxidation (%) of EE ( $67.07 \pm 1.48$ ) and HF ( $71.52 \pm 0.00$ ) showed no statistically significant difference regarding BHT ( $67.23 \pm 2.07$ ). All this data indicate that *B. forficata* appears to be a potential source of bioactive molecules with antioxidant activity for several applications, including the treatment of degenerative disorders.

**Acknowledgements:** UFJF, FAPEMIG, CAPES and CNPq.

**References:** [1] Miyake E.T., Akisue G., Akisue M.K. Pharmacognostic characterization of pata-de-vaca *Bauhinia forficata* Link. Rev. Bras. Farmacogn., 1986, 1: 58-68. [2] Cechinel-Filho V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. Phytother. Res., 2009, 23: 1347-1354. [3] Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose anime. J. Nutr., 1986, 44: 307-315. [4] Koleva I.I., van Beek T.A., Linssen J.P.H., Groot A., Evstatieva L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochem. Anal., 2002, 13: 8-17.

ANEXO B – Resumo do trabalho científico intitulado "Antibacterial Activity Assessment of *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)", a ser apresentado oralmente no 23º Italo-Latin American, Asian & African Congress of Ethnomedicine - SILAE 2014, 07 a 12 de setembro de 2014, Marsala, Itália.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY ASSESSMENT OF *Bauhinia forficata* LINK (FABACEAE)

Gasparetto, C. M.<sup>1,2</sup>; Borges, M. L.<sup>2</sup>; Fernandes, L. S.<sup>2</sup>; Tempomi, V. S.<sup>2</sup>; Rodrigues, K. C. M.<sup>1</sup>; Del-Vechio-Vieira, G.<sup>2</sup>; Mendonça, L. M.<sup>3</sup>; Sousa, O. V.<sup>1,2</sup>; Alves, M. S.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

<sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Governador Valadares, Brazil

\*Corresponding author E-mail: [silvana.alves@ufjf.edu.br](mailto:silvana.alves@ufjf.edu.br)

**Introduction**

The genus *Bauhinia* (Fabaceae) contains about 300 species distributed in tropical areas with globally medicinal interest. *Bauhinia forficata* Link, known in Brazil as "pata-de-vaca", is a native South America tree traditionally used as hypoglycemic, diuretic, hypocholesterolemic, and also against cystitis, intestinal parasites and elephantiasis.

**Method**

The present study aimed to assess the antibacterial activity of ethanol extract (EE) and hexane (HF), dichloromethane (DF), ethyl acetate (AF) and butanol (BF) fractions obtained from *B. forficata* leaves. The antibacterial activity was estimated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC), using microdilution method according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidance. *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 were used as reference bacterial strains.

**Results / Discussion / Conclusion**

The AF was active against *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 6538, with MIC values of 2.25 and 5 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. The other fractions and EE had MIC values greater than 5 mg mL<sup>-1</sup>. Alves (2013) and Rocha (2012) evaluated the antimicrobial activity of *B. forficata* against some species of fungi and bacteria. The results obtained in the present study agree with the previous studies, provide additional scientific information about the antibacterial activity of *B. forficata*, and corroborate with the antimicrobial potential of the species belonging to the *Bauhinia* genus. The data indicates that *B. forficata* is a source of bioactive substances with antibacterial property and may be a promising alternative to therapeutic applications.

Acknowledgement: UFFJ, FAPEMIG, CAPES and CNPq.

**Bibliographic References:**

- Vaz, A. M. S. F.; Tozzi, A. M. G. A. (2005) Sinopse de *Bauhinia* sect. *Paulletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil Rev. Bras. Bot. 3:477-491.
- Cechinel-Filho, V. (2009) Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. Phytother. Res. 23:1347-1354.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. (2008) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Pantarum. Nova Odessa, São Paulo, Brazil.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Ninth edition, M07-A9.
- Alves, E. P. (2013) Avaliação da atividade antimicrobiana da *Bauhinia forficata* Linn. State University of Paraíba, Campina Grande, Brazil. 26 f.
- Rocha, E. A. L. S. S. (2012) Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais do semiárido brasileiro contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. State University of Paraíba, Campina Grande, Brazil. 26 f.