

ABORDAGEM FITOQUÍMICA E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FOLHAS DE *BAUHINIA VARIEGATA* L.

FINÊNCIO, Beatriz M¹.

MININEL, Francisco José²

RESUMO: A espécie *Bauhinia variegata* L. pertence à família Fabaceae. Suas folhas são simples, parecendo bipartidas, dando a semelhança de uma pisada de bovino, daí seu nome popular: pata de vaca ou casco de vaca. O seu gênero, *Bauhinia*, ocorre desde o Piauí até o Rio Grande do Sul, nas formações florestais do complexo atlântico e nas matas de planalto. Os processos fitoquímicos são responsáveis por analisar experimentalmente e qualitativamente os constituintes químicos das plantas. Na espécie em questão, os principais compostos químicos incluem compostos fenólicos, tais como taninos e flavonoides, que parecem ser os responsáveis por suas propriedades farmacológicas. Entretanto, outros metabólitos secundários têm sido isolados de várias espécies do gênero *Bauhinia* e são objetos de investigação para utilização humana. As folhas e flores têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de algumas patologias, tais como diabetes e inflamações. A abordagem fitoquímica e posterior análise cromatográfica auxiliam na descoberta ou confirmação da presença de substâncias benéficas para a saúde humana, embora sejam necessários testes clínicos para comprovação de suas propriedades farmacológicas.

Palavras-chave: *Bauhinia variegata*; pata de vaca; processos fitoquímicos; compostos químicos; análise cromatográfica; propriedades farmacológicas.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Bauhinia variegata* L. pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinoidea. Devido às suas folhas de aspecto bipartido, dando a semelhança com o pisado de um bovino, leva o nome vulgar de pata de vaca ou casco de vaca (**FIGURA 1**). Esta planta é originária da Ásia, mais precisamente China e Índia. No Brasil, o gênero *Bauhinia* ocorre de norte a sul, principalmente mata atlântica e de planalto. Suas flores variam de róseas, roxo-pálidas até avermelhadas (**FIGURA 2**). *B. variegata*, além de ser utilizada no paisagismo e recuperação de áreas degradadas (por ser fixadora

¹ Autora do artigo em questão. Graduanda em Engenharia Química, Universidade Brasil, campus Fernandópolis. Correspondência: beatriz.miorin@gmail.com

² Doutor pela Universidade Estadual Paulista – UNESP, professor na Universidade Brasil, campus Fernandópolis. Orientador do projeto científico em questão. Correspondência: coor.biomedicina@universidadebrasil.edu.br



de nitrogênio do solo), também é utilizada na fitoterapia e estudos experimentais que buscam comprovar suas atividades farmacológicas. Suas folhas e caule são usados na medicina popular para efeitos hipoglicemiante e anti-inflamatórios. A grande diversidade e empregabilidade de seus constituintes químicos se deve a variedade de metabólitos secundários até compostos mais complexos como as proteínas encontrados em diferentes órgãos da planta.

A ciência responsável pelo estudo dos constituintes químicos dos vegetais denomina-se **Fitoquímica**. A Fitoquímica estuda cada grupo da planta, desde a estrutura química molecular até as propriedades biológicas dos vegetais. Faz levantamentos e análises dos componentes químicos das plantas, como os princípios ativos, os odores, pigmentos, entre outros. O conhecimento dos constituintes químicos de diversas partes da planta favorece o seu uso sustentável e contribui para sua preservação, além disso, os metabólitos secundários possuem atividade biológica, oferecendo benefícios também à saúde humana.

Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos, encontrados na natureza, revelarem uma gama quase inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (SIMÕES, 2002).

No contexto histórico a medicina popular contribui com inúmeras descobertas que devem sempre ser respaldadas pelo conhecimento científico, contribuindo para o uso racional de espécies medicinais e conscientizá-los quanto a sua toxicidade (GONSALVES, 1997).

Logo, a pesquisa objetiva a análise qualitativa que visa, através de reações químicas clássicas, identificar a presença ou ausência de classes de substâncias de interesse farmacológico e, também, através da leitura em espectrofotômetro UV-vis de uma fração cromatográfica, observar o comprimento de onda característico do composto químico de maior abundância presente nas folhas da planta analisada e montar sua curva de calibração.



Figura 1 Aspecto geral das folhas da espécie *Bauhinia variegata* (foto de Beatriz M. Finêncio)



Figura 2 Aspecto das flores e folhas da *Bauhinia variegata* (foto de Beatriz M. Finêncio)

2 METODOLOGIA

2.1 Preparação do extrato fluido de *Bauhinia variegata* L.

Para a execução dos ensaios fitoquímicos de folhas secas (a secagem da espécie foi feita em estufa com circulação de ar e controle de temperatura) foram preparados extratos hidroalcoólicos a 20%(p/v), por meio de maceração (trituração) do material à temperatura ambiente. Utilizou-se como líquido extrator, álcool etílico a 70% até completa submersão do material. Posteriormente foi vedado o recipiente com folha de alumínio e reservado por uma semana. Os extratos aquosos a 20%(p/v) foram obtidos macerando-se o material vegetal com água deionizada em banho-maria a 60°C. Os extratos foram filtrados através de papel de filtro e ensaiados para a pesquisa de metabólitos secundários por testes analíticos qualitativos, tais como: flavonóides, esteróides e triterpenóides, alcalóides, saponinas, taninos, antraquinonas e glicosídeos cardioativos (MATOS, MATOS, 1989).



O extrato hidroalcoólico deverá ser analisado também por cromatografia em coluna líquida clássica e deverão ser executados experimentos para determinação do teor (%) de fenóis totais em espectrofotômetro UV-vis e formação da sua curva de calibração em software específico.

2.2 Testes analíticos qualitativos: Prospecção de constituintes do extrato hidroalcoólico

2.2.1 Proteínas e Aminoácidos

REAÇÃO DE MOLISH: Foi redissolvido alguns miligramas do resíduo em 2mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se 3 gotas de solução alcoólica de α -naftol com conta gotas e, em seguida, cuidadosamente pelas paredes do tubo, 3mL de ácido sulfúrico concentrado com uma pipeta graduada. Formação de anel violáceo - azul no contato entre as duas camadas indica reação positiva.

2.2.2 Taninos

Redissolveu-se alguns miligramas do resíduo em 10 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado uma gota de cloreto férrico 1% com o auxílio de um conta gotas. Mudança de coloração para azul indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

2.2.3 Flavonóides

Foi redissolvido alguns miligramas do resíduo em 10 mL de metanol e filtrado com papel filtro em um tubo de ensaio. Adicionou-se:

- cinco gotas de ácido clorídrico concentrado com conta gotas;
- 1 cm de fita de magnésio

O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva para essa classe de polifenol.

2.2.4 Catequinas

Foi redissolvido alguns miligramas do resíduo em 3 mL de metanol e filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina 1% e 1 mL de ácido clorídrico concentrado com o auxílio de pipeta graduada. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva para esse polifenol com forte ação antioxidante.

2.2.5 Saponina Espumídica



Redissolveu-se alguns miligramas do resíduo em 1 mL de etanol 80°GL e diluído até 15 mL com água destilada. Posteriormente, foi agitado vigorosamente durante alguns minutos num tubo de ensaio fechado. Se a camada de espuma permanece estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo tendo, então, propriedades detergentes e surfactantes.

2.2.6 Esteroides e triterpenóides

Foi redissolvido alguns miligramas do resíduo em 3 mL de clorofórmio e filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se ao extrato clorofórmico, 2 mL de anidrido acético com uma pipeta graduada e agitado suavemente. Pelas paredes do tubo, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, também com auxílio de uma pipeta graduada. No caso de reação positiva, observa-se uma sucessão de cores, do azul evanescente seguido de verde persistente.

2.2. 7 Depsídeos e depsidonas

Foi redissolvido alguns miligramas do resíduo em 5 mL de éter etílico e filtrado. Foi evaporado todo o éter em banho-maria. Em seguida, foi adicionado ao resíduo 3 mL de metanol com uma pipeta graduada. Agitou-se e adicionou três gotas de cloreto férrico (FeCl_3) 1% com um conta gotas. Coloração verde, azul ou cinza indica reação positiva para essas substâncias fenólicas de ação antimicrobiana e atividade antioxidante.

2.2. 8 Purinas

Em uma cápsula de porcelana, juntou-se à alguns miligramas do resíduo:

- 3 gotas de ácido clorídrico 6N com conta gotas;
- 2 gotas de peróxido de hidrogênio concentrado (30%) com conta gotas

Evaporou-se em banho Maria. Deve formar um resíduo corado de vermelho. Após a formação do resíduo vermelho, adicionou-se três gotas de hidróxido de amônio 6N. Coloração violeta indica reação positiva.

2.2.9 Antraquinonas

Redissolveu-se alguns miligramas do resíduo em 3 mL de Benzeno e posteriormente foi filtrado. Adicionou-se 2 mL de Hidróxido de Amônio 10% e então foi agitado suavemente o tubo de ensaio. Uma coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa indica reação positiva.

2.2.10 Alcalóides



Foi redissolvido alguns miligramas do resíduo em 4 mL de ácido clorídrico a 5% e, então, filtrado. Separou-se porções de 1 mL em tubos de ensaio, e adicionado gotas dos reagentes citados abaixo. No caso de precipitação a reação é positiva.

- a. Bouchardat – precipitado laranja avermelhado;
- b. Dragendorff – precipitado vermelho-tijolo;
- c. Bertrand – precipitado branco;
- d. Mayer – precipitado branco.

2.2.11 Glicosídeos cardioativos

Foi redissolvido alguns miligramas do resíduo em 10 mL de metanol e filtrado. Então, foi separado em duas porções de 2 mL em tubos de ensaio (A e B) e adicionou-se gotas dos reagentes abaixo.

- a. Reativo de KEDDE – Coloração azul ou violeta indica reação positiva (Tubo de ensaio A)
- b. Adicionou-se 3 gotas de solução recente de nitroprussiato de sódio 5% em água e três gotas de hidróxido de sódio 2N com conta gotas. Coloração roxa intensa indica reação positiva (Tubo de ensaio B).

3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA COM MÁRMORE BRANCO COMO FASE ESTACIONÁRIA

1. Foi empacotado (preenchido) a coluna (bureta) com mármore branco triturado (não muito fino) lavado previamente com água destilada, e colocado um chumaço de algodão na parte inferior da bureta para evitar que o pó entupa a torneira. O mármore será a fase estacionária.
2. Adicionou-se acetona comercial no topo da coluna com a torneira aberta, em quantidade suficiente para molhar toda a fase estacionária, enchendo-a até o topo. Deixou-se escorrer o solvente, coletando-o em um frasco para eliminar o ar, até que restou-se somente cerca de 0,5 cm de líquido acima da fase estacionária. Então, fechada a torneira.
3. Adicionou-se ao topo da coluna 8 a 10 gotas do extrato fluido em questão para ser cromatografado. Em seguida foi aberto a torneira e deixado o líquido escoar lentamente (gotejando) até que a amostra penetre completamente na fase estacionária (o mármore).
4. Foi adicionado acetona para eluir o extrato colocado. No início, adicionou-se pequenas porções do solvente (acetona) com o conta-gotas, pelas paredes do tubo, para evitar revolver a camada de mármore que adsorveu os extractos.



5. Foi observado a separação dos diferentes componentes do extrato à medida que descem pela coluna. Foi recolhido cada um dos componentes separados em frascos pequenos. Continuou-se a adicionar acetona até retirar as frações que apresentam maior afinidade por esta fase móvel.
6. Em seguida, acrescentado água à coluna para retirar os componentes que não foram eluídos com a acetona. Recolhidos, também, em frasco pequenos.
7. Cada um dos componentes isolados podem ser analisados por espectrometria UV-vis.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados de classes de substâncias no extrato fluido de *Bauhinia variegata* L. pelos testes analíticos quantitativos

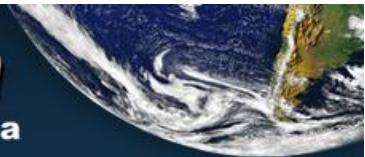
As diferentes reações executadas com o resíduo seco do extrato hidroalcólico de *Bauhinia variegata* L. detectaram a possível presença de uma variedade de substâncias, conforme indicado na tabela abaixo:

+ = Presença

- = Ausência

Tabela 1 Resultado dos metabólitos secundários no extrato fluido de *Bauhinia variegata*

| Classes de Substâncias | Presença/Ausência | Precipitado ou Coloração |
|-----------------------------|-------------------|--------------------------|
| Proteínas e Aminoácidos | + | Azul |
| Taninos | + | Azul |
| Flavonoides | + | Rósea vermelhada |
| Catequinas | - | Ausência |
| Saponina Espumídica | + | Permanência da espuma |
| Esteróides e Triterpenóides | + | Verde persistente |



| | | |
|-------------------------------|---|--------------------------|
| Depsídeos e Depsidonas | + | Azul/verde escuro |
|-------------------------------|---|--------------------------|

| | | |
|----------------|---|-----------------|
| Purinas | - | Ausência |
|----------------|---|-----------------|

| | | |
|----------------------|---|--------------------------------|
| Antraquinonas | + | Fase aquosa avermelhada |
|----------------------|---|--------------------------------|

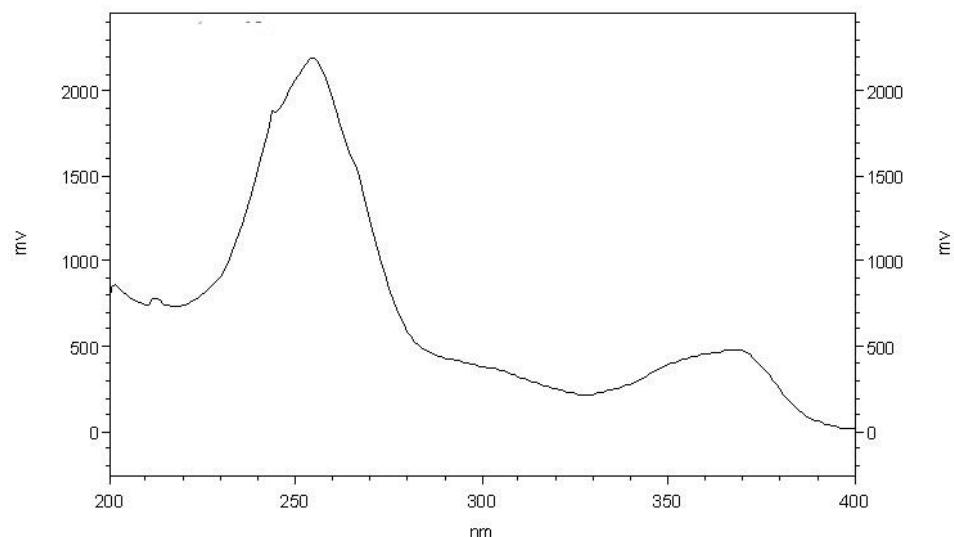
| | | |
|-------------------|---|--|
| Alcalóides | + | Precipitado avermelhado (Dragendorff) |
|-------------------|---|--|

| | | |
|---------------------------------|---|------------------------------|
| Glicosídeos Cardioativos | + | Roxa intensa (Tubo B) |
|---------------------------------|---|------------------------------|

4.2 Análise por Espectrometria Ultra Violeta (UV-vis)

A análise do cromatograma por HPLC-PDA das frações isolada, apresentou espectro no UV (**FIGURA 3**), máximos de absorção em λ_{max} 250, 306 e 368 nm, sugerindo que esta substância é um derivado de ácido elágico (DHOOGHE, 2010).

Figura 3 Espectro característico de derivados de ácidos elágicos (máximos de absorção: 260nm e 366nm) (gráfico obtido pelo software Xcalibur)





Tanino do tipo hidrolisável (ou seja, possível de ser hidrolisado a compostos mais simples), o Ácido Elágico é um [polifenol](#) sintetizado por várias espécies de plantas, e tem como função proteger os tecidos contra a [luz ultravioleta](#), [vírus](#), [bactérias](#) e [parasitas](#). Sua forma sintética é C₁₄H₆O₈.

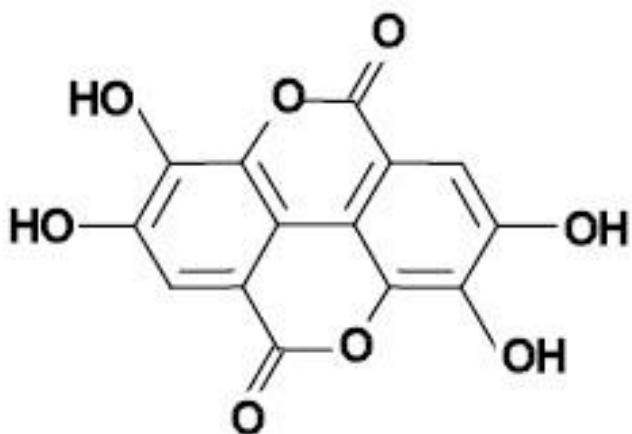


Figura 4: Representação da fórmula do ácido elágico

6 CONCLUSÃO

Um dos métodos considerado mais adequado para a análise químico-farmacológica de plantas é a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água), pois este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular e também possibilita a extração de um número maior de compostos. Neste trabalho, preparou-se um extrato hidroalcoólico a 70% utilizando-se o método da percolação. A partir deste extrato, realizou-se uma série de reações clássicas para identificação de classes de substâncias. Detectou-se a possível presença de proteínas e aminoácidos, taninos, flavonóides, saponina espumídica, esteróides e triterpenóides, depsídeos e depsidonas, antraquinonas, alcaloides e glicosídeos cardioativos.

A cromatografia em coluna e a posterior leitura das frações em espectrofotômetro uv-vis confirma a presença de ácido elágico (um tipo de tanino hidrolisável polifenólico). Isso significa que a espécie *Bauhinia variegata* possui metabólitos secundários considerados importantes pela indústria farmacêutica para a saúde humana, principalmente para a pele.



Destacando-se, também, o composto polifenólico flavonoide, a espécie *Bauhina variegata* pode ser considerada como uma planta de grande importância medicinal já que este composto possui potencial antioxidante e anticarcinogênico.

Para maior clareza, o organismo vivo está sujeito à ação oxidativa do oxigênio (formas de oxigênio extremamente reativas) responsável pelo envelhecimento do corpo, e doenças como câncer, diabetes e doenças do coração. Por isso o interesse em encontrar oxidantes naturais para uso farmacêutico e em alimentos de prateleira, e substituir o sintético, é tão grande. E os maiores responsáveis por essas ações antioxidantes são compostos fenólicos.

Para concluir, o famoso chá de Pata de vaca talvez seja um dos tratamentos alternativos para o Diabetes mais popular no Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, entretanto nessa pesquisa não foram realizados testes clínicos. O que conclui-se é a presença de antioxidantes que ajudam a combater radicais livres e o possível efeito benéfico sobre os níveis de glicose, deixando claro que isso não significa que o chá das folhas da planta em questão deve ser usado como medicamento para tratamento de diabetes e outras doenças humanas.

7 REFERÊNCIAS

- GONZALVES, P.E. **Medicinas Alternativas: os tratamentos não convencionais.** 2. ed. São Paulo: IBRASA, 1997.
- MATOS, J. M. D. MATOS, M.E.O. **Farmacognosia:** curso teórico-prático. Fortaleza: UFC, 1989. 245 p.
- WAGNER, H. BLADT, S. **Plant drug analysis:** a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlin: Springer, 1997. p. 166-167.
- CANNEL, R.J.P. **Natural Products Isolation.** New Jersey: Humana Press, 1998. p. 282-295.
- ROCHA. J. G. **Farmacopeia brasileira:** Parte I. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 392 p.
- LANÇAS, M.F. **Extração em Fase Sólida (SPE).** São Carlos: Rima, 2004. 96 p.
- PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.
- MACIEL, M. A. M. et al. **Plantas medicinais:** a necessidade de estudos multidisciplinares. **Revista Quim. Nova**, Rio de Janeiro, V. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Revista Acadêmica UFPR. Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/academica/article/viewFile/540/453>> Acesso em 10 jul. 2018.
- SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira De Farmacologia**, Florianópolis, V. 12, n.1, p. 35-40, 2002. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v12n1/a05v12n1.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2017.