

ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS E CAULE DE *LEPIDAPLOA RUFGRISEA* (St. Hill.) H. Rob. (ASSA-PEIXE-ROXO)

Nathália Viégas Busato¹, Jeniffer Cristina Silveira¹, Érica Daré Alves¹, Amélia Carlos Tuler², Adilson Vidal Costa³, Tatiana Tavares Carrijo², Daniel Rinaldo³, Patrícia Fontes Pinheiro³

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Engenharia Rural – Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário s/n, Guararema, 29.500-000, Alegre – ES, nathalia.busato@hotmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências Agrárias /Departamento de Biologia

³Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Química e Física – Centro de Ciências Agrárias

Resumo- O conhecimento da relação entre plantas e o tratamento de doenças tem contribuído para uma nova geração de terapia, que inclui os chamados biofármacos. Deve-se ressaltar a importância da diversidade química dos metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas, que tem despertado nas indústrias farmacêuticas um grande interesse visando à descoberta de novos fármacos. Nota-se que a fitoterapia é bem aceita como uma opção medicamentosa em diferentes países, entre estes o Brasil. Porém, existem poucas informações sobre as propriedades química, farmacológica e toxicológica de muitas das plantas medicinais da flora nativa brasileira que são consumidas na medicina popular. Diante desse fato, esse trabalho teve como objetivo realizar a prospecção fitoquímica das folhas e caule secos do *Lepidaploa rufogrisea* (St. Hil.) H. Rob., conhecida como assa-peixe-roxo, detectando assim as principais classes de metabólitos secundários presentes no mesmo, sendo elas: flavononas, flavonóis e xantonas, catequinas (taninos catéquicos), flavanonas, compostos fenólicos, taninos, cumarinas, núcleo estereoidal, lactonas alfa-beta insaturadas, 2-desoxiaçúcares, saponinas e antraquinonas. .

Palavras-chave: Assa-peixe-roxo, *Lepidaploa rufogrisea* (St. Hil.) H. Rob., *Vernonia rufogrisea* St. Hil., *Vernonia fruticulosa* Mart. ex DC., Prospecção Fitoquímica.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra

Introdução

Lepidaploa rufogrisea (St. Hil.) H. Rob. é uma das espécies da família Asteraceae conhecidas pelo nome comum “assa-peixe-roxo”, sendo muito valorizada por suas propriedades medicinais em comunidades tradicionais (Passa et al. 2005, Albertasse 2010). Em classificações anteriores, esteve subordinada à *Vernonia*, mas após ampla revisão taxonômica deste gênero nas Américas (Robinson 1999), foi classificada no gênero *Lepidaploa*. Ainda em relação à sua taxonomia, cabe ressaltar que *Lepidaploa rufogrisea* possui *Vernonia fruticulosa* Mart. ex DC., *V. eremophila* Mart. ex DC., *V. tricephala* Gardner, *V. resinosa* Gardner e *V. saxicola* Sch. Bip. ex Baker como sinônimos heterotípicos, constituindo um complexo de espécies afins ainda pouco esclarecido. Morfologicamente, *Lepidaploa rufogrisea* se caracteriza como um subarbusto de folhas alternas, conduplicadas, lineares, ramos pilosos e capítulos em cimeiras escorpióides com flósculos roxos (v. De Almeida 2008).

O Brasil possui a flora de plantas terrestres mais diversificada do mundo, com cerca de 45.000 espécies (22% de todas as espécies vegetais conhecidas no planeta). Deve-se ressaltar a importância da diversidade química dos metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas, que tem despertado nas indústrias farmacêuticas um grande interesse visando a descoberta de novos fármacos. Nota-se que a fitoterapia é bem aceita como uma opção medicamentosa em diferentes países, entre estes o Brasil. Porém, existem poucas informações sobre as propriedades química, farmacológica e toxicológica de muitas das plantas medicinais da flora nativa brasileira que são consumidas na medicina popular (NUNES, 2008), assim como das espécies conhecidas como assa-peixe-roxo.

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são sintetizados, no citoplasma, a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são

derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (SIMÕES et al., 2007).

Nesse trabalho foi realizada a prospecção fitoquímica do caule e das folhas secas da *Lepidaploa rufogrisea*, visando detectar as principais classes de metabólitos secundários presentes na espécie.

Metodologia

Material vegetal

O material botânico utilizado neste estudo foi coletado na Reserva Natural da Vale do Rio Doce, no Município de Linhares, ES, em vegetação do tipo Mussununga. As folhas e o caule foram secos em estufa de circulação forçada de ar por um período de 7 dias a 40 °C e, posteriormente, transferidos para moinho de facas para obtenção de um fino pó. Os extratos moídos foram acondicionados em recipientes hermeticamente fechados e mantidos em ambiente protegido da incidência de luz para posterior análise da prospecção fitoquímica. As amostras (extratos) foram submetidas às análises fitoquímicas para determinação das principais classes químicas de metabólitos secundários, de acordo com o protocolo descrito por MATOS (1997). O material testemunho (Carrijo 537) está depositado no herbário VIES, sede de Jerônimo Monteiro, com duplicatas no herbário da Reserva Natural da Vale (CVRD).

Flavonóides por classes:

Mediram-se a massa de 2 g do material moído em um béquer, acrescentaram-se 15 mL de etanol 70%, e aqueceu-se por 30 minutos. Realizou-se a filtração do extrato obtido em um béquer (250 mL) e evaporou-se o solvente até *secura* (60 °C). Dissolveram-se alguns miligramas do extrato seco em 20 mL de água. Transferiram-se para três tubos de ensaio, 3 mL da solução para cada tubo. Acidulou-se um dos tubos a pH 3 e alcalinizou-se os dois restantes a pH 8,5 e 11. Os resultados obtidos foram comparados com os dados da Tabela 1 para a detecção da presença de compostos pertencentes às diferentes classes de flavonóides.

Tabela 1 - Dados para a determinação de Flavonóides por classes

Constituintes	Coloração em meio		
	pH 3	pH 8,5	pH 11
Flavononas, flavonóis e xantonas	-----	-----	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelho	-----	Vermelho púrpura
Flavononóis	-----	-----	Vermelho-laranja

Subclasses de Flavonóides

Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavanonas:

Em dois tubos de ensaio adicionaram-se 3 mL da solução preparada anteriormente, acidulou-se o primeiro com solução de HCl a pH 1-3 e alcalinizou-se o outro a pH 11 com solução de NaOH. Aqueceu-os, cuidadosamente, em bico de Bunsen durante dois a três minutos. Observaram-se modificações na coloração, comparando com os tubos utilizados no teste anterior. Os resultados obtidos foram também comparados com os dados da Tabela 2 para a detecção da presença de compostos pertencentes às diferentes subclasses de flavonóides.

Tabela 2 - Dados para a determinação de Subclasses de Flavonóides

Constituintes	Coloração em meio	
	Ácido	Alcalino
Catequinas (Taninos catequicos)	pardo-amarela	-----
Flavanonas	-----	Vermelho-alaranjado

Flavonóis, Flavanonas, Flavononóis e Xantonas:

Transferiram-se para um tubo de ensaio, 3 mL da mesma solução extrativa usada no teste anterior e acrescentaram-se alguns miligramas de magnésio em raspas, e 0,5 mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da efervescência, e observou-se por comparação a mudança na coloração em relação aos tubos acidificados dos testes anteriores.

Compostos Fenólicos

Dissolveram-se alguns miligramas de extrato seco obtido anteriormente em 5 mL de água destilada, filtrou-se e adicionaram-se uma a duas gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 2%.

Taninos

Pesou-se 1 g do material moído em um béquer e colocaram-se 50 mL de água destilada, levando à ebulição por 5 minutos. O extrato foi filtrado e 2 mL foram colocados em tubos de ensaio para realização das seguintes reações:

- *Reações de sais de ferro:* ao extrato aquoso (2 mL), juntaram-se 5 mL de água destilada e algumas gotas de cloreto férrico 2% (2g de FeCl_3 dissolvido em 50 mL de água e, em seguida, adicionaram-se 2 mL de HCl 3N e completou-se o volume com etanol para 100 mL.
- *Reação com gelatina:* ao tubo de ensaio contendo o extrato acrescentaram-se uma a duas gotas de HCl 10% e de solução aquosa de gelatina 2,5%, gota a gota para evitar-se a redissolução do precipitado formado.
- *Reação com acetato de cobre:* juntaram-se ao extrato algumas gotas de solução aquosa de acetato de cobre 3%.
- *Reação com acetato de chumbo:* adicionaram-se ao extrato gotas de acetato de chumbo 10%.

Cumarinas

Pesaram-se 2 g do material moído, e adicionaram-se 1 mL de HCl 10% e 10 mL de etanol 70%, aqueceu-se durante 10 minutos (60 °C). Após filtração, reduziu-se o volume, por aquecimento, a 5 mL e realizou-se a extração com 10 mL de acetato de etila (P.A.) em funil de separação. O extrato em acetato de etila foi concentrado a 5 mL e transferido para um tubo de ensaio. Adicionaram-se 5 mL de solução alcoólica de KOH a 5% ao tubo de ensaio.

Terpenóides e esteróides

Pesaram-se 2 g do material moído em um béquer, colocaram-se 20 mL de etanol 50% e ferveu-se por 30 minutos. Filtrou-se o sobrenadante e repetiu-se a extração por duas vezes, utilizaram-se em cada, 10 mL de etanol 50%. Filtraram-se os extratos e, posteriormente foram reunidos em um béquer. Adicionaram-se 10 mL de solução saturada de acetato básico de chumbo e centrifugou-se. O líquido sobrenadante foi filtrado para um funil de separação, adicionando-se água destilada e extraíndo a

solução hidroalcoólica com duas porções de 15 mL de clorofórmio. Os extratos de clorofórmio foram reunidos e concentrados até 10 mL para realização das reações seguintes:

- *Reação de Lieberman-Buchard:* utilizaram-se 5 mL do extrato clorofórmio, levando-o a resíduo. Adicionou-se 0,5 mL de anidrido acético, transferiu-se para um tubo de ensaio que continha 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- *Reação de Kedde:* evaporaram-se 3 mL do extrato clorofórmio, juntaram-se ao resíduo quatro gotas de solução alcoólica 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico (0,1g em 10 mL de etanol) e 2 gotas de KOH 1N.
- *Reação de Baljet:* 3 mL do extrato clorofórmio foram evaporados e adicionados 4 a 5 gotas de ácido pícrico 0,5% e 2 gotas de KOH 1N.

2-desoxiaçucares:

Reação de Keller-Killiani: Evaporaram-se cerca de 3 ml de extrato. Dissolveu o resíduo em cerca de 1,0 ml de ácido acético glacial, juntaram-se à solução 8 a 10 gotas de cloreto férrico a 2%. Transferiu-se cuidadosamente a solução, através das paredes, para um tubo de ensaio contendo cerca de 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Saponinas

Em um béquer pesou-se 1g do material moído e adicionaram-se 80 mL de água destilada. Esse extrato foi neutralizado com gotas de solução (20%) de carbonato de sódio e aquecido até ebulição. Foi resfriado, filtrado e transferido para um balão de 100 mL. Dez tubos de ensaio foram numerados de 1 a 10. A cada tubo foi adicionado o seu respectivo volume de extrato obtido. De ordem inversa, começando do tubo 1. Foram adicionados 9 mL de água destilada de forma decrescente até o tubo 9. Ou seja: no tubo 9 foi adicionado 1 mL de água destilada e no tubo 10 não houve adição de água destilada. Cada tubo foi vedado com uma rolha e agitado por 15 segundos. A bateria de tubos ficou em repouso por 15 minutos para posterior detecção do índice de espuma.

Alcalóides

Em um béquer foram colocados 2 g do material moído da planta. Agitaram-se com 20 mL de ácido clorídrico 1%, aqueceu-se por 10 minutos (60 °C). Após esfriar, filtrou-se para um funil de separação e alcalinizou-se com 10 mL de solução aquosa de NH_4OH 10% (m/v) (~ pH 11; ~10 mL). A solução alcalina foi extraída com duas porções de 10 mL de clorofórmio (P.A.). Em seguida, a fase orgânica

foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada para um béquer. Evaporou-se o clorofórmio em banho de areia sob exaustão a 37 °C. Em seguida, ressuspendeu-se o resíduo em 5 mL de HCl 1%. Em quatro tubos de ensaio colocou-se 1 mL do resíduo ressuspenso e adicionaram-se os reagentes de Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat nos seus respectivos tubos.

Reagente de Mayer: Dissolveram-se 1,35g de cloreto de mercúrio em 60 mL de água e 5g de iodeto de potássio em 20 mL de água. Misturaram-se as duas soluções e diluiu-se com água até 100 mL.

Reagente de Dragendorff: Juntaram-se 50 mL de água a 5g de carbonato de bismuto, adicionaram-se 12 mL de ácido clorídrico e agitou-se até sua quase dissolução; juntaram-se aos poucos e agitando-se sempre, 25g de iodeto de potássio e, após a dissolução, completou-se com água até 100 mL.

Reagente de Bertrand: dissolveram-se 5g de ácido silicotúngstico em água para obtenção de 100 mL de solução.

Reagente de Bouchardat: Dissolveram-se 2g de iodeto de potássio e 1g de iodo em 50 mL de água destilada e completou-se o volume para 100 mL com água destilada.

Antraquinonas

Realizou-se a reação de Borntraeger: Ferveu-se, por 10 minutos, 0,2g do material pulverizado com 10 mL de H₂SO₄ 2N. Filtrou-o para um funil de separação, adicionando-se 10 mL de acetato de etila. Após agitação e separação das fases, recolheu-se a fase orgânica em um tubo de ensaio. Acrescentaram-se 2 mL de NaOH 2N e agitou-se.

Resultados

Na determinação de flavonóides por classes nas folhas do assa-peixe-roxo, observou-se coloração amarela da solução em pH 11, o que indicou a presença de flavononas, flavonóis e xantonas e no mesmo pH a solução teste para flavanonóis apresentou coloração vermelho-laranja, o que confirma a presença desse metabólito.

A presença de catequinas (taninos catéquicos) e flavanonas foi caracterizada pelo aparecimento da coloração pardo-amarela, em meio ácido, e vermelho-alaranjado, em meio alcalino.

A mudança de cor da solução teste para compostos fenólicos foi o indicativo da presença dessa classe de compostos, visto que a solução mudou para a coloração azul, sendo importante

ressaltar a formação de precipitado verde, o que indicou, mais uma vez, a presença de taninos catéquicos.

Nas reações testes para taninos, a formação de precipitado foi a confirmação da presença deste composto nos extratos utilizados, sendo o precipitado formado da cor verde, indicando a presença de tanino condensado.

A presença de cumarinas foi confirmada pela coloração verde assumida pela solução após ser exposta à luz UV.

A presença de terpenóides e de esteróides, foi confirmada pelo aparecimento de coloração castanho-avermelhada, ressaltando-se que a coloração foi bem acentuada. Indicativo da presença do núcleo estereoidal.

A coloração vermelha violácea intensa indicou a presença de lactonas α - β insaturadas nas amostras analisadas. O surgimento da coloração vermelho-acastanhada, também intensa, na zona de contato dos líquidos foi indicativo da presença de uma grande quantidade de 2-desoxiaçúcares.

O aparecimento, não tão acentuado, de espuma nos tubos testes para saponinas foi indicativo da presença de uma pequena quantidade deste metabólito. A presença da coloração vermelha na camada aquosa foi indicativa da presença de antraquinonas.

As classes de metabólitos secundários detectadas para os extratos secos de folhas e caule do Assa-peixe-roxo (*Lepidaploa rufogrisea*) são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da prospecção fitoquímica de extratos de folhas e caule do Assa-peixe-roxo (*Lepidaploa rufogrisea*)

Classes Químicas	Resultado
Flavononas, flavonóis e xantonas	+
Chalconas e auronas	-
Flavononóis	-
Catequinas – Taninos catéquicos	+
Flavanonas	+
Compostos Fenólicos	+
Taninos	+
Cumarinas	+
Núcleo estereoidal	+
Lactonas alfa-beta insaturadas	+
2-desoxiaçúcares	+
Saponinas	+
Alcalóides	-
Antraquinonas	+

Discussão

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a prospecção fitoquímica de *Lepidaploa*

rufogrisea. A espécie apresentou grande quantidade de metabólitos secundários, sendo eles: flavononas, flavonóis e xantonas, catequinas (taninos catéquicos), flavanonas, compostos fenólicos, taninos, cumarinas, núcleo estereoidal, lactonas alfa-beta insaturadas, 2-desoxiaçúcares, saponinas e antraquinonas.

Estudos como os de Lima *et al.* (2009) indicam que a atividade que leva à redução de radicais livres pode estar relacionada com a presença de flavonoides, sendo estes metabólitos secundários encontrados nas folhas e caule do assa-peixe-roxo. Martínez-Florez (2002) relata que os flavonóides possuem ações antioxidantes, pois atuam estabilizando espécies reativas de oxigênio visto que possuem grupo de ortodi-hidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere maior estabilidade à sua forma radicalar.

Rodrigues *et al.* (2010), ao realizarem um estudo de prospecção fitoquímica utilizando extratos alcoólicos dos frutos de *Momordica charantia*, confirmaram a presença de atividade antiulcerogênica e ação antiinflamatória, provavelmente advindas da presença de compostos terpênicos dos frutos estudados, cujos compostos também estão presentes no assa-peixe-roxo, como foi confirmado neste trabalho.

De acordo com Robbers *et al.* (1997) taninos compreendem um grande grupo de substâncias complexas presentes no reino vegetal. Em quase todas as famílias botânicas há espécies que contêm taninos. Quando ocorrem em grandes quantidades, geralmente se localizam em determinados órgãos da planta como as folhas, os frutos, o córtex ou o caule. Costumam ser divididos em duas classes químicas, com base na identidade dos núcleos fenólicos existentes e na maneira como se unem. Como ésteres são facilmente hidrolisados, produzindo ácidos fenólicos e açúcar, são conhecidos como taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados compõem a segunda classe. Os taninos precipitam proteínas e podem combinar-se a elas, tornando-as resistentes às enzimas proteolíticas.

Esses dados contribuem para realização de estudos posteriores, como por exemplo na descoberta de novos princípios ativos da planta na área da medicina curativa.

Conclusão

A triagem fitoquímica do caule e das folhas de *Lepidaploa rufogrisea* evidenciou que a espécie é promissora para prospecção em razão dos seus metabólitos secundários indicativos. Os metabólitos secundários identificados foram: flavononas, flavonóis e xantonas, catequinas

(taninos catéquicos), flavanonas, compostos fenólicos, taninos, cumarinas, núcleo estereoidal, lactonas alfa-beta insaturadas, 2-desoxiaçúcares, saponinas e antraquinonas.

O estudo fitoquímico realizado para extratos secos de folhas e caule de *Lepidaploa rufogrisea*, fornecerá bases para pesquisas das ações farmacológicas dos metabólitos secundários encontrados e, também, servirá como fonte de dados para comparações de análises semi-quantitativas que serão realizadas em estudos futuros.

Agradecimentos

Ao NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário) e a Reserva Natural da Vale pelo suporte logístico para as atividades de campo e herbário.

Referências

- ALBERTASSE, P.D. *et al.* Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 12(3): 250-260, 2010.
- DE ALMEIDA, G.S.S. **Asteraceae Dumort. Nos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. 365 p.
- DEMATTEIS, M. New species and new combinations in the South american genus *Lessingianthus* (Asteraceae: Vernonieae). **Edinburgh Journal of Botany**, v. 65, n. 3, p. 359–368, 2008.
- LIMA, J. M. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, Viçosa - MG, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.
- PASA, M.C. *et al.* Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta Botanica Brasilica** Acta bot. bras. 19(2): 195-207. 2005.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

- MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.
- NUNES, L. G. Prospecção fitoquímica e avaliação de mutagenicidade *in vitro* de três espécies vegetais: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum e *Bathysa cuspidata* (A. St.-Hil.) Hook. 2008. 114p. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER V.E. Farmacognosia e farmacobiocotecnologia. São Paulo: Editorial Premier, 1997.
- ROBINSON, H. 1999. Generic and Subtribal Classification of American Vernoniae. **Smithsonian Contributions to Botany** 89, 115 p.
- RODRIGUES, K. A. F. *et al.* Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 17, n. 2, p. 69-76, 2010.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. Porto Alegre: editora UFRGS, 2007. 1104p.