

ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS DE *MYRSINE CORIACEA* (Sw.) R. Br. (PRIMULACEAE)

Érica Daré Alves¹, Nathália Viégas Busato¹, Jeniffer Cristina Silveira¹, Amélia Carlos Tuler², Adilson Vidal Costa³, Tatiana Tavares Carrijo², Daniel Rinaldo³, Vagner Tebaldi de Queiroz³, Dirceu Pratissoli⁴, 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, erica_dare2@hotmail.com

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

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

⁴Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal – Centro de Ciências Agrárias

Resumo- O Brasil tem a flora mais diversa do mundo quanto a plantas terrestre. 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. *Myrsine coriacea* é uma espécie conhecida popularmente como capororoca. As plantas produzem metabólitos secundários, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de medicamentos. Os compostos pertencentes às classes dos terpenos, compostos fenólicos e alcalóides constituem três grandes grupos de metabólitos secundários. As análises realizadas evidenciaram a presença de: flavononas, flavonóis e xantonas, flavononóis, compostos fenólicos, taninos, cumarinas, núcleo estereoidal, lactonas alfa-beta insaturadas, 2-desoxiaçúcares, saponinas e antraquinonas.

Palavras-chave: *Myrsine coriacea*, metabólitos secundários, Myrsinaceae, prospecção fitoquímica, *Rapanea ferruginea*.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra

Introdução

O Brasil tem a flora mais diversa do mundo quanto a plantas terrestres, com cerca de 45.000 espécies de plantas superiores, aproximadamente 22% de todas as espécies conhecidas do planeta. Vale ressaltar a importância da diversidade química dos metabólitos secundários biossintetizados das plantas. 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).

Myrsine, tradicionalmente subordinado à família Myrsinaceae, está atualmente alocado na família Primulaceae. Suas espécies frequentemente são inventariadas em levantamentos etnobotânicos devidos ao uso popular de casca para tratamento de infecções estomacais (BOSCOLO E VALLE, 2004) e picadas de cobra, tumores e feridas (RODRIGUES E CARVALHO, 2001). Os poucos estudos concernentes à atividade biológica, indicam atividade tripanocida de *Myrsine lancifolia*,

M. guianensis e *M. umbellata* (LEITE et al., 2009). *Myrsine coriacea* é conhecida popularmente como capororoca, capororoquina, pororoca. Ocorre no Cerrado e na Floresta Atlântica (em formação Ombrófila Densa e Mista, Estacional Semidecidual e Restinga). Caracteriza-se morfológicamente como um arbusto de 3 a 10 metros de altura, de folhas alternas congestas no ápice dos ramos sendo estes cobertos por tricomas ramificados de colocação ferrugínea. Ecologicamente, é uma espécie importante para regeneração natural do solo e os frutos são uma importante fonte de alimento para a avifauna, razão pela qual é geralmente utilizada em reflorestamentos. O uso mais conhecido de sua madeira é para carvão e lenha. A resina da casca é utilizada por índios da etnia Guarani na fabricação de cordas de instrumentos musicais, com o intuito de melhorar os sons do instrumento. As folhas e cascas são utilizadas como diurético, agindo como um bom depurativo (MARTINS-RAMOS et al., 2010). A constituição química das plantas aplicado na

medicina popular envolve o estudo de interações do organismo com os efeitos das inúmeras classes de compostos e moléculas que podem existir numa única planta.

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Os terpenos são sintetizados, no citoplasma, a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). 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). Os compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produto de metabolismo primário e/ou secundário, são biologicamente ativos, quando apresentam ação tranquilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, inseticida etc (PLETSCH, 1998). Os compostos biologicamente ativos exercem ação específica sobre um ser vivo, seja ele, animal, vegetal ou microorganismo.

Este trabalho apresenta a prospecção fitoquímica de folhas secas de *M. Coriacea*, visando detectar as principais classes de metabólitos secundários presentes nesta 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 foram secas 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. A amostra (extrato) foi submetida 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.

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.

Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis 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 FeCl₃ 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 FeCl₃ 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-desoxiaçúcares:

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 NH₄OH 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 Dragendorf: 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 da *M. coriacea*, observou-se que não houve mudança de cor da solução em pH 3, o que indicou a presença de flavononas, flavonóis e xantonas e no pH 11 a solução teste para flavononóis apresentou coloração vermelho-laranja, o que confirma a presença desse metabólito.

A presença de flavanonas foi caracterizada pelo aparecimento da coloração 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 azul, o que indicou a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis).

Nas reações testes para taninos, a formação de precipitado foi a confirmação da presença deste composto nos extratos utilizados. Na reação de sais de ferro formou precipitado com coloração azul, indicando presença de tanino hidrolisável. A reação de gelatina obteve formação de precipitado. Na reação de acetato de cobre formou precipitado e houve mudança de cor. A reação com acetato de chumbo obteve formação de precipitado branco, confirmando a presença de taninos.

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 na zona de contato, 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-acastanhado, também intenso, na zona de contato dos líquidos foi indicativo da presença de uma grande quantidade de 2-desoxiaçúcares.

O aparecimento de espuma nos tubos testes para saponinas foi indicativo da presença deste metabólito. A presença da coloração vermelha na camada aquosa foi indicativa da presença de antraquinonas.

As classes de metabólitos secundários detectadas para o extrato seco de folhas de *M. coriacea* é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da triagem fitoquímica de extrato de folha de *M. coriacea*.

Classes Químicas	Resultado
Flavanonas, 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 *M. coriacea*. A espécie apresentou grande quantidade de metabólitos secundários, sendo eles: flavononas, flavonóis e xantonas, flavanonas, compostos fenólicos, taninos, cumarinas, núcleo estereoidal, lactonas alfa-beta insaturadas, 2-desoxiaçúcares, saponinas e antraquinonas.

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. 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 flavonóides.

Os 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 (ROBBERS *et al.*, 1997). 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

composta por polímeros de flavonóides. Os taninos precipitam proteínas e podem combinar-se a elas, tornando-as resistentes às enzimas proteolíticas.

O teste para saponinas demonstrou resultado positivo, pela formação de espuma. Elas são compostos glicosilados, polares, que se caracterizam por apresentar propriedade tensoativa, ou seja, podendo formar espuma abundante e persistente após agitação de suas soluções aquosas. Podem formar complexos com proteínas e fosfolipídios da membrana celular, determinando suas ações biológicas. Essa propriedade pode alterar a permeabilidade das membranas, podendo ajudar na absorção de substâncias ou pode destruí-la, indicando uma característica tóxica. As principais atividades apresentadas por plantas que possuem saponinas são: anti-inflamatória, larvicida, hipocolesterolemiante, moluscicida, expectorante e ventrípica. (SOLIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN, 2007).

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 das folhas de *M. caribaea* evidenciou que a espécie é promissora para prospecção químico-biológica em razão dos seus metabólitos secundários indicativos. As classes de metabólitos secundários identificadas foram: flavononas, flavanonóis e xantonas, flavanonas, compostos fenólicos, taninos, cumarinas, núcleo estereoidal, lactonas alfa-beta insaturadas, 2-desoxiaçúcares, saponinas e antraquinonas.

Com isso, é possível relacionar futuras atividades farmacológicas e/ou biológicas com as classes de metabólitos secundários detectadas neste trabalho. Entretanto, para estabelecer uma relação estrutura/atividade faz-se necessário o isolamento e identificação desses metabólitos por técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas de análises. Tais estudos serão realizados posteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.

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.
- BOSCOLO, O.H.; VALLE, L.S.. Plantas de uso medicinal em Quissamã. Rio de Janeiro, 2004.
- LEITE, A.C. *et al.* **Trypanocidal activity of favonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts.** Revista Brasileira de Farmacognosia. São Carlos, SP, 2009
- 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.
- MARTINS-RAMOS, D. *et al.* Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. CAV/UDESC. Lages, SC, 2010
- 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.
- PELA, D.; ABRAMOVICH, Z.; WIESMAN, M. K. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 407-409, 2002.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia.** São Paulo: Editorial Premier, 1997.

- 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.

- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A.. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no Domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. Lavras, MG, 2001

- 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.