



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, EXTENSÃO E AÇÃO  
COMUNITÁRIA  
PÓS - GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA  
ECOMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS  
DE *Bryophyllum calycinum* Salisb (CRASSULACEAE).**

RODOLFO MENDES SILVA

ANÁPOLIS  
2015

RODOLFO MENDES SILVA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA  
E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS  
DE *Bryophyllum calycinum* Salisb (CRASSULACEAE).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente da UniEVANGÉLICA, para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

**Área de Concentração:** Tecnologia e Meio Ambiente.

**Orientadora** Prof. Dra. Josana de Castro Peixoto.

ANÁPOLIS  
2015

S586

Silva, Rodolfo Mendes.

Estudo farmacognóstico, prospecção fitoquímica e composição química do óleo essencial das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb (CRASSULACEAE). / Rodolfo Mendes Silva. – Anápolis: Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica, 2015.  
58 p.; il.

Orientador: Profa. Dra. Josana de Castro Peixoto.

Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em  
Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente – Centro Universitário de  
Anápolis – UniEvangélica, 2015.

Catálogo na Fonte

Elaborado por Hellen Lisboa de Souza CRB1/1570

*“(...) várias pesquisas têm apontado para o efeito antimicrobiano de compostos obtidos de produtos naturais. O emprego desses compostos na odontologia pode ser considerado um instrumento de apoio na terapia de diversas patologias bucais (...). O desenvolvimento de medicamentos ainda é extremamente complexo, envolvendo estudos químicos, farmacológicos e clínicos e, muitas vezes, o conhecimento da população sobre os produtos naturais que as rodeiam pode ajudar os pesquisadores a direcionar suas buscas por produtos que realmente apresentem efetividade contra enfermidades”.*

Castilho, Murata e Pardi (2013).

Sabemos que o homem branco não entende nossos costumes. Um pedaço de terra para ele é igual ao pedaço da terra vizinha, pois é um estranho que chega, às escuras, e se apossa da terra de que tem necessidade. A terra não é sua irmã, mas sua inimiga, e uma vez conquistada, o homem branco vai mais longe. Seu apetite arrasará a terra e não deixará nela mais que um deserto.

(Chefe Índio *Seattle*).  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por ter me concedido a dádiva maior: a vida.

A minha esposa Daianny, por ser exemplo de mulher forte e sensível, por acreditar em meu potencial, me apoiar e me amar incondicionalmente.

Ao grande amigo e doutor Roberto Toledo, por acreditar em meu potencial e estar sempre disposto a me ajudar.

A minha amiga e orientadora doutora Josana Peixoto, pelas orientações, pela paciência e ajuda na condução da pesquisa.

A minha amiga e colega de mestrado Daianna Vargem pelo apoio e dedicação.

A meu amigo doutor Brunno Santos pela dedicação do seu tempo a mim, pela disposição em me ajudar em um momento que o caminho parecia perdido.

A meu amigo e Pró-reitor da UniEvangélica Prof. Marcelo Melo pelo incentivo científico de realizar o caminho a ser seguido.

A todos os professores do mestrado, pelas contribuições dos seus saberes.

À Universidade Federal de Goiânia (UFG), pela disponibilidade em receber mestrados de outras Universidades.

Aos professores Dra. Joelma Marciano e Dra. Josana de C. Peixoto, pela receptividade, respeito e educação que me trataram e disposição em me ajudar na condução da pesquisa na Universidade Federal de Goiás na Universidade Estadual de Goiás.

A todas as outras pessoas que torcem por mim.

## **LISTA DE SIGLAS**

**ANVISA-** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**MS** - Ministério da Saúde

**PNPM-** Programa Nacional de Plantas Mediciniais

**OMS-** Organização Mundial da Saúde

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**UFG-** Universidade Federal de Goiás

**UEG-** Universidade Estadual de Goiás

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> <i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb. Hábito; flor em corte longitudinal; estame; pistilo; corte transversal do ovário. Fonte: Carlquist, 1961.....	24
<b>Figura 02:</b> Hábito de <i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb no local de coleta das folhas, Jandaia, Goiás.....	24
<b>Figura 03:</b> Inflorescências de <i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb no local de coleta das folhas, Jandaia, Goiás.....	25
<b>Figura 04:</b> Hábito de <i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb.....	25
<b>Figura 05:</b> Folhas de <i>Bryophyllum calycinum</i> Salisb.....	26
<b>Figura 06 :</b> Secções transversais da folha de <i>B. calycinum</i> Salisb.....	27
<b>Figura 07:</b> Secções paradérmicas da face adaxial da folha de <i>Bryophyllum calycinum</i> .....	28
<b>Figura 08:</b> Secções transversais da lâmina foliar.....	29
<b>Figura 09:</b> A região da nervura principal A-B. Aspecto do feixe colateral da espécie <i>Bryophyllum calycinum</i> .....	29
<b>Figura 10:</b> Micrografia Eletronica da Lâmina foliar <i>Bryophyllum calycinum</i> .....	30

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Teores de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico expressos em porcentagem (p/p) dos espécimes de *Bryophyllum calycinum* coletados em Jandaia, GO.....**49**
- Tabela 2** - Principais classes de metabólitos secundários detectados nas folhas de *Bryophyllum calycinum* coletados em Jandaia, GO.....**51**
- Tabela 3** – Teor de óleo essencial em porcentagem (V/p) das amostras de *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.....**60**
- Tabela 4-** Componentes do óleo essencial das folhas das espécies de *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.....**62**
- Tabela 5-** Componentes principais e porcentagem de teor dos óleos essenciais das folhas das espécies de *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.....**63**
- Tabela 6-** Teores mínimos e máximos dos componentes principais do óleo essencial das amostras de espécies *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.....**63**

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1 – Morfoanatomia das folhas de *Bryophyllum calycinum* L. (CRASSULACEAE) OCORRENTE JANDAIA, GOIÁS**

1. INTRODUCAO .....	18
2. MATERIAL E METODOS .....	20
2.1 Material Botânico .....	20
2.2 Caracterização Morfológica .....	20
2.3 Caracterização Anatômica .....	21
2.3.1 Microscopia Óptica.....	21
Microscopia Eletrônica de Varredura .....	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.1 Descrição macroscópica.....	23
3.2 Descrição microscópica.....	27
4. CONCLUSAO .....	31
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32

### **CAPÍTULO 2 –Prospecção Fitoquímica das Folhas *Bryophyllum calycinum* L. (CRASSULACEAE) OCORRENTE JANDAIA, GOIÁS**

1 INTRODUCAO.....	35
2 MATERIAL E METODOS.....	37
2.1 Material Botanico.....	37
2.2 Determinacao do Teor de Umidade.....	37
2.3 Determinacao do Teor de Cinzas.....	38
2.3.1 Determinacao do Teor de Cinzas Totais.....	38
2.3.2 Determinacao do Teor de Cinzas Insolueis em Acido Cloridrico (HCl).....	38
2.4 Prospecção fitoquimica.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1 Teores de Umidade, Cinzas Totais e Cinzas Insolueis em Acido Cloridrico (HCl).....	48
3.2 Prospecção Fitoquimica.....	50
3. CONCLUSAO .....	52
4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	53

### **CAPÍTULO 3 – Análise do Óleo Essencial Extraído das Folhas de *Bryophyllum calycinum* L. (CRASSULACEAE) OCORRENTE NO MUNICÍPIO DE JANDAIA, ESTADO DE GOIÁS**

1. INTRODUCAO.....	57
2 MATERIAL E METODOS .....	58
2.1 Reagentes e equipamentos .....	58
2.2 Material Botanico.....	58
2.3 Extração dos Óleos Essenciais.....	59

2.4 Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais .....	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1 Rendimento dos Óleos Essenciais .....	60
3.2 Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais.....	61
4.CONCLUSÃO .....	65
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## RESUMO

Crassulaceae apresenta interesse para diferentes estudos, pois atende às diversas abordagens de estudos de prospecção (etiológica, quimiotaxonômica e etnodirigida). A espécie *Bryophillum calycinum* Salisb é conhecida popularmente como pirarucú, folha da fortuna, saião em diferentes regiões do Brasil é uma planta silvestre pertencente a família Crassulaceae. Caracteriza-se como uma planta nativa da África tropical, largamente disseminada no Brasil onde as folhas são usadas na medicina popular para o tratamento de feridas, contusões, queimaduras, arranhões, abscessos entre outras doenças da pele. Também é utilizada em picadas de insetos, doenças do trato respiratório, tratamento da tosse, dor de garganta, inflamações, hematomas, glaucoma e medicação tópica em afecções cutâneas de natureza alérgica. Com o objetivo de realizar o controle de qualidade vegetal da planta foi realizada a caracterização morfológica e microscópica da folha, a prospecção fitoquímica e a extração, qualificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial da espécie. Os resultados demonstram que as folhas são simples, pecioladas, ovaladas com coloração verde-escura e glabrescentes em ambas as superfícies, penínervas com ápice obtuso, base simétrica e atenuada. A epiderme na superfície abaxial apresenta-se uniestratificada, possui predominância de tricomas tectores longos entremeados por tricomas longos e tricomas glandulares. As folhas são hipostomáticas com estômatos predominantemente diacíticos. O mesófilo, em secção transversal, é dorsiventral. O sistema vascular é do tipo colateral, organizado em arco aberto. Através das análises da prospecção fitoquímica observou-se a presença de heterosídeos flavônicos, cumarinas, compostos esteroides e triterpenóides. Foram encontrados 22 componentes nos óleos essenciais das amostras de *B. calycinum* destacando-se, isopulegol, beta-bourboneno, (E)-cariofileno e 2-metilbutanoato de geranila. Estudos que contribuam para a determinação de caracteres que facilitem a identificação de espécies vegetais de interesse ou, ainda, que auxiliem na distinção entre elas, passam a ser de extrema importância para auxiliar pesquisas na Fitoterapia, com resultados reprodutíveis e, acima de tudo, seguros, com os benefícios superando os possíveis riscos.

**Palavras-chave:** Anatomia foliar. Fitoquímica. Óleo essencial. Crassulaceae

## ABSTRACT

Crassulaceae is of interest to different studies because it meets the different approaches of research studies (ethological, chemotaxonomic and etnodirigida). The specie *Bryophillum calycinum* Salisb. popularly known as pirarucú, Fortune sheet, full skirt in different regions is a wild plant belonging to this family. Crassulaceae. It is characterized as a plant native to tropical Africa, widespread in Brazil where the leaves are used in folk medicine to treat wounds, bruises, burns, scratches, abscesses and other skin conditions, insect bites, respiratory tract diseases, treatment of cough, sore throat, inflammation, bruising, glaucoma and topical medications in skin disorders allergic in nature. In order to achieve the quality of plant control plant was performed and microscopic morphological characterization of the sheet, the phytochemical exploration and extraction, classification and quantification of chemical constituents of essential oil of the species. The leaves are simple, petiolate, ovate with dark green and glabrescent on both surfaces, peninérveas with apex obtuse, symmetrical and toned base. The epidermis on the abaxial surface presents itself unisseriesate has long glandular trichomes predominantly interspersed with long trichomes and glandular trichomes. The leaves are hypostomatic with stomata predominantly diacytic. The mesophyll, in cross section, is dorsiventral. The vascular system is collateral type, organized in open arc. Through the phytochemical analysis showed the presence of flavonicos glycosides, coumarins, and tritepenóides steroid compounds. 22 components were found in the essential oils of the samples among them *B. calycinum* isopulegol, beta-bourboneno (E) -caryophyllene and 2-methylbutanoate geranila. Studies that contribute to the determination of characters to facilitate the identification of plant species of interest, or even to assist in distinguishing between them, become extremely important to assist research in herbal medicine, with reproducible results and, above all, safe , with benefits exceeding the risks.

**Keyword:** Leaf anatomy. Phytochemistry. Essential oil. Crassulaceae

## 1. APRESENTAÇÃO

O uso de plantas aromáticas é antigo e muitas propriedades foram atribuídas a elas, e estas têm sido usadas ao longo da história e na cosmetologia. Os egípcios usavam plantas e óleos aromáticos para embalsamar os mortos, demonstrando, assim, um conhecimento sofisticado de suas propriedades anti-sépticas (Guenther, 1977).

As plantas medicinais são utilizadas por vários setores da sociedade, tais como comunidades tradicionais, curandeiros, centros espirituais, empresas fabricantes de essências e aromas, laboratórios farmacêuticos, homeopáticos, fabricantes de extratos e tinturas para fins farmacêuticos, indústrias alimentícias, ervanários e feiras, atacadistas e outros intermediários. E, nesse contexto, a demanda existente por estes recursos irá se constituir em uma ameaça às populações nativas dessas espécies, principalmente quando partes destas plantas, tais como raízes, sementes e flores, essenciais para sua reprodução são coletadas, utilizadas e comercializadas de forma não sustentável. (Silva et al., 2001).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva na busca de alívio de sintomatologia dolorosa ou desagradável (Martins et al., 2003).

A utilização das plantas como medicamento é muito antiga e data dos primórdios da civilização. Na China, há registros de cultivo de plantas medicinais que datam de 3000 a.C.; os egípcios, assírios e hebreus também as cultivavam em 2300 a.C. (Nolla et al., 2005).

No Brasil, antes mesmo de seu descobrimento, os índios utilizavam plantas para a cura de doenças, para o preparo de corantes e para ajudar na pesca. Com a colonização, a utilização das plantas para tratamento de doenças, fundamentalmente apresentou influências não só da cultura indígena, mas também da africana e européia (Rodrigues & Carvalho, 2001a).

Apesar do extenso conhecimento que possa existir sobre o uso das plantas medicinais no Brasil, pouco se sabe sobre quais são as espécies medicinais nativas que são objeto de uso e comércio significativos, tanto a nível local como internacional e sobre o impacto que a atividade comercial está causando sobre estes recursos naturais e, finalmente, sobre a população humana (Silva et al., 2001).

Durante muito tempo, o conhecimento acerca das plantas medicinais foi transmitido de geração para geração, construindo-se farmácias naturais constituídas por plantas encontradas no ambiente e plantas exóticas, cultivadas em quintais e jardins (Di Stasi, 1996).

Esse conhecimento, geralmente, é preservado em muitas comunidades tradicionais, pois durante muito tempo não tiveram acesso à alopatia, tendo somente como alternativa, a grande biodiversidade encontrada nas proximidades (Zeni & Bosio, 2006).

Essas comunidades são peças chaves para se obter informações sobre como as plantas com finalidade medicinal estão sendo utilizadas, porque tais informações funcionam como base empírica para o desenvolvimento de estudos que possam respaldar cientificamente a obtenção de novos medicamentos (Amorozo, 2002).

Desta forma, vive-se hoje uma situação de destaque no interesse mundial por pesquisas relacionadas a essas interações entre populações humanas e plantas. É notável o crescente número de pessoas interessadas no conhecimento de plantas medicinais, inclusive pela consciência dos males causados pelo excesso de quimioterápicos que combatem as doenças. Remédios à base de ervas que se destinam às doenças pouco entendidas pela medicina moderna, como o câncer, viroses e algumas que comprometem o sistema imunológico, tornam-se atrativos para o consumidor (Sheldon et al., 1997).

Em função da necessidade de se conhecer mais sobre esse saber popular que cada vez mais estudos etnobotânicos, etnofarmacológicos e de botânica aplicada são realizados. A etnobotânica apresenta-se, portanto, como o primeiro passo para um trabalho multidisciplinar envolvendo vários profissionais para se estabelecer quais são as espécies vegetais promissoras para estudos botânicos, farmacológicos, agrônômicos, dentre outros (Rodrigues & Carvalho, 2001b).

Os estudos etnobotânicos também podem subsidiar trabalhos sobre uso sustentável da biodiversidade através da valorização e do aproveitamento do conhecimento empírico das sociedades humanas, a partir da definição dos sistemas de manejo, incentivando a geração de conhecimento científico e tecnológico voltados para o uso sustentável dos recursos naturais (Fonseca - Krueel & Peixoto, 2004). Isso é

importante, porque a exploração de espécies medicinais com potencial de utilização pelo homem tem levado às reduções drásticas em suas populações naturais, e algumas espécies correm o risco de desaparecerem (Guarin Neto & Moraes, 2003).

Montanari Junior (2002) assinala que, como consequência da revalorização mundial do uso de plantas medicinais, a pressão ecológica exercida sobre alguns desses recursos naturais tem sido grande nos últimos anos. Acrescenta ainda que o valor medicinal dessas plantas põe em risco a sobrevivência de muitas espécies medicinais nativas. Sánchez e Valverde (2002) assinalam que o comércio local de plantas medicinais leva à deterioração de populações naturais, tanto quanto a pressão extrativista da indústria de fitofármacos.

Os produtos fitoterápicos possuem, na maioria das vezes, ação mais suave que os medicamentos alopáticos. Isso se deve ao fato de que o princípio ativo da planta não é utilizado de maneira isolada, atuando juntamente com outras substâncias presentes nas plantas. Esse conjunto de elementos é chamado de fitocomplexo, que são os responsáveis pelo efeito terapêutico suave e pela redução dos efeitos colaterais (Francisco, 2010).

A utilização de extratos de plantas no campo médico e odontológico cresceu na década de 90 (Di Stasi, 2007). Especificamente no campo da odontologia, as plantas medicinais passaram a ser um avanço importante uma vez que auxiliam na prevenção de cáries, no tratamento de câncer bucal e em outras estratégias de tratamento, de modo que, no Brasil, a odontologia se beneficia com o emprego de plantas medicinais em sua prática cotidiana. Na odontologia, apesar do uso da fitoterapia ser milenar, a utilização de plantas medicinais para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais ainda é pouco explorada (Lustosa et al., 2008; Varoni et al., 2012). Entretanto, nos últimos anos as pesquisas relacionadas a produtos naturais cresceram significativamente frente ao aumento pela busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e biocompatíveis, além de custos mais acessíveis à população (Francisco, 2010).

Com a instituição do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos dentro do Sistema Único de Saúde (SUS) (Portaria interministerial 2.960/2008), foi confirmado o reconhecimento da eficácia de fármacos fitoterápicos na prática clínica, sobretudo no tratamento e na prevenção de afecções de menor severidade (Bettegaet al.,

2011). No entanto, um dos obstáculos encontrado no desenvolvimento da fitoterapia foi à ausência de trabalhos científicos adequados.

O emprego de plantas medicinais, portanto, vem sendo aplicado como forma estratégica de tratamento e prevenção de doenças, nas mais diversas áreas de atuação, sendo que na odontologia, os vegetais e seus compostos fitoterápicos passaram a ser empregados como forma estratégica de atuação e cuidados com a saúde bucal. A utilização de plantas como fonte de fármacos para o tratamento de doenças é conhecida, pelo menos, desde os tempos da Idade Antiga. A cura através das plantas de determinadas enfermidades já faz parte do imaginário popular e, a partir de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) começou a incentivar o estudo científico das plantas medicinais, buscando seus benefícios e riscos. Na Medicina, a Fitoterapia já é utilizada, porém na Odontologia este processo apenas iniciou (ASSIS, 2009).

Segundo Pal (1999), algumas espécies da família CRASSULACEAE são utilizadas como medicinais, dentre elas, se destaca o gênero *Bryophyllum*. A atividade tocolítica deste gênero foi comprovada em estudo *in vitro* que media a contratilidade em tiras de miométrio a termo, biopsiadas durante cesariana, em 14 mulheres e expostas a concentrações crescentes da planta. Houve redução da contração espontânea e da contração estimulada pela oxitocina (Gwehenberge, 2004).

Neste contexto, este trabalho se justifica por estudar a espécie *Bryophyllum calycinum* Salisb pertencente à família CRASSULACEAE cultivada em solo do bioma Cerrado, visto que estudos clínicos utilizados na região de Jandaia, Goiás para tratamento de gastrite apontam a melhora do quadro clínico da comunidade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Obter a caracterização morfológica, anatômica e realizar a identificação das classes de metabólitos secundários e a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb pertencente à família CRASSULACEAE cultivada no município de Jandaia, estado de Goiás.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar morfológicamente a espécie em estudo ocorrente no município de Jandaia, Goiás;
- Descrever a anatomia foliar da espécie em estudo visando auxiliar na caracterização estrutural que possam ser úteis em estudos taxonômicos;
- Determinar os teores de umidade e de cinzas das drogas vegetais das espécies em estudo;
- Realizar a prospecção fitoquímica das folhas, identificando as principais classes de metabólitos secundários;
- Extrair e identificar os principais compostos químicos dos óleos essenciais das folhas de *B. calycinun*.

**Capítulo 1 - Morfoanatomia das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb  
(CRASSULACEAE) OCORRENTE NO MUNICÍPIO DE JANDAIA, ESTADO  
DE GOIÁS**

## **1 Introdução**

CRASSULACEAE abrange 30 gêneros e 1400 espécies cosmopolitas, sendo que essas espécies apresentam ampla utilização como plantas ornamentais. São plantas herbáceas ou sub-lenhosas que podem atingir até um metro de altura, principalmente durante sua floração. Suas folhas são suculentas, ovaladas ou obovadas, de margem ondulada a subcrenada ou, ainda, crenada e filotaxia oposta cruzada ou alterna. Podem apresentar idioblastos cristalíferos contendo areias cristalinas (Lorenzi; Matos, 2002). O fruto é do tipo folículo e suas sementes apresentam endosperma (Barroso, 1991).

A utilização de plantas medicinais cresce a cada ano e a riqueza da flora brasileira permite a pesquisa desses vegetais, que podem ser utilizados no tratamento de vários tipos de distúrbios digestivos. A *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz, planta da família CRASSULACEAE, possui sinonímia científica com *Bryophyllum calycinum* Salisb., *Cotyledon calycina* Soland., *Coledon rhyzophilla* Roxb., *Crassovia floripendula* Comers. E *Kalanchoe pinnata* Pers. popularmente é conhecida como folha-da-fortuna, erva-da-corda, coirama, courama, diabinho, folha-da-vida, folha-de-pirarucu, folha-grossa, fortuna-milagre de São Joaquim, orelha de monge-pirarucu, roda-de-fortuna, e saião (Gomes et al., 1992). O local de origem desta planta é incerto, sendo usada pela população como antidiurético, no tratamento de úlceras, doenças cutâneas de origem fúngica e problemas respiratórios (Pio Corrêa, 1931).

Algumas das propriedades medicinais da espécie *B. calycinum*, que já foram estudadas no solo, advêm da presença de diversas substâncias químicas em sua composição, tais como: flavonoides, cálcio, ácido succínico, ácido málico, esteróis, ácido cítrico, ácido láctico, triterpeno, taninos, arginina, glicina, histidina (Okwu & Josia, 2006) e terpenos (Siddiqui et al., 1989). Estudos tem mostrado também que a *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz possui capacidade anti inflamatória (Sousa et al., 2005), cicatrizante (Suárez et al., 2001), depressora do sistema nervoso central (Salahdeen & Yemitan, 2006), antinociceptiva (Ojewole, 2005), antimicrobiana, antioxidante (Tatsimo et al., 2012) e antiulcerogênica (Adsanwo et al., 2007). A propriedade antiulcerogênica é presente no extrato metanólico das folhas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz .

Além da morfologia externa das plantas, outros tipos de caracteres têm se mostrado de grande importância para auxiliar a taxonomia vegetal e possibilitar o estudo farmacognóstico das espécies com importância medicinal, tais como os de natureza anatômica, os ecológicos, os de biologia reprodutiva bem como os de polinização, os moleculares, assim como a biogeografia (Judd et al., 1999).

A anatomia vegetal tem-se provado útil para a taxonomia de muitos grupos de plantas (Carlquist, 1961); no entanto, é de extrema importância interpretar as variações dos caracteres em um indivíduo, espécie ou grupo de táxons relacionados. A folha é um órgão que pode apresentar frequentes variações dentro da espécie, do gênero ou da família. Muitos caracteres anatômicos da folha, tais como os da epiderme, presença de cristais e estruturas secretoras têm demonstrado valor sistemático em diferentes táxons (Dickison, 2000).

As folhas são, tipicamente, estruturas simétricas bilateralmente achatadas, oriundas das células laterais do meristema apical do caule (Harper & Freeling, 1996) em um padrão característico que varia com a espécie. Exibem variados graus de complexidade, distribuídos entre estruturas simples e altamente subdivididas (Sinhá, 1999) e podem diferir não somente entre indivíduos de uma mesma população, mas dentro da mesma planta (Mccauley & Evert, 1988).

Segundo Hickey (1974), as folhas são raramente utilizadas em estudos morfológicos comparativos e taxonômicos, apesar de ser um dos órgãos que melhor reflete as variações estruturais tanto de origem genética como ambiental. Isto se deve a falta de uma caracterização morfológica detalhada, padronizada e não ambígua. Uma descrição precisa das características da folha pode auxiliar consideravelmente a classificação, além de permitir o estudo de efeitos dos fatores ambientais no vegetal.

As características foliares também podem ser utilizadas em estudos evolutivos, sendo consideradas tão úteis quanto às características florais, morfologia do pólen e a maioria das características anatômicas utilizadas tradicionalmente na sistemática (Hickey & Taylor 1991).

Com a finalidade de colaborar para os estudos farmacognósticos da espécie *Bryophyllum calycinum* Salisb este capítulo objetiva realizar a caracterização macroscópica e microscópica das folhas, visto que pesquisas desta natureza ainda são escassos para a espécie.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1. Material botânico**

Para a realização dos estudos, o material botânico- folhas de exemplares cultivados de *Bryophyllum calycinum* L. (CRASSULACEAE), foram coletados no município de Jandaia, estado de Goiás (16°59.511'S 050°11.181' W, 709 metros acima do nível do mar). Posteriormente à coleta, foram acondicionadas em sacos plásticos separados, identificados e, então submetidas à conservação em câmara fria JAMA 5.000 litros. As coletas foram realizadas no período matutino, devido o transporte do material do local da coleta ate a cidade de Anápolis, Goiás (UEG). O material botânico foi submetido à limpeza rápida, com auxílio de pincéis e imersão em água. A espécie foi identificada pela Profa. Dra. Mirley Luciene dos Santos e a exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis, Goiás sob o tomo de número 10112.

### **2.2 Caracterização morfológica**

Os espécimes foram coletados com flores e/ou frutos e fotografados em campo utilizando câmera digital Canon A310.

A caracterização macroscópica das folhas da espécie em estudo foi realizada na cidade de Anápolis no campos da UEG, à vista desarmada, e quando necessário utilizou-se o microscópio estereoscópico Q-106S - P1 binocular seguindo os parâmetros de OLIVEIRA et al. (1991) e OLIVEIRA & AKISUE (2009). Foram medidas o pecíolo, o comprimento e a largura da lâmina foliar (n= 30). As medições das folhas foram realizadas utilizando o paquímetro ZAAS Precision 8 polegadas.

### **2.3 Caracterização anatômica**

#### **2.3.1 Microscopia óptica**

A metodologia para microscopia óptica foi realizada no Laboratório de Biodiversidade do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis-Goiás. Para a análise anatômica foram utilizadas folhas livres de injúrias, com o limbo completamente expandido. Em seguida, fragmentos do terço médio da lâmina foliar destinadas à microscopia óptica foram fracionados da região mediana do pecíolo e da lâmina foliar (bordo, região internevural e nervura principal) armazenados em álcool 70% e acondicionados em frascos identificados e submetidos aos seguintes fixadores coaguladores: FAA<sub>70</sub> (etanol 70%, formaldeído e ácido acético 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940) por um período de 24 horas e FPA (formaldeído 37%, ácido propiônico e álcool etílico 70% 1:1:18 v/v) (BERRLY; MIKSCHE, 1976) por um período de 24 horas.

Após este período, o material foi lavado em álcool etílico 70% e permaneceu imerso neste líquido até o processamento (JENSEN, 1972).

Para a análise anatômica em microscopia óptica, os fragmentos foram cortados à mão livre. A confecção das lâminas histológicas foi realizada a partir de secções transversais da lâmina foliar e do pecíolo.

As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 6%, lavadas em água destilada e, em seguida submetidas à dupla coloração com fucsina básica 0,1% e azul de astra 0,3% na proporção 1:3, em média 3 minutos (ROESER, 1972). Posteriormente as secções foram desidratadas em séries alcoólicas etílicas crescentes (30, 50, 70, 90 e 100%) e pós-desidratadas em acetato de butila e álcool etílico (1:1) e acetato de butila puro (JOHANSEN, 1940). As secções foram montadas entre lâmina e lamínula utilizando-se resina sintética incolor 500, da marca Acrilex (PAIVA et al., 2006).

As lâminas histológicas encontram-se depositadas no laminário do Laboratório de Biodiversidade do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis- Go .

As fotomicrografias referentes às estruturas anatômicas foram obtidas em fotomicroscópio modelo LEICA DM27000 com captura digital das imagens e escalas obtidas nas mesmas condições ópticas. As escalas que acompanham as ilustrações foram obtidas nas mesmas condições ópticas.

### **2.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura**

O material foliar destinado à microscopia eletrônica de varredura foi fixado porções do terço-médio da lâmina foliar em solução fixadora Karnovsky (BOZZOLA; RUSSELL, 1992) modificada em soluções aquosas de glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2% diluídas no tampão cacodilato de sódio pH 7,2 a 0,05 M por 12 h e conservadas em tampão cacodilato de sódio 0,2 M (1:1 v/v) sob refrigeração. Posteriormente foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por uma hora. O material foi conservado em etanol 70% e depois transferido para uma solução de acetona 70%.

Análise anatômica em microscopia eletrônica de varredura, os fragmentos de epiderme e secções transversais foliares das cinco espécies foram corados com azul de metileno a 1% aquoso e bórax (LANGERON, 1949), por 5 min, desidratadas em série etílica, diafanizadas em acetato de butila. Posteriormente, foram novamente desidratadas em série acetônica crescente (30, 50,70 e 90) por dez minutos em cada concentração até a saturação (acetona 100%, 3 vezes). A seguir, as amostras foram submetidas à dessecação ao ponto crítico no aparelho CPD 030 (Balzers). Em seguida, os fragmentos secos foram fixados em pequenos “stubs” utilizando fita adesiva com dupla face e metalizados com uma camada de ouro de aproximadamente 40 nm por 2 minutos, em Aparelho Metalizador BALZERS SCD 050. O exame do material foi feito em microscópio de varredura JEOL- JSM 840A a 10 KV no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Goiás. As micrografias eletrônicas foram obtidas por transferência de imagens em computador acoplado ao monitor do microscópio. As escalas e feixes de elétrons encontram-se registradas nas micrografias eletrônicas .

### **3 Resultados e discussão**

#### **3.1 Descrição macroscópica da espécie *Bryophyllum calycinum* Salisb (CRASSULACEAE) . Figuras 1, 2 e 3**

É uma planta sublenhosa perene, carnosa e glabra (desprovida de pelos), rústica e resistente, com até 1,5 m de altura, com talo simples e ereto, castanho pardo, e caules mais velhos de cor clara e os mais jovens avermelhados com máculas brancas. A parte

que mais se destaca são suas folhas. São consistentes, decussadas (dispostas em cruz em relação às do nó anterior), sendo que as inferiores são mais simples, chegando a 30 cm de comprimento, e as superiores podem ser tri, penta ou heptafoliadas, com pecíolo longo, medindo até 5 cm, folíolos oblongos, ovados ou elípticos, obtusos, crenados, sendo o terminal mais comprido que os laterais. Na época fria aparecem, na base foliar, protuberâncias com forma de copo. As flores são hermafroditas, tubulosas, pêndulas, monopétalas, de cor verde pálido ou amarelo avermelhadas, dispostas em panículos de 10 a 40 cm; cálice intumescido, de 3 a 35 mm, tetradentado, glabro; corola mais comprida que o cálice ou um pouco menor, lobos lanceolados ou estrito ovados, agudos e oito estames inseridos sobre o tubo da corola, dispostos em duas séries; frutos carpelos escamosos que se tornam folículos polispermos, inclusos em involúcro papiráceo.

Figura 1- *Bryophyllum calycinum* Salisb. Hábito; flor em corte longitudinal; estame; pistilo; corte transversal do ovário. Fonte: Carlquist, 1961.



Figura 2- Hábito de *Bryophyllum calycinum* Salisb no local de coleta das folhas, Jandaia, Goiás. Fonte: Silva, R. M.



Figura 3- Inflorescências de *Bryophyllum calycinum* Salisb no local de coleta das folhas, Jandaia, Goiás. Fonte: Silva, R. M.



Os caules dos espécimes *B. calycinum* medem 0,5 a 1,0 m de altura e apresentam-se eretos, glabros e lisos (Figura 4).

Figura 4- Hábito de *Bryophyllum calycinum* Salisb com destaque para o caule no local de coleta das folhas, Jandaia, Goiás. Fonte: Silva, R. M.



As folhas são simples e pecioladas, lâminas foliares são ovaladas, com coloração verde-escura em ambas as superfícies. Medem de 8 à 16 cm de comprimento por aproximadamente 7,7 cm de largura. Apresentam-se glabras e lisas em ambas as superfícies. As folhas são peninérveas com ápice obtuso, base simétrica e atenuada, com coloração verde-escura. As lâminas foliares são flexíveis e membráceas. Pecíolo mede entre 2 à 5 cm e possui coloração verde-escuro (Figura 5A e 5B).

Figura 5- Folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb coletadas em Jandaia, Goiás. A- Estrutura individualizada. B- Estruturas comparativas Fonte: Silva, R. M.



A espécie pode se desenvolver à sombra e suporta longos períodos de estiagem. Suas folhas cortadas, ou mesmo fragmentadas, abandonadas sobre o solo ou impregnadas nas paredes das habitações, emitem raízes e logo surgem novos brotos adventícios.

No frio, requer mais calor do que a maior parte das plantas suculentas. Resiste a temperaturas mais baixas se o solo e o ambiente estiverem secos. É bastante tolerante à qualidade do solo e aceita bem a água. Para se obter maior colorido da planta, deve-se diminuir o aporte de água a partir de meados do verão (Correa, 1984).

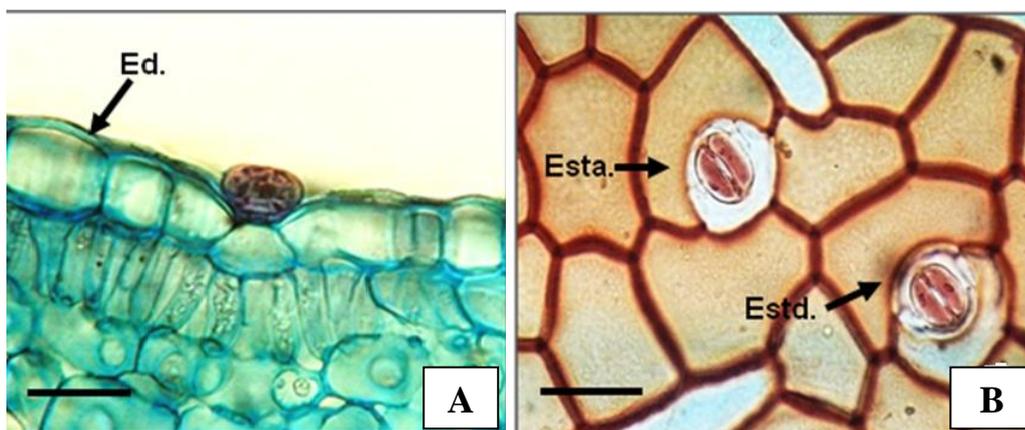
*Bryophyllum calycinum* apresenta grande vitalidade de suas folhas, capaz de gerar vários brotos a partir de suas extremidades (Figura 5A), o que possibilita sua característica aquosa, revelando sua intensa ligação com o elemento água. Mas apesar

de vital e suculenta, a folha é bem elaborada e refinada, com recortes, mostrando um processo luminoso configurativo capaz de conter a proliferação excessiva. A exuberante produção floral demonstra que a vitalidade intensa não cria obstáculos para o desenvolvimento das flores (Plangger, 2006).

### 3.2 Descrição microscópica

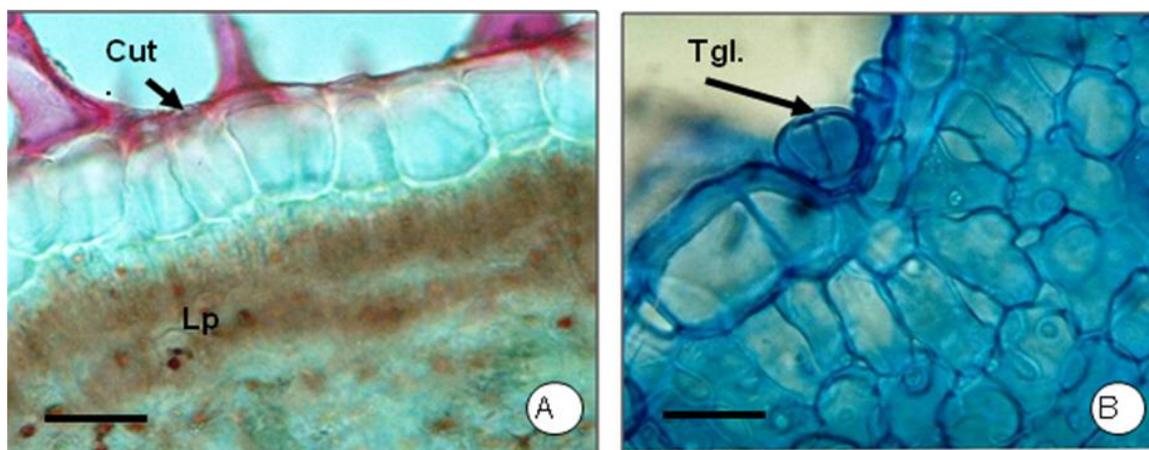
Em secção transversal a epiderme na superfície abaxial apresenta-se uniestratificada, cujas células são menores que as da adaxial; a cutícula que recobre essa superfície é menos espessa que a da face adaxial. Densamente pilosa com predominância de tricomas glandulares peltados localizados em sulcos na epiderme e tricomas tectores uni e pluricelulares simples. Em vista frontal, as células epidérmicas apresentam paredes com contornos retos e os estômatos formam grupos com disposição circular (Figura 6A e 6B).

Figura 6- Secções transversais da folha de *B. calycinum* A- Epiderme abaxial com paredes com contornos retos. B- Epiderme abaxial com estômatos que formam grupos com disposição circular. Legenda: Ed. Epiderme adaxial; Esta estômatos anisocíticos; Estd estômatos diacíticos Barra=20 $\mu$ m (A e B).



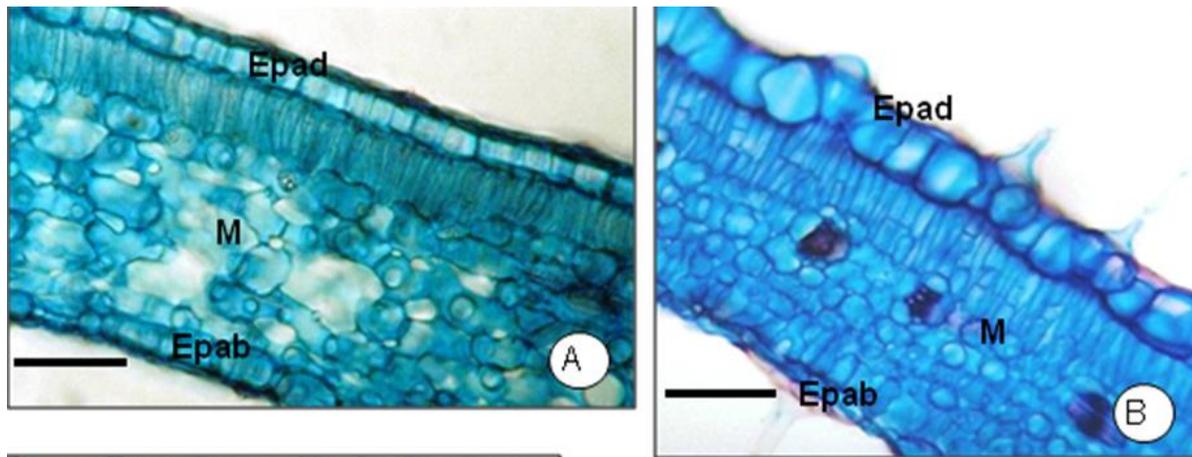
A espécie em estudo possui predominância de tricomas tectores longos entremeados por tricomas longos, presença de tricomas glandulares. Em vista frontal, as células epidérmicas possuem formas e tamanhos variáveis, em geral são poligonais, tendo de 4- 6 lados, mais freqüentemente 5. Suas paredes são espessas e levemente onduladas nas espécies em estudo (Figura 7A e B) .

Figura 7- Secções paradérmicas da face adaxial da folha de *Bryophyllum calycinum* A- Epiderme adaxial com tricomas tectores. B- Epiderme abaxial com tricomas glandulares  
Legenda: Cut Cutícula; Tgl tricoma glandular. Lp Lipídeos Barra = 20µm (A e B).



As folhas da espécie estudada são hipoestomáticas, com estômatos predominantemente diacíticos. O mesofilo, em secção transversal, é dorsiventral (Figura 8A). A região da nervura principal apresentou uma uniformidade na espécie. Em secção transversal, apresentaram contorno convexo-convexo com convexidade em ambas as faces, com maior proeminência na abaxial (Figura 8B).

Figura 8- Secções transversais da lâmina foliar. A-B. Aspecto do mesofilo dorsiventral da espécie *Bryophyllum calycinum* ocorrente em Jandaia, Goiás. Legenda: Epab: Epiderme abaxial; Epad: Epiderme adaxial; M Mesofilo Barra= 50µm (A-B); 130µm (A e B).



O sistema vascular é do tipo colateral organizado em arco aberto. Os feixes estão envolvidos por uma faixa estreita de esclerênquima com 4-6 camadas de células às vezes interrompidas por células parenquimáticas (Figura 9A e B).

Figura 9- A região da nervura principal A-B. Aspecto do feixe colateral da espécie *Bryophyllum calycinum* corrente no município de Jandaia, Goiás.

Legenda: PCL Parênquima clorofiliano; C CórTEX Barra= 50 $\mu$ m (A-B); 130 $\mu$ m (A e B).

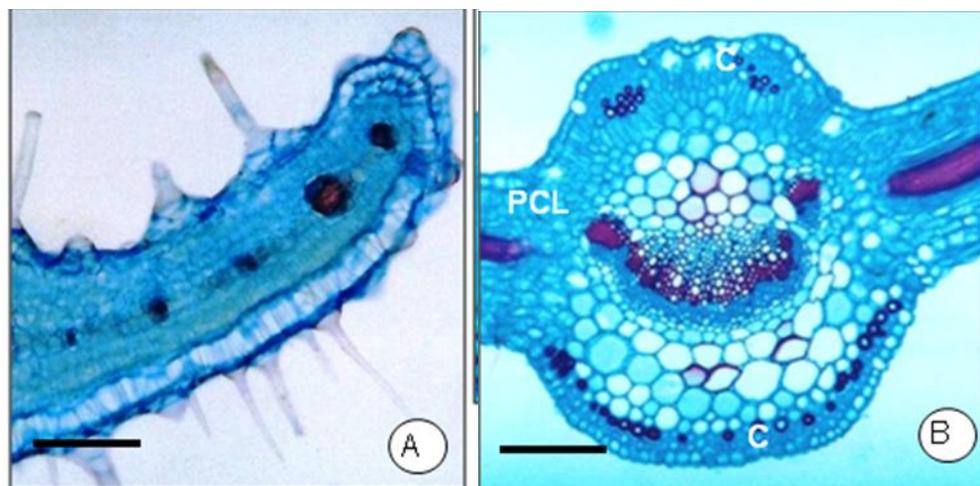
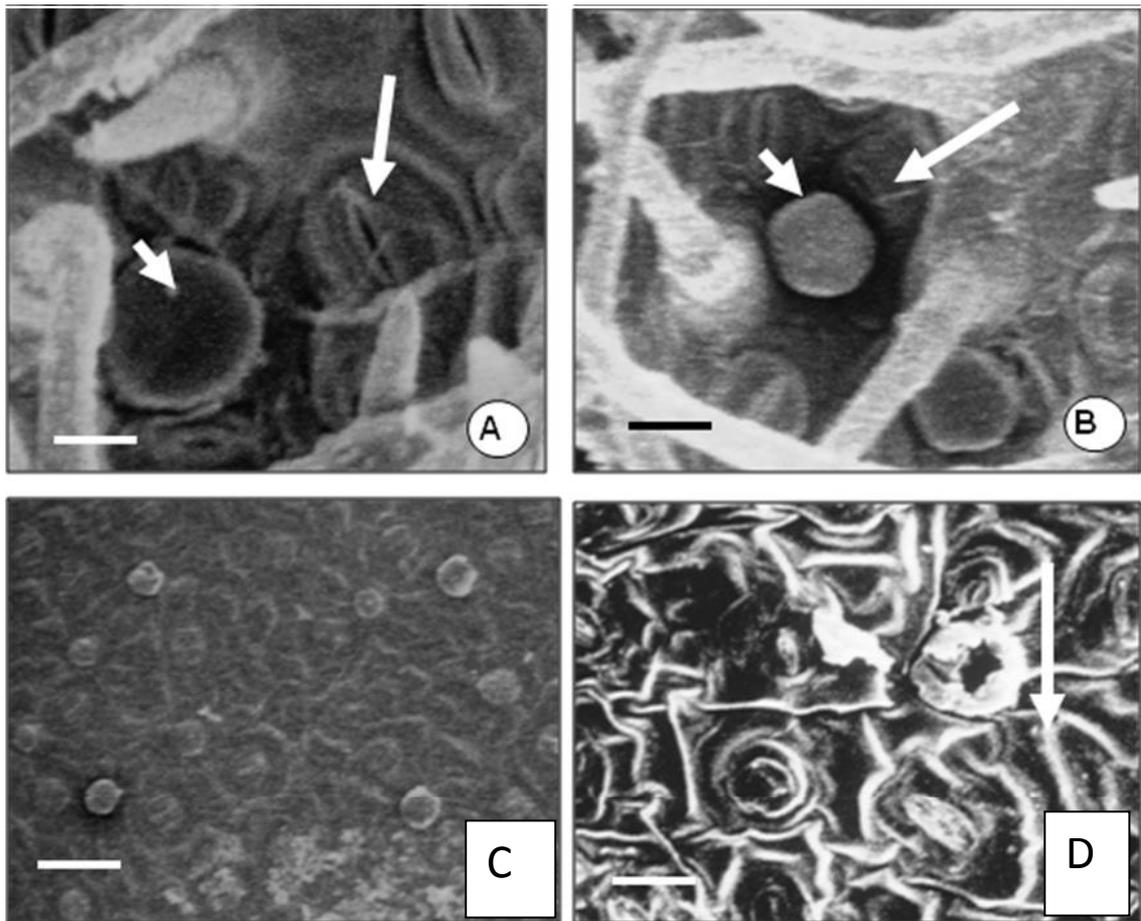


Figura 10- Micrografia Eletrônica da Lâmina foliar *Bryophyllum calycinum* (A)-epiderme abaxial evidenciando estômatos diacíticos (seta maior) e tricoma glandular (seta menor); (B)- epiderme abaxial evidenciando estômatos diacíticos em depressões (seta maior) e tricomas glandulares em depressões (seta menor); (C)- epiderme adaxial presença de tricomas glandulares e estômatos diacíticos; Barra= 100 $\mu$ m (A-D).



O gênero *Bryophyllum* apresenta um notável polimorfismo foliar. As folhas das espécies dentro de cada grupo exibem formas e tamanhos semelhantes, provavelmente, devido às questões genéticas. Tal afirmação está de acordo com Pankhurst & Loucks (1972), que afirmam ser a forma e tamanho das folhas controladas pela hereditariedade, fato demonstrado em seus estudos pela alta variação de tipos que ocorre entre diferentes espécies que coexistem num determinado ambiente.

As características dos estômatos podem ser vistas sob diferentes perspectivas, e serem utilizadas em estudos de ecologia, evolução, fisiologia, morfologia e taxonomia. A função dessas estruturas especializadas e, provavelmente a sua distribuição tem papel importante na evolução e conquista terrestre das plantas (Croxdale, 2000).

As folhas de *B. calycinum* em estudo são hipoestomáticas ocorrendo estômatos predominantemente diacíticos e raramente anisocíticos corroborando os dados de Solereder (1908), Metcalfe & Chalk (1983) com resultados das folhas do gênero *Bryophyllum*.

#### 4 Conclusão

Os estudos anatômico e histoquímico de plantas medicinais podem ser explorados para auxiliar a identificação. Porém, trata-se de tarefa árdua já que muitas plantas apresentam grande semelhança, principalmente quando pertencem ao mesmo gênero.

Com base nos resultados obtidos foi possível o levantamento de características anatômicas foliares da espécie *Bryophyllum calycinum* ocorrente em Jandaia, Goiás. Alguns caracteres da anatomia foliar em microscopia óptica são potencialmente promissores para a taxonomia do grupo quando usados isolados ou em combinação, tais como: as folhas são simples, pecioladas, ovaladas com coloração verde-escura e glabrescentes em ambas as superfícies, peninérveas com ápice obtuso, base simétrica e atenuada. A epiderme na superfície abaxial apresenta-se uniestratificada. tricomas tectores longos entremeados por tricomas longos e tricomas glandulares. As folhas são hipoestomáticas com estômatos predominantemente diacíticos. O mesofilo, em secção transversal, é dorsiventral. O sistema vascular é do tipo colateral, organizado em arco aberto.

O estudo das superfícies sob microscopia eletrônica de varredura forneceu informações detalhadas relacionadas à micromorfologia com possível aplicação taxonômica. Dentre as principais características distintas da espécie em estudo estão: tricomas tectores longos e glandulares, espessamento nas paredes ventrais das células-guarda dos estômatos. Tais características anatômicas observadas na espécie estudada apresentam valor taxonômico e podem ser usadas como diagnósticos.

### **Referências bibliográficas**

ADSANWO, J.K. et al. Antiulcer activity of methanolic extract of *Bryophyllum pinnatum* in rats. *Journal of Biological Sciences*, v.7, n.2, p.409-12, 2007.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (editoras). *Anatomia Vegetal*. Viçosa, Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa. 2003.

BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas no Brasil. Viçosa-MG, UFV: Imprensa Universitária, 1991. v. 2, 377 p.

BOZZOLA, J. J & RUSSELL, L. D. electron Microscopy: principles and techniques for biologists. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 1992.

CARLQUIST, S. Comparative Plant Anatomy. New York, Holt, Rinehart and Winston, 1961.

CARVALHO, A.S.T. Úlcera péptica. *Jornal de Pediatria*, v.76, n.2, p.127-34, 2000.

COSTA NETO, P.L.O. Estatística. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 264p.

COSTA, A. F. Farmacognosia 3v. 2ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1970.

COSTA, A.F. Farmacognosia. 3v. .3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2001.

COUTINHO, D.F. et al. Estudo fitoquímico comparativo das folhas de *Bryophyllum Calycium Salisb* em diferentes períodos de coleta. *Revista do Hospital Universitário/UFMA*, v.2, n.2, p.30-4, 2001.

CROXDALE, J. L. Stomatal patterning in angiosperms. *American Journal of Botany*, vol. 87, n.8, p.1069-1080. 2000.

DICKSON, W. C. Integrative Plant Anatomy. San Diego, Harcourt Academic Press. 2000.

GOMES, A.A. et al. Estudo da ação do suco extraído das folhas de *Bryophyllum calycinum Salisb.* (Crassulaceae) sobre o sistema gabaérgico. *Arquivos Médicos do ABC*, v.15, n.2, p.14-8, 1992.

GONZALEZ, F.G.; DI STASI, L.C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine*, v.9, n.2, p.125-134, 2002.

GOODLAND, R. A physiognomic analysis of the cerrado vegetation of central Brazil. *Journal of Ecology* 59: 411–419, 1971.

GOULART, Y.C.F. et al. Evaluation of gastric anti-ulcer activity in a hydro-ethanolic extract from *Kielmeyera coriacea*. *Brazilian Archives of Biology and Technology - an international journal*, v.48, n.1, p.211-6, 2005.

JENSEN, W.A. Botanical histochemistry, principles and practice. W.H. Freeman, San Francisco. 1962

JOHANSEN, D. A. Plant Microtechnique. New York: McGraw- Hill. 1940.

JUDD, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F. Plant Systematic. A Phylogenetic Approach. Inglaterra, Sinauer Associates, inc., p. 383-5. 1999.

KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. Manual Básico em Métodos em Morfologia Vegetal. Rio de Janeiro: EDUR. 1997.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, v.135, n.1, p.41-60, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. p. 185-186.

MAZIA, D., BREWER, P. A & ALFERT, M. (1953). The cytochemistry staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.* vol.104, p. 57- 67. 1953.

MUZITANO, M.F. Flavonóides de *Kalanchoe pinnata* (CRASSULACEAE): Avanços na pesquisa da utilização desta espécie medicinal no tratamento da Leishmaniose cutânea. 2006. 186p. Tese (Doutorado - Em Ciências) - Departamento de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

NAVARRO, T., EL Qualidid, J. Trichomes morphology in *Teucrium L.* (labiatae). A taxonomic Review. *Anales Jardim Botanic Madrid*, vol.57, n. 2, p. 277- 97. 2000.

OJEWOLE, J.A.O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, n.1, p.13-19, 2005.

OKWU, D.E.; JOSIA, C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.4, p.357-61, 2006. [ Links ]

PARK HURST, D. F. & LOUCKS, O. L. Optimal leaf size in relation to environment. *Journal of Ecology*, vol.60, n. 2, p. 505-537. 1972.

PERRIN. C. Inclusions in the epithem cells of the hydathodes of *Cichorium intybus L.* and *Taraxacum officinale Weber*. In: METCALFE, C. R. & CHALK, L. *Anatomy of the Dicotyledons*, vol. 11, Oxford: claredon Press. 1983.

PETROVICK, P. R. *Farmacognosia- da Planta ao medicamento*. 4a Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC. 2004.

PIO CORRÊA, M. *Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. 1.ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. 646p.

SANTIAGO, E. J. A.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M.; LAMEIRA, O. A.; Conceição, H. E. O.; Gavilanes, M. L. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, vol. 25, n. 5, p. 1035-1042. 2001.

SIDDIQUI, S. et al. Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *Bryophyllum pinnatum*. *Phytochemistry*, v.28, n.9, p.2433-2438, 1989.

SOUSA, P.J.C. et al. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophyllum* Hist., vol.4, p. 3-78.1965. Strasburger, F.; Noll, H. & Schimper, A.F.W. *Tratado de Botânica*. Barcelona, Manuel Marin, p. 651. 1960.

STRAUSS-DEBENEDETTI, S.; BERLYN, G. P. Leaf anatomical responses to light in five tropical Moraceae of different successional status. *American Journal of Botany*, Columbus, vol.81, n.12, p.1582-1591. 1994.

SUÁREZ, A.D. et al. Efecto cicatrizante de extracto fluido de hojas de siempreviva. *Revista Cubana Planta Medica*, v.6, n.1, p.16-8, 2001

TATSIMO, S.J.N. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*, *BMC Research Notes*, v.5, n.158, p.1-6, 2012.

## **CAPÍTULO 2 - Prospecção Fitoquímica das folhas *Bryophyllum calycinum* Salisb (CRASSULACEAE) OCORRENTE JANDAIA- GOIÁS**

### **1 Introdução**

Os metabólitos secundários encontram-se presentes na maioria das plantas, muitos deles, tais como alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas e ligninas têm encontrado aplicações como fármacos, corantes, aromas, inseticidas e parecem ser os principais responsáveis pelas ações analgésica, anti

inflamatória, antiviral, hipoglicemiante, antiespasmódica e antialérgica das espécies vegetais (Calixto et al. 1997).

A presença de certos compostos em determinados grupos de plantas é de grande importância nos estudos sobre evolução. Os processos evolutivos dependem da combinação gênica e seleção. Durante a evolução pode ocorrer que, grupos não relacionados quimicamente apresentem similaridades morfológicas, chamado de convergência ou paralelismo. Por outro lado, pode ocorrer divergência, em que plantas intimamente relacionadas originam descendentes diferenciados. Tais fenômenos podem causar consideráveis dificuldades nos estudos taxonômicos. Nesses casos, o conhecimento fitoquímico desses grupos pode ser de grande importância (Gottlieb et al., 1987).

Segundo alguns autores, a existência de um padrão comum no metabolismo secundário pode prover evidências corretas de parentesco do que similaridades morfológicas, que podem tanto ser devidas a ancestrais comuns quanto à evolução convergente (Swain, 1963; Gershenzon & Mabry, 1983; Hegnauer, 1986).

Gottlieb & Salatino (1987) fizeram um estudo sobre a função e evolução dos óleos essenciais e das suas estruturas secretoras e descreveram as funções dos constituintes dos óleos essenciais nas plantas, suas localizações e principais características, relacionando as produções de óleos essenciais com as características evolutivas das plantas, onde demonstraram as tendências biossintéticas de várias famílias de plantas. Evidenciaram, desta forma que os óleos essenciais vêm apresentando uma importância crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos.

Gros et al. (1985) afirmam que a característica mais importante da maioria dos metabólitos secundários é a sua distribuição restrita na natureza, que se limita a uma espécie ou a espécies relacionadas, permitindo a ela se adequar às condições impostas pelo ambiente. O estudo desta distribuição e variabilidade em populações naturais das plantas por meio de estudos bioquímicos é denominado quimiotaxonomia, que consiste na investigação de compostos químicos que ocorrem em plantas.

Um dos problemas atribuídos aos fitoterápicos está relacionado ao controle de qualidade da matéria-prima. As plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas, sendo que algumas são produzidas em maior quantidade do que outras, e podem variar de acordo com as condições climáticas e edáficas. Dessa forma, a

qualidade da matéria-prima vegetal pode variar dependendo da sua procedência e período de coleta (Von poser et al., 2001).

Estudos para espécies como *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. *Kalanchoe daigremontiana* x *tubiflora*, *Kalanchoe brasiliensis* Camb. E *Kalanchoe gastonibonnierei* Raym.-Hamet & H. Perrier pertencentes à família Crassulaceae são fontes de diversas classes de metabólitos secundários já descritos, sendo que alguns são de interesse comercial, tais como: bufadienolídeos (usados como anti-tumorais e inseticidas), dimolato de kalanchosina (usado como bloqueador seletivo de linfopoiese, inibindo o mecanismo de proliferação dependente de IL-7) e flavonóides (com ação larvívica sobre *Aedes aegypti* e inibidores de acetilcolinesterase, sendo um possível fármaco para o tratamento do mal de Alzheimer) (Supratman et al., 2000; Supratman et al., 2001; Trevisan et al., 2006; De-Paiva et al., 2008).

Com a finalidade de colaborar para os estudos fitoquímicos da espécie *Bryophyllum calycinum* Salisb este capítulo objetivou realizar a determinação dos teores de umidade e de cinzas das drogas vegetais da espécie em estudo e realizar a prospecção fitoquímica das folhas, identificando as principais classes de metabólitos secundários.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Material botânico**

As análises relacionadas à prospecção fitoquímica foram realizadas no Laboratório de Química Instrumental da Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis, GO.

O material botânico foi preparado dessecando as folhas em estufa do tipo FABBE- PRIMA com ventilação forçada a 40°C e, em seguida, triturado em moinho de

facas WILLYE TECNAL modelo TE 650. O pó assim obtido foi devidamente identificado, acondicionado e armazenado até a sua utilização nos experimentos.

## **2.2 Determinação do teor de umidade**

Os ensaios foram realizados em triplicata conforme Farmacopéia Brasileira V (2010). Foi pesado, em balança analítica BIOPRECISA modelo FAN, 2 g do material botânico pulverizado e transferido para um cadinho, previamente pesado e dessecado a 100-105°C por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi dessecada em estufa FANEM modelo 002 CB a 100-105°C por 2h, retirada em dessecador e pesada. Posteriormente, foi feita a dessecação pesando o material em intervalos de 1 hora. O ensaio foi concluído quando duas pesagens sucessivas não diferirem entre si por mais de 5 mg. A porcentagem da água foi calculada em relação à amostra seca ao ar utilizando a fórmula (COSTA, 1982; PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985):

$$\% \text{ teor de umidade} = 100 \times N/p$$

Onde:

N- perda de peso da amostra em gramas;

p- quantidade de amostra em gramas.

## **2.3 Determinação do teor de cinzas**

### **2.3.1 Determinação do teor de cinzas totais**

Para a determinação desse parâmetro de qualidade, os ensaios foram realizados em triplicatas, conforme a Farmacopéia Brasileira V (2010). Foi pesado em balança analítica BIOPRECISA modelo FA2104N, 3 g da amostra pulverizada, os quais foram transferidos para cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado.

A amostra foi distribuída de forma uniforme e incinerada em mufla EDG EQUIPAMENTO modelo 3000, aumentando-se a temperatura até cerca de 500°C, até a obtenção de cinzas brancas. Em seguida, a amostra foi retirada em dessecador e pesada. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação à amostra seca ao ar (COSTA,1982; PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985) conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ teor de cinzas} = 100 \times N/p$$

Onde:

N- quantidade de cinzas totais da amostra em gramas;

p- quantidade em gramas da amostra.

### **2.3.2 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido clorídrico (HCl)**

Para a determinação desse parâmetro de qualidade, os resíduos obtidos na determinação do teor de cinzas totais, em triplicata, foram fervidos durante 5 minutos com 12,5 ml de HCl SR, preparado conforme Farmacopéia Brasileira V (2010) em cadinhos cobertos com vidro relógio. O resíduo foi filtrado em papel filtro quantitativo. Os cadinhos e os vidros relógios foram lavados em água quente. O papel de filtro contendo o resíduo foi lavado com água quente até o filtrado se tornar neutro.

O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original e levado à secagem e carbonização em fogareiro. Em seguida, os cadinhos foram transferidos para uma mufla EDG EQUIPAMENTO modelo 3000, pré-aquecida a 500°C, incinerando-se o resíduo por volta de 5 horas ou até a formação de cinzas brancas. Os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados.

A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido clorídrico foi calculada em relação à amostra inicial (COSTA, 2001).

### **2.4 Prospecção fitoquímica**

A análise qualitativa das principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas de *B. calycinum* foi realizada nas amostras pulverizadas obtidas

conforme descrito anteriormente, para a determinação do teor de umidade e cinzas. Foi utilizado, nos experimentos, metodologias adaptada de Matos (1988), Matos & Matos (1989) e Costa (2001), descritas a seguir:

- **Pesquisa de Heterósídeos Antraquinônicos.**

**Extração:**

Para a extração dos possíveis heterosídeos antraquinônicos, presentes na amostra pulverizada pesou-se, em balança semi-analítica, 1g da amostra e acrescentou-se 30 mL de etanol a 75% (v/v), aqueceu-se durante 3 minutos em chapa aquecedora, e, filtrou-se em papel de filtro.

**Caracterização:**

Para a caracterização dessa classe de metabólitos secundários transferiu-se 10 mL do filtrado para um béquer de 40 mL que foi designado béquer (I) e 10 mL para outro béquer que foi designado (II). O conteúdo do béquer I foi acidificado com 0,5 mL de ácido clorídrico a 10% (v/v) e levado à fervura por 2 minutos em chapa aquecedora, sendo que com o conteúdo do béquer (II) fez-se o mesmo procedimento, exceto a acidificação.

Os líquidos foram transferidos para os tubos de ensaio designados de (I) e (II), respectivamente, após o resfriamento, foram adicionados, a cada tubo, 10 mL de éter etílico P. A., agitando-os levemente. Em seguida, separou-se 5 ml da fase etérea dos tubos (I) e (II), e foram acrescentados 4 mL de amônia 50% (v/v) em cada um, deixando-os em repouso por 5 minutos para verificação da coloração da fase amoniacal. A coloração rósea a vermelha na fase amoniacal indica reação positiva para heterosídeos antraquinônicos. Esta reação é denominada Reação de Borntrager Indireta.

- **Pesquisa de Heterosídeos Cardioativos**

**Extração:**

Para a extração dos possíveis heterosídeos cardioativos presentes na amostra pulverizada pesou-se, em balança semi-analítica, 2,5 g da amostra, acrescentou-se 25 mL de etanol a 50% (v/v) e 10 mL de solução de acetato de chumbo a 10% (p/v) e

ferveu-se por 4 minutos. Após o resfriamento, o volume foi completado para 25 mL com etanol a 50% (v/v) e filtrado. Ao filtrado, adicionou-se 15 ml de clorofórmio PA (por duas vezes), separando-se em seguida, a fase clorofórmica.

### **Caracterização:**

Para a caracterização desta classe de metabólitos secundários foram realizadas as seguintes reações:

- *Reação de Liebermann-Burchard* (reação de caracterização do núcleo esteróide): Foram transferidos 3 mL da fração clorofórmica para um tubo de ensaio e levados à secura em banho-maria. Ao resíduo do tubo, foi adicionado 1 mL do reagente de Liebermann-Burchard, recém preparado (1 mL de clorofórmio P. A., 1 mL de anidrido acético P. A. e 3 - 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado). Deixou-se o tubo em repouso por 5 minutos. O desenvolvimento de coloração acastanhada a esverdeada indica reação positiva para esteróides/ triterpenos. O reagente de Liebermann-Burchard promoverá desidratações e desidrogenações no núcleo fundamental esteróide resultando derivados com ligações duplas conjugadas, portanto corados, tal coloração poderá ir do acastanhado ao esverdeado (COSTA, 2001).
  
- *Reação de Keller-Kiliani* (reação que detecta desoxi-açúcares): Foram evaporados, até a secura, 5 mL da fração clorofórmica num tubo de ensaio em banho-maria. Ao resíduo do tubo, foi adicionado um reagente recém-preparado que contém ácido acético glacial P. A. e cloreto férrico 9% (p/v) na proporção de 3: 0,1. Homogeneizou-se o conteúdo do tubo e foi lentamente vertido para outro tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de um anel de coloração castanho-avermelhada na zona de contato, assim como se houve aparecimento de coloração azul-esverdeada na camada acética, indica reação positiva para desoxi- açúcares.
  
- *Reação de caracterização do núcleo esteroide (Reação de Pesz)*: Foram evaporados 3 mL da fração clorofórmica até a secura numa cápsula de porcelana em chapa aquecedora. Foram acrescentadas, ao conteúdo da cápsula, após o

resfriamento, 3 - 6 gotas de ácido fosfórico concentrado. A presença de fluorescência amarela ou verde, sob luz ultravioleta (365nm), indica reação positiva.

- *Reação de Kedde* (reação específica para o anel lactônico): Foram transferidos 6 mL da fração clorofórmica para um tubo de ensaio e levados à secar em banho-maria. Ao resíduo do tubo foram acrescentados 2 mL de etanol 50% (v/v), 2 mL de água, 2 mL de reagente ácido 3 - 5 dinitrobenzólico a 1% (p/v) recém-preparado em etanol a 96% (v/v) e 2 mL de hidróxido de potássio 1M. Após repouso de 5 minutos. A coloração castanho-avermelhada a vermelho-violeta indica reação positiva para heterosídeos cardioativos.

- **Pesquisa de Heterosídeos Flavonóides**

**Extração:**

Para a extração dos possíveis heterosídeos flavonóides presentes na amostra pulverizada foram pesados, em balança semi-analítica, 7g da amostra e foram acrescentados 60 mL de etanol a 70% (v/v). Essa mistura foi fervida durante 5 minutos e filtrada em papel de filtro umedecido com etanol a 70% (v/v).

**Caracterização:**

A partir do filtrado obtido foram realizadas as seguintes reações:

- *Reação de Shinoda*: Foram transferidos 3 mL do filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se cerca de 1 cm de fita de magnésio fina e acrescentou-se cuidadosamente 1 mL de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento de coloração vermelha indica reação positiva para heterosídeos flavonóides. Nessa reação, os derivados flavônicos, que têm cor amarelada, em presença de meio ácido, reduzem tornando - se vermelhos. Chalconas e isoflavonas não desenvolvem cor nesse ensaio (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

- *Reação Oxalo-Bórica:* Evaporou-se 5 mL de solução extrativa em uma cápsula de porcelana. Juntou-se ao resíduo semi-seco 3 mL de solução de ácido bórico a 3% (p/v) e 1 mL de solução de ácido oxálico a 10% (p/v). Evaporou-se até secura e adicionou-se, ao resíduo seco, 7 mL de éter etílico P.A. Observou-se sob luz ultravioleta a ocorrência ou não de fluorescência. Costa (2001), afirma que os flavonóides da amostra, na presença de ácido bórico e ácido oxálico, formam complexos cromóforos que apresentam fluorescência verde ligeiramente amarelada sob luz ultravioleta.
  
- *Reação com Ácido Sulfúrico Concentrado:* Foram adicionados 3 mL da solução extrativa numa cápsula de porcelana e deixou-se evaporar até a semi-secura. Juntou-se 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A presença de fluorescência amarela ou verde, sob luz ultravioleta, indica reação positiva para heterosídeos flavonóides. Na presença de ácido sulfúrico concentrado os compostos flavônicos formam sais de oxônio (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Estes sais apresentam fluorescência variável, conforme a posição do íon oxônio, quando expostos à luz ultravioleta.
  
- *Reação com Hidróxidos:* Foram transferidos 3 mL da solução extrativa para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio a 20% (p/v) e agitou-se o tubo. O desenvolvimento de coloração amarela indica reação positiva para heterosídeos flavonóides. Segundo Costa (2001), a presença de heterosídeos flavônicos na amostra, promove o desenvolvimento de coloração amarela.
  
- *Reação com Cloreto de Alumínio:* Foram transferidos cerca de 5 mL da solução extrativa para uma cápsula de porcelana. Concentrou-se à metade e transferiu-se para um pedaço de papel de filtro espalhando sobre toda a superfície. A seguir, uma das regiões do papel foi umedecida com solução de cloreto de alumínio a 5% (p/v). O cloreto de alumínio forma complexos com hidroxilas vizinhas ou hidroxilas e carbonilas vizinhas nos derivados flavonóides, tais complexos apresentam fluorescência que vai do amarelo ao azul-esverdeado quando observados sob luz ultravioleta 365 nm (COSTA, 2001).

- *Reação com Cloreto Férrico:* Foram transferidos 3 mL da solução extrativa para um tubo de ensaio. Foram acrescentadas 2 gotas de cloreto férrico a 4,5% (p/v) e observou-se o aparecimento de coloração azul, verde marrom ou vermelha indicando reação positiva. Segundo Zuanazzi e Montanha (2004), muitos compostos fenólicos na presença de cloreto férrico desenvolvem coloração azul, verde, marrom ou vermelho.

- **Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos (saponinas)**

#### **Extração:**

Para a extração dos possíveis heterosídeos saponínicos, pesou-se em balança semi-analítica, 1g da amostra em pó que foi transferida para um béquer contendo 100 mL de água destilada. Essa mistura foi levada à fervura em chapa aquecedora por 5 minutos, adicionando-se durante a decocção, carbonato de sódio em solução até a neutralização, que foi observada utilizando-se papel de tornassol como indicador. Logo em seguida, a mistura foi filtrada em algodão e ao filtrado acrescentou-se água destilada até completar um volume de 100 mL.

#### **Caracterização:**

Para a caracterização dessa classe de metabólitos secundários montou-se uma bateria contendo 10 tubos de ensaio de tamanhos e diâmetros iguais. Os tubos de ensaio foram marcados em duas graduações diferentes: a primeira correspondente a 10 mL e a segunda 1 cm acima desta. Tais tubos foram preparados com solução extrativa e água destilada nas seguintes proporções em mL respectivamente: 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 3:7; 2:8; 9:1; 10:0. Após esse procedimento, cada tubo foi vigorosamente agitado por 20 segundos e deixado em repouso por 10 minutos. Observou-se o desenvolvimento ou não de espuma persistente. Calculou-se o índice de espuma conforme Costa (2001). Segundo Simões et al. (2004), a presença de saponinas na amostra é constatada pela formação de espuma persistente.

- **Pesquisa de Taninos**

### **Extração:**

Para a extração dos possíveis taninos, foram pesados em balança semi-analítica, 2g da amostra pulverizada e adicionados 50 mL de água destilada, a mistura foi levada à fervura durante 5 minutos. Em seguida, procedeu-se a filtração da mistura ainda quente, utilizando papel de filtro. Completou-se o volume do filtrado obtido para 100 ml e procedeu-se a pesquisa de taninos.

### **Caracterização:**

Foi montada uma bateria contendo 6 tubos de ensaio. A cada tubo foram adicionados 5 mL da solução extrativa e foram realizadas as seguintes reações:

- *Reação com gelatina:* Foram adicionadas ao primeiro tubo, 5 gotas de solução de gelatina a 2,5% (p/v) em solução de cloreto de sódio a 5% (p/v). A presença de precipitado branco indica reação positiva. Segundo Santos e Mello (2004), taninos reagindo com a gelatina formam-se pontes de hidrogênio entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os grupamentos amidas das proteínas, além de interações hidrofóbicas e algumas ligações covalentes, responsáveis pelo aparecimento de um precipitado.
- *Reação com sais de alcalóides:* Foram adicionadas ao segundo tubo, 5 gotas de solução de sulfato de quinino a 1% (p/v) em ácido sulfúrico a 5% (p/v). Ao terceiro tubo, foram adicionadas 5 gotas de solução de brucina a 1% (p/v) em ácido sulfúrico 5% (p/v). A presença de precipitado indica a existência de taninos na amostra, pois as hidroxilas fenólicas dos taninos reagem com os grupamentos aminas dos alcalóides formando substâncias insolúveis (COSTA, 2001).
- *Reação com sais metálicos:* Ao quarto tubo foram adicionadas 5 gotas de acetato de cobre a 4% (p/v). Ao quinto tubo acrescentou-se 2 gotas de cloreto férrico a 2% (p/v). A presença de taninos é evidenciada pela formação de precipitado na

amostra. O aparecimento de precipitado indica presença de taninos, pois eles reagem com sais de metais pesados como cobre, ferro, zinco, dentre outros, formando fenatos insolúveis. Os fenatos férricos apresentam coloração enegrecida (COSTA, 2001).

- *Reação com Hidróxidos Alcalinos:* Ao sexto tubo foram adicionadas 5 gotas de solução de hidróxido de sódio ou potássio a 20% (p/v). A presença de taninos é evidenciada pela formação de precipitado e presença de fenatos solúveis na solução. Para cada uma dessas reações, paralelamente, foi preparado um tubo controle contendo 5 mL de ácido tânico 0,5% (p/v) e os reagentes da reação correspondente, a fim de comparar o tubo teste com o tubo controle. Os fenatos férricos apresentam coloração enegrecida. Na reação com hidróxidos há uma mudança de coloração da solução (escurecimento) caracterizada pela presença de fenatos solúveis formados pela reação de grupos fenólicos dos taninos com os hidróxidos (COSTA, 2001).

- **Pesquisa de Alcalóides**

#### **Extração:**

Para a extração dos possíveis alcalóides, foram pesados em balança semi-analítica 2g da amostra pulverizada. Foram adicionados 20 mL de HCL 20 % (v/v). A mistura foi levada à fervura por 3 minutos e, em seguida, filtrada em papel de filtro e resfriada.

#### **Caracterização:**

O filtrado foi submetido à pesquisa de alcalóides utilizando os reagentes gerais para alcalóides de acordo com metodologia adaptada de Costa (2001), como segue:

- *Reativo de Mayer*: Dissolver em água 2,71g de cloreto de mercúrio e 10g de iodeto de potássio e, em seguida, completar o volume para 200 mL com água destilada. Agitar e filtrar.
  
- *Reativo de Dragendorff*: Dissolver 8g de subnitrato de bismuto em 20 mL de ácido nítrico a 30% (p/v). Dissolver, em separado, 22,8g de iodeto de potássio em um volume mínimo de água destilada. Adicionar a primeira solução, pouco a pouco, sobre a segunda. Deixar em repouso durante algumas horas e filtrar. Completar o volume com água destilada para 100 mL.
  
- *Reativo de Bouchardat*: Dissolver 4g de iodeto de potássio e 2g de iodo em 100 mL de água destilada.
  
- *Reativo de Bertrand*: Dissolver 5g de ácido sílico-túngstico em 100 mL de água destilada.
  
- *Reativo de Hager*: Dissolver 2g de ácido pícrico em 100 mL de água destilada.
  
- *Ácido Tânico*: Dissolver 1g de ácido tânico em 100 mL de água destilada.

A solução extrativa foi distribuída igualmente em 6 tubos de ensaio, sendo que em cada tubo, respectivamente, foram acrescentadas 3 - 9 gotas dos reativos gerais. Montou-se, em paralelo, outra bateria de 6 tubos de ensaio, contendo 3 mL de solução padrão de sulfato de quinina 1% (p/v). Em cada um destes tubos foram adicionadas 3 - 9 gotas dos respectivos reativos gerais para alcalóides a fim de servirem de padrão para comparação com a primeira bateria de tubos. A presença de alcalóides foi constatada pela presença de precipitados nos tubos.

Os reagentes iodados (Mayer, Dragendorff e Bouchardat) precipitam os alcalóides de soluções ácidas sob a forma de poliiodetos complexos. Os poli-ácidos

minerais complexos (reativo de Bertrand) precipitam os alcalóides em meio ácido ou neutro na forma de substâncias amorfas ou cristalinas. Os reativos à base de ácidos orgânicos (reativo de Hager e ácido tânico a 1%) precipitam os alcalóides de soluções ácidas ou neutras formando compostos cristalinos que se dissolvem na presença de álcalis (COSTA, 2001).

Para comprovar a presença de alcalóides também se realizou o teste com o seguinte procedimento: Em balança analítica, foram pesados 4g da amostra pulverizada e adicionados 20 mL de ácido sulfúrico a 5 %. A mistura foi levada à fervura por 3 minutos, em seguida, filtrada em algodão e resfriada. Posteriormente o filtrado foi transferido para um funil de separação, alcalinizado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% e procedeu-se a extração utilizando 10 mL de clorofórmio e após a decantação repetiu-se o procedimento. A seguir evaporou-se o clorofórmio e o resíduo foram dissolvidos em 2 mL de ácido sulfúrico a 5%. Foram distribuídas 2-3 gotas do filtrado em lâminas de vidro, gotejou-se 3- 6 gotas dos reativos gerais dos alcalóides em cada lâmina, após 5 min. de reação observou a presença de precipitado. Foram feitos padrões com sulfato de quinino como controle positivo para comparação (PAULA; BARA, 2007).

- **Pesquisa de Cumarinas**

**Extração:**

Para extração das possíveis cumarinas, foram pesadas 2g da amostra pulverizada em balança semi-analítica e adicionados a 30 mL de água quente. Essa mistura foi filtrada, e ao filtrado adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico 1N ( $\text{pH}_1$ ). Em seguida, extraiu-se com 10 mL de éter etílico P.A. A fase etérea foi concentrada até a metade de seu volume.

**Caracterização:**

Para caracterização dessa classe de metabólitos secundários foram aplicadas gotas da fase etérea sobre duas regiões de um papel de filtro. Em uma das manchas formadas adicionou-se 1 gota de  $\text{NaOH}$  1mol/l . O papel foi observado sob luz ultravioleta 365nm. Segundo Simões *et al.* (2004), as cumarinas, desenvolvem fluorescência azul-brilhante ou verde quando observadas sob luz ultravioleta 365 nm e

em solução alcalina, sofrem rompimento do anel lactônico, desenvolvendo cor amarelada.

## Resultados e discussão

### 3.1 Teores de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico (HCl)

Os teores de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico para as amostras coletadas da espécie em estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Teores de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico expressos em porcentagem (p/p) dos espécimes de *Bryophyllum calycinum* coletados em Jandaia, GO.

<b>Amostras</b>	<b>Umidade (%p/p)</b>	<b>Cinzas totais (%p/p)</b>	<b>Cinzas insolúveis em HCl (%p/p)</b>
<i>Espécime 1</i>	6,9	6,6	0,07
<i>Espécime 2</i>	6,8	6,2	0,08
<i>Espécime 3</i>	7,3	5,5	0,06
<i>Espécime 4</i>	7,7	7,4	0,11
<i>Espécime 5</i>	7,4	7,3	0,32

Os espécimes coletados de *B. calycinum* apresentaram em média 6,9% (p/p); 6,8% (p/p); 7,3% (p/p); 7,7% (p/p) e 7,4% (p/p) de teor de umidade. Os valores encontrados estão de acordo com o proposto na Farmacopéia Brasileira IV (1988) que estabelece

limites de 8 a 14% de umidade para as drogas vegetais, em geral, com algumas exceções especificadas nas monografias. Segundo Costa (2001), as drogas vegetais contêm naturalmente, certa quantidade de água, que se mantém desde a secagem das plantas. O alto teor de água em drogas vegetais diminui o valor farmacológico da droga e pode até anulá-lo, pois o excesso de água permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de substâncias ativas, além de facilitar o aparecimento e o desenvolvimento de microrganismos (Farias 2004). A presença do excesso de água pode indicar, ainda, que o material foi mal preparado ou se encontra acondicionado inconvenientemente (Farias, 2004).

A segurança e a eficácia dos produtos naturais dependem de diversos fatores, dentre estes se destacam a qualidade do produto comercializado. Segundo Farias (2001) a eficácia é dada pela comprovação, por meio de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos e a segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos. No entanto, a má qualidade de um produto fitoterápico ou droga vegetal pode vir a anular a sua eficácia e trazer riscos à saúde do consumidor. Desta forma, a determinação do teor de umidade é um parâmetro de controle de qualidade.

Em relação ao teor de cinzas totais, as amostras analisadas das espécies coletadas apresentaram 6,6% (p/p); 6,2% (p/p); 5,5% (p/p), 7,4% (p/p) e 7,3% (p/p). Segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988), o limite máximo de cinzas totais em uma matéria-prima vegetal deve ser determinado caso a caso. As cinzas, resíduos não voláteis, isentos de carbono, que se originam da combustão das substâncias orgânicas em condições apropriadas, provêm, basicamente, dos constituintes minerais e dos organometálicos que integram as plantas (cinzas fisiológicas) e, ainda, de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não fisiológicas).

Desta forma, o teor de cinzas totais acima do estabelecido como parâmetro para uma determinada droga vegetal indica presença de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (Oliveira et al., 1998).

O teor de cinzas insolúveis em ácido clorídrico para os espécimes foi de 0,76% (p/p); 0,08% (p/p); 0,06% (p/p); 0,11% (p/p) e de 0,32% (p/p). A determinação destas cinzas está relacionada à presença de sílica e constituintes silicosos que em quantidade acima da estabelecida para a droga vegetal indica contaminação por excesso de areia ou terra (Farias, 2004; Farmacopéia Brasileira IV, 1988).

Os resultados diferentes nos respectivos teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico dos diferentes espécimes podem estar relacionados às condições ambientais e do tipo solo no local de coleta.

### 3.2 Prospecção Fitoquímica

Pelas análises da prospecção fitoquímica observou-se a presença de heterosídeos flavonóides, cumarinas, compostos esteróides e triterpenóides (Tabela 2).

**Tabela 2** – Principais classes de metabólitos secundários detectados nas folhas de *Bryophyllum calycinum* coletados em Jandaia, GO.

Classe de metabólitos secundários	Espécime de <i>B. calycinum</i>
Heterosídeos Antraquinônicos	Negativo
Heterosídeos Cardioativos	Positivo
Heterosídeos Flavonóides	Positivo
Heterosídeos Saponínicos	Negativo
Taninos	Negativo
Alcalóides	Negativo
Cumarinas	Positivo

Na pesquisa de heterosídeos cardioativos foi observado que na reação de Liebermann-Burchard a solução extrativa corou-se em castanho. Na reação de Keller-Kilian, teve formação de um anel de coloração castanha na zona de contato e a camada acética corou-se ligeiramente esverdeada. Na reação de caracterização do núcleo esteróide se formou fluorescência verde, sob comprimento de onda 365 nm. Na reação de Kedde, a solução extrativa de ambas as espécies apresentou coloração avermelhada. Devido as colorações observadas nas reações descritas, pôde-se concluir que há presença de heterosídeos cardioativos nos espécimes.

Na pesquisa de heterosídeos flavonoides foi observado que na reação de Shinoda, a solução extrativa das amostras apresentou coloração vermelho-tijolo. Na reação com ácido sulfúrico concentrado, forma-se fluorescência verde sob comprimento de onda 365 nm. Na reação com os hidróxidos alcalinos, a solução extrativa apresenta coloração amarelo-acastanhada. Na reação com cloreto de alumínio, apresentou-se fluorescência amarela sob comprimento de onda 365 nm. Na reação com cloreto férrico, a solução extrativa apresentou coloração verde marrom.

Na pesquisa de cumarinas, foi observado que, na região do papel de filtro contendo a fase etérea e uma gota de NaOH 1N formou-se fluorescência amarelo-esverdeado sob comprimento de onda 365 nm. Segundo COSTA (2001), o desenvolvimento de fluorescência azul-brilhante ou verde sob luz ultravioleta em comprimento de onda igual a 360 nm, indica reação positiva para cumarinas.

Fatores como temperatura, tipo de solo, umidade, pluviosidade, altitude e época de coleta podem influenciar na composição química das espécies vegetais e, consequentemente na sua qualidade e eficácia (Simões et al., 1999).

A presença nas amostras aqui estudadas de heterosídeos flavônicos, cumarinas, compostos esteróides e triterpenóides corroboram resultados similares em estudos realizados com *B. calycinum* em diferentes períodos de coletas no Bairro Vinhais, na cidade de São Luiz, MA se também observou a presença de taninos. Na identificação dos heterosídeos cardioativos os testes fitoquímicos para determinação de esteróides e triterpenóides mostraram resultados positivos para Ester e triterpenóides em todos os extratos. As classes de saponinas, resinas, ácidos fixos fortes, alcalóides, bases quaternárias não foram detectados nos extratos hidroalcoólicos das folhas da espécie em estudo (Coutinho, et al., 2001).

Estudos sobre ensaios fitoquímicos realizados com o extrato metanólico da planta, por meio de testes gerais de identificação e cromatografia em camada delgada

(CCD), mostraram-se positivos com relação à presença de cumarinas, flavonóides, esteróides e triterpenóides e negativos para alcalóides. Estudos cromatográficos e espectrométricos isolaram e caracterizaram derivados cumarínicos (cumarina, dihidroxicumarina e umbeliferona), assim como derivados do ácido fenilpropiónico (CORREA, 2013; FONSECA, 2009).

#### **4 Conclusão**

O método de secagem adotado neste trabalho propiciou uma umidade para as folhas de *Bryophyllum calycinum* próxima ao limite estabelecido pela Farmacopéia Brasileira IV (1988) o que evidencia uma boa conservação da droga vegetal.

Apesar dos resultados diferentes nos respectivos teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico dos espécimes estudados, isso pode estar relacionado às condições ambientais e de outros fatores.

A presença das classes de metabólitos secundários como heterosídeos flavonóides, compostos esteróides e triterpenóides e cumarinas têm ocorrência na família Crassulaceae, podendo ser utilizados como marcadores taxonômicos.

Os testes qualitativos da prospecção fitoquímica demonstraram que as folhas de *Bryophyllum calycinum* apresentam potencial fitoterápico que merece investigações futuras mais aprofundadas. Análises quantitativas, testes farmacológicos e toxicológicos serão importantes para comprovar cientificamente a eficácia dessas espécies.

#### **Referências bibliográficas**

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; PAULINO, N.; CECCHINEL FILHO, V.; YUNES, R. The plants Of the genus Phyllanthus as a pontecial souce of new drugs. *Ciência e Cultura*, vol.49, n.5/6, p. 422 -432. 1997.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. v. 3, 1032 p., 1982.

COSTA, A.F. *Farmacognosia*. 3 v. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

COSTA, M. C. C. D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. *Revista Brasileira Planta Medica*. Botucatu, vol.8, n.2, p.81-88. 2006.

DE-PAIVA, L. S.; NOBREGA, A.; DE-MELO, G.; HAYASHI, E. A.; CARVALHO, V.; RODRIGUES-E-SILVA, P. M.; BELLIO, M.; TEIXEIRA, G. P.; RUMJANEK, V.; COSTA, S. S.; KOATZ, V. L. G. Selective blockade of lymphopoiesis induced by kalanchosine dimalate: inhibition of IL-7-dependent proliferation. *Journal of Leukocyte Biology*, v.83, p.1038-1048. 2008

FALCÃO, D. Q. & MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *The Hyptis nus: an ethnopharmacological and chemical review*. *Revista Brasileira de Farmácia*, vol.84, n. 3, p. 69-74. 2003.

FARIAS M. T. Morfologia, anatomia, histoquímica e fitoquímica de espécies do gênero *Hyptenia* (Mart. ex Benth) R. Harley – Lamiaceae ocorrentes no estado de Goiás. 188f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2008.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias- primas vegetais. In: Simões, C. M. O. et AL. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Ver. Ampl. Florianópolis: Ed. Da UFSC; Porto Alegre: Ed. Da UFRGS, p. 263-288, 2004.

FARIAS, M. T. Morfologia, anatomia, histoquímica e fitoquímica de espécies do gênero *Hyptenia* (Mart. ex Benth) R. Harley – Lamiaceae ocorrentes no estado de Goiás. 188f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2008.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, cap.12, págs. 199-222, 2001.

FERREIRA, H. D. Morfologia, taxonomia, filogenia, anatomia foliar e fitoquímica de espécies do gênero *Hyptis* Jacq. (LABIATAE) ocorrentes em Goiás e Tocantins. 439f. Tese (Programa de Pós Graduação em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2009.

GOTTLIEB, O. R. & BORIN, M. R. M. B. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 66 (Supl. 1 - Parte I): p. 205-210. 1994.

GOTTLIEB, O. R. Evolução química vegetal. *Ciência e Cultura*, vol. 39, p. 357-370. 1987.

GOTTLIEB, O. R., FINEBERG, M., GUIMARÃES, M. L., MAGALHÃES, M. T., MARAVALHAS, M. Associação brasileira de pesquisa sobre plantas aromáticas e óleos essenciais. Boletim 11, p. 1-13. 1965.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. D. E & M. B. Biodiversidade, um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: UFRJ. 1996.

GOTTLIEB, O. R; Salatino, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. Ciência e Cultura. p. 707-7016.1987.

GROS, E. G.; POMILIO, A. B.; SELDES, A. M.; BURTON, G. Introduccion al estudio de los productos naturales. Washington: The General Secretariat of the Organization of American States, p. 196. 1985.

GUENTHER, E. History, Origin in Plants, Production and Analysis. In: The Essential Oils, 4.ed. New York: Van Nostrand, v.1. 1977.

HAGERMAN, A.E.; RIEDL, K.M.; JONES, A.G.; SOVIK, K.N.; RITCHARD, N.T.; HARTZFELD, P.W.; RIECHEL, T.L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 46, p.1887- 1892. 1998a.

KIM, E. H. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari- Acaridae). Applied Entomology and Zoology, vol.38, p.261-6. 2003.

KUSTER, R. M. & ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3a.ed. Editora Universidade/UFRGS, Porto Alegre. 2001.

LACAILLE- DUBOIS, M. - A. Saponinas as immunoadjuvants and immunostimulants. In: Wagner, H. (ed). Immunomodulatory agents from plants. Basel: Birkhäuser, p. 243-272. 1999.

Leal, L. K. A. M. et al. Antinociceptive antiinflammatory and bronchodilatador activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. Journal of Ethnopharmacology, RJ, v.70, p. 151-159, 2000.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Focaliza: UFC, n. 128, p. 1988.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. Farmacognosia. Fortaleza: UFC, 1989.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. & AKISUE, M.K. 1998. Farmacognosia. São Paulo, Atheneu, 1998.

PAULA, J. R. & BARA, M.T.F. Farmacognosia 2. Universidade Federal de Goiás- Faculdade de Farmácia: Apostila de aulas práticas. 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS. 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. Petrovick. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 5ª ed. (revisada e ampliada). Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC. 2004.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New Insecticidal Bufadienolide, Bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry, v.64, n.6, p.1310-1312. 2000.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H.; MURAKAMI, A.; SAKAI, H.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana x tubiflora*. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry. v.65, n.4, p.947-949. 2001.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ-FILHO, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. Química Nova, v. 29, n. 3, p. 415-418. 2006.

VON POSER, G.L.; L.A. MENTZ (2001) “Diversidade biológica e sistemas de classificação”, em “Farmacognosia: da planta ao medicamento”, Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, cap. 4, págs. 61-74.

ZUANAZZI, J. A. S. & MONTANHA, J. A. FLAVONÓIDES. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. Petrovick. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 5. ed. (revisada e ampliada). Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC. p. 577-614. 2004.

ZUANAZZI, J. A. S. FLAVONÓIDES. IN: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. Petrovick. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC. Cap. 23, p. 499-526. 2001.

## **CAPÍTULO 3 – Análise do Óleo Essencial Extraído das folhas de *Bryophyllum calycinum* L. (CRASSULACEAE) OCORRENTE JANDAIA- GOIÁS**

### **1 Introdução**

O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis fortemente aromáticos, extraídos de plantas. Seus principais constituintes são os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), alguns diterpenos (C20), além de outros compostos alifáticos com baixo peso molecular. A geração destes compostos se dá por diferentes rotas metabólicas, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. A depender da família, eles podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, e bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. O estoque destes óleos ocorre em diversos órgãos, como flores, folhas, frutos, cascas do caule entre outros (DORMAN; DEANS, 2000; ARAÚJO et al., 2001; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Gottlieb e Salatino (1987) fizeram um estudo sobre a função e evolução dos óleos essenciais e das suas estruturas secretoras e descreveram as funções dos constituintes destes óleos nas plantas, suas localizações e principais características, relacionando sua produção às características evolutivas das plantas, desta forma, demonstraram as tendências biossintéticas de várias famílias de plantas evidenciaram,

que os óleos essenciais vêm apresentando uma importância crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos. A utilização de óleos essenciais pela indústria farmacêutica reside no fato de que grande parte de seus constituintes já possuem descrição de diversas atividades farmacológicas, tais como carminativa, antiespasmódica, secretolítica, estimulante, antiinflamatória e antimicrobiana. Entretanto, ressalta-se que estas atividades são atribuídas ao óleo isolado e não necessariamente à farmacógenos ricos em óleos essenciais, pois a presença de outros constituintes somam para a predominância de determinada atividade farmacológica (COSTA, 1994; SIMÕES; SPITZER, 2004; DE PAULA, 2006).

Algumas espécies do gênero *Bryophyllum* são importantes fontes de óleos essenciais. A presença destes óleos conferem grande importância econômica às espécies desta família graças ao seu alto valor junto a diversas sociedades que os usam por suas propriedades terapêuticas já comprovadas (HEAL et al., 2000; OLIVEIRA, 1995; OLIVEIRA et al., 2000; OKOLI et al., 2008).

Nessa perspectiva, esta pesquisa teve como objetivo, analisar o teor e a composição química do óleo essencial das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb ocorrente em Jandaia, Goiás.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Reagentes e equipamentos**

Os reagentes utilizados para os ensaios descritos no presente capítulo foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, ácido clorídrico, clorofórmio, metanol, etanol e sulfato de sódio amido os quais foram de procedência QUIMEX e/ou MERCK, especificação pró-análise. A água utilizada foi obtida pelo processo de destilação. Para a detecção nas cromatografias, foi utilizado solução de reagente cromogênico vanilina ácida.

### **2.2 Material botânico**

O material botânico foi coletado durante a época em que as inflorescências encontravam-se maduras, no período de agosto a outubro de 2014 e, posteriormente preparado dessecando as folhas coletadas em estufa do tipo FABBE- PRIMA com

ventilação forçada a 40°C e, em seguida, triturado em moinho de facas WILLYE TECNAL modelo TE 650. O pó assim obtido foi devidamente identificado, acondicionado e armazenado até a sua utilização na extração do óleo .

### **2.3 Extração do óleo essencial**

Para a extração do óleo essencial, utilizou-se 50g do material botânico e, posteriormente submetidas à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado, durante 2 horas. O volume do óleo essencial foi medido no tubo graduado do próprio aparelho e o rendimento, em porcentagem, foi calculado em relação à quantidade inicial de material botânico empregado nas extrações. O óleo essencial assim obtido foi dessecado com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, acondicionado em recipiente livres de impurezas, hermeticamente fechado e estocado a baixa temperatura até a sua utilização.

### **2.4 Análise da composição química do óleo essencial**

O óleo essencial extraído foi submetido à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) em um equipamento modelo QP5050A (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida SBP-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm; filme de 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu, Kyoto, Japão), mantendo-se uma vazão de 1mL.min<sup>-1</sup> de hélio, como gás de arraste, e aquecimento com temperatura programada (60°C com uma isoterma de 2 min; seguido de um gradiente de 3°C. min<sup>-1</sup> até 240°C, e em seguida, com um gradiente de 10°C. min<sup>-1</sup> até 280°C, mantendo-se uma isoterma de 10min, com um tempo total de corrida de 70 min). A energia de ionização do detector foi medida em 70 eV, sendo o volume de injeção da amostra de 0,5L diluídas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (~10%). A análise foi conduzida no modo varredura, com um intervalo de massas de 40-400 m/z e uma razão de split de 1:5. A análise quantitativa foi obtida pela integração do Cromatograma Total de Íons (TIC).

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por comparação (automática e manual) dos espectros de massas com os das bibliotecas NIST/EPA/NIH (1998), além da comparação dos espectros de massas de amostras autênticas e Índices de Retenção (IR) calculados com os da literatura (Adams, 2001). Os Índices de Retenção foram calculados através da coinjeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C8–C32 (Sigma, USA), e com aplicação da equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963; ADAMS, 2007).

Equação 1- proposta por Van den Dool e Kratz:

$$IR = 100N [(t_x - t_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})] + 100 C_{n-1}$$

Onde:

$N = C_n - C_{n-1}$   $C_n$  = número de carbonos do n-alcano que elui após a substância analisada

$C_{n-1}$  = número de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada

$t_x$  = tempo de retenção da substância analisada

$t_n$  = tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância analisada

$t_{n-1}$  = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância analisada.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Rendimento do óleo essencial

Os rendimentos dos óleos essenciais, em porcentagem (V/p), calculados a partir das amostras coletadas em Jandaia, Goiás empregadas na extração encontram-se expressos na Tabela 5.

**Tabela 3** – Teor de óleo essencial em porcentagem (V/p) das amostras de *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.

<b>Amostras</b>	<b>Teor de óleo essencial (%)</b>
<i>Espécime 1</i>	0,4
<i>Espécime 2</i>	0,5
<i>Espécime 3</i>	0,5
<i>Espécime 4</i>	0,4
<i>Espécime 5</i>	0,8

Possivelmente, os rendimentos obtidos nas amostras estudadas não variaram uma vez que as coletas foram realizadas na mesma estação do ano (período da seca: agosto a outubro de 2013). Além disso, deve-se levar em consideração, que os indivíduos coletados localizavam-se em locais geográficos distintos, porém relativamente próximos entre si.

Os rendimentos obtidos de óleo essencial de 0,4% e 0,8% nas amostras analisadas de *B.calycinum* corroboram os resultados obtidos por TAKAISI-KIKUNI et al. (2000), em estudos realizados com espécie próxima taxonomicamente.

Verifica-se que os rendimentos obtidos, nas amostras analisadas coincidem com os apresentados na monografia de *C. citratus*, onde se estabelece que as folhas dessecadas dessa espécie devem conter, no mínimo, 0,5% de óleo essencial (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 2003), assim como ao rendimento de 0,5% de óleo essencial de *C. giganteus* (Hochst.) Chiov (KANKO et al., 2004). Ambas as espécies são próximas em nível evolutivo. Adotou-se avaliar a similaridade desse teor em monografia de espécies similares, em função de haver a monografia para *B.calycinum*.

O rendimento de óleo essencial é avaliado a partir da matéria seca, podendo ser muito variável, dependendo de diversos fatores internos e externos, como por exemplo: época e horário de colheita (SILVA, 2005). Dentre outros fatores que influenciam na variação do rendimento do óleo essencial estão os fatores abióticos: tipo de clima e solo e bióticos: interação planta-planta, planta-microrganismos e planta-herbívoros (ROBBERS et al., 1997). Tais fatores resultam em pressões ambientais que ocasionam mudanças quanto à constituição genética e também, nas atividades fisiológicas, que levam as plantas a se adaptarem aos diversos ambientes (KULKARNI e RAMESH, 1987; SANGWAN et al., 2001).

### **3.3 Análise da composição química dos óleos essenciais**

A Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) permitiu detectar 22 componentes comuns nos óleos essenciais das amostras de *Bryophyllum calycinum*, em estágio vegetativo. Destes 22 componentes, cinco não foram identificados.

Todos os componentes identificados encontram-se registrados na Tabela 4. Os componentes principais e percentagem de teor: teores mínimos e máximos dos óleos essenciais encontram –se nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 4-** Componentes do óleo essencial das folhas das espécies de *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.

<b>Componentes</b>	<b>RI<sup>a</sup></b>	<b>RI/ (LIT.)<sup>b</sup></b>
Sabineno	974	975
1-octen-3-ol	977	979
B-pineno	978	979
o-cimeno	1024	1022
Beta-felandreno	1029	1029
Não identificado	–	–
Não identificado	–	–
Não identificado	–	–
1 3,8-p-mentatrieno	1121	1110
<b>Isopulegol</b>	1145	1145
Não-identificado	–	–
Não-identificado	–	–
<b>Isso-isopulegol</b>	1157	1155
formato de nerila	1270	1280
Alfa-copaeno	1378	1376
<b>beta-bourboneno</b>	1387	1387
Beta	1392	1390
Geosmina	1404	1399

Dodecanal	1407	1408
Alfa-cedreno	1410	1410
<b>(E)-cariofileno</b>	1420	1419
Alfa-trans-bergamoteno	1439	1432

<sup>a</sup>Índice de Retenção; <sup>b</sup>Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured: Illinois, p. 804, 2007.

Nota : em negrito componentes com maior teor de óleo das 05 espécies *Bryophyllum calycinum*

**Tabela 5-** Componentes principais e percentagem de teor dos óleos essenciais dos espécimes (1-5) das folhas de *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.

Componente químico do óleo essencial	Teor (%)				
	1	2	3	4	5
Isopulegol	1,29	9,3	1,23	0	1,7
Beta-bourboneno	0,71	0	3,96	0	3,3
(E)-cariofileno	1,93	3,6	18,6	2,7	6,2
Isso- isopulegol	8,09	6	0	0	0

**Tabela 6-** Teores mínimos e máximos dos componentes principais do óleo essencial das amostras de espécies *Bryophyllum calycinum* coletadas em Jandaia, GO.

Componentes principais	RIa	RI/(lit.)b	Teor (%)	Teor (%)
------------------------	-----	------------	----------	----------

			<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>
Isopulegol	1145	1145	0.00	9.32
Isso-isopulegol	1157	1155	0.00	5.20
beta-bourboneno	1387	1387	0.00	3.96
(E)-cariofileno	1420	1419	1.93	18.57

<sup>A</sup>Índice de Retenção; <sup>B</sup>Adams, R.P. *Identification of Essential Oil*

O monoterpeno *isopulegol* foi observado em algumas famílias da ordem Lamiales, dentre elas Lamiaceae e Acanthaceae, famílias botânicas próximas das Crassulaceae e têm alto poder anti-séptico (MENEZES, 1994). Além da importância medicinal desses compostos e muitos de seus derivados, devido ao agradável odor floral, são utilizados na perfumaria e produtos cosméticos, por exemplo, perfumes, loções, sabões, desodorantes e como aromatizantes em alimentos, tais como bebidas não-alcoólicas, sorvetes e doces (JIROVETZ et al., 2007). Silva Santos et al. (2006), em trabalho de revisão, realizaram levantamento dos principais compostos de óleos essenciais, utilizados industrialmente e citam que monoterpenos como *citronelol*, *citronelal*, *geraniol* e *linalol* são utilizados para fragrâncias.

O composto (*E*)-*cariofileno* presente de maneira representativa nas amostras de *Bryophyllum calycinum* são compostos sesquiterpenos hidrocarbonetos bicíclicos amplamente usados para perfumaria cosmética e sabonetes (COSTA, 1994; SIMÕES & SPITZER, 2004).

Costa (2006) em seu trabalho de revisão sobre as ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae) afirma que os compostos (*E*)-*cariofileno* e *óxido de cariofileno* possuem uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividades antibacteriana (frente a bactérias Gram-positivo, Gram-negativas e álcool ácido resistente), antiviral, antihelmíntica, antiprotozoário, anticâncer, quimioterapêutica, hiperglicêmica.

Em *Ocimum selloi* (Lamiaceae) foi registrada a presença de *germacreno-D* outro sesquiterpeno juntamente com (*E*)-*cariofileno*, porém em pequenas quantidades, e em diferentes épocas do ano (MORAES, 2002). Essas substâncias apresentam esqueletos carbônicos com ampla atividade antibacteriana, antifúngica e inibidores enzimáticos (ABRAHAM, 2001). A espécie *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae) contém

*germacreno-D* que apresentou atividade antibacteriana e fungicida, (ALMEIDA et al., 2005). As outras substâncias *β-bourbonemo* e *α-muuroleno* apresentaram atividade alelopática (ALMEIDA, et al., 2003).

Estudos comprovaram que sesquiterpeno *α-muurolol* possui atividade antimicrobiana, principalmente em fungos patogênicos e bactérias gram (+/-), (COSTA, 2006).

A substância beta-bourbonemo encontrada na maioria das espécies aromáticas apresenta ampla atividade biológica como antioxidante (WEEL, 1999), inseticida (YANG, 2003; KIM, 2003), antimicrobiana (BOUGATSOS, 2003) e anticancerígena (LEGAULT, 2003).

O reconhecimento da existência de raças químicas é importante quando se pensa na coleta de plantas medicinais e aromáticas, tanto para estudos químicos e farmacológicos nos quais se tenta avaliar e melhorar a capacidade destas plantas de produzirem determinado constituinte químico (POLZERNHEIM et al., 2006).

#### **4 Conclusão**

O presente estudo possibilitou a determinação do rendimento do óleo essencial e da composição química do óleo essencial.

De acordo com os constituintes verificados nos óleos essenciais da espécie em estudo pôde-se perceber que a composição química dos óleos essenciais está quimicamente relacionada com outros gêneros da família CRASSULACEAE. Assim a análise da composição dos óleos essenciais pode ser importante como subsídio para a quimiotaxonomia, uma vez que este gênero apresenta espécies diferentes que se assemelham morfológicamente, tornando difícil a distinção das espécies baseada em caracteres morfológicos.

Sendo assim, este estudo serve como contribuição no entendimento do perfil químico e ecológico da espécie da família CRASSULACEAE e do gênero sendo, ainda necessários a realização de ensaios biológicos para avaliar se os componentes encontrados no óleo essencial da espécie apresentam atividades farmacológicas, genotóxica e citotóxica.

A espécie estudada demonstra-se relevante para os fins medicinais aos quais são popularmente utilizados e devido a este potencial fitoterápico, merecem estudos mais aprofundados, ou seja, experimentos de isolamento, purificação e determinação

estrutural dos constituintes detectados. Além de testes farmacológicos e toxicológicos que forneçam embasamento científico para o uso seguro dos óleos essenciais destas espécies.

### 3.5 Referências bibliográficas

ABRAHAM, W.R. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? *Current Medicinal Chemistry*, vol.8, p.583- 606. 2001.

ADAMS, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Allured: Illinois. 2007.

ALMEIDA, L. F. R.; DELACHIAVE, M.E.A.; MARQUES, M. O. M. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. – Lamiaceae). *Revista Brasileira Planta Medica*, Botucatu, vol.8, n.1, p.35-38. 2005.

ARAÚJO, G. M.; HARIDASAN, M.A comparison of the nutrient status of two forests on dystrophic and mesotrophic soils in the cerrado region of central Brazil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19:1075-1089, 1988.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D. ; DENS, S. G. BIONDI, D. M. RUBERTO, G. CHEMICAL composition, antimicrobial and oxidative activity of laurel, sage, Rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oils.Research*.vol.10, p. 618- 627. 1998.

BELAICHE, T.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; IBRAHIMY, A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes.*Sciences Aliments*. vol. 15, p. 571-578. 1995.

BOUGATSOS, C. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Helichrysum Kraussi* Sch. Big.And *H. Rugulosum* Lebs.From South Africa.*Flavour and Fragrance Journal*, vol. 18, p.48-51.2003.

CORTÊS, A. L. A. *Justicieae (Acanthaceae) do Bioma Caatinga do Estado da Bahia*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Botânica. Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 142f. 2009.

COSTA, A. F. Farmacognosia. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. v. 3, 1032 p., 1982.

COSTA, A.F. Farmacognosia. 3 v. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

COSTA, M. C. C. D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. Revista Brasileira Planta Medica. Botucatu, vol.8, n.2, p.81-88. 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. Parte II – Fascículo 4. São Paulo: Atheneu. 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2000. 4. ed., segundo fascículo. São Paulo, Atheneu

GOTTLIEB, O. R; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. Ciência e Cultura. p. 707-7016.1987.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G. SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A.S.; DENKOVA, Z.; NIKOLOVA, R.; GEISLER, M. PURITY, Antimicrobial activities and olfactic evaluations of Geraniol/Nerol and various of their derivatives. Journal of Essential Oil Research, vol. 19, p. 288-291. 2007.

KANKO, C.; SAWALIHO, B.E.H.; KONE, S.; KOUKOUA, G.; N'GUESSAN, Y.T. Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. Chimie. 7: 1039-1042. 2004.

KIM, E. H. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari- Acaridae). Applied Entomology and Zoology, vol.38, p.261-6. 2003.

KULKARNI, R.N.; RAMESH, S. Heritability estimates of citral content in East Indian lemongrass. Theoretical and Applied Genetics. 73: 476-477. 1987.

LEAL, L. K. A. M. ET AL. Antinociceptive antiinflammatory and bronchodilatador activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. Journal of Ethnopharmacology, RJ, v.70, p. 151-159, 2000.

LEGAULT, J. Antitumor activity of balsam oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. Planta Medica, vol.69, p.402-7. 2003.

MENEZES, F.S. Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae (Tese de Mestrado). Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. Rio de Janeiro: UFRJ, p. 94, 1994.

MORAES, L. A. S. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol.74, p.183-6. 2002.

OKOLI CO, AKAH PA, ONUOHA NJ, OKOYE TC, NWOYE AC, Nworu CS *Acanthus montanus*: An experimental evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory and immunological properties of a traditional remedy for furuncles. *BMC Complementary. Alternative Med.* 8:27 doi:10.1186/1472-6882-8-27, 2008.

OLIVEIRA, A. F. M. Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil. 125 f. Dissertação de Mestrado – UFPE, Recife, 1995.

OLIVEIRA, A. F. M. et al., Screening Cromatográfico de Acanthaceae Medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq e *J. gendarussa* Burm. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Botucatu, v.3, n.1, p. 37-41, 2000.

POLZERNHEIM, M. C. L., BIZZO, H. R., VIERA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol.16, n. 2, p. 246-251, Abr./Jun. 2006.

PRATES, H. T., LEITE, R. C., CRAVEIRO, A. A., OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and activity against Cattle-tick (*Boophilus microplus*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 9, n. 5, p. 193-197. 1998.

SANTOS, R. I. METABOLISMO BÁSICO E ORIGEM DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. IN: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. PETROVICK. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 5ª ed. (revisada e ampliada). Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC, p. 403-434. 2004.

SANTOS, S. C & MELLO, J. C. P. TANINOS. IN: SIMÕES, C. M. O; SPITZER, V. ÓLEOS ESSENCIAIS. IN: SIMÕES, C. M. O.; SHENCENCKEL, E. P.; GOSTMANN, G.; MELLO, J. C. P. *Farmacognosia. Da planta ao Medicamento*. 5ª ed. (revisada e ampliada). Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC, 615-656. 2004.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo: Editorial Premier. 1997

SANGWAN, N.S.; YADAV, U.; SANGWAN, R.S. Molecular analysis of genetic diversity in elite Indian cultivars of essential oil trade types of aromatic grasses (*Cymbopogon* species). *Plant Cell Reports*. 20: 437-444. 2001.

SARER, E., J. J. C. SCHEFFER, A. M. JANSSEN, A. BAERHEIM-SVENDSEN. Composition of the essential oil of *Origanum majorana* grown in different localities in Turkey. In: Essential Oils and Aromatic Plants, edited by A. Baerheim-Svendsen and J. J. C. Scheffer, Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers: Dordrecht, the Netherlands, p. 209- 212 1985.

SILVA SANTOS, A; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A.M.S.; D'AVILA, I. A. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 8(4): 14-22. 2006.

SILVA, F. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 2005.

SIMÕES C. M. O, SPITZER, V. FARMACOGNOSIA DA PLANTA AO MEDICAMENTO. ÓLEOS VOLÁTEIS. IN: IN: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. PETROVICK. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC. Capt. 18, p. 387-416. 1999.

SIMÕES, C. M. O. & SPITZER, V. ÓLEOS VOLÁTEIS. IN: ÓLEOS VOLÁTEIS. IN: IN: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. PETROVICK. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC. Capt. 18, p. 467-495. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P. R. FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS. 2000.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; P, P. R. PETROVICK. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 5ª ed. (revisada e ampliada). Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis: UFSC. 2004.

TAKAISI-KIKUNI, N.B. TSHILANDA, D.; BABADY, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. Fitoterapia. 71: 69-71. 2000

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A.; Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.

VILLAR, T. S. Acanthaceae Juss no Distrito Federal, Brasil. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Botânica, Brasília, DF. 117f., 2009.

YANG, Y. C. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compound on *Pediculus capitatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.51, p .4884-8. 2003.