
ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS FOLHAS, CAULES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Mollinedia clavigera* Tul. (Monimiaceae)

Mollinedia clavigera Tul. (Monimiaceae) PHYTOCHEMICAL SCREENING AND LEAVES', STEAMS' AND ESSENTIAL OIL'S PHYSICAL-CHEMICAL PARAMETERS DETERMINATION

HOMEM, I. C.M.¹, SZABO, E. M.², MIGUEL, O. G.³

1- Mestre em Ciências Farmacêuticas. Parte da dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UFPR

2 - Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFPR

3 - Professor Titular da Universidade Federal do Paraná

Autor para correspondência: belmign@hotmail.com

RESUMO:

Este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos das folhas, caules e óleo essencial de folhas e avaliar o perfil fitoquímico dos extratos de folhas e caules de *Mollinedia clavigera*, pertencente à família Monimiaceae. Os parâmetros físico-químicos analisados foram perda por dessecação (4,1% para as folhas e 4,6% para os caules) e ensaio de cinzas totais (9,3% para as folhas e 3,9% para os caules). No ensaio sistemático fitoquímico foram encontrados flavonoides, alcaloides e saponinas nos caules, enquanto nas folhas verificou-se a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides e triterpenos. Após hidrodestilação por arraste de vapor d'água das folhas em aparato de Clevenger, foi calculado o rendimento da extração do óleo essencial (1,18%). O óleo foi caracterizado como amarelo claro, translúcido, de odor forte e não agradável, apresentando densidade de 0,967 mg/mL, índice de refração de 1,5039, sendo considerado bastante solúvel em concentrações maiores de 90% de etanol.

Palavras-chave: *Mollinedia clavigera*. Monimiaceae. Óleo essencial. Perfil fitoquímico.

ABSTRACT:

This study aimed to evaluate *Mollinedia clavigera* Tul. (Monimiaceae) leaves', steams' and leaves' essential oil physical-chemical parameters, leaves' and steams' extracts phytochemical profile. Humidity (leaves: 4,1% and steams: 4,6%) and ash content (leaves: 9,3% and steams: 3,9%) were determined. Phytochemical screening found flavonoids, alkaloids and saponins in steams and alkaloids, flavonoids, esteroids and triterpens in leaves. Essential oil yield (hydrodistillation in Clevenger extraction) was determined in 1,18%. Essential oil was characterized as unpleasant odor releasing translucent pale-yellow liquid, quite soluble in ethanolic solutions (>90%), its' density (0,967 mg/mL) and refractive index (1,5039) were also determined.

Key Words: *Mollinedia clavigera*. Monimiaceae. Essential oil. Phytochemical profile.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mollinedia* compreende cerca de 70 espécies que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, que se estendem do México até a região sul do Brasil, onde está presente em todas as regiões, nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (MOREIRA; LEITÃO 2001). Segundo Philipson (1998), *Mollinedia* é o maior gênero da família Monimiaceae, tanto em complexidade quanto em número de espécies.

Algumas espécies do gênero *Mollinedia* fazem parte da dieta alimentar de aves, morcegos e macacos, contribuem na arborização e reflorestamento, além de apresentarem uso popular e serem comercializadas em feiras livres. A *M. racemosa* é utilizada por comunidades indígenas colombianas para tratamento de gripes, como analgésica e para transtornos estomacais. As espécies *M. costaricensis*, *M. schottiana* e *M. brasiliensis* também são empregadas como estomáquicas e antiespasmódicas. A *M. schottiana* fornece uma madeira flexível, utilizada na fabricação de barris, bordas de peneiras e como fornecedora de lenha (DUQUE *et al.*, 2011; SANTOS; PEIXOTO, 2001; LEITÃO *et al.*, 1999; LOPEZ *et al.*, 1988). Os alcaloides benzilisoquinolínicos, fenilamidas, óleo essencial e esteroides são os metabólitos secundários mais encontrados no gênero *Mollinedia* Ruiz & Pav. (LOPEZ, 1998; CLAROS *et al.*, 2000; MOREIRA; LEITÃO, 2001; MARQUES *et al.*, 2008; MURILLO *et al.*, 2011).

A espécie *Mollinedia clavigera* Tul., popularmente conhecida como Pimenteira, Capixim-pimenteira ou Capixim, é um arbusto que pode chegar a 3 metros de altura, apresenta folhas inteiras, dentadas e opostas, frutificando no mês de março (FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2013). Trata-se de uma espécie nativa e endêmica no Brasil. Seu domínio fitogeográfico é a Floresta Atlântica, nas regiões sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e sul (Santa Catarina e Paraná) (PEIXOTO; LIRIO, 2015).

Não foram encontrados estudos anteriores determinando parâmetros físico-químicos e fitoquímicos desta espécie. Assim sendo, os presentes resultados contribuem para a caracterização da espécie vegetal bem como do óleo essencial, estabelecendo padrões de qualidade e indicação preliminar dos principais grupos de metabólitos secundários presentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as folhas e caules de *Mollinedia clavigera* coletadas no Capão do Cifloma (Curitiba-PR) sob as coordenadas geográficas 25°26'52"S 49°14'21"W, nos meses de maio e junho de 2013. Foi depositada a exsiccata do material botânico no museu botânico municipal de Curitiba sob registro MBM384847. O material vegetal (folhas e caules) foi seco e estabilizado em estufa (35°C) com circulação de ar ao longo de 24 horas. Separando as folhas dos caules, os materiais foram triturados em moinho de facas e martelos (marca TRAPP), para aumentar a superfície de contato do material com o solvente no momento da extração. Para a extração do óleo essencial foram coletadas folhas, estas secas à sombra em temperatura ambiente e trituradas manualmente. Os três materiais vegetais resultantes foram pesados e

armazenados em local fresco, de baixa umidade e ao abrigo da luz.

2.1 Ensaios físico-químicos das folhas e caules

Para a determinação do teor de cinzas totais foi adotado o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

Os cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em mufla a 600°C por 30 minutos e resfriados em dessecador. Pesou-se em cada cadinho tarado 1 g do material vegetal, sendo em seguida incinerado em mufla a 600°C por duas horas e posteriormente resfriado em dessecador.

Após resfriamento foi realizada a pesagem do resíduo. A análise foi feita em triplicata e o resultado foi calculado em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal seco a temperatura ambiente, através do seguinte cálculo (1):

(1)

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

Onde:

P_1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (cadinho tarado);

P_2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P_3 = Peso da amostra inicial.

Para a realização do ensaio de perda por dessecação pesou-se 1 g de material vegetal de folha e caule em cadinhos de porcelana, previamente dessecados e tarados, e colocou-se em estufa a 100°C, por um período de 3 horas, até a obtenção de peso constante. Retirou-se os cadinhos com as amostras da estufa e colocou-se em dessecador para resfriar. Após este processo pesou-se a amostra e aplicou-se a fórmula a seguir (2). O resultado foi dado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco. A análise foi realizada em triplicata.

(2)

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde:

P_a = Peso da amostra;

P_u = Peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação;

P_s = Peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

2.2 Ensaio sistemático fitoquímico

O ensaio sistemático fitoquímico consiste na realização de reações de coloração e/ou precipitação para verificar qualitativamente a presença ou ausência de determinados metabólitos secundários na espécie vegetal. Os ensaios foram realizados segundo Moreira (1979), contando com algumas modificações. Realizou-se a determinação de metabólitos solúveis em álcool e em água através da obtenção de extratos hidroetanólicos e extratos aquosos das folhas e caules.

Os extratos hidroetanólicos (20% p/v) de folhas e caules de *M. clavigera* foram obtidos por maceração. Separadamente, 40 g dos materiais vegetais previamente secos e triturados e 200 mL de álcool etílico 70% (v/v) foram aquecidos em banho-maria (70°C) por 1 hora. Os extratos foram filtrados com papel de filtro e completou-se o volume para 200 mL com álcool etílico 70%, obtendo-se assim, dois extratos hidroetanólicos. Os metabólitos secundários pesquisados nestes extratos foram: alcaloides, flavonoides, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, esteroides e triterpenos.

Os extratos aquosos (20% p/v) de folhas e caules de *M. clavigera* foram obtidos por maceração. Separadamente, 40 g dos materiais vegetais previamente secos e triturados e 200 mL de água (v/v) foram aquecidos em banho-maria (70°C) por 1 hora. Os extratos foram filtrados com papel de filtro e completou-se o volume para 200 mL com água, obtendo-se assim, dois extratos aquosos. Nestes extratos foram pesquisados a presença de: heterosídeos antocianínicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos e taninos.

2.3 Extração do óleo essencial

Utilizou-se como método para a extração do óleo essencial das folhas de *M. clavigera* a hidrodestilação por arraste de vapor d'água, realizada em aparato de Clevenger (Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010). As folhas secas (337,8 g) foram trituradas e acondicionadas em balão de fundo redondo de 3000 mL, com água destilada (cerca de 10 mL : 1 g de folha), suficiente para embeber devidamente o material vegetal. O balão foi conectado ao aparato de Clevenger e o conjunto foi submetido a uma temperatura de 100° C pelo período de 6 horas. Finalizado a extração, foi verificado o volume do óleo obtido com auxílio do coletor do Clevenger com escala graduada.

2.4 Caracterização físico-química do óleo essencial

2.4.1 Determinação do rendimento

Determinou-se o rendimento da extração de óleo essencial das folhas *M. clavigera*

calculando em mililitros de óleo essencial por 100 g do vegetal (mL%), conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (2010).

2.4.2 Determinação das características organolépticas

Para a determinação das características organolépticas do óleo essencial de *M. clavigera* foram analisados os parâmetros de cor e odor.

2.4.3 Determinação da densidade

O ensaio de determinação da densidade foi realizado a partir da média aritmética das massas de alíquotas de 20 µL (volume constante) de óleo essencial de *M. clavigera*, em 10 repetições, à temperatura de 25°C. A razão entre a massa e o volume constante (aferidos em balança analítica e pipeta automática) das alíquotas de óleo essencial, foi determinada aplicando a seguinte fórmula (3):

$$(3) \quad d = \frac{m}{v}$$

Onde:

d = densidade

m = massa do óleo essencial

v = volume do óleo essencial

2.4.4 Determinação da solubilidade em etanol

Seguindo metodologia da Pharmacopea Helvetica VII (1990), foi determinada a solubilidade do óleo essencial em etanol 70%, 80%, 90% e 100%.

Com auxílio de bureta as diferentes concentrações alcólicas tiveram sua capacidade de solubilidade do óleo essencial de *M. clavigera* verificadas. Liberando o solvente gota a gota, lentamente, sobre 0,1 mL de óleo essencial até completa miscibilidade das amostras, foi determinada a proporção de solubilidade do óleo essencial pelas diferentes concentrações etanólicas pela verificação do volume de etanol gasto.

2.4.5 Determinação do índice de refração ²⁰n_D

O índice de refração foi determinado em função da luz de sódio no comprimento de onda 589,3 nm (raia D) (20 ± 0,5 °C) em refratômetro Aus Jena, previamente calibrado, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio físico-químico

A fim de estabelecer parâmetros mínimos de qualidade para o material vegetal, foram realizadas determinações de teor de cinzas totais e perda por dessecação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O teor de cinzas totais é um parâmetro físico-químico que estabelece a quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis presentes na amostra. Esse parâmetro é utilizado pela indústria farmacêutica no controle de qualidade da matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos, tendo como finalidade detectar possíveis adulterações do material. O resultado da determinação do teor de cinzas totais (TABELA 1) mostrou-se maior para as folhas do que para os caules de *M. clavigera*, podendo-se inferir que as folhas possuem maior quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis do que os caules.

Na determinação da perda por dessecação verifica-se se a secagem do material foi eficiente. A presença de umidade pode causar ação de enzimas que causam degradação de constituintes químicos além da contaminação microbiana do material (FARIAS, 2010). A determinação de perda por dessecação (TABELA 1) do material vegetal (folhas e caules) expressou um teor de umidade inferior a faixa entre 8 e 14%, sendo este o limite máximo recomendado de umidade para drogas vegetais em diferentes farmacopeias (FARIAS, 2010).

Esses resultados podem contribuir para o estabelecimento de padrões de qualidade e caracterização da espécie vegetal.

TABELA 1 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS DAS FOLHAS E CAULES DE *M. clavigera*

PARTE VEGETAL	PERDA POR DESSECAÇÃO	CINZAS TOTAIS %
FOLHAS	4,0931 ± 0,0787	9,3109 ± 0,0652
CAULES	4,5941 ± 0,2894	3,9465 ± 0,2179

3.2 Ensaio sistemático fitoquímico

Os ensaios realizados com os extratos hidroetanólicos das folhas e caules foram positivos para alcaloides e flavonoides, resultados estes compatíveis aos relatados na literatura para o gênero *Mollinedia*. Moreira e Leitão (2001) analisaram os caules de cinco espécies de *Mollinedia* (*M. schottiana*, *M. gilgiana*, *M. glaziovii*, *M. marliae*

e *M. salicifolia*) onde identificaram o alcaloide aporfínico liriodenina. Duque *et al.* (2011), Murillo *et al.* (2011) e Sanchez-Peralta *et al.* (2014) também mencionam a presença de alcaloides e flavonoides nas folhas da espécie *Mollinedia racemosa*. Lopez (1988) relata o isolamento do flavonoide vitexina e do alcaloide benzilisoquinolínico mollinedina das folhas e raízes de *Mollinedia costaricensis*, respectivamente. A pesquisa de esteroides e triterpenos no extrato hidroetanólico das folhas também foi positivo, assim como relatado por Duque *et al.* (2011), Murillo *et al.* (2011) e Sanchez-Peralta *et al.* (2014) na espécie *M. racemosa* e por Claros *et al.* (1999), nas folhas de *M. marliae* e *M. gilgiana*. Nestas duas espécies citadas encontrou-se a mistura dos esteroides estigmasterol e sitosterol.

No extrato aquoso dos caules determinou-se a presença de saponinas, resultado este citado por Sanchez-Peralta *et al.* (2014) para as folhas do gênero *M. racemosa*. No ensaio não observou-se resultado positivo para o teste de taninos, mas já houve citações da presença de taninos na espécie de *Mollinedia racemosa* (MURILLO *et al.*, 2011; DUQUE *et al.*, 2011; SANCHEZ-PERALTA *et al.* 2014).

3.3 Caracterização física do óleo essencial

3.3.1 Rendimento do óleo essencial

O rendimento do óleo de *M. clavigera* obtido através de hidrodestilação por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger foi de 1,18% (p/v) em relação às folhas. Assim sendo, a partir de 100 g de folhas é possível obter cerca de 1,18 mL de óleo essencial.

3.3.2 Características organolépticas

Em relação às características organolépticas foram analisadas a coloração e odor do óleo essencial obtido das folhas de *M. clavigera*. O óleo apresentou-se translúcido com coloração amarela clara e odor forte e não agradável.

3.3.3 Determinação da densidade

Determinou-se a densidade do óleo essencial de *M. clavigera* no valor de 0,967 mg/mL. De acordo com Simões e Spitzer (2010), os valores para a densidade dos óleos essenciais geralmente encontram-se entre 0,69 e 1,118 mg/mL. O valor determinado localiza-se nesta faixa e pode ser utilizado como parâmetro característico para a espécie vegetal em questão.

3.3.4 Determinação da solubilidade em etanol

Para cada óleo essencial existe um valor que indica sua solubilidade numa solução de etanol/água, onde o óleo é miscível de forma transparente ou opalescente (SIMÕES; SPITZER, 2010). A TABELA 2 apresenta os resultados da solubilidade do óleo essencial de *M. clavigera* determinando as partes em que são solúveis nas concentrações abaixo testadas.

TABELA 2 – SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. clavigera* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL

CONCENTRAÇÃO ETANOL	70%	80%	90%	100%
Volume Gasto	35 mL	6,5 mL	0,2 mL	1 gota
Solubilidade do óleo	1:350	1:65	1:2	completamente solúvel

FONTE: A autora, 2014

3.3.5 Determinação do índice de refração ²⁰n_D

O índice de refração do óleo essencial de *M. clavigera* determinado foi de 1,5039. Segundo Simões e Spitzer (2010) os valores para o índice de refração de óleos essenciais variam entre 1,450 e 1,590, faixa na qual se enquadra o resultado obtido.

A composição, quantidade e características dos óleos essenciais podem sofrer variação conforme o estágio de desenvolvimento do vegetal, as influências do ambiente (salinidade do solo, umidade e temperatura), local de coleta e a sazonalidade (SOUZA *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A principal determinação quantitativa dos óleos essenciais é obtida através do seu doseamento (realizado através de hidrodestilação por arraste de vapor d'água), mas esta avaliação pode ser complementada através de outros ensaios: densidade, índice de refração, solubilidade em etanol e determinações de características organolépticas (SIMÕES; SPITZER, 2010).

A caracterização dos óleos essenciais serve na definição de parâmetros para o controle de qualidade, evitando assim possíveis falsificações ou adulterações. Este é o primeiro estudo que visa à caracterização do óleo essencial da espécie *M. clavigera*, sendo este inédito também para o gênero *Mollinedia*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As determinações de teor de cinzas totais e perda por dessecação foram

realizadas a fim de estabelecer parâmetros mínimos de qualidade para o material vegetal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A análise fitoquímica preliminar nos indicou quais são os principais grupos de metabólitos secundários presentes nas folhas e caules de *M. clavigera*, confirmando os relatos na literatura do gênero e da família. Esse conhecimento pode ser utilizado como base para o posterior isolamento de substâncias, direcionando o processo de escolha de solventes e de colunas para o fracionamento. Além de permitir a escolha das atividades biológicas que devam ser inseridas no planejamento estratégico da pesquisa diminuído o consumo de tempo, trabalho e custos das pesquisas.

A crescente utilização de óleos essenciais por indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticas, tornam o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos essenciais uma importante atividade econômica. Os óleos essenciais frequentemente apresentam problemas de qualidade, seja pela variabilidade da sua composição (fatores genéticos ou ambientais), por identificações incorretas ou ainda por adulterações ou falsificações (SIMÕES; SPITZER, 2010).

A caracterização dos óleos essenciais, através de procedimentos geralmente descritos em farmacopeias, auxilia na definição de parâmetros para rigoroso controle de qualidade das espécies e para correta identificação das mesmas. Os resultados obtidos neste estudo foram determinantes para estabelecer a identidade e caracterizar a espécie *Mollinedia clavigera*, tendo em vista que esta espécie não apresenta estudos anteriores, sendo estes resultados preliminares inéditos.

5. REFERENCIAS

CLAROS, B. M. G., *et al.* Chemical constituents of two *Mollinedia* species. **Phytochemistry**, v. 55, p. 859 – 862, 2000.

DUQUE, J. F. S. *et al.* Valoración del potencial antioxidante de *Mollinedia racemosa* (romadizo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, p. 151 -163, 2011.

FARIAS, M. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Capítulo 12, Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

FARMACOPEIA Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Fundação Oswaldo Cruz. 5. ed., v. 1. Brasília: Anvisa, 2010.

FIGUEIREDO, A. C. *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213 - 26, 2008.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=6276). Acesso em: 03/2014

LEITÃO, G. G. *et al.* Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 87 - 102, 1999.

LOPEZ, J. A. *et al.* Mollinedine, a new alkaloid from *Mollinedia costaricensis*. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 754 - 759, 1988.

MARQUES, C. A. *et al.* Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 415 - 429, 2008.

MOREIRA, D. L.; LEITÃO, G. G. Quantitative Determination of Liriodenine and Moupinamide in Five Species of *Mollinedia* by High Performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 4, p. 223 - 225, 2001.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1 - 19, 1979.

MURILLO, E. *et al.* Química y Funcionalidad Biológica de *Mollinedia racemosa* (Monimiaceae). **Información Tecnológica**, v. 22, p. 3 - 14, 2011.

PHARMACOPOEA Helvetica. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1990.

PHILIPSON, W. R. A classification of the Monimiaceae - an additional note. **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 8, n. 1, 1998.

SANCHEZ-PERALTA, W. E. *et al.* Caracterización química preliminar y evaluación de la actividad antioxidante in vitro y antiinflamatoria in vivo de los extractos y fracciones de diferente polaridad de *Mollinedia racemosa* (Romadizo). **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacêutica**, v. 21, 2014

SANTOS, I. S.; PEIXOTO, A. L. Taxonomia do gênero *Macropelplus* Perkins (Monimiaceae, Monimioideae). **Rodriguesia**, v. 52, p. 65 - 105, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Capítulo 18, Óleos voláteis. Editora UFSC e UFRGS, 6ª edição. Florianópolis e Porto Alegre, 2010.

SOUZA, T. J. T. *et al.* Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 368 - 372, 2007.