

**Avaliação farmacognóstica de *Phyllanthus tenellus* Roxb.,  
Euphorbiaceae (Quebra-Pedra) coletadas em Rancho Alegre  
D'Oeste, Paraná**

**Pharmacognostic evaluation of *Phyllanthus tenellus* Roxb.,  
Euphorbiaceae (Quebra-Pedra) from Rancho Alegre D'Oeste,  
Paraná**

*Tháisa Meira Sandini, Núbbya Macedo Rodrigues, Karen Elaine Peloi, Elisa Perez*

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, Brasil

**Endereço para correspondência**

Elisa Perez

R. Simeão Camargo Varela de Sá, nº 03, Vila Carli, CEP Guarapuava-PR, Fone: (42)36298137  
e-mail: eperez@unicentro.br

**Resumo**

O gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae), é encontrado distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo utilizado na medicina popular para o tratamento de problemas renais, distúrbios urinários, infecções intestinais, diabetes e hepatite B. O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade farmacognóstica de partes aéreas de quebra-pedra, por identificação morfoanatômica e química. Foi observado que a droga analisada é realmente *Phyllanthus tenellus*, com um teor de  $7,80 \pm 0,209$  % de fenólicos totais, expresso em ácido gálico.

**Palavras-chave:** quebra-pedra, taninos, compostos fenólicos.

**Abstract**

**ABSTRACT:** The genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) is distributed in tropical and subtropical regions in the world, and is used in folk medicine to treat kidney and urinary problems, intestinal infections, diabetes and hepatitis B. The objective of this study was to evaluate the pharmacognostic quality of the aerial parts of quebra-pedra, for morphoanatomic and chemical identification. It was observed the drug analyzed is actually *Phyllanthus tenellus*, with content a  $7,80 \pm 0,209$  % of total phenolics, expressed as gallic acid.

**Keywords:** Stone breaker, tannins, phenolic compound.

## INTRODUÇÃO

As plantas constituem a mais rica fonte natural de biomoléculas utilizadas pelo homem. O uso de plantas com propriedades curativas é oriundo desde a era pré-história, em que sociedades primitivas encontravam a cura terapêutica e psicoterapêutica através de preparações botânicas. Atualmente inúmeras espécies de plantas ainda são utilizadas para estas finalidades, destacando-se espécimes do gênero *Phyllanthus*.

O gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) é encontrado em regiões tropicas e subtropicais do mundo e apresentam diferentes espécies que são usadas na medicina popular em diversos países <sup>(1)</sup>. A família Euphorbiaceae pode ser encontrada como invasora em áreas cultivadas, em terrenos baldios e às margens de calçadas de vias públicas, pois possui a característica de ser encontrada em locais úmidos <sup>2</sup>. É uma erva anual, variando seu tamanho de 30-60 cm. Suas raízes, folhas, frutos, bem como a planta inteira, podem ser usados para fins medicinais.

Entre as espécies empregadas pelo homem destaca-se *Phyllanthus tenellus* Roxb.; conhecida no Brasil como “quebra-pedra”, “arrebenta-pedra” ou “erva-pombinha”. Segundo a literatura, as plantas do gênero *Phyllanthus* podem ser utilizadas para o tratamento de problemas renais, distúrbios urinários, infecções intestinais, diabetes e hepatite B <sup>(3, 4, 5)</sup>. As propriedades medicinais da *Phyllanthus tenellus* estão relacionadas com a eliminação de cálculos renais, atividade diurética, hipoglicemiante e no tratamento das infecções do fígado <sup>(6)</sup>.

Diversos compostos, tais como, alcalóides, flavonóides, lignanas, fenóis e terpenos foram isolados das plantas do gênero *Phyllanthus* <sup>7</sup>. Lipídeos comuns, flavonóis e esteróis também são encontrados na planta <sup>(8,9)</sup>. Entre esses compostos, está muito presente a estrutura química de fenol, o que caracteriza muitos desses compostos como compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos possuem, no mínimo, um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. Tais grupos podem ser trocados por ésteres, ésteres metílicos e glicosídeos. Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante devido a sua facilidade em se oxidar, que permitem que estes ajam como agentes redutores ou doadores de oxigênio. Além disso, eles também apresentam um potencial quelante de metais <sup>(10,11)</sup>. Encontram-se amplamente distribuídos em plantas, como produtos do metabolismo secundário, derivados de duas rotas distintas: a rota do ácido chiquímico e a rota do acetato, e destas rotas origina-se os flavonóides, taninos e seus derivados.

Os flavonóides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos devido, sobretudo, à sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal, especificidade para algumas espécies, relativa estabilidade e seu acúmulo com menor influência do meio ambiente <sup>(12)</sup>. A partir dos anos 90 do século passado, os flavonóides começaram a se tornar foco de múltiplas pesquisas pelos seus comprovados efeitos benéficos à saúde, devido à ação anticarcinôgena, anti-úlceras, anti-trombótica, anti-inflamatória, anti-alérgica, moduladora do sistema imunológico, anti-microbiana, vasodilatadora e analgésica <sup>(13)</sup>.

Taninos também são considerados bons marcadores químicos e distinguem-se em dois grupos: condensados e hidrolisáveis, que diferem pela sua estrutura e origem biogenética. Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos estejam relacionadas à habilidade de complexarem-se a íons metálicos, características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos taninos condensados e hidrolisáveis. Por outro lado, a sua ação no tratamento de doenças pode estar intimamente ligada à atividade

antioxidante (seqüestradora de radicais livres) e a habilidade de complexarem-se com outras moléculas incluindo macromoléculas, entre elas proteínas e polissacarídeos<sup>(9,14)</sup>. Essa característica pode permitir que o doseamento de taninos totais seja possível utilizando-se essa característica de complexação.

Tendo em vista a importância dos constituintes químicos para a ação farmacológica de *Phyllanthus tenellus*, objetivou-se verificar se a planta, coletada na região de Rancho Alegre D'Oeste, apresentava os marcadores morfoanatómicos e químicos, bem como se apresentava o teor recomendado pela Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> edição, para uso como insumo fitoterápico, visto que é uma planta muito usada para fins medicinais na região.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes de quebra-pedra foram coletados na cidade de Rancho D' Oeste em novembro de 2008. Para a identificação da planta foi depositada uma exsicata sob o n° 34401, no Herbário Botânico Municipal de Curitiba (PR). A planta foi identificada como sendo *Phyllanthus tenellus* Roxb, Euphorbiaceae. As amostras coletadas apresentavam aspecto sadio, com folhas e caules verde escuro, não apresentavam danos e nem fungos visíveis que pudessem prejudicar os resultados da pesquisa. As plantas foram secas à sombra.

### *Avaliação macro e microscópica*

Para a avaliação farmacognóstica da planta foram utilizados métodos contidos na monografia do Quebra-Pedra da Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> ed., 2003<sup>(15)</sup>.

A análise macroscópica foi realizada em lupa, com lâmpada de 35 W, para a observação de folhas e frutos. Para a identificação microscópica da droga foram utilizadas folhas secas, posteriormente hidratadas em água destilada e em seguida seccionadas transversalmente e paradermicamente. Os cortes foram diafanizados em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) em água. Posteriormente o corte foi montado sobre a lâmina e lamínula e observado em microscópio.

### *Avaliação fitoquímica*

#### *Preparo do pó*

As partes aéreas secas foram moídas em moinho IKA<sup>®</sup> modelo A11 Basic e, em seguida, tamisadas em tamis ABNT 50 Tyler 48. As massas obtidas de cada granulometria foram pesadas para determinação do rendimento. A granulometria contendo partículas menores que 0,3 mm de diâmetro foram utilizadas para o preparo de todos os experimentos.

#### *Testes de identificação*

##### ***Identificação de taninos totais***

Para a identificação de taninos totais, primeiramente fez-se um extrato com exatamente cerca de 3,0 g das partes aéreas pulverizadas com 60 mL de água. Deixou-se em banho-maria durante 15 min, sendo a solução resfriada e filtrada. A seguir, para a identificação de taninos totais foram executados testes químicos com vanilina em metanol, com FeCl<sub>3</sub> em etanol, com gelatina mais ácido clorídrico e com acetato de chumbo mais ácido acético, todos com o extrato aquoso das partes aéreas. Os testes

acima foram desenvolvidos de acordo com os testes para taninos, constantes da Farmacopéia Brasileira, 4ª edição <sup>(16)</sup>.

#### *Identificação de quebra-pedra por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)*

Seguiu-se o recomendado na monografia da droga <sup>15</sup>. Preparou-se a solução a ser cromatografada, a partir de 0,75 g da droga moída com 10 mL de água destilada, em aquecimento sob refluxo durante 15 min. Resfriou-se e filtrou-se a mistura, sendo essa seca e ressuspensa em 5 mL de metanol. A seguir, fez-se a CCD com solução acima na fase estacionária de sílica Merck 60 F254, fase móvel acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5) e padrão ácido gálico, sendo a observação do cromatograma em luz UV (365 nm).

#### *Determinação de Umidade*

Exatamente cerca de 2,0 gramas da amostra (n=3) foram colocadas em estufa Gehaka (modelo G4023D) a 100 °C – 105 °C por quatro horas, em placas de Petri previamente dessecadas. Posteriormente as amostras foram resfriadas em dessecador a temperatura ambiente, e pesadas em balança analítica marca Bioprecisa. Repetiu-se a operação com somente 30 min em estufa a 100 °C – 105 °C, até a obtenção de peso constante, ou seja, quando duas pesagens sucessivas não diferissem entre si mais que 5 mg <sup>17</sup>. O teor de umidade foi calculado em percentual em relação ao peso inicial.

#### *Determinação de Cinzas Totais*

Foram pesados exatamente cerca de 3,0 g da amostra pulverizada (n=3) em cadinhos previamente calcinados, resfriados e pesados. Após, as amostras foram distribuídas uniformemente nos cadinhos e incineradas até eliminação total do carvão, primeiramente na chama e a seguir em mufla a 450 °C. As amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas <sup>18</sup>.

#### *Curva Analítica*

Tanto para a realização da curva analítica, quanto para o doseamento de fenólicos foi preparado o reativo de Folin-Denis <sup>19</sup>. Este reagente foi composto por tungstato de sódio diidratado PA (Aldrich), ácido fosfomolibdico PA (Merck) e ácido fosfórico PA (Merck).

Para realizar a curva analítica foi preparada uma solução estoque de 0,448 mg.mL<sup>-1</sup> de ácido gálico em água. A seis diferentes volumes da solução estoque foi adicionado o reativo de Folin-Denis (0,4 mL), completando o volume final em balão volumétrico (10 mL) com uma solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Após 30 min da adição do Folin-Denis, a solução obtida teve sua absorvância lida em 715 nm, em um espectrofotômetro Spectrum SP 2000 UV.

#### *Doseamento de fenólicos totais*

Para o doseamento de fenólicos totais (polifenóis totais) utilizou-se a metodologia descrita na monografia de *Phyllanthus tenellus* Roxb <sup>(20)</sup>. A quantificação foi realizada com auxílio da curva analítica citada anteriormente.

Para tal, preparou-se uma solução-mãe. Essa foi obtida pesando-se exatamente cerca de 0,75 g de pó de quebra-pedra (n=5), sendo essa massa posteriormente extraída com 150 mL de água em banho-maria a 80 °C por 30 min. Resfriou-se a mistura por 30 min e o volume foi completado com auxílio de balão volumétrico para 250 mL com água. Em seguida, a mistura foi filtrada, desprezando os primeiros 50 mL. O filtrado resultante foi então re-filtrado em papel de filtro com auxílio de funil de Büchner e

kitasato, para diminuição da turbidez. Esse segundo filtrado constituiu a solução-mãe (SM). Foi transferido um mL da SM para um balão volumétrico de 25 mL e seu volume foi completado com água (SM1).

Um mL da solução SM1 foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e foi acrescentado 0,4 mL do reagente de Folin-Denis. O volume do balão foi completado com solução saturada de carbonato de sódio. Após 30 min da adição do Folin-Denis, a absorvância foi medida em 715 nm, em espectrofotômetro. O branco foi preparado da mesma maneira, mas sem a adição do extrato (amostra).

#### ***Doseamento de fenólicos não tânicos e de taninos totais***

Para o doseamento de fenólicos totais (polifenóis totais) e de taninos totais utilizou-se a metodologia descrita na monografia de *Phyllanthus tenellus* Roxb<sup>20</sup>, porém adaptou-se o método com pó de pele utilizando caseína.

A 20 mL da SM (n=5) foi adicionado exatamente cerca de 0,2 g de caseína. A mistura foi agitada por inversão por 60 min em homogeneizador (modelo Benfer HHS-300). Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo em papel de filtro com auxílio de funil de Büchner e kitasato. Foram retirados 5 mL do filtrado e diluídos em balão volumétrico de 25 mL com água (SM2). Um mL de SM2 foi transferido para balão volumétrico de 10 mL. Acrescentaram-se 0,4 mL do reagente de Folin-Denis e completou-se o volume com solução saturada de carbonato de sódio. Após 30 min da adição de Folin-Denis, mediu-se a absorvância em 715 nm, em espectrofotômetro. Essa absorvância referiu-se ao doseamento de fenólicos não tânicos. O branco foi preparado da mesma maneira, mas sem a adição do extrato (amostra). Por diferença entre o teor de fenólicos totais (FT) e teor de fenólicos não tânicos (FNT) obtidos após a precipitação dos taninos, obteve-se o valor de taninos totais<sup>7</sup>.

#### ***Análise Estatística***

Os dados foram submetidos a tratamento com teste Q (com limite de confiança de 90%), para rejeição dos resultados, e definição de intervalo de confiança, com limite de confiança a 95%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Avaliação macroscópica e microscópica***

Na avaliação macroscópica da planta observou-se que a mesma apresentava cerca de 50 cm de altura, alguns caules simples e outros ramificados. As folhas eram miúdas, simples, glabras e de coloração verde, os frutos apresentavam uma coloração verde escura. Através da lupa pode-se observar o aspecto geral dos frutos. Na microscopia da folha, em corte transversal, observou-se mesofilo heterogêneo assimétrico, contendo parênquima paliádico e lacunoso. Cristais foram observados na forma de drusas, entretanto não foram observados cristais romboédricos, como relata a literatura<sup>(15)</sup>. Nos cortes paradérmicos, a face adaxial não apresentou estômatos, sendo a folha hipostomática. Encontraram-se estômatos do tipo paracítico na face abaxial. Com exceção dos cristais, os marcadores morfoanatômicos apresentaram-se de acordo com o exigido pela monografia<sup>(15)</sup>.

## **Avaliação Fitoquímica**

### **Preparo do Pó**

Os pós retidos no tamis foram separados e pesados, para cálculo de percentual e de determinação de granulometria média. Foram moídos 4,9939 g das partes aéreas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. O resultado obtido foi de 74,42 % em granulometria menor que 0,3 mm, perfazendo um total de 3,697 g da droga e 25,58 % em granulometria maior que 0,3 mm, resultando em 1,271 g da droga. Observa-se como resultado final 4,968 g da droga, havendo uma perda de 0,0258 g.

### **Testes de Identificação**

#### Identificação de taninos totais

Os métodos de identificação realizados tinham como objetivo evidenciar as principais classes de substâncias químicas presentes na droga, a partir de extratos da planta, testes e reagentes específicos para cada classe. Sabe-se que, a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido obtida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração ou precipitado característico.

No teste para taninos totais percebeu-se o aparecimento de precipitado com gelatina. A ligação entre taninos e proteínas são altamente hidrofílicas e reagem com os grupos nucleofílicos ( $\text{NH}_2$  e  $\text{SH}$ ) das proteínas, formando ligações de hidrogênio entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os sítios eletronegativos das proteínas, dessa forma, levando a um precipitado <sup>(21)</sup>. Os taninos são solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 D e apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides e proteínas <sup>(22)</sup>. A capacidade dos diversos taninos se complexarem com proteínas variam conforme a sua estrutura química. Relatos em literatura definiram que o peso molecular e a flexibilidade da molécula são fatores importantes no processo de complexação <sup>(21)</sup>.

Os taninos são classificados segundo sua estrutura química em hidrolisáveis e condensados; os primeiros são resultantes da rota do ácido chiquímico sendo o intermediário, ácido gálico. Já os taninos condensados são advindos de rota mista, isto é, da rota do acetato/acetil CoA e do ácido chiquímico <sup>(22)</sup>. Na reação para taninos hidrolisáveis e condensados, observou-se a formação de cor negra na presença de cloreto férrico, indicando a presença de taninos totais, porque taninos são facilmente oxidáveis, tanto através das enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como o cloreto férrico, o que causa o escurecimento de suas soluções<sup>22</sup>. No entanto, esse teste não é específico para identificar a classe do tanino presente, pois na realidade essa reação ocorre com qualquer substância fenólica. Taninos hidrolisáveis e condensados podem ser diferenciados através da reação de Stiasny (HCl concentrado e formol), ocorrendo precipitação destes últimos<sup>(22)</sup>.

O teste para identificar taninos condensados com vanilina apresentou coloração rósea; essa mudança baseia-se na reação da vanilina frente a compostos fenólicos, dando cor vermelha à rósea. Alguns autores afirmam que o método com vanilina depende da reação dessa com os taninos condensados para formação de complexos coloridos. O sucesso deste ensaio depende do tipo do solvente usado, da concentração e natureza do ácido, do tempo da reação, temperatura e concentração da vanilina. O maior problema para o método com vanilina parece ser a reatividade de subunidades de polímeros, o que pode evidenciar a falta de especificidade para taninos condensados<sup>(23)</sup>. É interessante perceber que, apesar disso, a Farmacopéia Brasileira determina que esse ensaio caracteriza a presença de taninos condensados<sup>(16)</sup>, o que, de acordo com o artigo supra-citado, não ocorreria facilmente.

Como taninos precipitam com metais pesados, pode-se observar uma resposta positiva com a solução de acetato de chumbo. A positividade desta reação pode ter ocorrido devido à complexação de grupos fenólicos como, por exemplo, nos taninos hidrolisáveis ou outros constituintes fenólicos. A hidroxila reage com metais, levando ao escurecimento da solução<sup>21</sup>.

### **Identificação de quebra-pedra por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A CCD é uma técnica de separação amplamente utilizada para fins de análise, tanto para extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação<sup>(22)</sup>. A CCD apresentou uma mancha azul, coincidente em Rf (0,79) com o ácido gálico em luz UV. Como não foi usado outro padrão e nem revelador específico, outras manchas significativas não foram observadas.

### **Determinação de umidade**

O excesso de água nas amostras é prejudicial a sua qualidade, pois favorece a atividade enzimática e a proliferação de microrganismos que poderão decompor os princípios ativos da planta<sup>(24)</sup> e produzir substâncias que se ingeridas podem provocar intoxicações. Portanto, a determinação do teor de umidade constitui um parâmetro para o controle de qualidade da droga vegetal<sup>(25)</sup>.

O teor máximo de umidade estabelecido pela monografia de *Phyllanthus tenellus* Roxb é de 9,5 %, sendo que o teor de umidade verificado na amostra foi de 9,09 %; deste modo a mesma encontra-se dentro do previsto pela monografia<sup>(15)</sup>.

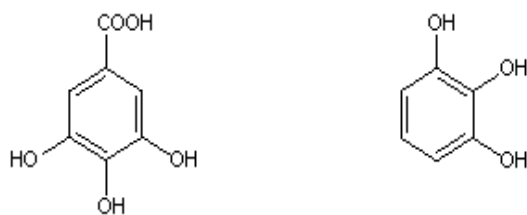
### **Determinação de cinzas totais.**

O conteúdo de cinzas totais estabelece a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração. As cinzas totais constituem-se das cinzas fisiológicas e não fisiológicas. As cinzas provêm fundamentalmente de constituintes minerais e dos organo-metálicos integrantes da planta. Podem proceder, ainda, de substâncias aderentes de origem terrosa. A determinação do teor de cinzas pode permitir a verificação de impurezas inorgânicas. Isso significa que essa determinação é uma referência de qualidade e caracterização de um vegetal<sup>(22)</sup>.

O teor máximo de cinzas totais segundo a monografia de *Phyllanthus tenellus* Roxb. é de 8%. O conteúdo de cinzas obtido foi de  $8,13 \pm 0,146$  %, sendo superior ao valor citado na monografia de *Phyllanthus tenellus* Roxb<sup>15</sup>. Essa diferença pode ter ocorrido devido à presença de impurezas junto às partes aéreas da planta. Porcentagens encontradas além do limite estabelecido para a determinação de cinzas totais, em geral são indicativas da presença de material inorgânico adulterante, como areia, terra ou pedras. Trabalhos desenvolvidos com *Phyllanthus amarus* Schum. mostraram teores de cinzas totais de  $6,44 \pm 0,35$  %<sup>(26)</sup>. Estudos realizados com espécies de *Vanillosmopsis erythropappa* (DC.) Sch. Bip., Asteraceae, mostraram que os valores de cinzas totais foram mais significativos nos meses em que a planta foi coletada em outubro, novembro e dezembro, concluindo assim que a época do ano pode influenciar no teor de cinzas dessa espécie<sup>(27)</sup>.

### **Curva Analítica**

Segundo a monografia da quebra-pedra<sup>(15)</sup>, o padrão ouro para a determinação de taninos totais é o pirogalol. Porém, devido à indisponibilidade desse padrão, utilizou-se ácido gálico. Este é precursor na via metabólica dos taninos hidrolisáveis e apresenta três hidroxilas reativas como o pirogalol (figura 1).



ácido gálico

**Figura 1.** estruturas do Ácido Gálico e Pirogalol

Para a confecção da curva analítica o reativo de Folin-Denis foi utilizado por ser este o mais comum método utilizado para o doseamento de fenóis totais. O método baseia-se em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente em torno de 760 nm<sup>28</sup>.

Os resultados foram confrontados com uma curva analítica que utilizou como padrão ácido gálico, que é precursor dos taninos hidrolisáveis. Assim a curva analítica mostrou resultado linear, com um R de 0,99773 e equação da reta igual a  $y = 0,11279.x + 0,01393$ . O coeficiente de correlação previsto na legislação vigente para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos em fitoterápicos deve ser de, no mínimo, 0,99<sup>29</sup>, portanto o resultado obtido está de acordo com o exigido.

#### Doseamento de fenólicos totais e taninos totais

O teor de fenólicos totais foi de  $7,80 \pm 0,209$  % de fenólicos totais, expresso em ácido gálico, com desvio padrão - DP = 0,2384; desvio padrão relativo - DPR= 3,056. Devido à impossibilidade da utilização de pirogalol para a construção da curva analítica, foram realizados cálculos de equivalência entre o padrão utilizado (ácido gálico) e o padrão de referência (pirogalol). Sabe-se que o pirogalol tem massa molecular de 126,11 u.m.a. e o ácido gálico 170,12 u.m.a. Dessa maneira, o teor de fenólicos totais foi de  $5,78 \pm 0,209$  % em pirogalol em material seco à sombra. No material dessecado – livre de água - o teor de fenólicos totais foi de  $6,36 \pm 0,230$  % em pirogalol.

Em estudos realizados com extratos de frutos de *Phyllanthus emblica* L. na Índia o total de fenólicos totais encontrado foi de  $29,04 \pm 0,07$  % do extrato de planta ou 13,08 % em amostra seca, observa-se uma diferença significativa no resultado de fenólicos totais<sup>(30)</sup> comparando com os resultados obtidos no presente trabalho. Outros trabalhos relatam que o conteúdo total de fenólicos totais, encontrados em espécies de *Phyllanthus*, encontra-se na faixa de 13-17 %, obtidos com o extrato da planta. Pesquisas realizadas com *Phyllanthus amarus* apresentaram variação nos resultados de fenólicos totais entre os diferentes lotes das plantas frescas coletadas em diferentes dias e lugares<sup>(31)</sup>. A média encontrada para fenólicos totais foi de  $1,51 \pm 0,228$  % expressos em ácido gálico<sup>(31)</sup>. Observou-se que diferentes tratamentos de secagem e extratos afetaram os valores de fenólicos totais. A secagem resultou numa diminuição significativa de fenólicos totais em *Phyllanthus amarus* extraídos com metano<sup>(31)</sup>. A explicação para essas diferenças do conteúdo de fenólicos totais pode ser atribuída a diversos fatores como: a espécie da planta em estudo, condições climáticas e edáficas, bem como a época e modo de colheita, o método de extração e de secagem e, ainda, à parte da planta utilizada para a obtenção dos extratos.



Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis; eles têm sido relatados por apresentar múltiplos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devida principalmente a sua propriedade redox, que podem desempenhar um papel na adsorção e neutralização de radicais livres<sup>(31)</sup>. Pesquisadores relataram que o ácido gálico e o ácido tânico, na fração fenólica são os principais compostos antioxidantes do *Phyllanthus emblica*<sup>(30)</sup>.

#### **Doseamento de fenólicos não tânicos e de taninos totais**

No doseamento de fenólicos não tânicos o resultado foi de  $2,62 \pm 0,206$  em ácido gálico ou  $1,94 \pm 0,153\%$  em pirogalol no material seco à sombra. Por diferença, o teor de taninos totais pelo reativo de Folin-Denis e caseína foi de  $5,178 \pm 0,4319 \%$  em ácido gálico, apresentando DP=0,3750 e DPR=7,241. Já os resultados de taninos totais foram  $3,83 \pm 0,320\%$  expressos em pirogalol no material seco à sombra. Ao se transformar os resultados para material livre de água – considerando-se a perda por dessecação – observa-se que o teor é de  $4,21 \pm 0,352 \%$  expressos em pirogalol. O valor encontrado situou-se abaixo do recomendado na monografia da droga, que é  $9,0 \%$  em pirogalol no material livre de água<sup>(15)</sup>.

As plantas medicinais freqüentemente apresentam diferenças químicas sazonais, afetando a produção de princípios ativos nas diferentes épocas do ano. Outros fatores que influenciam nos teores de princípios ativos da planta são a composição do solo, local de plantio, luminosidade, técnica de colheita e processamento pós-colheita<sup>32</sup>. Estudos realizados com folhas de *Maytenus aquifolium* nas quatro estações do ano revelaram que na primavera o teor de fenóis totais foi maior<sup>33</sup>. Porém a droga analisada foi coletada na primavera e mesmo assim, mostrou resultados inferiores ao estabelecido pela literatura, isso pode ser devido a variações climáticas, tipo de secagem e também de alterações de fenótipos.

Apesar de cada espécie se adaptar ao seu habitat, as plantas freqüentemente são capazes de existir em uma considerável amplitude térmica. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários. No entanto, talvez pelo fato da temperatura ser, de modo geral, uma consequência de outros fatores, como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários<sup>(34)</sup>.

## **CONCLUSÃO**

A espécie em estudo, *Phyllanthus tenellus* (quebra-pedra), apresentou marcadores morfoanatómicos especificados na literatura, bem como Rf e quantidade de umidade satisfatória. Mostrou-se uma pequena diferença no resultado da determinação de cinzas conforme o estabelecido pela Farmacopéia. Com relação aos compostos fenólicos, encontrou-se  $6,36 \pm 0,230 \%$  de fenólicos totais e  $4,21 \pm 0,352 \%$  de taninos totais, ambos expressos em pirogalol no material livre de água. Esses resultados foram inferiores ao estabelecido pela farmacopéia. Como observado na literatura, os compostos fenólicos podem variar, dependendo da espécie da planta. Métodos de secagem e solventes diferentes também podem influenciar na determinação de fenólicos totais.

Através de pesquisas em literatura percebeu-se que foram realizados diversos estudos com muitas espécies de *Phyllanthus*, todavia, são poucos os trabalhos sobre a espécie em estudo *Phyllanthus tenellus* Roxb.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shakil NA, Pankaj, Kumar J, Pandey RK, Saxena DB. Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry*, 69: 759–764, 2008.
2. Silva TCL, Souza IA, Araújo EC, Amorim ELC, Gomes TLB, Veras Filho J. Estudo da toxicidade subcrônica de *Phyllanthus tenellus* Roxb: avaliação comportamental. *Revista de Enfermagem UFPE*, 1: 17-22, 2008.
3. Barros ME, Schor N, Boim MA. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urological Research*, 30: 374 - 379, 2003.
4. Farias MR. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Farmacognosia – da planta ao medicamento Orgs. Simões CMO et al. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: editora da UFRGS/editora da UFSC, p. 263 – 288, 2004.
5. Ott M, Thyagarajan SP, Gupta S. *Phyllanthus amarus* suppresses hepatitis B virus by interrupting interactions between HBV enhancer I and transcription factors. *European Journal of Clinical Investigation*, 27: 908-915, 1997.
6. Silva MJ, Sales MF. *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 21: 2007.
7. Calixto JB, Santos DR, Cechinel Filho V, Yunes RA. A Review of plants of genus *Phyllanthus*: their chemistry pharmacological and therapeutic potencial. *Medicinal Research Reviews*, 18: 225-258, 1998.
8. Lionço MI, Souza TP, Petrovick PR. Avaliação cromatográfica de polifenóis presentes nas partes morfológicas de *Phyllanthus niruri*. *Caderno de Farmácia*, 17: 117-120, 2001.
9. Santiago LJM, Louro RP, Oliveira DE. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* roxb and their induction by copper sulphate. *Annals of Botany Company*, 86: 1023-1032, 2000.
10. Atoui FM, Monsouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89: 27-36, 2005.
11. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology or Medicine*, 36: 838–849, 2004.
12. Melo MEA, Coelho STS, Santos DR, Ajzen H, Schor N. Urolitíase experimental: avaliação do efeito do chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*). *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 13: 26-30, 1991.
13. Wollgast J, Anklan E. Review in polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 1: 423-447, 2000.
14. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59: 205-215, 1996.
15. Farmacopéia Brasileira. Quebra-Pedra. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 246-1 – 246-6; 247-1 – 247-6.
16. Farmacopéia Brasileira. Pitangueira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 245-2.
17. Farmacopéia Brasileira. Determinação de água em drogas vegetais. 4. ed. São Paulo: *Biosaúde*, Londrina, v. 13, n. 1 / 2, 2011

Atheneu, 2000, verbete 4.2.3.

18. Farmacopéia Brasileira. Determinação de cinzas totais. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000, verbete 4.2.4.

19. Folin O, Denis W. Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. *The Journal of Biological Chemistry*, 12: 245-251, 1912.

20. Farmacopéia Brasileira. Determinação da quantidade de taninos totais pelo reativo de Folin-Denis e caseína. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p 246-3 – 246-4; 247-3 – 247-4.

21. Letícia DM, Orlando VS. Avaliações qualitativas e quantitativas da variação de metabólitos secundários em *Tournefortia paniculata* Cham. (Boraginaceae) *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 1032-1034, 2007.

22. Simões CMO., Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (Org.) et al. *Farmacognosia : da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, p. 230-245; 615 – 656, 2004.

23. Schofield P, Pell AN, Mbugua DM. Analysis of condensed tannins – a review. *Animal feed science and technology*, 91: 21-40, 2001.

24. Bacchi EM. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: STASI, L.C. *Plantas medicinais: [arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar]*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 169-186, 1996.

25. Farias MR. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões CMO, Schenkel E P, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA.; Petrovick, P. R. (Org.). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 263-288, 2003.

26. Maria MBA, Maria FGL, Paulo HMS, Célia MDN, Carlos ECM. Determinação de umidade, fibras, lipídeos, cinzas e sílica em plantas medicinais. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 21: 343 – 350, 2003.

27. Souza OVS, Oliveira MS, Rabello SV, Cunha RO, Costa BLS, Leite MN. Estudo Farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip – Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13: 50 – 53, 2003.

28. Funari CS, Ferro VO. Análise de própolis. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 26: 171-178, 2006.

29. BRASIL, Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D.O.U. – Diário Oficial da União; poder executivo, de 02 de junho de 2003.

30. Mayachiew P, Devahastin S. Antimicrobial and antioxidant activities of India gooseberry and galangal extracts. *LWT- Food Science and Technology*, 41: 1153 – 1159, 2008.

31. Kumaram A, Karunakaran JR. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of live *Phyllanthus* species from India. *LWT- Food Science and Technology*, 40: 344 – 352, 2007.

32. Negri MLS. Secagem das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

33. Yariwake JH, Lanças FM, Cappelaro EA, Vasconcelos EC, Tiberti LA, Pereira MAS, Franca SC. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15: 162-168, 2005.

34. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30: 374-381, 2007.