

Volume 13 - Número 1  
Janeiro - Março 2019

REVISTA

# FITOS<sup>®</sup>

e-ISSN: 2446-4775 | ISSN 1808-9569

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos

*Ceiba speciosa* Ravenna

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**farmanguinhos**  
Instituto de Tecnologia em Fármacos



e-ISSN: 2446-4775 | ISSN: 1808-9569

**Presidente da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ):** Nísia Trindade Lima

**Diretor do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos):** Jorge Souza Mendonça

**Coordenador do Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde (CIBS):** Glauco de Kruse Villas-Bôas

**Editores Científicos  
Coordenadores:** Glauco de Kruse Villas-Bôas, FIOCRUZ  
Marcelo Neto Galvão, FIOCRUZ  
José Luiz Mazzei da Costa, FIOCRUZ

**Editores de Área de  
Conhecimento:** Emiliano de Oliveira Barreto, UFAL  
Israel Felzenszwalb, UERJ  
João Paulo Viana Leite, UFV  
Marcos Sorrentino, USP  
Paulo Rogério Lopes, UFPR

**Editores Adjuntos:** Érica Speaglich, USP  
Ivanildes Vasconcelos Rodrigues, UFJF  
Rodolfo Santos Barboza, UFRJ

**Editor Executivo:** Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu, FIOCRUZ

**Corpo Editorial:** Benjamin Gilbert, FIOCRUZ, Brasil  
Cecília Veronica Nunez, INPA, Brasil  
Edeltrudes de Oliveira Lima, UFPB, Brasil  
Edemilson Cardoso da Conceição, UFG, Brasil  
Jan Carlo Delorenzi, Universidade Presbiteriana Mackenzie, Brasil  
Jislaine de Fátima Guilhermino, FIOCRUZ, Brasil  
João Marcos Hausmann Tavares, UFRJ, Brasil  
José Maria Guzman Ferraz, UFSCar, Unicamp, Brasil  
Katia Soares da Poça, INCA, Brasil  
Maria Cecília Tomassini Urti, Universidad de República Uruguay, Uruguai  
Maria Cristina Marcucci Ribeiro, UNIBAN, Brasil  
Nilson do Rosário Costa, FioCruz, Brasil  
Norma Albarello, UERJ, Brasil  
Sarita Albagli, IBIC, Brasil  
Ulysses Paulino de Albuquerque, UFPE, Brasil

# REVISTA FITOS

**Ministério da Saúde**

**Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ**

**Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos**

**Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde - CIBS**

## **Correspondência / Mail**

Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde - CIBS

FIOCRUZ, Farmanguinhos, Complexo Tecnológico de Medicamentos - CTM

Av. Comandante Guarany, 447 Jacarepaguá - Rio de Janeiro, RJ, Brasil

CEP 22775-903

revistafitos@far.fiocruz.br

Tel.: +55 21 3348.5370 / +55 21 3348.5598

## **Informações para cadastro e submissão / Registration and Submission Information**

[www.revistafitos.far.fiocruz.br](http://www.revistafitos.far.fiocruz.br)

Tel: +55 21 3348.5370 / +55 21 3348.5598

E-mail: [revistafitos@far.fiocruz.br](mailto:revistafitos@far.fiocruz.br)

## **Acesso on-line / On line Access**

Artigos disponíveis em formatos PDF e HTML no endereço eletrônico:

[www.revistafitos.far.fiocruz.br](http://www.revistafitos.far.fiocruz.br)

## **Classificação CAPES-Qualis**

Qualis B4 – Interdisciplinar, Medicina Veterinária e Odontologia

Qualis B5 – Biotecnologia, Ciências Agrárias, Ciências Ambientais, Engenharia II e Saúde Coletiva

Qualis C – Biodiversidade, Ciências Biológicas II, Ciências Biológicas III, Farmácia e Química

## **Escritório Editorial - CIBS**

Assistente Editorial e Revisora – Yolanda de Castro Arruda

## **Apoio CIBS**

Gestão – Preciosa de Jesus Meireles de Oliveira

Divulgação e Comunicação – Denise Monteiro da Silva

Administrador SEER e Design – Eugênio Fernandes Telles

## **Associada à ABEC**

**Associação Brasileira  
de Editores Científicos**



Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

Revista Fitos: pesquisa, desenvolvimento e inovação em fitoterápicos. /  
Fundação Oswaldo Cruz; Instituto de Tecnologia em Fármacos; Centro  
de Inovação em Biodiversidade e Saúde. – v.1, n.1, (Jun. 2005), - .  
Rio de Janeiro: CIBS, 2005 – v.: il.

Anual: 2007 e 2011

Interrompida: 2008, 2014

Quadrimestral: 2010, 2018

Trimestral: 2012, 2015, 2016

Semestral: 2005, 2006, 2009, 2013, 2017

ISSN 1808-9569

e-ISSN 2446-4775

1. Fitoterápicos. 2. Fitofármacos. 3. Medicamentos de origem vegetal.  
4. Biodiversidade. 5. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) I.  
Fundação Oswaldo Cruz. II. Instituto de Tecnologia em Fármacos. Centro  
de Inovação em Biodiversidade e Saúde.

CDD 615.32

## Revista Fitos

e-ISSN 2446-4775 | ISSN 1808-9569

Volume 13, número 1

Janeiro - Março, 2019

## EDITORIAL

### Desafios do acesso aberto

6-8

Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu.

## ARTIGO DE PESQUISA

### **Análise fitoquímica, toxicidade, potencial antioxidante e atividade antibacteriana da *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil.) Ravenna**

9-21

Phytochemical analysis, toxicity, antioxidant potential and antibacterial activities of *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil.) Ravenna

*Química*

Braga, Pâmela Milene dos Santos; Barcelos, Izabel Bárbara; Calazans, Richard da Silva Pereira; Bulian, Alexandra Luiza Silva; Gabler, Josiane Cezar Rodrigues; Sobral, Fabiana de Oliveira Solla; Salvi, Jeferson de Oliveira.

### **Anthocyanins in inflorescences of *Tarenaya rosea* (Vahl ex DC.) Soares Neto & Roalson (Cleomaceae)**

22-28

*Etnobotânica*

Gurgel, Claudia Simões; Bizarri, Carlos Henrique Brasil; Cordeiro, Lívia da Silva; Castro, Tatiana Carvalho; Albarello, Norma.

### **Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lechleri*)**

29-37

Toxic, cytotoxic and mutagenic/genotoxic evaluation of a commercial dragon's blood extract (*Croton lechleri*)

*Química*

Almeida, Fernanda Karen Virgolino de; Novais, Valéria Pinheiro de; Salvi, Jeferson de Oliveira; Marson, Renan Fava.

### **Extrato etanólico das folhas de *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzg (nabo forrageiro): efeitos anti-hiperglicêmico, antilipidêmico e antioxidante em ratos com Diabetes Mellitus tipo 1**

38-48

Ethanollic extract from the leaves of *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzg (nabo forrageiro): effects antihyperglycemic, anti-dyslipidemic and antioxidant in type 1 diabetic rats

*Agroecologia*

Silva, Amanda Basílio; Lopes, Gabriela Dias Siqueira; Neves, Thamiris Vilas Boas; Barros, Gérsika Bitencourt Santos; Reis, Luís Felipe Cunha dos; Salles, Bruno Cesar Correia; Cerdeira, Cláudio Daniel; Moraes, Gabriel de Oliveira Isac.

**Isolation and characterization of polyphenols from *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae) leaves** 49-60

*Química*

Tostes, João Batista de Freitas; Silva, Antônio Jorge Ribeiro da; Kuster, Ricardo Machado.

**Multiplicação da planta medicinal *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura** 61-73

*Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) medicinal plant multiplication in culture medium

*Etnobotânica*

Carneiro, Maurízia Fátima; Duarte, Edson Ferreira; Vargas, Laureano Magno; Sibov, Sérgio Tadeu; Conceição, Edemilson Cardoso da; Nogueira, João Carlos Mohn.

**PERSPECTIVA**

**Intensificação de processos e química verde: importância para as indústrias farmacêutica, cosméticos, alimentícia e biorrefinarias** 74-93

Process intensification and green chemistry: importance for the pharmaceutical, cosmetic, food and biorrefineries industries

*Política e Gestão*

Coutinho, Paulo Luiz de Andrade; Bastos, João Bruno Valentim; Alijó, Pedro Luiz de Andrade; Goulart, Adriana Karla.

**INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

**Normas para submissão e apresentação do manuscrito** 94-105

**AGRADECIMENTOS** 106-107

## Desafios do acesso aberto

Desde a criação da Revista Fitos (RF) na modalidade eletrônica em 2014, metas de fluxo contínuo (qualidade, indexação, profissionalização e internacionalização) norteiam o desenvolvimento do periódico e orientam a definição do foco de trabalho a cada ano.

A RF também acompanha os movimentos da Fiocruz relacionados à comunicação científica e, nesse sentido, o ano de 2018 foi marcado por um amplo debate em torno da Ciência Aberta, definida aqui como: “[...] a atividade científica praticada de modo aberto, colaborativo e transparente, em todos os domínios do conhecimento, desde as ciências fundamentais até às ciências sociais e humanidades” <sup>[1]</sup>.

O paradigma da abertura, cujo terreno fértil para o seu desenvolvimento foi a evolução das tecnologias da informação e comunicação (TICs), coloca no foco da discussão os processos colaborativos, de compartilhamento e de reutilização na produção científica. Na concepção de Albagli<sup>[2]</sup>, Ciência Aberta tem um conceito abrangente, semelhante a um guarda-chuva, que se baseia em diversos pilares e inclui múltiplas dimensões, a saber: Acesso Aberto, Dados Abertos, Pesquisa e Inovação Aberta, Ciência Cidadã, Código Aberto, Caderno Aberto de Laboratório, Recursos Educacionais Abertos, Redes Sociais Científica, etc.

Destaca-se, nesse contexto, o Acesso Aberto (AA), em que se incluem as publicações científicas (Via Dourada) e o auto arquivamento/depósito das publicações em repositórios institucionais (Via Verde), cuja definição, segundo o documento da Iniciativa de Budapest sobre Acesso Aberto (BOAI-*Budapest Open Access Initiative*) é:

Acesso Aberto à literatura científica revisada por pares significa a disponibilidade livre na Internet, permitindo a qualquer usuário ler, fazer *download*, copiar, distribuir, imprimir, pesquisar ou referenciar o texto integral desses artigos, recolhê-los para indexação, introduzi-los como dados em *software*, ou usá-los para outro qualquer fim legal, sem barreiras financeiras, legais ou técnicas que não sejam inseparáveis ao próprio acesso a uma conexão Internet. As únicas restrições de reprodução ou distribuição e o único papel para o *direito autoral* neste domínio é dar aos autores o controle sobre a integridade do seu trabalho e o direito de ser, devidamente, reconhecido e citado<sup>[3]</sup>.

No que se refere aos periódicos científicos, propriamente ditos, a emergência das revistas eletrônicas em AA no início deste século, prometia o rompimento com a tradicional estrutura de validação e controle do conhecimento científico, abrigando a esperança da democratização deste conhecimento, ampliando o acesso não apenas aos cientistas, mas à sociedade em geral e transformando a estrutura do sistema de comunicação científica. Outro fator que em muito estimulou o acesso aberto foi a crise dos periódicos (década de 1980) que levou a comunidade científica a buscar alternativas para disponibilizar o conhecimento produzido, minimizando custos. Instalou-se, entretanto, um jogo político-econômico

revelador da tensão entre pesquisadores e academia e os grandes *publishers*, no que se refere ao poder sobre o conhecimento científico produzido.

Os periódicos eletrônicos, no entanto, em adaptação à nova realidade tecnológica, fizeram a transposição de suas práticas editoriais tradicionais para o ambiente *online*, sem levar em conta a especificidade da *web*, com a diferença de serem acessíveis sem pagamento.

Passado esse tempo, muitas mudanças ocorreram, muitos serviços editoriais evoluíram tecnologicamente e várias adaptações foram necessárias para acompanhar o novo panorama da comunicação científica internacional, tais como a publicação de manuscritos em servidores de *preprints* e *posprints*, as novas opções da revisão por pares e o papel geral dos periódicos em garantir qualidade e agregar valor aos manuscritos.

Spinak<sup>[4]</sup> alerta que essa onda de inovações está mudando o papel dos periódicos, o processo de arbitragem, a edição em geral e apresenta um desafio para as revistas sem fins lucrativos dos países emergentes e em desenvolvimento.

São esses desafios que estão motivando a equipe editorial da Revista Fitos a mergulhar na temática do AA em total consonância com as políticas e encaminhamentos da Fiocruz.

Assim como a maioria dos periódicos, a passagem da RF para o modelo eletrônico, fundamental para a caracterização de acesso aberto, tomou por base o modelo tradicional de publicação, transpondo-o do impresso para o eletrônico. Na atualidade, então, adequações estão em andamento para que, cada vez mais, a RF possa atender aos critérios da temática do AA, com vistas a difundir o conhecimento científico sobre pesquisa, desenvolvimento e inovação em medicamentos da diversidade vegetal.

Nesse contexto, busca-se: a melhoria na página de publicação da revista, priorizando o conteúdo e a usabilidade; a motivação para que o autor seja parceiro da revista na divulgação de seu trabalho; o estabelecimento de critérios mais rígidos de revisão dos manuscritos, visando à qualidade do conteúdo; a exigência dos objetos digitais que facilitam a identificação da obra e do autor (DOI, ORCID), a submissão do periódico à avaliação em bases voltadas para o AA (Redalyc, DOAJ, etc.), a disponibilização dos documentos e orientações editoriais também em Inglês, o uso de mídias alternativas para divulgação (Facebook, Twitter, etc.), entre outros.

Diante disso, formula-se o convite a todos os envolvidos com o desenvolvimento da RF para assumirem, como sendo de sua responsabilidade, os desafios que se apresentam para o AA e, conseqüentemente, da Ciência Aberta.

Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu  
Editora Executiva

## Referências Bibliográficas

1. Fiocruz - Campus Virtual, **Curso de Introdução à Ciência Aberta** (*online*). 2018. [\[Link\]](#).



2. Albagli, S. Ciência Aberta em questão. In: **Seminário internacional ciência aberta, questões abertas**, Rio de Janeiro, 2014. Trabalho apresentado: Liinc. IBICT. OKF. UNIRIO. Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 1 set 2014.
3. BOAI - *Budapest Open Access Initiative*. **A Iniciativa de Acesso Aberto de Budapeste 10 anos depois** (Tradução realizada pelo Gabinete de Projetos *Open Access* dos Serviços de Documentação da Universidade do Minho). 2011. [\[Link\]](#).
4. Spinak E. **Innovaciones en publicaciones científicas: el futuro de la revisión por pares y las revistas**. SciELO en Perspectiva. 30 jan 2019. [\[Link\]](#).

# Análise fitoquímica, toxicidade, potencial antioxidante e atividade antibacteriana da *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil.) Ravenna

Phytochemical analysis, toxicity, antioxidant potential and antibacterial activities of *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil.) Ravenna

DOI 10.17648/2446-4775.2019.641

Braga, Pâmela Milene dos Santos<sup>1</sup>; Barcelos, Izabel Bárbara<sup>1</sup>; Calazans, Richard da Silva Pereira<sup>1</sup>; Bulian, Alexandra Luiza Silva<sup>1</sup>; Gabler, Josiane Cezar Rodrigues<sup>1</sup>; Sobral, Fabiana de Oliveira Solla<sup>2</sup>; Salvi, Jeferson de Oliveira<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA), Departamento de Farmácia, Laboratório de Toxicologia. Av. Engenheiro Manfredo Barata Almeida da Fonseca, nº 762, Caixa Postal 61, Sala 2-prédio C, CEP: 76907-438, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Biomédicas de Cacoal (FACIMED), Av. Cuiabá, 3087, Jardim Clodoaldo, CEP: 76963-665, Cacoal, Rondônia, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade Panamericana de Ji-Paraná (UNIJIPA). Departamento de Farmácia. RO 135 Km 1, CEP:78961-080, Campus I, Ji-Paraná, Rondônia, Brasil.

\*Correspondência: [jefersonsalvi@hotmail.com](mailto:jefersonsalvi@hotmail.com)

## Resumo

O presente estudo realizou a prospecção fitoquímica e avaliou a toxicidade aguda, o potencial antioxidante e a atividade antibacteriana das flores da *Ceiba speciosa*. A triagem dos metabólitos foi realizada por reações colorimétricas, a toxicidade foi avaliada *in vitro* por meio do teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, a atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres, utilizando o radical sintético 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e a atividade antimicrobiana pela difusão em disco frente às bactérias *Escherichia coli*, *Shigella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Os resultados indicaram a presença de flavonoides e saponinas, observou-se a ausência da toxicidade das amostras (DL<sub>50</sub>=1.067 ug/mL) e a positividade para a atividade antioxidante (EC<sub>50</sub>=56,7 mg/mL). Em relação à atividade antibacteriana, as soluções hidrometanólicas a 80% (80:20, v/v) apresentaram efeito nas quatro maiores concentrações (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL) para as cepas de *E. coli* e *Shiguela* spp., e para o *S. aureus* o mesmo ocorreu a partir de 25 mg/mL. Concluiu-se sobre a ausência de toxicidade, positividade para o efeito antioxidante e atividade antibacteriana para as soluções hidrometanólicas. Sugere-se a continuidade das investigações para exploração do potencial biológico das flores de *Ceiba speciosa*, que pode constituir-se em uma alternativa como recurso terapêutico.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. Paineira. *Screening* fitoquímico. Prospecção fitoquímica. Metabólitos secundários. *Artemia salina*. Toxicidade.

## Abstract

The present study aimed to determine the phytochemical prospection, to evaluate the acute toxicity, antioxidant potential and antibacterial activity of *Ceiba speciosa* flowers. The identification of the metabolites was developed by colorimetric reactions, *in vitro* cytotoxicity was evaluated by the *Artemia salina* (brine shrimp) lethality test, the antioxidant activity by the capacity of free radical scavenger, using the synthetic radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and to verify an antimicrobial activity was used the disk diffusion method against the bacteria *Escherichia coli*, *Shigella* spp and *Staphylococcus aureus*. The results showed a presence of flavonoids and saponins, with absence of toxicity of the samples (LD<sub>50</sub>=1.067 ug/mL) and a positivity for antioxidant activity (EC<sub>50</sub>=56.7 mg/mL). In relation to the antibacterial activity, the hydromethanolic solutions presented halos greater than 6 mm in the four highest concentrations, for *E. coli* and *Shigella* spp., and to the *S. aureus* strains, the same occurred from 25 mg/mL. Our results showed the absence of toxicity, positivity for the antioxidant effect and antibacterial activity for hydromethanolic solutions. We suggest the continuity of the investigations to explore the biological potential of *Ceiba speciosa* flowers that can constitute an alternative as a therapeutic resource.

**Keywords:** Medicinal plants. Paineira. Phytochemical screening. Phytochemical prospects. Secondary metabolites. *Artemia salina*. Toxicity.

---

## Introdução

O uso popular de plantas com finalidade medicinal, por meio das diversas formas de preparo e indicações, constitui-se em uma prática bastante difundida em todo o mundo. Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), até 80% da população mundial utiliza recursos das medicinas populares para suprir necessidades de assistência médica<sup>[1]</sup>.

As diferentes indicações terapêuticas atribuídas a uma planta podem dificultar a descoberta e o desenvolvimento de novos princípios ativos<sup>[2]</sup>. Variadas classes de compostos químicos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, são encontrados distribuídos nas diferentes partes vegetais. O conhecimento da presença desses compostos fitoquímicos pode servir de predileção para identificação da espécie e elucidação das suas prováveis atividades biológicas<sup>[3]</sup>.

A popularização e a facilidade de acesso podem levar a interações no consumo concomitante com medicamentos e a manifestação de efeitos adversos<sup>[4]</sup>. Neste contexto, é possível considerar a planta medicinal como xenobiótico e, desta forma, os produtos da sua biotransformação são potencialmente perigosos. Com relação à toxicologia, é necessário considerar os efeitos esperados logo após a ingestão e, principalmente, os danos decorrentes do uso contínuo, tais como: a hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade<sup>[5,6]</sup>.

As espécies do gênero *Ceiba* sp. são árvores que variam de 5 a 20 metros e encontram-se amplamente distribuídas pelo mundo, incluindo a América do Sul e a região amazônica do Brasil. A *Ceiba speciosa*, conhecida popularmente como paineira ou barriguda, pertence à família Malvaceae e, anteriormente era denominada de *Chorisia speciosa*, pertencente à família Bombaceae. Suas flores apresentam coloração em tons de rosa e contêm estames com anteras sésseis, geralmente polinizadas por borboletas<sup>[7]</sup>.

A utilização do gênero está descrita para diversas finalidades com base em seu potencial terapêutico, nutricional e econômico, todavia, são poucas as evidências relacionadas ao potencial antioxidante e aos aspectos fitoquímicos e toxicológicos da *Ceiba speciosa*. Existem relatos do uso desta planta para a redução dos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose<sup>[8-10]</sup>.

Assim, pesquisas direcionadas para a investigação da eficácia e da segurança das espécies, relatadas pelo uso popular, proporcionam não somente a descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos, como também a investigação de informações para o uso racional das plantas com fins medicinais, o que proporciona a eficácia terapêutica e a promoção à saúde.

O presente estudo teve por objetivo realizar a prospecção fitoquímica das flores da planta *Ceiba speciosa*, considerando a segurança quanto à toxicidade do seu extrato aquoso e a detecção do seu provável potencial antioxidante e a atividade antimicrobiana.

## Materiais e Método

O material vegetal para herborização foi obtido de um exemplar de *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil.) Ravenna, localizado nas coordenadas 10°51'44,3''S; 61°57'36,5''W, no bosque do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA), no município de Ji-Paraná, estado de Rondônia, Brasil.

A coleta foi realizada por tração mecânica com o auxílio de um podão acoplado a uma vara de alumínio, o material foi acondicionado em sacos de nylon para o transporte<sup>[11]</sup>. A identificação ocorreu junto ao Herbário Antônio Dalla Martha do CEULJI/ULBRA, seguindo as técnicas padronizadas, e a exsicata foi depositada sob o nº de registro 257.

### Obtenção das flores e secagem

As flores de *C. speciosa* caídas foram recolhidas, entre os meses de abril e maio de 2016, respeitando a integridade e a ausência de contaminantes. Em seguida, estas foram submetidas ao processo de secagem artificial em estufa (Q317M, Quimis®) à 50°C, por sete dias, e conduzidas ao seccionamento para a redução a pó ou partículas ( $\leq 4$  mm, Mesh 5)<sup>[12]</sup>.

### Preparo do extrato aquoso

Com base na principal forma de consumo popular para a utilização de plantas medicinais, normalmente na forma de chás, preparou-se uma infusão com duas colheres de sopa do pó das flores secas para uma xícara de chá (240 mL), conforme o regulamento técnico 519 do Ministério da Saúde<sup>[13]</sup>, totalizando uma concentração final de 8,15 mg/mL. A água a 90°C ( $\pm 2$ ) foi vertida no material vegetal e, em seguida, a solução foi abafada até atingir a temperatura ambiente de 25°C, e procedeu-se com a filtragem em papel filtro para a retirada do material sobrenadante.

### Prospecção fitoquímica

Realizou-se a análise fitoquímica qualitativa conforme métodos validados baseados em testes colorimétricos, considerando a identificação dos principais metabólitos secundários.

O teste para detecção de alcaloides foi realizado após a extração com ácido clorídrico (1%) e análises nos reagentes de Dragendorff, Bertrand e Mayer. A adição de solução de carbonato de sódio (22%), extração com clorofórmio e tratamento com ácido acético revelam a positividade do teste<sup>[14]</sup>.

Para as antraquinonas foram utilizados os princípios da reação de Borntraeger, por meio da adição de uma mistura de soluções de diclorometano e de hidróxido de sódio, sendo que a coloração vermelha indica o resultado positivo<sup>[15]</sup>.

A pesquisa das classes das auronas e chalconas foi realizada após a extração inicial por decocção seguida de filtragem com acetato de etila, logo após, ocorreu a adição de solução aquosa de hidróxido de sódio, considerando-se positivas as amostras de tons vermelho-alaranjados<sup>[16]</sup>.

A presença de compostos cumarínicos foi verificada pela coloração amarelo fluorescente após o contato com a solução etanólica de hidróxido de sódio (1%) mediante aquecimento<sup>[17]</sup>.

Os flavonoides foram investigados pela reação de Shinoda<sup>[18]</sup> que consiste no aquecimento da amostra que posteriormente entra em contato com etanol, ácido clorídrico concentrado e magnésio metálico. O teste foi considerado positivo, quando a amostra apresentou tons associados ao vermelho e ao laranja.

A presença da saponinas foi investigada por meio da submissão do decocto do material vegetal à intensa agitação, sendo que, são consideradas presentes quando há a formação de um anel afrogênico persistente<sup>[19]</sup>.

A pesquisa de taninos foi realizada mediante as reações de precipitação de gelatina ao entrar em contato com solução aquosa de cloreto de sódio (2%)<sup>[14]</sup>.

O teste para triterpenos e/ou esteroides utilizou n-hexano como solvente para extração em 24 horas. Em seguida, procedeu-se à reação de Liebermann-Burchard, que utiliza anidro acético e ácido sulfúrico concentrado<sup>[15]</sup>. Diferentes colorações e intensidades de cores caracterizam os núcleos esteroidais ou triterpênicos. A coloração azul pela Reação de Liebermann-Burchard é indicativa da presença de esteroides. A mudança para cor rósea pela Reação de Shinoda indica presença de flavonoides<sup>[20]</sup>.

## Toxicidade

A atividade citotóxica da infusão das flores de *Ceiba speciosa* foi avaliada por meio do teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*<sup>[21]</sup>. Os ovos eclodiram em solução de sal marinho (pH 8,5) e as larvas aclimatadas na temperatura de 25°C (±2) com aeração e iluminação constantes, por 48 horas. Foram transferidos 10 náuplios de *Artemia salina* para tubos de ensaio contendo 5 mL do infuso inicial (8,15 mg/mL) e diluições (1:2, 1:5, 1:10 e 1:20) preparados com solução marinha. O teste foi realizado em triplicata de amostras e como controle negativo (CN) utilizou-se apenas solução salina.

A contagem dos microcrustáceos mortos foi realizada após 24h, e estimou-se a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) com base na regressão linear logarítmica, considerando a correlação das concentrações e a frequência dos óbitos, substituindo o valor pela metade das mortes máximas registradas por série (n/2) na equação da reta obtida<sup>[22]</sup>. Os resultados das sobrevivências foram estatisticamente comparados ao do CN por análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnet para múltiplas comparações com auxílio do programa *Graphpad Prism* (versão 6.0).

### Atividade antioxidante

O efeito antioxidante das flores da *Ceiba speciosa* foi avaliado pela capacidade de desativação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)<sup>[23]</sup>. Esse radical sofre redução pelos agentes antioxidantes, promovendo alteração da coloração inicial violeta, para variações de tons de cor amarela, proporcional a concentração da substância redutora da amostra.

Em ambiente escuro, transferiu-se 3,9 mL de DPPH (0,06 mM) e 100 µL de cada extrato aquoso (1, 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20) para tubos de ensaios. O experimento foi realizado em triplicata de amostras. Um controle positivo (CP) foi preparado pela adição de 3,9 mL de DPPH (0,06 mM) com 100 µL de uma solução padrão de DPPH metílico e água destilada foi utilizada como branco. Como controle negativo utilizou-se uma solução de 100 µL de água e 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mMol). As absorbâncias foram medidas pelo aparelho Bioplus (Bio-2000<sup>®</sup>) a 515 nm e monitoradas minuto a minuto até se observar a estabilização da absorbância da amostra.

Construiu-se uma curva-padrão de DPPH utilizando diluições metanólicas de DPPH, nas seguintes concentrações: 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM.

Calculou-se o decaimento da absorbância das amostras (A<sub>am</sub>) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (A<sub>c</sub>) que resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL), expressa pela fórmula: % SRL = (A<sub>c</sub> - A<sub>m</sub>/A<sub>c</sub>)x100.

### Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de difusão em disco utilizando o meio ágar Mueller-Hinton<sup>[24]</sup>. Para os ensaios foram utilizadas soluções aquosas e hidrometanólicas a 80% (80:20, v/v) nas concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL e 6,125 mg/mL, como CN foi utilizado apenas o veículo. 10 µL de cada amostra foi pipetada sobre discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro, os quais foram levados à dessecador por 48 horas.

Foram utilizadas cepas padronizadas de *Escherichia coli* (ATTC 1809) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 2494) e *Shigella* spp., obtidas da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do CEULJI/UBRA. As suspensões bacterianas contendo solução fisiológica obtiveram turvação equivalente a padrão de 0,5 na escala de Mac Farland. Após a inoculação dos discos, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, após esse período, os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro manual.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata de amostra e os controles positivos (CP) utilizados foram ceftriaxona (30 µg) para *Escherichia coli*, amoxicilina com ácido clavulânico (30 µg) para *Staphylococcus aureus* e ciprofloxacino (5 µg) para *Shigella* spp.

Considerou-se a atividade antimicrobiana positiva mediante a formação de halo de inibição (HI) superior a 6 mm de diâmetro<sup>[25]</sup> e, ainda, quando presente, a atividade antibacteriana foi classificada em moderada atividade antibacteriana (7 mm ≤ HI ≤ 13 mm) e com elevada atividade antibacteriana (HI > 13 mm) frente todas as cepas pesquisadas<sup>[26]</sup>.

Os resultados da atividade antibacteriana foram expressos com base na análise das médias dos halos de inibição identificados juntamente com os desvios-padrão observados. Empregou-se a análise de variância (ANOVA) e a comparação múltipla com o CP por meio do teste de Dunnet para múltiplas comparações com auxílio do programa *Graphpad Prism* (versão 6.0).

## Resultados e Discussão

A identificação qualitativa dos metabólitos secundários revelou a positividade para saponinas e flavonoides (TABELA 1).

Os flavonoides representam uma das classes fitoquímicas de maior ocorrência em plantas, atuando como agentes antioxidantes, antimicrobianos, antialérgicos, antivirais, anti-inflamatórios e vasodilatadores, sendo a principal causa de estudos a sua atividade antioxidante<sup>[27]</sup>.

TABELA 1: Prospecção fitoquímica nas flores de *Ceiba speciosa*.

Classes de metabólitos secundários	Resultado
Alcaloides	-
Antraquinonas	-
Auronas/chalconas	-
Cumarinas	-
Flavonoides	+
Saponinas	+
Taninos	-
Triterpenos e/ou esteroides	-

“+”: presente; “-”: ausente.

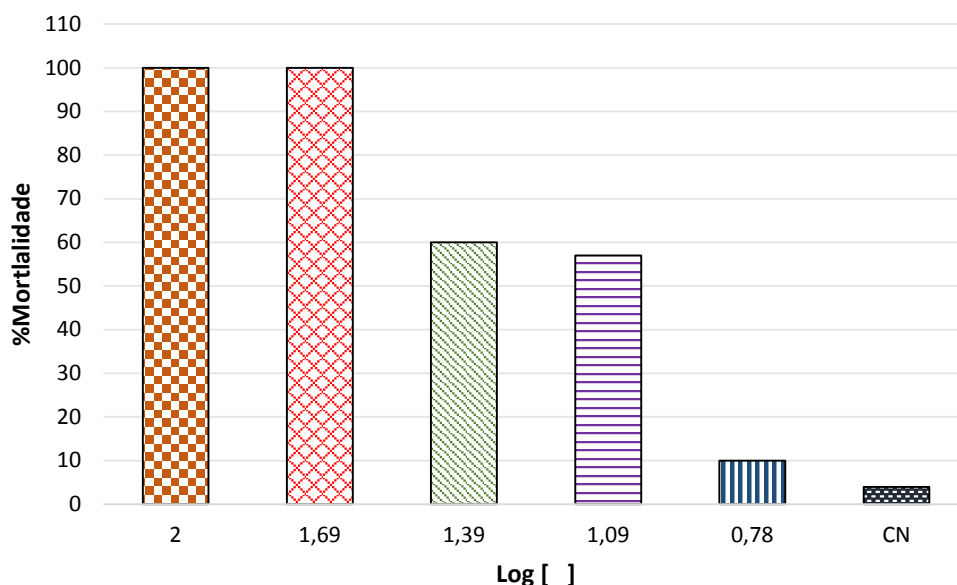
A presença de compostos fenólicos foi identificada em extratos aquosos obtidos das folhas<sup>[28]</sup> e das flores<sup>[29]</sup> de *C. speciosa*. Em revisão<sup>[30]</sup> descreveu-se a presença de dois compostos da família das antocianinas, a cianidina 3,5-diglicosídeo e a cianidina 3-glicosídeo, tipos de flavonoides, nas flores da *C. speciosa*.

As saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos, por isso classificam-se como saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas, e são responsáveis por proteger as plantas contra o ataque de insetos e microrganismos<sup>[5,31]</sup>. Possuem atividades farmacológicas atribuídas aos efeitos antitumoral, anti-inflamatório, antiviral, antifúngico, antibacteriano e citotóxico, dentre outros<sup>[3,32]</sup>.

Na literatura científica há registro da presença de triterpenos na fração de éter de petróleo obtida das flores de *C. speciosa*<sup>[29]</sup>. Autores<sup>[33]</sup> descreveram a presença de saponinas em folhas de *Pavonia varians*, e traços desse mesmo metabólito também foram encontrados nas folhas de *Ceiba glaziovii*, ambas pertencentes à família Malvaceae.

Em relação à toxicidade, a DL<sub>50</sub> foi de 1.047 ug/mL, o que indica a ausência de toxicidade da amostra<sup>[20]</sup>. Observou-se diferença significativa do número de sobreviventes entre o infuso inicial e as três primeiras diluições quando comparados ao controle negativo (CN), evidenciando a relativa seguridade na concentração de 0,4 mg/mL como demonstra a FIGURA 1.

**FIGURA 1:** Distribuição da frequência dos óbitos (%Mortalidade) em função do logaritmo das concentrações (Log [ ]) dos extratos aquosos de *Ceiba speciosa*. CN = controle negativo.



Dados sobre a toxicidade de extratos aquosos das flores de *C. speciosa* não foram encontrados na literatura científica, ressaltando a importância dos achados do presente estudo. Pesquisa de Silveira<sup>[34]</sup> atribuiu a toxicidade do fruto da paineira à presença de um polissacarídeo obtido do seu exsudato, estabelecendo uma relação dose dependente com a diminuição da viabilidade *in vitro* de macrófagos e de linhagens de células de câncer cervical (HeLA). Extratos aquosos obtidos da casca de *C. speciosa* demonstraram negatividade para danos ao DNA, bem como, a inexistência de peroxidação lipídica, refletindo na ausência do estresse oxidativo<sup>[10]</sup>.

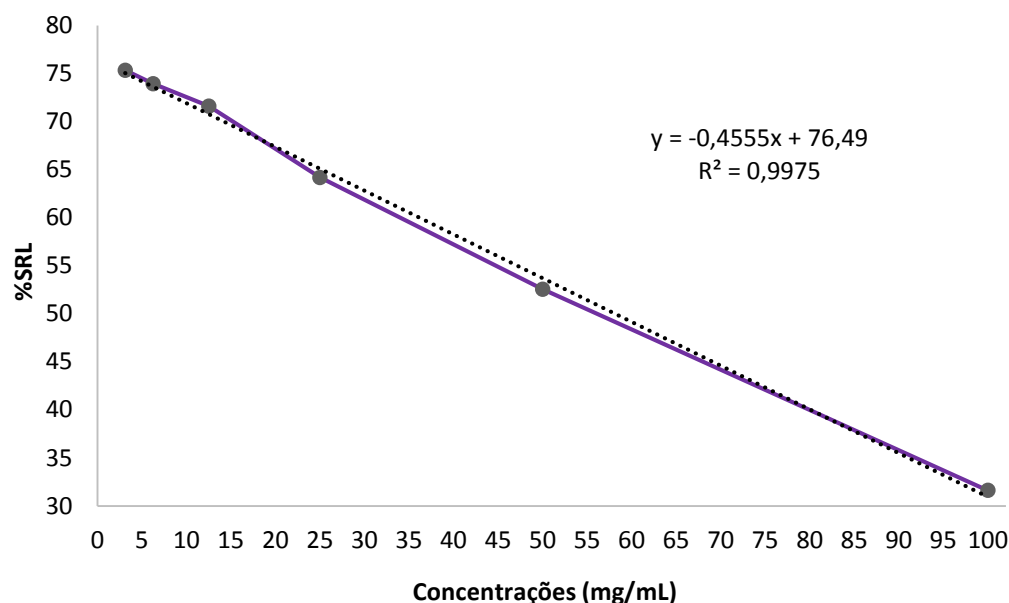
Testes de toxicidade *in vitro* podem ser úteis para o seguimento de pesquisas com extratos e substâncias de ação ainda desconhecidas, pois fornecem dados preliminares para as avaliações nas pesquisas *in vivo*, de maneira a elucidar o estudo das doses e o estabelecimento da correlação dose-dependência com os efeitos fisiológicos manifestados<sup>[35,36]</sup>.

Observou-se a positividade para a atividade antioxidante, evidenciada pelas alterações da coloração violeta para tons de amarelo e confirmada pelos resultados menores das absorvâncias das soluções testadas em comparação aos valores obtidos para o CN, sendo calculada uma EC<sub>50</sub> = 56,7 mg/mL.

O percentual de radicais livres consumidos baseia-se na capacidade de doar átomos de hidrogênio e reduzir o DPPH à hidrazina, desta forma ocorre a mudança de coloração<sup>[37]</sup>. No presente estudo, observou-se a redução do sequestro do radical livre DPPH conforme o aumento da concentração dos extratos aquosos de *C. speciosa* (**FIGURA 2**).

**FIGURA 2:** Atividade antioxidante expressa pela frequência relativa do sequestro de radicais livres (%SRL) nas diferentes concentrações (mg/mL) avaliadas.





O processo de extração por infusão é bastante comum para fins medicinais e permite a extração de compostos fenólicos com reconhecida atividade antioxidante<sup>[38]</sup>, portanto, o potencial antioxidante da amostra apresenta relação com a presença dos flavonoides identificados na prospecção fitoquímica. A atividade antioxidante da *C. speciosa* também foi detectada em extratos aquosos obtidos das cascas<sup>[39]</sup>, observando-se<sup>[40]</sup> o efeito antioxidante de extratos de saponinas obtidos as folhas de *Abutilon indica*, planta da família Malvaceae.

Não foi possível observar alguma atividade antibacteriana dos extratos aquosos das flores de *C. speciosa*, porém, as soluções hidrometanólicas apresentaram resultados positivos para algumas concentrações, conforme se demonstra na **TABELA 2**.

**TABELA 2:** Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento (mm), obtidos a partir de diferentes concentrações (mg/mL) dos extratos hidrometanólicos das flores de *Ceiba speciosa* frente às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella* spp.

Concentrações (mg/mL)	CN	1,56	3,125	6,125	12,5	25	50	100	CP
<i>E. coli</i> (ATCC 1809)	-	-	-	-	7,6±0,57*	9±0*	10±0	13±0	32,6±0,57
<i>S. aureus</i> (ATCC 2494)	-	-	-	-	-	9,6±0,57*	11±0	13±0	26±0
<i>Shigella</i> spp	-	-	-	-	8±0*	10,3±0,19*	12,3±0,5	15±0,57	25,3±0,57

Os dados são apresentados com o valor médio ± o desvio padrão. \*Diferença significativa  $p < 0,05$  em relação ao CP (ANOVA *One-Way*, Teste de Dunnet). \*\*CN = controle negativo, CP= controle positivo, (-) não houve formação de halo de inibição. Atividade inibitória positiva para o halo > 6 mm.

As soluções hidrometanólicas apresentaram halos superiores a 7 mm nas quatro maiores concentrações, para as cepas de *E. coli* e *Shigella* spp., sendo que, para o *S. aureus* o mesmo ocorreu a partir de 25 mg/mL. Os maiores halos obtidos foram para a concentração de 100 mg/mL (*E. coli* = 13±0, *S. aureus* = 13±0 e *Shigella* spp = 15±1) e, segundo a escala de Matsuura<sup>[41]</sup>, todos os halos observados classificam as

suas respectivas concentrações como de atividade moderada, com exceção para a de 100 mg/mL contra *Shigella* spp que apresentou elevada atividade antibacteriana.

A análise estatística aplicada sobre a variação das médias dos HI identificou uma distribuição significativa dos valores registrados ( $p=0,005$ ), já na comparação das médias não se observou diferença significativa entre os resultados das duas maiores concentrações e os dados obtidos para os CP.

Resultados anteriores indicaram a ausência da atividade antibacteriana de infusos obtidos das flores de *C. speciosa* e o desenvolvimento de halos de inibição com soluções hidrometanólicas oriundas dessa mesma parte vegetal da planta<sup>[42,43]</sup>. Em estudo<sup>[44]</sup>, achados semelhantes ao da presente pesquisa, foram evidenciado em extratos metanólicos e clorofórmicos obtidos das folhas de *C. speciosa*, demonstrando atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* e *Staphylococcus aureus*.

A presença de flavonoides nas soluções hidrometanólicas das flores de *C. speciosa* pode explicar os efeitos antibacterianos observados, uma vez que, em certa concentração, essa classe de metabólito secundário pode causar danos à membrana plasmática em decorrência da diminuição da fluidez e da perfuração da membrana, da inibição do metabolismo energético e da diminuição da síntese de ácidos nucleicos<sup>[45]</sup>. Além disso, devido à capacidade de agirem como detergentes, também consta na literatura científica o efeito antibacteriano dose dependente das saponinas contra *S. aureus* e *E. coli* <sup>[45,40]</sup>.

## Conclusão

Considerando que natureza do solvente empregado no processo de extração influencia diretamente no tipo e na quantidade do composto fitoquímico em solução, no presente estudo, as soluções aquosas preparadas por infusão, maneira popular mais comum de consumo, apresentaram flavonoides e saponinas. As mesmas se demonstraram atóxicas, com potencial antioxidante, todavia, a atividade antibacteriana foi identificada nas soluções hidrometanólicas.

Sugere-se a continuidade da investigação para explorar o potencial biológico das flores da *Ceiba speciosa* que pode constituir-se em uma alternativa acessível e sustentável como recurso terapêutico.

## Referências

1. WHO, World Health Organization. **The World Medicines Situation 2011 - Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges**. Geneva, n. 3, 2011. 14p. [\[Link\]](#).
2. Leonti M, Stafford MI, Cero MD, Cabras S, Castellanos ME, Casu L, Weckerle CS. Reverse Ethnopharmacology and Drug Discovery. **J Ethnop**. 2017. [\[CrossRef\]](#).
3. Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Rev Bras Plan Med**. 2013; 15(4):692-707. [\[CrossRef\]](#).

4. Macedo AF, Oshiiwa M, Guarido CF. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 2007; 28(1): 123-128. [\[Link\]](#).
5. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2002. 4ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 833p.
6. Veiga-Junior VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev Bras Farmacog.** 2008; 18(2):308-313. [\[CrossRef\]](#).
7. Gibbs P, Semir J. A taxonomic revision of the genus *Ceiba* Mill. (Bombacaceae). **Anales Jardin Bot Madrid.** 2003; 60(2):259-300. [\[Link\]](#).
8. Ladeji O, Omekarah I, Solomon M. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnop.** 2003; 84:139-42. [\[CrossRef\]](#)[\[PubMed\]](#).
9. Said WM, Ehsan NOM, Khalifa NS. Comparative study of three species of Malvaceae (Bombacoideae) and Malvoideae (Malvaceae sensu lato) using Morphological, Anatomical and RAPD-PCR analyses. **Adv Environ Biol.** 2016; 7(2):415-26. [\[Link\]](#).
10. Malheiros CKC. **Avaliação preliminar *in vitro* do potencial antioxidante e da toxicidade de *Ceiba speciosa* (a. st.-hill) Ravenna (paineira)**. 2014. 52p. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pampa/Campus Uruguaiana, Uruguaiana. [\[Link\]](#).
11. Fidalgo O, Bononi VLR. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. Instituto de Botânica, São Paulo, 1989. 61p.
12. Melo EC, Radünz LL, Melo RCA. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas Medicinais – Revisão. **Engenharia na Agricultura**. Viçosa. 2004; 12(4):307-15. [\[Link\]](#).
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria da SVS n.º 519** de 26 de junho de 1998. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de chás-plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 jun 1998.
14. WHO - World Health Organization. Marini-Betollo, G.B. **Preliminary chemical screening of medicinal plants in field conditions**. Roma: DPM, 1980.
15. Girre PL. **Travaux Pratiques de Pharmacognosie**. Toulouse: Université de Toulouse, 1982. 111p.
16. Paech K, Tracey MV. **Modern methods of plant analysis**. 1955; v.3, Berlin: Springer-Verlag. [\[Link\]](#).
17. Rizk AM. Constituents of Plants Growing in Qatar I.A. Chemical Survey of Sixty Plants. **Fitot.** 1982; 52(35). [\[Link\]](#).
18. Shinoda, J. A new biologically active flavone glycoside from the roots of *Cassia fistula* Linn. **J Pharm Soc Japan.** 1928; 48:214-20.

19. Farnsworth NR. Biological and Phytochemical Screening of Plants. **J Pharm Sci.** 1966; 55(3):225-276. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
20. Radi PA, Terrones MGH. Metabólitos secundários de plantas medicinais. **Rev Bras Farm.** 2007; 20(2):18-22.
21. Meyer BM, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **J Med Plant Res.** 1982; 45(1):31-34. [[PubMed](#)][[CrossRef](#)].
22. Carvalho CA, Matta SLP, Melo FCSA, Andrade DCF, Carvalho LM, Nascimento PC, et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Rev Elet Farm.** 2009; 6(1):51-8. [[Link](#)].
23. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico.** 2007; Embrapa, Ceará. 4p. [[Link](#)].
24. Mendonça DE, Onofre SB. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Rev Bras Farmacog.** 2009; 19(2):577-81. [[CrossRef](#)].
25. De-Bona EAM, Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq Inst Biol.** 2014; 81(3):218-25. [[CrossRef](#)].
26. Braquehais ID, Vasconcelos FR, Ribeiro ARC, Silva ARA, Franca MGA, Lima DR, et al. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Rev Bras Plan Medic.** 2016; 18(2):582-87. [[CrossRef](#)].
27. Lima FO, Bezerra AS. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia-Série: Ciências Naturais e Tecnológicas.** Santa Maria. 2012; 13(1):111-124. [[Link](#)].
28. Ani RR, Haleem AM. Phytochemical analysis of some Iraqi medicinal plants. **World J Pharm Sci.** 2014; 2(12):1837-40. [[Link](#)].
29. Refaat J, Desoukey SY, Ramadan AM, Kamel MS, Han J, Isoda H. Comparative polyphenol contents, free radical scavenging properties and effects on adipogenesis of *Chorisia Chodatii* and *Chorisia Speciosa*. **J Herb Drug.** 2015; 5(4):193-207. [[Link](#)].
30. Paula VF, Barbosa LCA, Demuner AJ. A química da família Bombaceae. **Quim Nova.** 1997; 20(6):627-30. [[CrossRef](#)].
31. Vizzotto M, Krolow ACR, Weber GEB. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância.** Embrapa: Clima Temperado Pelotas, 2010. 16p. [[Link](#)].

32. Lacaille-Dubois MA, Wagner H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytom**. 1996; 21(4):363-86. [[PubMed](#)][[CrossRef](#)].
33. Leal RS, Maciel MAM, Dantas TNC, Melo MD, Pissinate K, Echevarria A. Perfil Etnobotânico e Atividade Antioxidante de *Cleome spinosa* (Brassicaceae) e *Pavonia varians* (Malvaceae). **Rev Fitos**. 2007; 3(3):25-31. [[Link](#)].
34. Silveira JC. **Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril***. 2010. 99p. Dissertação de Mestrado (Área de Concentração em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. [[Link](#)].
35. Barcelos IB, Bulian AL, Calazans RSPC, Degen NA, Alves LO, Sobral FOS, et al. Análise fitoquímica e das atividades citotóxica, antioxidante, e antibacteriana das flores de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson. **Rev Fitos**. 2017; 11(1):9-23. [[CrossRef](#)].
36. Massud-Filho, J [Org]. **Medicina farmacêutica: conceitos e aplicações**. 1ª ed. 2016. Porto Alegre: Artmed. ISBN: 9788582713167. [[Link](#)].
37. Cheng Z, Moore J, Yu L. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. **J Agric Food Chem**. 2006; 54(20):7429-36. [[CrossRef](#)].
38. Schneider ALS, Bertelli PR, Barreto ML, Abreu NV, Agostini F, Schwambach J. Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de *Brunfelsia cuneifolia* J.A. Schmidt (Solanaceae). **Rev Bras Plan Med**. 2015; 17(4 Supl.3):1103-11. [[CrossRef](#)].
39. Abdul-Hafeez EY, Karamova NS, Ilinskaya ON. Antioxidant activity and total phenolic compound content of certain medicinal plants. **Intern J Biosc**. 2014; 5(9):213-22. [[CrossRef](#)].
40. Ravi L, Manasvi V, Praveena Lakshmi B. Antibacterial and antioxidant activity of saponin from abutilon indicum leaves. **Asian J Pharm Clin Res**. 2016; 9(Sup.3). [[CrossRef](#)].
41. Matsuura T, Oliveira VM, Manfio GP. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 2004. 55p. Tese de Doutorado (Engenharia de alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. [[Link](#)].
42. Barcelos IB, Calazans RSP, Buliam ALS, Braga PMS, Salvi JO, Sobral FOS. Avaliação do potencial antimicrobiano das flores de *Ceiba speciosa*, *Platonia insignis* e *Tabebuia serratifolia* sobre *Escherichia coli*. In: III Simpósio Interdisciplinar de Pós-Graduação de Rondônia, 2016, Porto Velho. **J Amazon Health Scien**. 2016. 2: 49. [[Link](#)].
43. Braga PMS, Barcelos IB, Buliam ALS, Calazans RSP, Novais VP, Valiatti TB, et al. **Atividade antibacteriana das flores de *Ceiba speciosa* (St. Hill, Ravenna) frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella spp.*** In: XII Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa e V Simpósio de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Público de Saúde, 2017, Gramado. Resumos; Congresso Internacional de Fitoterapia. Brasília: INFARMA, 2017. 29: S175-S175. [

44. Khan A, Asadsaeed M, Chaudhary MA, Ahmad Q, Ansari F. Antimicrobial, anti-inflammatory and antipyretic activity of *Chorisia speciosa* leaves (bombacaceae). *Inter J Biol, Pharm Allied Scien*. 2015; 4(12):6826-38. [\[Link\]](#).
45. Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Inter J Antim Ag*. 2011; 38(2):99-107. [\[PubMed\]](#)[\[CrossRef\]](#).

---

**Histórico do artigo** | Submissão: 05/06/2018 | Aceite: 21/02/2019 | Publicação: 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Braga PMS, Barcelos IB, Calazans RSP, Bulian ALS, Gabler JCR, Sobral FOS, SJO. Análise fitoquímica, toxicidade, potencial antioxidante e atividade antibacteriana da *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil.) Ravenna. *Revista Fitos*. Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 9-21. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/641>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.



# Anthocyanins in inflorescences of *Tarenaya rosea* (Vahl ex DC.) Soares Neto & Roalson (Cleomaceae)

DOI 10.17648/2446-4775.2019.712

Gurgel, Claudia Simões<sup>1\*</sup>; Bizarri, Carlos Henrique Brasil<sup>1</sup>; Cordeiro, Livia da Silva<sup>1</sup>; Castro, Tatiana Carvalho<sup>1</sup>; Albarello, Norma<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV), Departamento de Biologia Vegetal (DBV), Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan). Rua São Francisco Xavier 524, PHLC sala 509, CEP: 20550-013, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*Correspondência: [csimoes04@yahoo.com.br](mailto:csimoes04@yahoo.com.br).

## Abstract

Anthocyanins are plant pigments of economic interest, due to their use as natural colorants, as well as their pharmacological application. Analysis of inflorescences of *Tarenaya rosea* (Vahl ex DC.) Soares Neto & Roalson by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-DAD/ESIMS) revealed the presence of acylated cyanidins and a peonidin. Ten anthocyanins acylated with *p*-coumaric, caffeic, ferulic, sinapic or *p*-hydroxybenzoic acid were detected. The major peak was identified as cyanidin 3-(*p*-coumaroyl)(*p*-coumaroyl) diglucoside-5-glucoside. Two anthocyanins, (cyanidin 3-(*p*-hydroxybenzoyl) diglucoside-5-glucoside and cyanidin 3-(glycopyranosyl-caffeoyl) diglucoside-5-glucoside), were detected only in the inflorescences when compare to other analyses previously performed with the species. The study of the anthocyanin content in plant species is an important step in the development of strategies for the commercial exploitation of these pigments. The results obtained in the present work showed the diversity of anthocyanins in the inflorescences of *T. rosea*.

**Keywords:** acylated anthocyanins. *Tarenaya rosea*. Cyaniding. Medicinal plant. Peonidin. Restingas.

## Introduction

*Tarenaya rosea* (Vahl ex DC.) Soares Neto & Roalson is a Brazilian herbaceous annual species known as “mussambê cor-de-rosa”, frequently found in coastal sandy plains (*restingas*), ecosystems intensely affected by human impact<sup>[1]</sup>. This species was formerly named *Cleome rosea* ex DC. (2). Several protocols of plant cell tissue culture have already been established with *T. rosea*<sup>[2-8]</sup> and its medicinal potential has been evaluated from *in vivo* and *in vitro* materials, with promising results<sup>[9-11]</sup>. In addition, due to its attractive pink inflorescences the species is employed as ornamental (**FIGURE 1A**). The pink coloration is provided by anthocyanins, water-soluble plant flavonoids responsible for scarlet to blue colors in flowers, fruits, leaves and storage organs. Some of these pigments are used to color food as substitutes for synthetic red dyes<sup>[12]</sup> and great attention has been focused on their multifaceted pharmacological potential<sup>[13,14]</sup>. The diversity of anthocyanins in extracts obtained from stems of field-grown plants and callus cultures of *T. rosea* has already been identified in a previous work<sup>[5]</sup>. The increasing commercial and pharmacological interest in

plant pigments is currently leading to several studies related to their isolation and identification in different plant species. In continuation to our study of investigating anthocyanins presented in *T. rosea*, this work was undertaken to characterize the anthocyanins in inflorescences by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-DAD/ESIMS).

## Material and Methods

### Plant material and extract preparation

Inflorescences of *T. rosea* were collected from natural populations in an area of restinga vegetation located at Maricá, RJ, Brazil (22°58'01" S and 42°58'36" W) according to the Brazilian legislation on access to the biodiversity (SISBIO 17889-1 and CGEN 207/2014). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil (HRJ7185). The plant material was macerated for 24 h at 4 °C with methanol acidified with 1% (v/v) HCl (MeOH-HCl) and the extractive solution were prepared at the final ratio of 1 g of fresh weight/2 cm<sup>3</sup> of solvent.

### HPLC-DAD/ESIMS analysis

Anthocyanin analysis was performed with a Shimadzu HPLC system (MassLynx software, LC-10Advp binary gradient pump, SIL-10Advp autosampler, SPD-M10Avp diode-array detector and SCL-10Avp system controller). Samples were analyzed under a gradient using a Supelco C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) with injection volume of 20 µL. The flow rate was 1 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> and detection was performed at 525 nm. Mobile phase A was 7.5% formic acid in acetonitrile (v/v) and mobile phase B was 7.5 % formic acid in water (v/v). The gradient used was as follows: 3% A for 1 min, 3-15 % A for 11 min, 15-25 % A for 12 min, 25-30 % A for 4 min, and 30 % A for 7 min before returning to the initial conditions. The diode-array detector was set to an acquisition range of 200-600 nm at a spectral acquisition rate of 1.56 scans s<sup>-1</sup> (peak width 0.2 min) and it was coupled to a Waters ZQ single quadrupole mass spectrometer. Mass spectra were achieved by electrospray ionization in positive mode scanning from *m/z* 100 to *m/z* 1500. The capillary temperature and voltage used were 100 °C and 3 kV, respectively. In order to obtain a better spectra profile, three voltages were applied to the cone (30V, 50V and 70V). Nitrogen was used as sheath gas at a flow rate of 400 dm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> at 250 °C.

## Results and Discussion

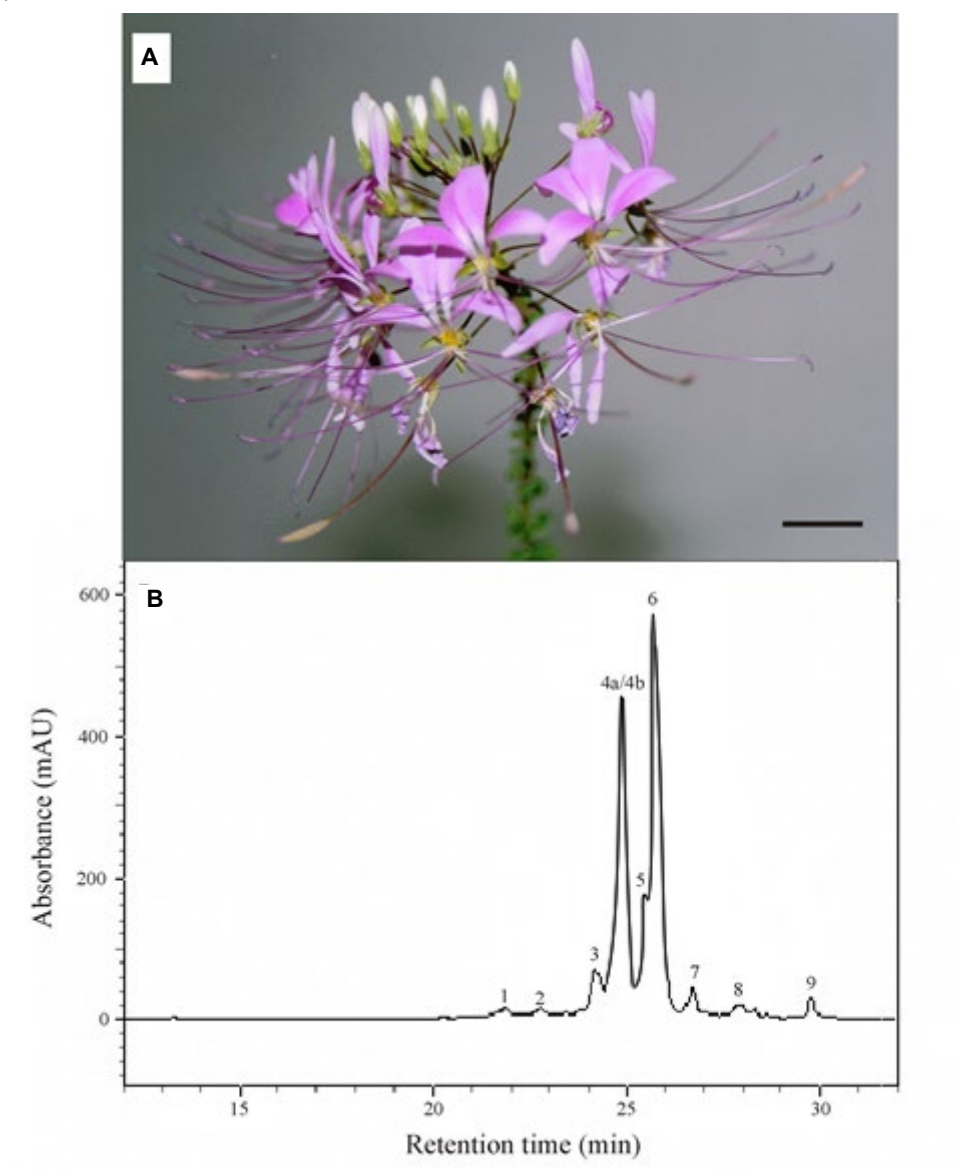
Ten anthocyanins were found in the inflorescences of *T. rosea* and fragment ions at *m/z* 287 and *m/z* 301 allowed the identification of the aglycones cyanidin and peonidin, respectively. The anthocyanins are acylated with *p*-coumaric, caffeic, ferulic, sinapic or *p*-hydroxybenzoic acids, with prevalence of *p*-coumaroyl derivatives, that constitutes the most common acylation type among known anthocyanins<sup>[15]</sup>. Acylated anthocyanins were also identified in extracts obtained from stems of field-grown plants as well as from callus cultures of *T. rosea*<sup>[6]</sup>. Analysis of inflorescences of another *Cleomaceae* species, *C. hassleriana*, revealed the presence of acylated cyanidins and pelargonidins<sup>[16]</sup>. Moreover, studies with species from the related family Brassicaceae reported the occurrence of polyacylated anthocyanins with prevalence of the same aromatic acids found in *T. rosea*<sup>[17-19]</sup>. Acylated anthocyanins have commercial importance since they are more stable in neutral aqueous solutions and thus more suitable for use as food and beverage colorants<sup>[20]</sup>.



The presence of peonidins was not observed in previous studies with extracts obtained from stems of field-grown plants of *T. rosea*, but two peonidins were identified on callus cultures that were initiated with stem explants [5]. The bioconversion of cyanidin to peonidin by methylation of the B-ring of the aglycon influenced by the type and concentration of growth regulators used to establish the *in vitro* culture is suggested and it was also reported in strawberry cell cultures [21].

The major peak in the chromatogram from the inflorescences was observed at the retention time of 25.90 min (FIGURE 1B) and has been identified as cyanidin 3-(*p*-coumaroyl)(*p*-coumaroyl) diglucoside-5-glucoside (TABLE 1) based on the fragment ions displayed at *m/z* 1065; 903; 449; 287. Although this anthocyanin has also been identified in stem extracts, its presence was detected in small percentage of the total anthocyanins [5].

**FIGURE 1:** Inflorescences features of *Tarenaya rosea*. Morphological aspect (a) and HPLC anthocyanin profile at 525 nm (b). The peaks numbers refer to Table 1. Bar = 1.0 cm.



**TABLE 1:** Characterization of anthocyanins from inflorescences of *Tarenaya rosea* using HPLC-DAD/ESIMS.

Peak	t <sub>R</sub> (min)	[M] <sup>+</sup> (m/z)	Fragment ions m/z)	Proposed identity
1	21.79	979	817/449/287	cyanidin 3-(sinapoyl)diglucoside-5-glucoside
2	22.90	1081	919/449/287	cyanidin 3-(caffeoyl)( <i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-glucoside
3*	24.27	1125	963/449/287	cyanidin 3-(feruloyl)(feruloyl)diglucoside-5-glucoside
4a*	24.87	1125	963/449/287	cyanidin 3-(feruloyl)(feruloyl)diglucoside-5-glucoside
4b	24.87	1095	933/449/287	cyanidin 3-( <i>p</i> -coumaroyl)(feruloyl)diglucoside-5-glucoside
5**	25.63	1065	903/449/287	cyanidin 3-( <i>p</i> -coumaroyl)( <i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-glucoside
6**	25.90	1065	903/449/287	cyanidin 3-( <i>p</i> -coumaroyl)( <i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-glucoside
7	26.64	989	827/449/287	cyanidin 3-( <i>p</i> -hydroxybenzoyl)diglucoside-5-glucoside
8	28.05	1079	917/463/301	peonidin 3-( <i>p</i> -coumaroyl)( <i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-glucoside
9	29.76	1003	841/449/287	cyaniding 3-(glycopyranosyl-caffeoyl)diglucoside-5-glucoside

\*Isomers of cyanidin 3-(feruloyl)(feruloyl)diglucoside-5-glucoside; \*\*Isomers of cyanidin 3-(*p*-coumaroyl)(*p*-coumaroyl)diglucoside-5-glucoside.

Two anthocyanins coelute at 24.87 min, one of them showed fragment ions at *m/z* 1095; 933; 449; 287 and was identified as cyanidin 3-(*p*-coumaroyl)(feruloyl) diglucoside-5-glucoside. The other anthocyanin showed fragment ions at *m/z* 1125; 963; 449; 287 and was identified as cyanidin 3-(feruloyl)(feruloyl) diglucoside-5-glucoside. The structure of the latter compound is similar to a cyanidin previously detected in stem extracts of *T. rosea*<sup>[5]</sup>. In addition, similarly to previous findings in extracts from stem and callus cultures, some isomeric anthocyanins (sugar moiety can present different hexoses with the same molecular weight, such as galactose and glucose) were observed in inflorescences of *T. rosea* (peaks 3 - 4a and peaks 5 - 6). In such cases, the compounds were identified by their retention times.

Considering the anthocyanins reported in inflorescences of *T. rosea*, six of them were detected in extracts obtained from stems and five of these anthocyanins were also observed in callus cultures of *T. rosea*. Despite the similarities among the pigments identified in these materials, two anthocyanins were found only in inflorescences. The MS fragmentation pattern of these compounds showed fragment ions at *m/z* 989, 827, 449; 287 and at *m/z* 1003, 841, 449; 287. They were identified as cyanidin 3-(*p*-hydroxybenzoyl) diglucoside-5-glucoside and cyanidin 3-(glycopyranosyl-caffeoyl) diglucoside-5-glucoside, respectively.

The variety in anthocyanin production from different organs of *T. rosea* is a desirable characteristic, since small differences in chemical structure can have critical impacts on color and tinctorial strength<sup>[22]</sup> as well as in their biological activities<sup>[23]</sup>. In addition, a great number of biotechnological strategies have been applied to *in vitro* production of anthocyanins<sup>[24]</sup> considering the increased interest in the scale-up production of these pigments to pharmaceutical, food, cosmetic, and chemical industries.

## Conclusion

The results achieved in the present work provide additional information on anthocyanin content in *T. rosea*. These data contribute to demonstrate the diversity of these pigments in the species and it will be very important for further commercial exploitation.

## Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## References

1. Soares Neto RL, Thomas WW, Barbosa MRV, Roalson EH. New combinations and taxonomic notes for *Tarenaya* (Cleomaceae). **Acta Bot Bras.** 2018; 32(4):540-545. ISSN: 1677-941X. [[CrossRef](#)].
2. Zamith LR, Scarano FR. Restoration of a restinga sandy coastal plain in Brazil: Survival and growth of planted woody species. **Restoration Ecol.** 2006; 14(1):87-94. ISSN: 1526-100X. [[CrossRef](#)].
3. Simões C, Santos AS, Albarello N, Figueiredo SFL. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from stem explants of *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). **J Plant Biotechnol.** 2004; 6:199-204. ISSN: 1229-2818. [[Link](#)].
4. Simões C, Albarello N, Callado CH, Castro TC, Mansur E. New approaches for shoot production and *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell Tiss Org Cult.** 2009; 98(1):79-86. ISSN: 0167-6857. [[CrossRef](#)].
5. Simões C, Bizarri CHB, Cordeiro LS, Castro TC, Coutada LCM, Silva AJR, et al. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiol Biochem.** 2009; 47(10): 895-903. ISSN: 0981-9428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
6. Simões-Gurgel C, Cordeiro LS, Castro TC, Callado CH, Albarello N, Mansur E. Establishment of anthocyanin-producing cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). **Plant Cell Tiss Org Cult.** 2011; 106:537-545. ISSN: 0167-6857. [[CrossRef](#)].
7. Cordeiro LS, Simões-Gurgel C, Albarello N. Multiplication and cryopreservation of adventitious roots of *Cleome rosea* Vahl. **In Vitro Cell Dev Biol Plant.** 2015; 51(3):249 - 257. ISSN: 1054-5476. [[CrossRef](#)].
8. Cordeiro LS, Simões-Gurgel C, Albarello N, Engelmann F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. **In Vitro Cell Dev Biol Plant** 2015; 51(6): 688 - 695. ISSN: 1054-5476. [[CrossRef](#)].
9. Simões C, Mattos JCP, Sabino KCC, Caldeira-de-Araújo A, Coelho MGP, Albarello N, et al. Medicinal potential from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). **Fitoterapia.** 2006; 77(2): 94-99. ISSN: 0367-326X. [[CrossRef](#)].

10. Simões C, Castro TC, Cordeiro LS, Albarello N, Mansur E, Romanos MTV. Antiviral activity of *Cleome rosea* extracts from field-grown plants and tissue culture-derived materials against acyclovir-resistant Herpes simplex viruses type 1 (ACVr-HSV-1) and type 2 (ACVr-HSV-2). **World J Microbiol Biotechnol.** 2010; 26(2): 93-99. ISSN: 0959-3993. [[CrossRef](#)].
11. Simões-Gurgel C, Rocha AS, Cordeiro LS, Gayer CRM, Castro TC, Coelho MGP, et al. Antibacterial activity of field-grown plants, *in vitro* propagated plants, callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl. **J Pharm Res.** 2012; 5(1):3304-3308. ISSN: 0974-6943.
12. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernandez ML, Paez-Hernandez ME, Rodriguez JA, Galan-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chem.** 2009; 113(4): 859–871. ISSN: 0308-8146. [[CrossRef](#)].
13. Lila MA. Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach. **J Biomed Biotechnol.** 2004; 2004(5): 306-313. ISSN: 1110-7243. [[CrossRef](#)].
14. Miguel MG. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. **J Appl Pharm Sci** 2011; 01(06): 07-15. ISSN: 2231-3354. [[Link](#)]
15. Haslam E. Practical polyphenolics. **From structure to molecular recognition and physiological action.** Cambridge University Press, Cambridge, 1998. ISBN: 0521465133.
16. Nozzolillo C, Amiguet VT, Bily AC, Harris CS, Saleem A, Andersen ØM, et al. Novel aspects of the flowers and floral pigmentation of two *Cleome* species (Cleomaceae), *C. hassleriana* and *C. serrulata*. **Biochem Syst Ecol.** 2009; 38: 361-369. ISSN: 0305-1978. [[CrossRef](#)]
17. Honda T, Tatsuzawa F, Kobayashi N, Kasai H, Nagumo S, Shigihara A, et al. Acylated anthocyanins from the violet-blue flowers of *Orychophragmus violaceus*. **Phytochemistry.** 2005; 66: 1844-1851. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tatsuzawa F, Saito N, Shinoda K, Shigihara A, Honda T. Acylated cyanidin 3-sambubioside-5-glucosides in three garden plants of the Cruciferae. **Phytochemistry.** 2006; 67: 1287-1295. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Saito K, Tatsuzawa F, Suenaga E, Toki K, Shinoda K, Shigihara A, et al. Tetra-acylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside from the flowers of *Iberis umbellata* L. (Cruciferae). **Phytochemistry.** 2008; 69: 3139-3150. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)]
20. Saito K, Mizukami H. Plant cell cultures as producers of secondary metabolites. In: Oksman-Caldentey K-M & Barz WH (ed.). **Plant Biotechnology and Transgenic Plants**, Marcel Dekker Inc, New York, 2002, p. 93-125. ISBN: 9780824707941.
21. Nakamura M, Seki M, Furusaki S. Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture. **Enzyme Microb Tech.** 1998; 22: 404-408. ISSN: 0141-0229. [[CrossRef](#)]

22. Giusti MM, Rodríguez-Saona LE, Wrolstad RE. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. **J Agricult Food Chem.** 1999; 47: 4631-4637. ISSN: 0021-8561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hou D-X, Kai K, Li J-J, Lin S, Terahara N, Wakamatsu M, et al. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure activity relationship and molecular mechanisms. **Carcinogenesis.** 2004; 25: 29-36. ISSN: 1460-2180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Simões C, Albarello N, Castro TC, Mansur E. Production of anthocyanins by plant cell and tissue culture strategies. In.: Orhan I. E. (Org.) **Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites.** Benthan E-books, 2012; p. 67-86. ISBN: 978-1-60805-410-7 [[CrossRef](#)]

---

**Histórico do artigo | Submissão:** 07/01/2019 | **Aceite:** 14/03/2019 | **Publicação:** 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Gurgel CS, Bizarri CHB, Cordeiro LS, Castro TC, Albarello N. Anthocyanins in inflorescences of *Tarenaya rosea* (Vahl ex DC.) Soares Neto & Roalson (Cleomaceae). **Revista Fitos.** Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 22-28. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/712>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.



# Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lechleri*)

Toxic, cytotoxic and mutagenic/genotoxic evaluation of a commercial dragon's blood extract (*Croton lechleri*)

DOI 10.17648/2446-4775.2019.605

Almeida, Fernanda Karen Virgolino de<sup>1</sup>; Novais, Valéria Pinheiro de<sup>1</sup>; Salvi, Jeferson de Oliveira<sup>1</sup>; Marson, Renan Fava<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná - CEULJI/ULBRA, Av. Engenheiro Manoel Barata Almeida da Fonseca, nº 572 a 573, Jardim Aurélio Bernardi, CEP: 76907-438, Ji-Paraná, RO, Brasil.

<sup>2</sup>Instituição de Ensino Superior de Cacoal – FANORTE, Rua Anísio Serrão, 2325 – Centro, CEP: 76963-728, Cacoal, RO, Brasil.

\*Correspondência: [renanfmarson@gmail.com](mailto:renanfmarson@gmail.com)

## Resumo

Na região amazônica é comum o uso de plantas para fins terapêuticos. Entre as espécies utilizadas, a *Croton lechleri* vem ganhando destaque pela sua extensa aplicabilidade, sendo utilizada principalmente como cicatrizante de feridas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico, citotóxico e mutagênico/genotóxico de um extrato comercial de *Croton lechleri*. O teste do *Allium cepa* foi realizado a partir de diluições de 0,5 mL; 1,0 mL; 2,0 mL e 2,5 mL do extrato em 250 mL de água, utilizando como parâmetros o crescimento das raízes, índice mitótico e a presença de micronúcleos. Os resultados demonstraram uma inibição no crescimento das raízes de todas as concentrações e uma diminuição no índice mitótico, com ênfase na maior concentração, que apresentou um resultado estatístico altamente significativo. A ocorrência de micronúcleos foi significativa nas quatro doses. Dessa forma, conclui-se que o extrato comercial de *Croton lechleri* apresentou potencial tóxico, citotóxico e mutagênico/genotóxico evidenciando o perigo de sua utilização de forma indiscriminada.

**Palavras-chave:** *Croton lechleri*. *Allium cepa*. Micronúcleos. Índice mitótico.

## Abstract

In the Amazon region, the use of plants for therapeutic purposes is common. Among the species used, *Croton lechleri* has gained prominence due to its extensive applicability, being used mainly as wound healing. The objective of this study was to evaluate the toxic, cytotoxic and mutagenic/genotoxic potential of a commercial *Croton lechleri* extract. The *Allium cepa* test was performed by diluting 0.5 mL; 1.0 mL; 2.0 mL and 2.5 mL extract in 250 mL water, through, using as parameters root growth, mitotic index and the

presence of micronuclei. The results showed an inhibition in the growth of the roots of all the concentrations and a decrease in the mitotic index, with emphasis in the greater concentration that presented a highly significant statistical result. The occurrence of micronuclei was significant in the four doses. Thus, it was concluded that the commercial *Croton lechleri* extract presented toxic, cytotoxic and mutagenic/genotoxic potential evidencing the danger of its use indiscriminately.

**Keywords:** *Croton lechleri*. *Allium cepa*. Micronucleus. Mitotic index.

---

## Introdução

As plantas medicinais são utilizadas para tratamento e prevenção de enfermidades há séculos, prática ainda muito comum, principalmente, em países em desenvolvimento. Por serem de fonte natural, as pessoas acreditam que tais plantas são incapazes de trazer malefícios à saúde<sup>(1)</sup>. Dados de 2009 apontavam que 99% das plantas medicinais brasileiras não possuem seus princípios farmacológicos e toxicológicos identificados<sup>(2)</sup>.

Na região amazônica, há um grande número de plantas utilizadas para fins terapêuticos. Pertencente à família Euphorbiaceae, a espécie *Croton lechleri* destaca-se por sua extensa aplicabilidade na saúde<sup>(3)</sup>. Essa espécie é popularmente conhecida como sangue de dragão, sangue de drago ou sangue de grado por produzir um látex vermelho viscoso<sup>(4)</sup>.

A *C. lechleri* geralmente tem de 5 a 6 metros, mas pode alcançar até 20 metros de altura e seu diâmetro pode variar entre 20 a 40 cm<sup>(5)</sup>; cresce em florestas e à margem de rios, não suportando um período longo de inundação<sup>(4)</sup>. No Brasil, a *C. lechleri* é encontrada de forma espontânea nos estados do Acre e Rondônia<sup>(5)</sup>, sendo, também, encontrada em outros países como Peru, Colômbia, Bolívia e Equador<sup>(6)</sup>.

O látex é utilizado como cicatrizante de feridas, antimicrobiano, antioxidante, antiviral, anticancerígeno, anti-inflamatório<sup>(7)</sup>, analgésico bucal, cicatrizante de úlceras gástricas e antidiarreico<sup>(8)</sup>. Porém, se consumido em excesso pode causar anemia<sup>(9)</sup>, prisão de ventre e, em casos extremos, cegueira<sup>(5)</sup>.

Um dos principais componentes da *C. lechleri* é a taspina, um alcaloide isolado do látex e da casca da planta, cujo princípio é um dos mais importantes para o processo de cicatrização de feridas, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes<sup>(4)</sup>. Há também a presença de outros alcaloides: piridina, aporfineindole, quinoleína, tropanos e antraquinonas<sup>(6)</sup>. Além desses componentes, há triterpenos, diterpenos Korberina A e Korberina B e compostos polifenólicos, que representam 90% do seu peso seco: 3',4'-O-dimetil-cedrusina (que possui ação contra os radicais livres), flavonoides (catequina, epicatequina, galocatequina, proantocianidinas B-1 e B-4), 1,3,5 trimetoxibenzeno e o 2,4,6 trimetóxi-fenol<sup>(10)</sup>.

Pesquisas que avaliam o potencial mutagênico das plantas medicinais são de extrema importância, servindo para informar a população sobre os riscos do uso indiscriminado de extratos biológicos que, ocasionalmente podem prejudicar a saúde humana<sup>(11)</sup>. Um dos testes utilizados para esta finalidade é o sistema teste *Allium cepa*, um bioensaio que está entre os testes preliminares recomendados por agências internacionais e instituições governamentais, para avaliar a toxicidade de novos produtos químicos e farmacêuticos<sup>(12)</sup>. A partir desse teste, é possível definir a toxicidade através do crescimento radicular, citotoxicidade pelo índice mitótico e a mutagenicidade/genotoxicidade pela presença de micronúcleos e aberrações cromossômicas<sup>(13,14)</sup>. O micronúcleo pode ser descrito como um pequeno núcleo que fica

separado do núcleo celular, formado por cromossomos ou até mesmo fragmentos cromossomais que não se prendem ao fuso mitótico, sendo, portanto, observados em células com a divisão celular completa<sup>(15,16)</sup>.

As principais características que fazem desse teste um dos mais eficientes é o baixo custo, sua fácil manipulação, sua disponibilidade durante o ano todo, o crescimento rápido das raízes e o grande número de células em divisão<sup>(17)</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial tóxico, citotóxico e mutagênico/genotóxico do extrato comercial de sangue de dragão em diferentes concentrações, usando como base as dosagens comumente utilizadas pela população.

## Material e métodos

### Aquisição da seiva de dragão e preparo da amostra

O produto comercial em estudo foi adquirido em uma loja de produtos naturais no município de Porto Velho, Rondônia, sendo posteriormente levado ao laboratório do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná CEULJI/ULBRA para as respectivas análises. O rótulo do produto denomina “seiva de sangue de dragão”, mas o produto não apresenta o aspecto resinoso característico da seiva bruta, indicando uma possível diluição em álcool etílico/água.

As concentrações utilizadas foram 0,5 mL (grupo A), 1,0 mL (grupo B), 2,0 mL (grupo C) e 2,5 mL (grupo D), todas diluídas em 250 mL de água destilada, tendo em vista que essas são as concentrações geralmente utilizadas pela população, para diversas finalidades, compreendendo assim 10, 20, 40 e 50 gotas respectivamente.

### Teste em raízes de *Allium cepa*

As unidades de *Allium cepa* (cebolas) utilizadas foram adquiridas em um supermercado do município de Ji-Paraná/RO, e como critério de inclusão cebolas de mesmo tamanho, saudáveis e ainda não germinadas. Foram utilizadas 10 cebolas para cada concentração, além do controle negativo (água destilada)<sup>(18)</sup>, totalizando 50 unidades.

As cebolas foram descascadas e submersas em água de torneira por um período de duas horas, para a retirada de possíveis impurezas tóxicas capazes de inibir o crescimento das raízes<sup>(19)</sup>. Em seguida, as cebolas foram então colocadas em potes coletores em contato com as concentrações durante 48 horas. Os meristemas foram coletados com o auxílio de um bisturi, e colocados em eppendorfs contendo solução de Carnoy (álcool e ácido acético na proporção 3:1) por 12 horas, sendo em seguida lavadas com água destilada, hidrolisadas com HCl 1N durante 10 minutos em banho-maria a 60°C e lavadas em água destilada<sup>(20)</sup>.

Foram preparadas duas lâminas por bulbo de cebola, utilizando uma raiz por lâmina, coradas com o Kit Panótico Rápido LB. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica, com objetiva de 100x e ocular de 10x, caracterizando um aumento de 1000x. Realizou-se a pesquisa das variáveis: formação de micronúcleos, onde se observou 1000 células por lâmina, totalizando 2000 células por cebola e o índice mitótico (IM), onde para cada tratamento dividiu-se o número de células em mitose (prófase, metáfase, anáfase, telófase) pelo número total (interfase e células em divisão) de células multiplicando por 100<sup>(21)</sup>. As



cebolas ainda foram mantidas em contato com as concentrações por mais 72 horas para posterior medição do tamanho das raízes<sup>(22)</sup>.

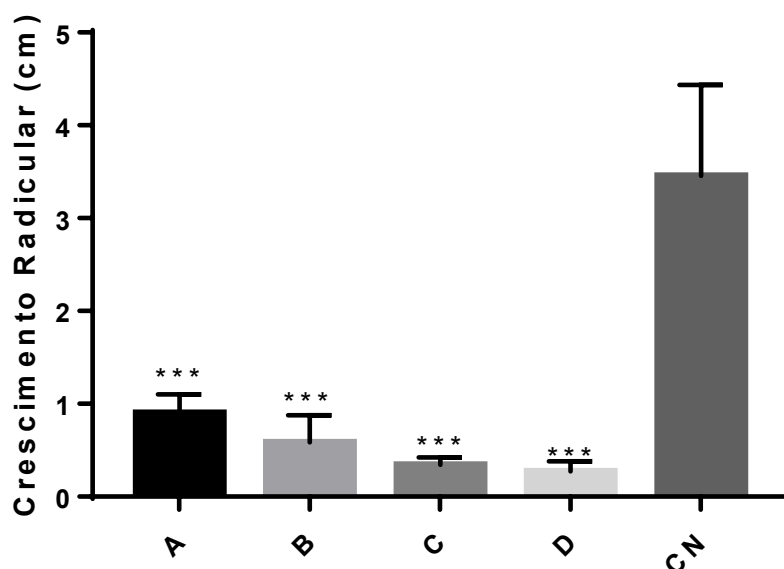
### Análise estatística

Os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) e Teste de *Tukey*. Os gráficos foram feitos utilizando-se o software *GraphPad Prism*® (Versão 7.0), considerando valores significativos  $p \leq 0,005$ .

## Resultados e Discussão

Os resultados apresentados para a média de crescimento radicular dos meristemas de *Allium cepa* demonstram que no grupo controle negativo (CN) a média foi de  $3,46 \pm 0,98$  cm, o grupo A revelou um crescimento de  $0,9 \pm 0,2$  cm, o grupo B  $0,59 \pm 0,29$  cm, o grupo C  $0,43 \pm 0,08$  cm e o grupo D  $0,27 \pm 0,11$  cm. Os resultados apresentados (**FIGURA 1**) demonstraram que todas as concentrações do extrato influenciaram no crescimento radicular do *Allium cepa*, sendo que, quanto maior a concentração menor o crescimento médio dessas raízes, e a análise estatística mostra que o crescimento radicular de todas as concentrações do extrato etílico apresentou diferença estatística significativa quando comparadas ao controle negativo.

**FIGURA 1:** Média do crescimento radicular de *Allium cepa* no controle e grupos tratados com extrato de Sangue de dragão. \*\*\*Valor altamente significativo ( $p < 0,0001$ ) quando comparado os tratamentos com o controle negativo.



A **TABELA 1** mostra o número de células em interfase e divisões mitóticas dos grupos de controle negativo e tratamentos. A fase que mais apresentou número de células foi a interfase seguido por prófase, anáfase, metáfase e telófase respectivamente. Em relação ao índice mitótico, todas as concentrações apresentaram uma média menor que o controle negativo. Entretanto, apenas a concentração 2,5 mL apresentou diferença significativa na análise estatística.

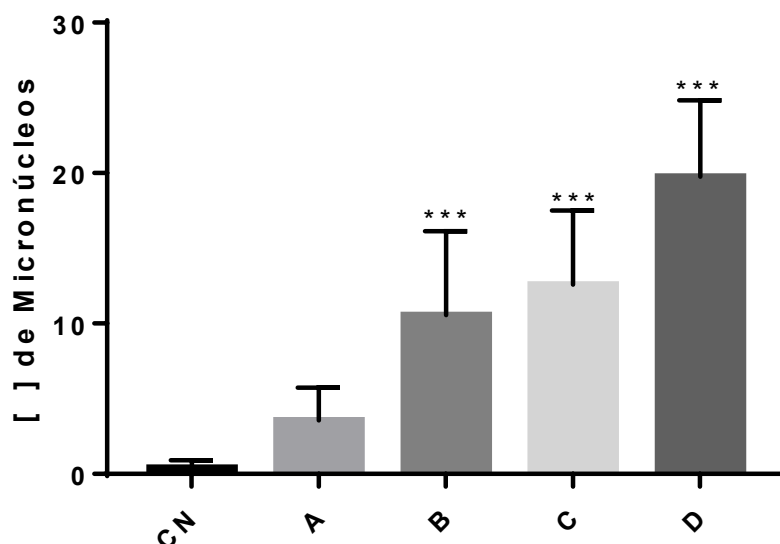
**TABELA 1:** Número de células em mitose, índice mitótico e desvio padrão conforme tratamento aplicado sobre o sistema e teste de *Allium cepa*.

Tratamento	Interfase	Fase Mitótica				- IM ±DP
		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
CN	19600	183	80	69	68	2,00±1,3
Grupo A	19753	105	45	62	35	1,24±0,4
Grupo B	19773	106	31	61	29	1,13±0,34
Grupo C	19805	94	36	31	34	0,97±0,44
Grupo D	19829	73	40	36	22	0,86±0,48*

CN=Controle Negativo. IM=Índice mitótico. DP= Desvio Padrão. \* Valor significativo (p<0,005).

Na **FIGURA 2** é possível observar a média do número de micronúcleos de cada concentração. No controle negativo houve uma média de 0,4 micronúcleos formados a cada 2000 células, estando dentro da normalidade. No tratamento contendo 0,5 mL foram observados 3,54 micronúcleos, não apresentando diferença significativa em relação ao controle negativo. Já os tratamentos contendo 1,0 mL, 2,0 mL e 2,5 mL do extrato apresentaram, respectivamente, 10,5, 12,6 e 20 micronúcleos, evidenciando uma alta significância estatística.

**FIGURA 2:** Média de micronúcleos formados a cada 2000 células analisadas em função do tratamento aplicado sobre o sistema de teste de *Allium cepa*. \*\*\*Valor altamente significativo (p<0,0001) quando comparado os tratamentos com o controle negativo.



O sangue de dragão já é utilizado há séculos como planta medicinal pelas comunidades indígenas da Amazônia, visto que nesta região há uma grande diversidade de plantas com propriedades medicinais<sup>(5)</sup>.

Para este estudo foi utilizado o sistema teste *Allium cepa* para avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos do extrato comercializado de sangue de dragão. Este sistema de teste é bem aceito para estudos de citotoxicidade/toxicidade, pois as raízes entram e permanecem em contato com a substância testada, o que permite a análise de diversas substâncias e concentrações simultâneas<sup>(23)</sup>.

A inibição do crescimento radicular de *Allium cepa* apresentou significância estatística em todas as concentrações utilizadas. O tamanho das raízes está geralmente associado ao IM, entretanto apenas o IM do grupo D apresentou significância no presente estudo. De acordo com alguns autores isso pode ocorrer devido a um atraso ou interrupção do ciclo celular, o que inibiria o crescimento da raiz, além de poder resultar em um aumento de células em fases específicas<sup>(24)</sup>. A toxicidade e citotoxicidade do *Croton lechleri* pode ser atribuída aos metabólitos terpenos, principalmente ao diterpeno, que está associado com a diminuição do cálcio, capaz de inibir a proteína quinase C (PKC), diminuindo assim a proliferação celular<sup>(25)</sup>. Resultados semelhantes de diminuição radicular e do IM no teste de *Allium cepa* foram observados em outro trabalho semelhante utilizando *Croton urucurana* (sangra d'água)<sup>(26)</sup>.

Como observado (**FIGURA 2**), o tratamento D teve uma média de formação de micronúcleos 50 vezes maior, quando comparado ao controle negativo, e ainda os testes estatísticos mostram uma diferença altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) na formação de micronúcleos em três das quatro concentrações testadas.

O potencial mutagênico do extrato etílico de *Croton lechleri* também foi observado<sup>(27)</sup>, e os resultados demonstraram que, na concentração de 1 mL de extrato, a formação de micronúcleos em células de *Allium cepa* é significativa. Evidenciaram-se<sup>(28)</sup> a mutagenicidade do látex por meio do teste *Salmonella*/microsoma, onde se detectaram mutações do tipo substituição de pares de base, reversões e frameshift. Atribuíram-se<sup>(25)</sup> a mutagenicidade do extrato aquoso de *Jatropha gossypifolia* (Pinhão-Roxo), planta pertencente à família Euphorbiaceae, a presença de flavonoides.

De acordo com esse trabalho, percebe-se a necessidade de uma preconização e cautela pelos consumidores de *C. lechleri*, visto que doses progressivas a partir de 1,5 mL ao dia, utilizadas para tratamento de tumores<sup>(29)</sup>, são consideradas, por esse teste, tóxicas e mutagênicas.

Devido a sua ampla utilização popular, os estudos sobre a mutagenicidade e toxicidade de *Croton lechleri* são necessários para garantir a segurança dos indivíduos que fazem uso desse extrato, tornando-se uma ferramenta indispensável para informar sobre seus possíveis efeitos em grandes doses ou em longo prazo<sup>(4)</sup>.

## Conclusão

Diante dos resultados apresentados, observou-se que todas as concentrações utilizadas do *Croton lechleri* inibiram o crescimento radicular das raízes de *Allium cepa*, evidenciando o seu potencial tóxico. Constatou-se, também, a diminuição do índice mitótico, principalmente na concentração de 2,5 mL, indicando a citotoxicidade. Além da toxicidade/citotoxicidade, observou-se o potencial mutagênico através do alto índice de micronúcleos, evidenciando-se que a “seiva de dragão” deve ser utilizada com cautela, sendo necessários mais estudos para garantir a segurança da população.

Considera-se, ainda, que mesmo com informações precárias no rótulo, o estudo de toxicidade é relevante, uma vez que, produtos como este são vendidos em feiras populares e websites sem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ou responsabilidade técnica.

## Referências

1. Veiga VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: Cura segura? **Quim Nova**. 2005; 28(3):519-528. ISSN: 1678-7064. [[CrossRef](#)].
2. Santos FS. **As plantas brasileiras, os jesuítas e os indígenas do Brasil: história e ciência na trianga brasileira (sec. XVII-XVIII)**. 1ª ed. São Paulo: Casa do Novo Autor Editora; 2009. ISBN: 978-85-7712-1182. [[Link](#)].
3. Salatino A, Salatino MLF, Negri G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J Braz Chem Soc**. 2007; 18(1):11-33. ISSN: 1678-4790. [[CrossRef](#)].
4. Lopes TV, Félix SR, Schons SV, Nobre MO. Dragon's blood (*Croton lechleri* Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. **Rev Bras Hig San Anim**. 2013; 7(2):167-191. ISSN: 1981-2965. [[CrossRef](#)].
5. Osakada A. **Desenvolvimento inicial de sangue-de-dragão (*Croton lechleri* Mull. Arg.) sob diferentes classes de solos, corretivos e níveis de luminosidade na Amazônia Central**. 2000. 75 f. Dissertação de Mestrado [Programa de pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais]. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. [[Link](#)].
6. Marino S, Gala F, Zollo F, Vitalini S, Fico G, Visioli F, et al. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. **Molecules**. 2008 Jun; 13(6):1219-1229. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)].
7. Rossi D, Bruni R, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, Lista A, et al. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. **Phytomedicine**. 2003 Mar; 10(2-3):139-144. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)].
8. Zevallos-Pollito PAZ, Tomazello MF. Espécies lenhosas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado do Acre. **Rev Bras Bioci**. 2007; 5(2):177-179. ISSN: 1981-4849. Disponível em: [[Link](#)].
9. Laszlo F. Sangue de dragão: **Sangue Cicatrizante da Floresta**. 2012. Laszlo Aromaterapia. [[Link](#)].
10. Cai Y, Evans FJ, Roberts FM, Phillipson JD, Zenk HM, Glebas YY. Polyphenolic compounds from *C. lechleri*. **Phytochemistry**. 1991; 30(6):2033-2040. [[CrossRef](#)].
11. Tedesco M, Kuhn AW, Boligon AA, Laughinghouse IVHD, Athayde ML, Silva ACF, et al. Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) osbeckon the *Allium cepa* L. test system. **Biosci J**. 2015; 31(4):1213- 1221. ISSN 1981-3163. [[CrossRef](#)].

12. Luz AC, Pretti, IR, Dutra JCV, Batitucci, MCP. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. **Rev Bras PI Med**. 2012; 14(4):635-642. ISSN: 1516-0572. [[CrossRef](#)].
13. Galucio NCR. **Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de *Eleutherine plicata* Herb**. 2014. 96 f. Dissertação de Mestrado [Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas]. Universidade Federal do Pará. Belém. [[Link](#)].
14. Figueiredo DR. **Avaliação da citotoxicidade do extrato hídrico da erva doce (*Pimpinella anisum* L.) através do teste em *Allium cepa* L**. 2014. 19 f. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Ciências Biológicas]. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande. 2014. [[Link](#)].
15. Carrard VC, Costa CH, Ferreira LA, Lauxen IS, Rados PV. Teste dos micronúcleos – um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal células descamadas da mucosa bucal células descamadas da mucosa bucal. **Rev Fac Odont**. Porto Alegre. 2007; 48(1-3):77-81. [[Link](#)].
16. Chequer, FD. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. 2008. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2008. [[CrossRef](#)].
17. Silva AEP, Moura JWM, Neto MPL. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica da *Turnera Ulmifolia* L. (Chanana) em células eucarióticas. **Rev S Foco**. 2015; 2(1):25-48. ISSN: 2358-7946. [[Link](#)].
18. Poletto PO, Diniz AP, Bernardon B, Zan RA, Ramos LJ, Meneguetti DUO. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (MART. EX BENTH. J. F. MACBR: FABACEAE), Timbó Amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Rev Pesq Criação**. 2011 Jan-Jun; 10(1):163-175. [[Link](#)].
19. Neto MPL. **Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas**. 2011. 130 f. Dissertação de Mestrado [Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas], Universidade Federal do Piauí. Teresina. [[Link](#)].
20. Meneguetti DUO, Silva FC, Zan RA, Poletto PO, Ramos LJ. 2012. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da Região do Vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental. **Rev Pesq Criação**. 2012. Jul-Dez; 10(2):181–187. [[Link](#)].
21. Pires NM, Souza IRP, Prates HT, Faria TCL, Filho IAP, Magalhães PC. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Rev Bras Fisio Veg**. 2001; 13(1):55–65. ISSN: 0103-3131. [[CrossRef](#)].
22. Guerra M, Souza M. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC; 2002.
23. Vicentini, VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Rev Maringá**. 2001; 23(2):593-598. [[Link](#)].

24. Silva DSBS, Garcia ACFS, Mata SS, Oliveira B, Estevam CS, Scher R. Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Rev Bras Farmacog.** 2011; Feb;21(1):92-97. ISSN: 0102-695X. [[CrossRef](#)].
25. Almeida PM. **Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.)**. 2014. Tese de Doutorado [Programa de pós-graduação em Genética]. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2014. [[Link](#)].
26. Mesquita DD, Ciappina AL, Almeida LM. Avaliação do potencial tóxico do látex de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae). In: III Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG; 2016; v.3. 19-21. Pirenópolis. Goiás: CEPE. ISSN: 2447-8687. [[Link](#)].
27. Fão F, Zan RA, Brondani FMM, Ramos LJ, Meneguetti DUO. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Mull. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. **Rev S Biol.** 2012; 7(1):91-98. [[Link](#)].
28. Lopes MI, Saffi J, Echeverrigaray S, Henriques JA, Salvador M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **J Ethnoph.** 2004; 95:437-445. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)].
29. Estrella E. **Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y Perspectivas Tratado de Cooperación Amazónica: Secretaría Pro Tempore**. Lima, 1995. [[Link](#)].

---

**Histórico do artigo** | **Submissão:** 28/01/2018 | **Aceite:** 20/05/2018 | **Publicação:** 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Almeida FKV, Novais VP, Salvi JO, Marson RF. Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lechleri*). **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 29-37. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/605>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.



# Extrato etanólico das folhas de *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzg (nabo forrageiro): efeitos anti-hiperglicêmico, antidislipidêmico e antioxidante em ratos com Diabetes Mellitus tipo 1

Ethanol extract from the leaves of *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzg (nabo forrageiro): effects antihyperglycemic, anti-dyslipidemic and antioxidant in type 1 diabetic rats

DOI 10.17648/2446-4775.2019.654

Silva, Amanda Basílio<sup>1</sup>; Lopes, Gabriela Dias Siqueira<sup>1</sup>; Neves, Thamiris Vilas Boas<sup>1</sup>; Barros, Gérsika Bitencourt Santos<sup>1</sup>; Reis, Luís Felipe Cunha dos<sup>2</sup>; Salles, Bruno Cesar Correia<sup>3</sup>; Cerdeira, Cláudio Daniel<sup>1,4</sup>; Moraes, Gabriel de Oliveira Isac<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Faculdade de Medicina, Rodovia 179, Km 0, s/n, Trevo, CEP: 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, CEP: 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Faculdade de Biomedicina, Rodovia 179, Km 0, CEP: 37132-440, Alfenas, MG, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) Departamento de Bioquímica (DBq), Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Prédio E, Sala 207 C, CEP: 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL, Instituto de Química, Laboratório de Ressonância Magnética, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, CEP: 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

\*Correspondência: [daniel.cerdeira.84@gmail.com](mailto:daniel.cerdeira.84@gmail.com)

## Resumo

Diabetes Mellitus (DM) ainda representa um sério problema de saúde pública, carente de novas alternativas terapêuticas. Plantas estão entre as possíveis fontes de novos compostos com ação anti-hiperglicêmica ou servindo como fitoterápicos. Neste estudo, avaliou-se o efeito anti-hiperglicêmico do extrato etanólico das folhas de *Raphanus sativus* (nabo forrageiro) administrado por gavagem (dose oral de 300 mg/kg/dia) em ratos Wistar com DM tipo 1 induzido por aloxana, durante 90 dias. A efetividade deste tratamento em prevenir danos oxidativos hepáticos (avaliação de oxidação proteica), e ação sobre outros biomarcadores das funções hepática, renal e do perfil lipídico também foram avaliados. Após três meses de tratamento, os ratos diabéticos tratados com *R. sativus* tiveram uma marcante diminuição na glicemia de jejum, comparados aos ratos diabéticos não tratados ( $p < 0,05$ ). Além disso, este tratamento preveniu tanto a oxidação proteica no fígado como o aumento dos níveis de triglicérides sérico ( $p < 0,05$ ). Portanto, demonstrou-se um marcante efeito anti-hiperglicêmico de *R. sativus* (a uma baixa dose) e as extensivas

ações em prevenir típicas complicações do DM, tais como os danos oxidativos e dislipidemia, demonstrando que esta planta apresenta um potencial terapêutico.

**Palavras-chave:** Danos oxidativos, Dislipidemia, Plantas.

## Abstract

Diabetes mellitus (DM) is still a serious public health problem, lacking new therapeutic alternatives. Plants are among the possible sources of new compounds with ant hyperglycemic activity or they serve as herbal medicines. In this study, we evaluated the ant hyperglycemic effect of the ethanolic extract from the leaves of *Raphanus sativus* ("nabo forrageiro"), administered by gavage (at an oral dose of 300 mg/kg/day for 90 days) to Wistar rats with alloxan-induced type 1 DM. The effectiveness of this treatment in preventing hepatic oxidative damage (evaluation of protein oxidation), as well as its action on biomarkers of hepatic and renal functions, and lipid profile, were also evaluated. Ninety days after treatments, *R. sativus*-treated diabetic rats had an outstanding decrease in fasting glycemia, compared to untreated diabetic rats ( $p < 0.05$ ). Moreover, this treatment prevented both protein oxidation in the liver and an increase in serum triglyceride levels ( $p < 0.05$ ). Therefore, we demonstrated a marked ant hyperglycemic effect of *R. sativus* (at a low dose) and its extensive actions in preventing typical DM complications, such as oxidative damage and dyslipidemia, demonstrating that this plant presents a therapeutic potential.

**Keywords:** Oxidative damage, Dyslipidemia, Plants.

---

## Introdução

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças endócrinas e metabólicas, marcadamente caracterizadas por alterações no metabolismo da glicose. Atualmente, o DM ainda permanece como um sério problema de saúde pública, sendo mundialmente associado a altas taxas de morbimortalidade. Entre as complicações relacionadas ao DM, a dislipidemia e as alterações que envolvem danos oxidativo renais e hepáticos são notórias, agravando as condições dos afetados e aumentando as taxas de mortalidade<sup>(1,2)</sup>.

Diante do exposto, além da instituição de hábitos de vida saudáveis para o paciente com DM, incluindo uma alimentação adequada e a prática regular de exercícios físicos, novas alternativas terapêuticas que possam controlar a glicemia e paralelamente prevenir as complicações associadas à doença são essenciais. Estas alternativas podem ser pesquisadas em fontes naturais, como as de origem vegetal, que são uma notória fonte de fitoterápicos e/ou de novos compostos na busca por terapias medicamentosas mais efetivas e seguras<sup>(2-4)</sup>.

Dentre estas fontes vegetais, *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzg (família Brassicaceae) é popularmente conhecida no Brasil como "nabo forrageiro", uma planta distribuída ao longo do Brasil e no mundo, com amplo uso na medicina popular e culinária. Diversas bioatividades são descritas para *R. sativus*, principalmente para suas folhas e raiz, incluindo as antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, além do extrato da folha apresentar ausência de toxicidade aguda em camundongos<sup>(5)</sup>. Portanto, este estudo avaliou a atividade anti-hiperglicêmica do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* e, a associada efetividade em prevenir danos oxidativos hepáticos, bem como a ação desta planta sobre outros biomarcadores das funções hepática, renal e do perfil lipídico.



## Material e métodos

### Aspectos éticos

Todos os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as recomendações do “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”<sup>(6)</sup>. Este estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética institucional sobre o uso de animais (Parecer Nº 28A/2015). Este estudo não envolve qualquer espécie ameaçada de extinção e/ou protegida e nenhuma permissão específica foi requerida quanto ao uso do material vegetal.

### Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *R. sativus* foram coletadas na comunidade de Bárbaras, Alfenas/MG, Brasil (21°27'10"S 45°56'43"W). A identificação taxonômica do material vegetal foi realizada no herbário UALF da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), onde uma amostra foi depositada (#2279).

### Preparo do extrato etanólico das folhas de *R. sativus*

As folhas de *R. sativus* foram arranjadas em camadas e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 45°C até a completa secagem (quando o peso constante de 10 g foi alcançado) e pulverizadas em moinho de facas. O extrato etanólico foi obtido através do método de maceração. Após o intumescimento de 500 g do pó das folhas com o líquido extrator (álcool: água 7:3 v/v) durante 30 minutos, fora do percolado, mais extrator (álcool 70%) foi empacotado com a mistura. O empacotamento foi feito de uma forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro. O álcool 70% foi gradualmente adicionado até cobrir o pó e a mistura foi deixada por 21 dias em maceração, com agitação diária. Após esta etapa, a mistura foi submetida ao processo de rota-evaporação sob uma pressão reduzida (500 mmHg) e temperatura de 50°C para concentrar o extrato (remoção do álcool) e, finalmente, liofilizada para completa remoção da água. O extrato seco obtido foi apropriadamente armazenado e, quando do uso, solubilizado em água destilada para administração por gavagem aos animais.

## Parte experimental

### Animais

Foram utilizados 45 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos (6–9 semanas), com peso corporal inicial variando entre 250-300 g, fornecidas pelo Biotério da Unifenas/Alfenas. Os animais foram submetidos a um período de aclimação por 10 dias, alojados em gaiolas coletivas (três animais por gaiola), em temperatura controlada (25 ± 1°C) em um ambiente com ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo alimentação específica para espécie (ração comercial) e água potável *ad libitum*.

### Indução de DM tipo 1

Para indução do DM tipo 1, resumidamente, os animais foram previamente mantidos em jejum por 12 horas, com água fornecida *ad libitum*. A seguir, os animais receberam uma dose única (130 mg/kg de peso) de uma solução de aloxana monoidratada (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, USA), via intraperitoneal. Uma hora e meia após a injeção, a alimentação foi reintroduzida aos animais. Após 7 dias, foi realizada a

pesagem e determinação da glicemia capilar de cada animal. Aqueles animais que obtiveram e sustentaram uma glicemia superior a 250 mg/dl foram considerados diabéticos<sup>(2)</sup>.

### Desenho experimental

Ratos sem DM (saudáveis) não tratados foram usados como controle, conforme demonstrado no grupo 1 da TABELA 1. Após indução do DM tipo 1, como acima descrito, os ratos diabéticos foram mantidos com dieta padrão e água *ad libitum*, e divididos em mais dois grupos experimentais (TABELA 1), um não tratado e outro tratado com uma dose oral de 300 mg/kg/dia do extrato etanólico das folhas de *R. sativus*, administrado pelo processo de gavagem, durante 90 dias. Os consumos de água e ração, bem como o acompanhamento do peso dos ratos, foram avaliados neste intervalo.

TABELA 1: Detalhamento dos grupos experimentais utilizados no presente estudo.

	Grupo experimental	Nº inicial de animais/ Nº final de animais	Injeção administrada/ Indução do DM (Sim/Não)	Dieta	Tempo de Tratamento/ Tipo de Tratamento
1	Ratos sem DM	15/10	Salina/Não	Padrão*	90 dias/Placebo
2	Ratos diabéticos	15/5	Aloxana (130 mg/kg) /Sim	Padrão	90 dias/Placebo
3	Ratos diabéticos + Extrato	15/10	Aloxana (130 mg/kg) /Sim	Padrão	90 dias/Extrato (300 mg/kg/dia)

Legenda: \*Ração comercial + água *ad libitum*

### Obtenção das amostras biológicas

Após os três meses de tratamento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e, em seguida anestesiados usando Isoflurano a 5% e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Para obtenção do soro, as amostras de sangue coletadas em tubos siliconizados (sem aditivo) foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos, em temperatura ambiente, e o soro foi separado, sendo imediatamente utilizado para a determinação da glicemia de jejum, da função renal, da função hepática e do perfil lipídico. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia e o fígado retirado. Para o preparo do homogeneizado de fígado, o órgão foi homogeneizado a 4 °C em tampão fosfato (PBS, pH 7,2) 0,1 M na proporção 5 mL/g de órgão. O homogeneizado foi centrifugado a 3000 g, por 10 min a 4 °C, sendo posteriormente utilizado o sobrenadante<sup>(6)</sup>.

### Avaliação da glicemia de jejum, do colesterol total e frações, de creatinina e AST

As concentrações de glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações (lipoproteína de alta densidade [HDL]) foram determinados no soro por método enzimático colorimétrico de ponto final. Os níveis séricos de creatinina foram determinados pelo método de Jaffé modificado utilizando um kit adquirido comercialmente, cujo procedimento de medição foi calibrado com o material de referência SRM 914 do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), tornando os resultados rastreáveis ao método definitivo (espectrometria de massas com diluição isotópica). As concentrações da enzima aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas no soro, por método cinético UV<sup>(9)</sup>.

### Determinação de carbonilação proteica

Para a determinação das proteínas carboniladas, o ensaio espectrofotométrico com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) foi utilizado, baseado na reação do DNPH com as proteínas carboniladas<sup>(10,11)</sup>. Neste ensaio, 500

$\mu\text{L}$  das alíquotas do homogeneizado de fígado em PBS mais 500  $\mu\text{L}$  da solução de DNPH (10  $\mu\text{M}$ ) foram incubadas por 1 h, com gotejamento de 500  $\mu\text{L}$  da solução de ácido tricloroacético (TCA, 20%), até a precipitação completa. 500  $\mu\text{L}$  da solução Etanol/Acetato de Etila foram, em seguida, adicionados à mistura e, esta foi então centrifugada a 600g por 10 minutos. Ao *pellet* resultante foi adicionado novamente 500  $\mu\text{L}$  da solução Etanol/Acetato de Etila e foi feita uma nova centrifugação (600 g, 10 minutos). Finalmente, o *pellet* foi dissolvido com 1000  $\mu\text{L}$  de Guanidina 6M. A taxa da variação na absorbância foi medida espectrofotometricamente a 370 nm. Para comparação, a concentração proteica total foi determinada pelo método de Bradford (utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão da curva de calibração) e os resultados expressos em nmol proteínas carb./ mg proteínas totais<sup>(12)</sup>.

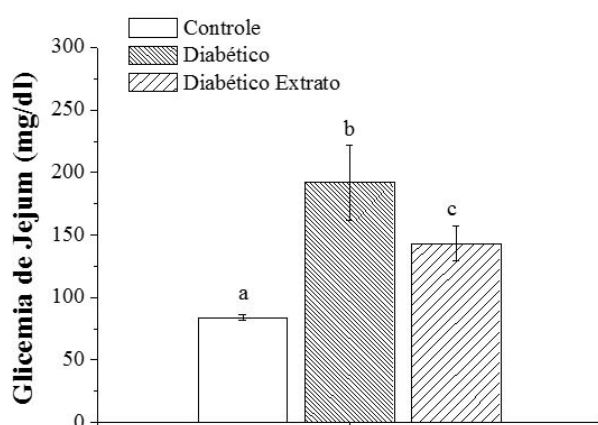
### Análises dos dados

Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de, no mínimo, três experimentos independentes, realizados em triplicata. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas das médias foram realizadas usando o software BioEstat (Versão 5.0, Belém, Pará, Brasil, 2007). As médias foram consideradas significativamente diferentes com valores de  $p < 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Neste estudo, verificou-se a princípio, o efeito anti-hiperglicêmico do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* em ratos com DM tipo 1 (**FIGURA 1**). Após 90 dias de tratamento, tempo necessário para o marcante aparecimento das complicações do DM não controlado (hiperglicemia não controlada), houve uma significativa ( $p < 0,05$ ) diminuição na glicemia de jejum em animais que receberam uma dose diária de 300 mg/kg deste extrato, durante este intervalo de tempo. Em recente estudo<sup>(5)</sup> demonstrou-se que *R. sativus* apresenta um perfil fitoquímico com marcante presença de flavonoides (rutina, quercetina e kaempferol), uma possível ação regenerativa das células  $\beta$  do pâncreas exercida por estes antioxidantes, bem como a promoção de um estímulo para a secreção de insulina podem ser inferidas<sup>(13-15)</sup>. Outra possível explicação, seria a ação de antioxidantes e/ou outros compostos presentes em *R. sativus* favorecendo a captação de glicose pelas células alvo, independente das concentrações séricas de insulina<sup>(16)</sup>.

**FIGURA 1.** Efeito anti-hiperglicêmico do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* (300 mg/kg/dia) em ratos com DM tipo 1.



Legenda: Os dados representam a média  $\pm$  DP de, no mínimo, três aferições independentes, realizadas em triplicata. As letras diferentes acima da coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ).

Com relação ao peso dos animais, ratos saudáveis apresentaram, em média, maior peso, como visto na **TABELA 2**, não havendo diferenças significativas entre os grupos de ratos diabéticos e aqueles diabéticos tratados com *R. sativus*. Isto demonstra que o tratamento com o extrato desta planta não influenciou o peso dos animais, apesar de promover um marcante efeito anti-hiperglicêmico. O consumo de ração também não foi influenciado pelo tratamento com *R. sativus*, sendo que houve apenas um significativo menor consumo no grupo de ratos não diabéticos. O consumo de água foi significativamente diferente entre os três grupos avaliados. A literatura tem demonstrado que tais variáveis podem ser influenciadas pelas alterações induzidas pelo DM<sup>(17)</sup>.

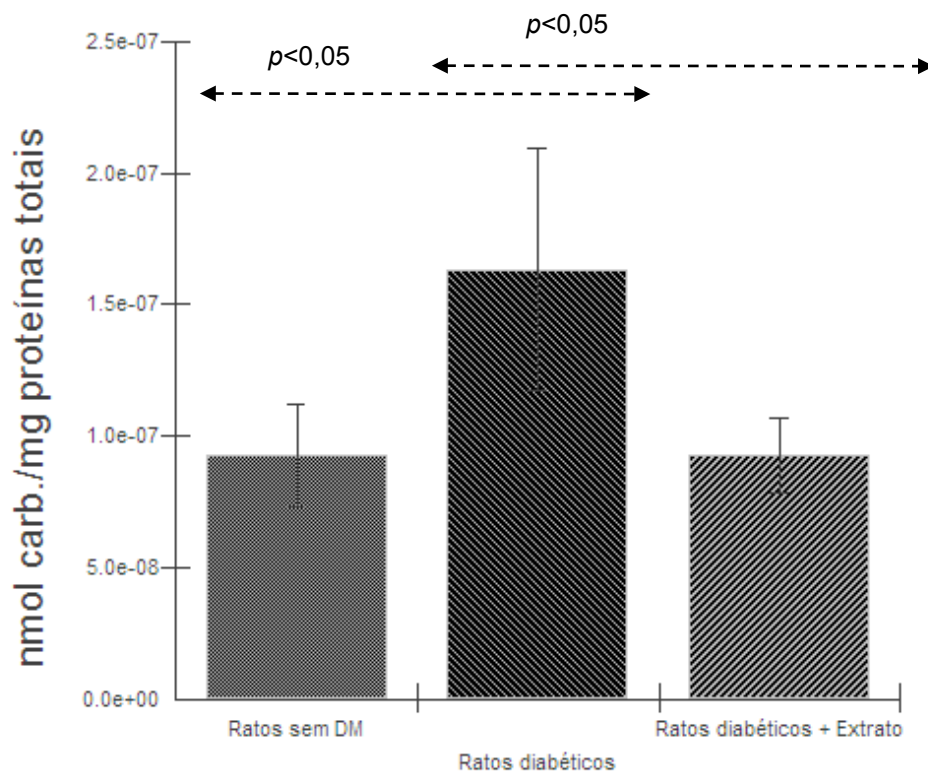
**TABELA 2:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* (300 mg/kg/dia) sobre o peso dos ratos, e relação entre os consumos de água e ração nos grupos experimentais durante os 90 dias de tratamento.

	Ratos sem DM	Ratos diabéticos	Ratos diabéticos + Extrato (300 mg/kg/dia)
Peso (g)	321,23±23,11 <sup>a</sup>	277,7±56,9 <sup>b</sup>	256,6±51,8 <sup>b</sup>
Consumo de ração (g)*	16,17±1,91 <sup>a</sup>	29,46±4,47 <sup>b</sup>	27,53±3,33 <sup>b</sup>
Consumo de água (ml)**	53,34±8,15 <sup>a</sup>	145,6±16,2 <sup>b</sup>	127,12±16,61 <sup>c</sup>

Legenda: Os dados representam a média ± DP de até 10 ratos por grupo experimental, avaliados em 16 diferentes dias. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ). \*O consumo de ração para um rato adulto saudável varia de aproximadamente 15-30 g, mas a polifagia em ratos com DM pode aumentar estes valores; \*\*A polidipsia pode ser notória em ratos com DM.

No DM tipo 1 não controlado, a hiperglicemia pode induzir um quadro de estresse oxidativo, que é considerado uma das grandes complicações crônicas da doença, sendo gerado através do acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs) de origem mitocondrial, em vários tipos de células, e/ou via o *burst* oxidativo de fagócitos, o que pode levar a danos oxidativos em vários órgãos, principalmente os rins e fígado. Uma maneira fidedigna de avaliar tais danos é através da mensuração de proteínas carboniladas, que são biomarcadores de oxidação proteica<sup>(2,18,19)</sup>. De acordo com estudos<sup>(20)</sup>, produtos avançados de oxidação proteica podem ser, também, formados na interação de EROs com proteínas plasmáticas. Como aqui observado, ratos com DM não tratados apresentaram uma marcante oxidação proteica no fígado após 90 dias, ao passo que tais danos foram prevenidos/atenuados nos ratos com DM que receberam por gavagem 300 mg/kg/dia de *R. sativus* (**FIGURA 2**). Outros danos oxidativos, como a oxidação proteica nos rins e a peroxidação lipídica no fígado e rins<sup>(10)</sup> não foram significativos ( $p > 0,05$ ) em ratos com DM comparados aos saudáveis (Dados não mostrados).

**FIGURA 2:** Prevenção da oxidação proteica no fígado promovida pelo extrato etanólico das folhas de *R. sativus* (300 mg/kg/dia) após 90 dias de tratamento dos ratos com DM tipo 1.



Legenda: Os dados representam a média  $\pm$  DP de, no mínimo, três experimentos independentes realizados em triplicata.  $p < 0,05$  (diferenças significativas) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ). A administração por gavagem de *R. sativus* (300 mg/dia) aos ratos diabéticos, durante 90 dias, preveniu a oxidação proteica no fígado.

A dislipidemia é uma complicação frequente no DM tipo 1 não controlado e pode também estar relacionado aos hábitos de vida dos afetados<sup>(21,22)</sup>, sendo que atenuar mais esta complicação crônica é um grande desafio durante o tratamento do DM. Neste estudo, observou-se um aumento de triglicérides nos ratos com DM, ao passo que o tratamento oral por três meses com o extrato de *R. sativus* promoveu um significativo efeito preventivo sobre tal aumento (**TABELA 3**). Não houve influência do tratamento com *R. sativus*, na dose usada (300 mg/kg/dia), sobre os níveis de colesterol total nos ratos com DM.

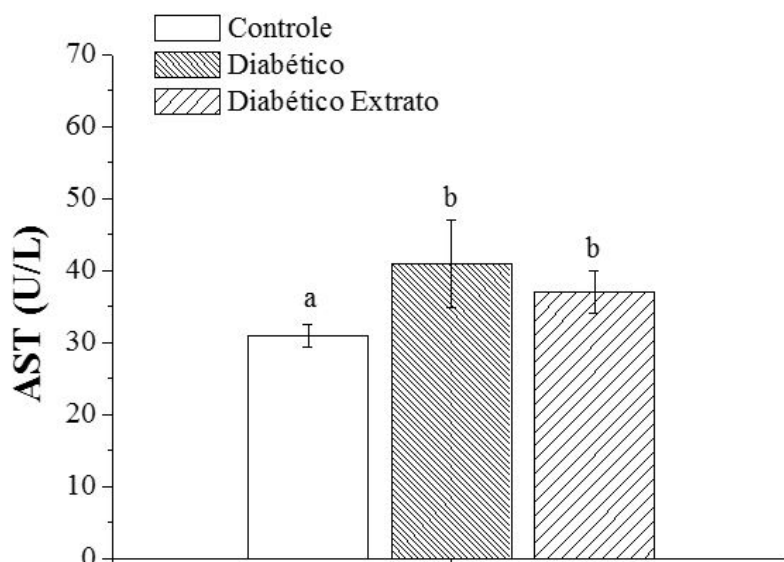
**TABELA 3:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* (300 mg/kg/dia) sobre o perfil lipídico de ratos com DM tipo 1, após três meses de tratamento.

Grupos	Triglicerídeos (mg/dl)	Colesterol Total (mg/dl)	HDL colesterol (mg/dl)
Ratos sem DM	56,5 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	49,6 $\pm$ 3,48 <sup>a</sup>	48,3 $\pm$ 2,84 <sup>a</sup>
Ratos diabéticos	70,2 $\pm$ 5,85 <sup>b</sup>	68,7 $\pm$ 3,13 <sup>b</sup>	61,4 $\pm$ 7,25 <sup>b</sup>
Ratos diabéticos + Extrato (300 mg/kg/dia)	57,3 $\pm$ 6,14 <sup>a</sup>	61,5 $\pm$ 3,25 <sup>b</sup>	60,8 $\pm$ 3,06 <sup>b</sup>

Legenda: Os dados representam a média  $\pm$  DP de, no mínimo, três experimentos independentes realizados em triplicata. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ).

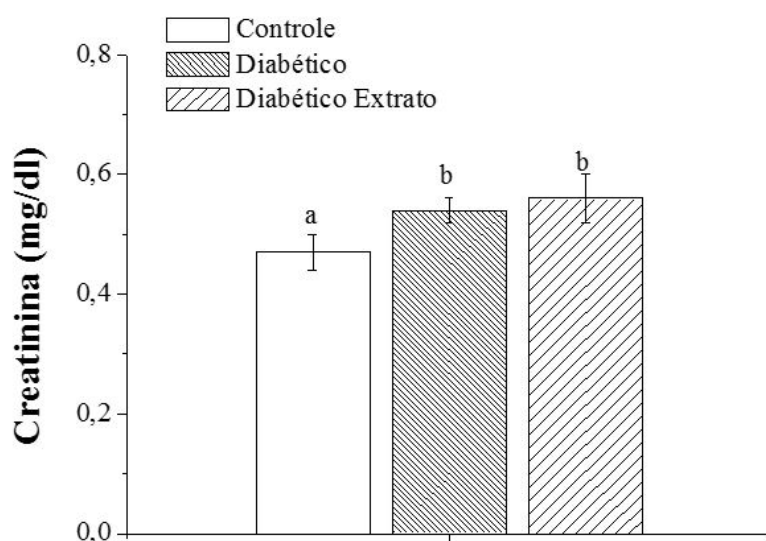
Disfunções e danos hepáticos (como exemplo, as alterações dos níveis de AST) e renais (níveis de creatinina) em pacientes com DM tipo 1 não controlado também são complicações comuns, advindas de diferentes danos a estes órgãos induzidos pela hiperglicemia. Aqui são demonstradas tais alterações (**FIGURAS 3 e 4**), mas o tratamento com *R. sativus* não promoveu uma melhora em estabilizar os níveis normais destes biomarcadores.

**FIGURA 3:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* (300 mg/kg/dia) sobre os níveis séricos de AST em ratos com DM tipo 1.



Legenda: As letras diferentes acima da coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ).

**FIGURA 4:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* (300 mg/kg/dia) sobre os níveis séricos de creatinina em ratos com DM tipo 1.



Legenda: As letras diferentes acima da coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ( $\alpha=0,05$ ).

Os efeitos positivos do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* em controlar o DM tipo 1 e suas complicações, como aqui observados em ratos Wistar, são também notórios, visto que a dose administrada oralmente, para a promoção de tais efeitos (300 mg/kg/dia), é destacada em prévios estudos como não tóxica, conforme evidências<sup>(5)</sup>, de que uma dose diária de 5 g/Kg/dia de *R. sativus* administrada durante 7 dias não induz toxicidade aguda em camundongos. Ainda, o amplo uso desta planta na medicina popular e culinária é destacado. Como sugestões, são essenciais outros estudos que possam investigar o potencial terapêutico de fitoterápicos desta planta e/ou o isolamento de compostos que apresentem efeitos sobre o DM, através de um fracionamento bio guiado, com estabelecimento dos mecanismos subjacentes e um foco maior sobre a segurança quanto ao uso em humanos.

## Conclusão

Neste estudo preliminar, usando um modelo experimental de ratos com DM tipo 1, demonstrou-se um marcante efeito anti-hiperglicêmico do extrato etanólico das folhas de *R. sativus* e as extensivas ações em prevenir típicas complicações do DM, tais como os danos oxidativos e dislipidemia, com uma dose de 300 mg/kg/dia. Estes dados preliminares indicam um potencial terapêutico de *R. sativus* que deve ser mais detalhadamente investigado em outros modelos experimentais, visando elucidar os efeitos sobre as funções hepática e renal e sobre os marcadores lipídicos e de glicêmica, além de análises histopatológicas que possam adicionalmente corroborar nossos achados.

## Agradecimentos

Programa de Bolsas de Iniciação Científica-PROBIC/UNIFENAS.

## Referências

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. 2011; 34(Suplement 1): S62-9. ISSN: 1935-5548. [\[CrossRef\]](#).
2. Silva AR, Cerdeira CD, Brito AR, Salles BCC, Revazi GF, Moraes GOI, et al. Green banana pasta diet prevents oxidative damage in liver and kidney and improves biochemical parameters in type 1 diabetic rats. **Arch Endocrinol Metab**. 2016; 60(4): 355-66. ISSN: 2359-4292. [\[CrossRef\]](#).
3. Martins DM. Exercício físico no controle do diabetes mellitus. Guarulhos, 145p. SP: Phorte e editora, 2000.
4. Adewoye EO, Taiwo VO, Olayioye FA. Anti-oxidant and anti-hyperglycemic activities of *Musa sapientum* root extracts in alloxan-induced diabetic rats. **Afr J Med Med Sci**. 2009; 38(2): 109-117. ISSN: 0002-0028. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
5. Paula BF, Reis LFC, Cerdeira CD, Mattedi LC, Veloso CC, Silva MA, et al. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the leaves of *Raphanus sativus* (L.) var. oleifera metzg in mice. **J Pharm Biol**. 2016; 6(1): 27-33. ISSN: 2249-7560.
6. National Institutes of Health [NIH], Washington DC: The National Academy Press, 2011.

7. Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Experimental alloxan diabetes-induced: a model for clinical and laboratory studies in rats. **Acta Cir Bras**. 2003; 18(2): 132-42. ISSN: 1678-2674. [[CrossRef](#)].
8. Jones B, Roberts PJ, Faubion WA, Kominami E, Gores GJ. Cystatin A expression reduces bile salt-induced apoptosis in a rat hepatoma cell line. **Am J Physiol**. 1998; 275: G723–G730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
9. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. **Saunders Company**, 1917p.1999. ISBN-13: 978-0721656106.
10. Winterbourn CC, Gutteridge JM, Halliwell B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. **J Free Rad Biol Med**. 1981; 2: 1119-1122. ISSN: 0748-5514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
11. Punchard NA, Kelly FJ. IRL Press at Oxford University Press, Ed. 168, 1996.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 1976; 72: 248–254. [[CrossRef](#)].
13. Kamalakkannan N, Prince PSM. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2006; 98(1): 97-103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
14. Kappel VD, Cazarolli LH, Pereira DF, Postal BG, Madoglio FA, Buss ZS, et al. Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: multiple sites of action. **Braz J Pharmac**. 2013; 23(4): 706-715. [[CrossRef](#)].
15. Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, Reynolds KA. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. **Diab**. 2006; 55(4): 1043-50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
16. Alpert E, Altman H, Totary H, Gruzman A, Barnea D, Barash V, et al. 4-Hydroxy tempol-induced impairment of mitochondrial function and augmentation of glucose transport in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol**. 2004; 67(10): 1985–1995. ISSN: 0006-2952. [[CrossRef](#)].
17. Harkness SE, Wagner JE. **Biologia e clínica de coelhos roedores**. São Paulo: Livraria Roca, 1993. 238p.
18. Omori K, Ohira T, Uchida Y, Carter JD, Si H, Reynolds KA. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. **J Leukoc Biol**. 2008; 84(1): 292-301. [[CrossRef](#)].
19. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Oxidative Stress: a Review on Metabolic Signaling in Type 1 Diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2008; 52(7): 1096-1105. ISSN: 1677-9487. [[CrossRef](#)].
20. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **J Biom**. 2013; Article ID 378790: 1-8. [[CrossRef](#)].



21. Zimmet ZP. Obesity, hypertension, carbohydrate disorders and risk of chronic diseases. **Med J Aust.** 1986; 145: 256-62. [[Link](#)].

22. Kaplan NM. The Deadly Quartet. **Arch Intern Med.** 1989; 149: 1514-20. [[CrossRef](#)].

---

**Histórico do artigo | Submissão:** 28/01/2018 | **Aceite:** 20/05/2018 | **Publicação:** 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Silva AB, Lopes GDS, Neves TVB, Barros GBS, Reis LFC, Salles BCC, et al. Extrato etanólico das folhas de *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzg (nabo forrageiro): efeitos anti-hiperglicêmico, antilipídêmico e antioxidante em ratos com Diabetes Mellitus tipo 1. **Revista Fitos.** Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 38-48. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/654>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.



# Isolation and characterization of polyphenols from *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae) leaves

DOI 10.17648/2446-4775.2019.696

Tostes, João Batista de Freitas<sup>1\*</sup>; Silva, Antônio Jorge Ribeiro da<sup>2</sup>; Kuster, Ricardo Machado<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos Rua Sizenando Nabuco, 100, Manguinhos, CEP: 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais Walter B. Mors, CCS, Bloco H, Ilha do Fundão, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Química, Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Vitória, CEP: 29075-910, Espírito Santo, Brazil.

\*Corresponding: [joao.tostes@far.fiocruz.br](mailto:joao.tostes@far.fiocruz.br).

## Abstract

Many Euphorbiaceae species are recognized as traditional medicinal plants and the oils and latex of many species have also economic importance. Among these, *Euphorbia heterophylla* L. is popularly known in Brazil as “leiteira”, “flor-de-poetas” and wild poinsettia, and has been used traditionally in Africa and India to treat many kinds of health disorders. However, the chemical composition of this species has not been extensively studied so far. In the present investigation, the flavonoids quercitrin (quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside), hyperin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside), isoquercitrin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) and isoquercitrin 6”-malonate (quercetin 3-O- $\beta$ -D-(6”-malonate)-glucopyranoside) were isolated from an ethyl acetate partition of aqueous ketone extract from *E. heterophylla* leaves. The dehydroellagitannins geraniin and phyllantusiin D as well as 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, *trans*-caffeic acid and the coumarin aesculetin (6,7-dihydroxycoumarin) were also isolated. All the compounds were characterized by spectroscopic methods such as <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR, COSY, HETCOR, APT and by comparison with literature data. The presence of these substances of relevant bioactivity is reported for the first time in *E. heterophylla* through our study, supporting in this way the medicinal use of this species.

**Keywords:** Euphorbiaceae. *Euphorbia heterophylla* L.. Polyphenols. Flavonoid glycosides. Dehydroellagitannins. Aesculetin.

## Introduction

Euphorbiaceae is among the largest families of Angiosperms (flowering plants), comprising 228 genera and 6547 accepted species names<sup>[1]</sup>. Many of its species are recognized as traditional medicinal plants, such as *Phyllanthus niruri*, used to treat kidney stones (nephrolithiasis), and *Croton campestris*, used as a laxative, anti-syphilitic and for the treatment of biliary duct infections<sup>[2,3]</sup>. The oils and latex of many species have also economic importance as *Ricinus communis*, *Aleurites fordii* and *Hevea brasiliensis*. Others like *Manihot*

*glaziovii*, *Manihot esculenta*, and *Manihot utilissima* are used in the food industry<sup>[4]</sup>. Recently, the possibilities of utilization of *Jatropha curcas* seed oil as fuel has been attracted the attention of researchers<sup>[5]</sup>.

*Euphorbia* is the largest genus in Euphorbiaceae family with approximately 2000 species<sup>[1]</sup>. As example of medicinal use, it can be mentioned *Euphorbia tirucalli*, whose latex has antitumoral and anti-syphilitic properties<sup>[2]</sup> and *Euphorbia hirta* that has been used traditionally for respiratory ailments (cough, coryza, bronchitis, and asthma), worm infestations in children, digestive problems, and tumors<sup>[6]</sup>. *Euphorbia heterophylla* Linnaeus is an annual plant reproducing by seeds, latescens, erect, being able to reach 30-80 cm height. Its leaves are glabrous to slightly pubescent with widely variable form, reaching 4-10 cm length<sup>[7]</sup>. It is native from the tropical regions of Americas and is widespread in tropical and subtropical regions around the world<sup>[7]</sup>. In Brazil, it is popularly known as "leiteira", "flor-de-poetas" and wild poinsettia<sup>[8]</sup>. In Africa and India, this species has been used traditionally to treat many kinds of health disorders such as arthritis, rheumatism, skin tumors, gonorrhoea, erysipelas and many others<sup>[9]</sup>. In these regions, it is popularly known as milkweed.

Despite its importance, few substances have been isolated from *E. heterophylla* so far: flavonoids such as quercetin, 3-methyl quercetin, kaempferol 3-*O*-arabinoside, kaempferol 3-*O*-glucoside and kaempferol 7-*O*-glucoside along with some triterpenes<sup>[10,11]</sup>. Therefore, this study aims to contribute with new information on the chemical composition of this species.

## Material and Methods

### General

Reagents and solvents were PA grade (Vetec or Merck) except those used for HPLC analysis that were UV/HPLC grade (Merck). The ultrapurified water used was Milli-Q (Millipore). The standards were obtained from Sigma-Aldrich or Fluka.

### Plant extraction

*E. heterophylla* was collected on campus at University of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro – Brazil, in August 2000. A voucher specimen was deposited at Herbarium of Botanic Garden of Rio de Janeiro. The fresh leaves (540.0 g) were extracted by static maceration with acetone-water (70:30), 7 x 2.0 L for 24 h each one. The extract was grouped, filtered by gravity in paper and the acetone removed by evaporation under reduced pressure at 40 °C. The residual aqueous phase (4.0 L) was sequentially partitioned 3 times at 1:1 v/v ratio with chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol yielding 0.5 g, 6.0 g and 6.9 g, respectively.

### Thin Layer Chromatography (TLC) analysis

Extract and fractions were analyzed in silica gel AL 60F<sub>254</sub> 20 x 20 cm plates (Merck) using NP/PEG reagent for detection of flavonoids<sup>[12]</sup>, acetic acid/sodium nitrite reagent for ellagitannins<sup>[13,14]</sup>, sulfuric orcinol for sugars, KMnO<sub>4</sub>-NaCO<sub>3</sub>-bromocresol green-bromothymol blue for malonic acid<sup>[15]</sup>, ferric chloride for phenolic substances<sup>[12]</sup>, UV light 254 nm and 365 nm. TLC solvent systems: (A) ethyl acetate/acetic acid/formic

acid/water (100:11:11:27), (B) ethyl acetate/formic acid/water (100:10:5) and (C) *i*-propanol/ethyl acetate/water (7:2:1).

### Medium pressure liquid column chromatography (MPLC)

MPLC was performed in a solvent resistant column (SR) from Pharmacia (26.0 x 2.8 cm) with the stationary phase Toyopearl HW-40C (TosoHaas) and peristaltic pump EP-1 EconoPump (BioRad). The extract (2.5 g) was solubilized in 6.0 mL of ethanol-water (3:2) collecting 24 fractions of 20.0 mL each and then other 26 fractions of the same volume were collected with ethanol-water-acetone (7:2:1), flow-rate of 2.5 mL/min, totalizing 50 fractions, named as UN01 to UN50.

### Analytical High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The Shimadzu chromatograph consisted of LC-10AD pump, diode array detector SPD-M10A, DGU-14A degasser, CTO-10A column oven at 30 °C, Rheodyne injector with a 20 µL loop, SCL-10A interface and controlled by Class-VP software. A Hypersil ODS C18, 250 × 4.0 mm, 5 µm (Thermo Scientific) column was applied using as mobile phase acetonitrile and water adjusted to pH 3.0 with trifluoroacetic acid (TFA) (15:85) at flow-rate 1 mL/min. The runs were monitored at 254, 280 and 365 nm.

### Semi-preparative HPLC system and conditions

For the semi-preparative purposes, a Shimadzu chromatograph was used composed with LC-10AS pump, diode array detector SPD-M10A or refraction index detector RID-6A, DGU-14A degasser, and a Rheodyne injector with a 500 µL loop. A Supelcosil LC-18, 250 × 10.0 mm, 5 µm (Supelco) column was employed at room temperature using same mobile phase that applied in analytical system at flow-rate 4 mL/min or 5 mL/min. The separations were also monitored at 254, 280 and 365 nm.

### Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra were obtained in Varian Gemini 200 RT and Bruker Avance DRX-400. Correlations were assigned by two-dimensional techniques of correlated spectroscopy (COSY), carbon-13-proton correlation (HETCOR) and attached proton test (APT).

### Flavonoid glycosides hydrolysis

Flavonoid (2.0 mg) were heated in a boiling water for two hours in sealed tube with 2.0 mL TFA. After that, the respective aglycone was adsorbed in XAD-2 mini-column (50 x 5 mm) and the eluate was evaporated adding methanol several times until all the acid has been removed. The aglycone was eluted from the column with methanol.

### Reduction of the sugars

The acid-free eluates from XAD-2 were reduced with 3.0 mg of sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>) (Merck) in 1.0 mL of Milli-Q water cooled in an ice bath. After 2 hours the NaBH<sub>4</sub> excess was decomposed with acetic acid 20% v/v (3 drops) and the solution was passed through a column (50 x 5 mm) containing Dowex 50W-X8 resin (acid form) to remove sodium. The eluate was evaporated adding methanol several times until all the

borate has been removed. The residue was solubilized in water, frozen with liquid nitrogen and lyophilized yielding a white solid. Sugar standards were treated the same way.

### Sugars derivatization

Dried acetonitrile (0.1 mL) and 70 µL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (BSTFA/TMCS) were added to the final residues from sugars reduction. The sealed tubes were heated to 100 °C for 2 hours. The products were analyzed by Gas Chromatography (GC) and the identity of the epimeric forms of the free sugars were confirmed against standards in individual injections as well co-injections.

### Gas Chromatography (GC)

GC analyses were performed in a Varian Star 3400 CX system with Flame Ionization Detector (FID) using a DB-1 30.0 m × 0.25 mm × 0.25 µm. Injector, detector and column were set at 250°C, 250°C and 170°C, respectively, and the product from sugar derivatization was injected directly (3 µL) at split 1:50.

## Results and Discussion

At first, the ethyl acetate extract was analyzed by TLC suggesting the presence of phenolic substances (dark blue spots after sprayed with FeCl<sub>3</sub>), cinnamic acid derivatives (blue fluorescence under 365 nm after NP/PEG reagent), flavonoids derivatives from luteolin, quercetin or myricetin (orange fluorescence under 365 nm after NP/PEG reagent) and ellagitannins (brown spots after reaction with acetic acid/sodium nitrite). A portion of this extract was fractionated by MPLC according literature<sup>[16]</sup>. The fractions were analyzed by TLC and grouped according similar profile (UN07-10: 1.05 g, UN11-12: 10.0 mg and UN20-50: 420.0 mg).

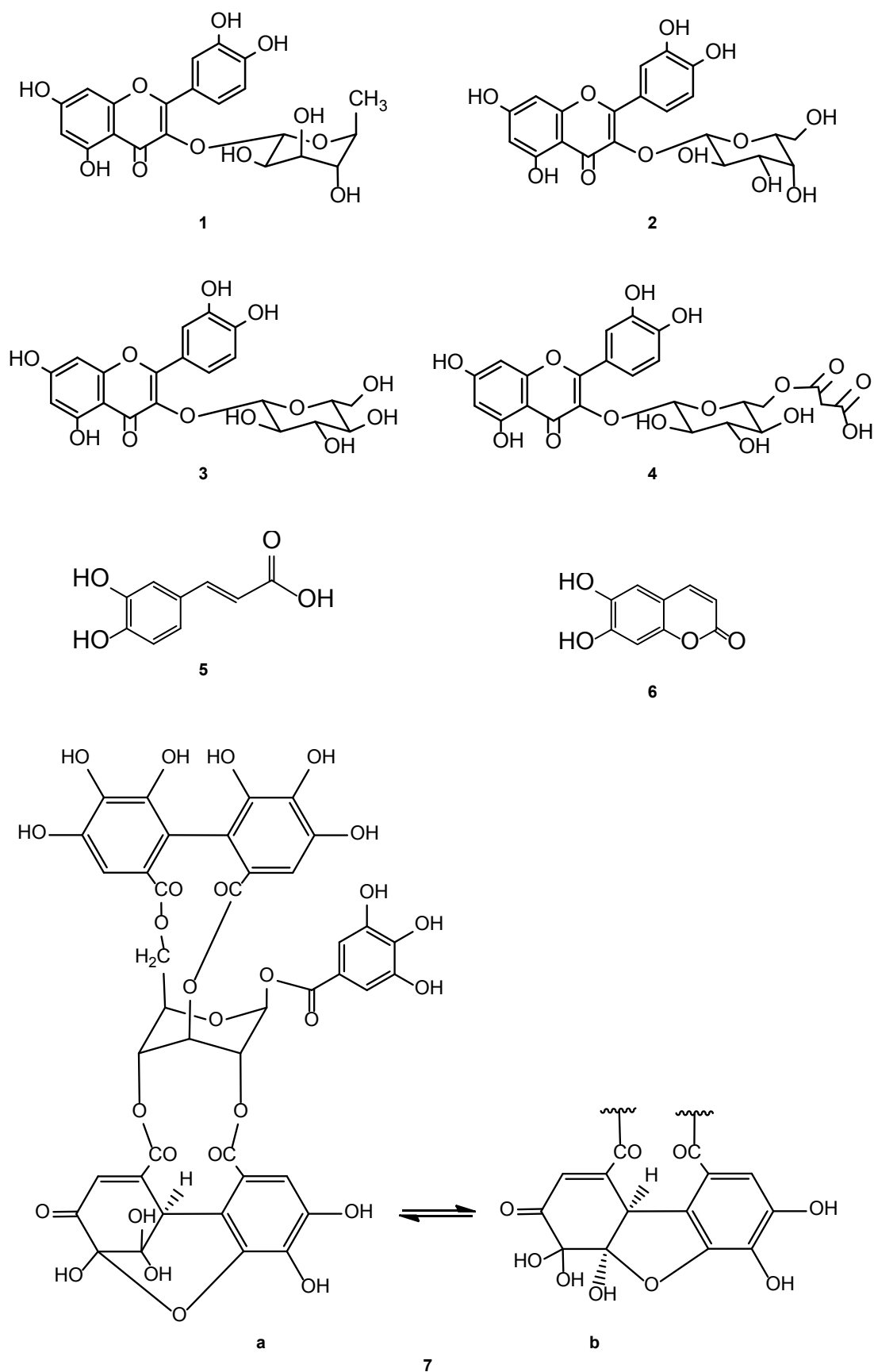
### Isolation and characterization of Flavonoids

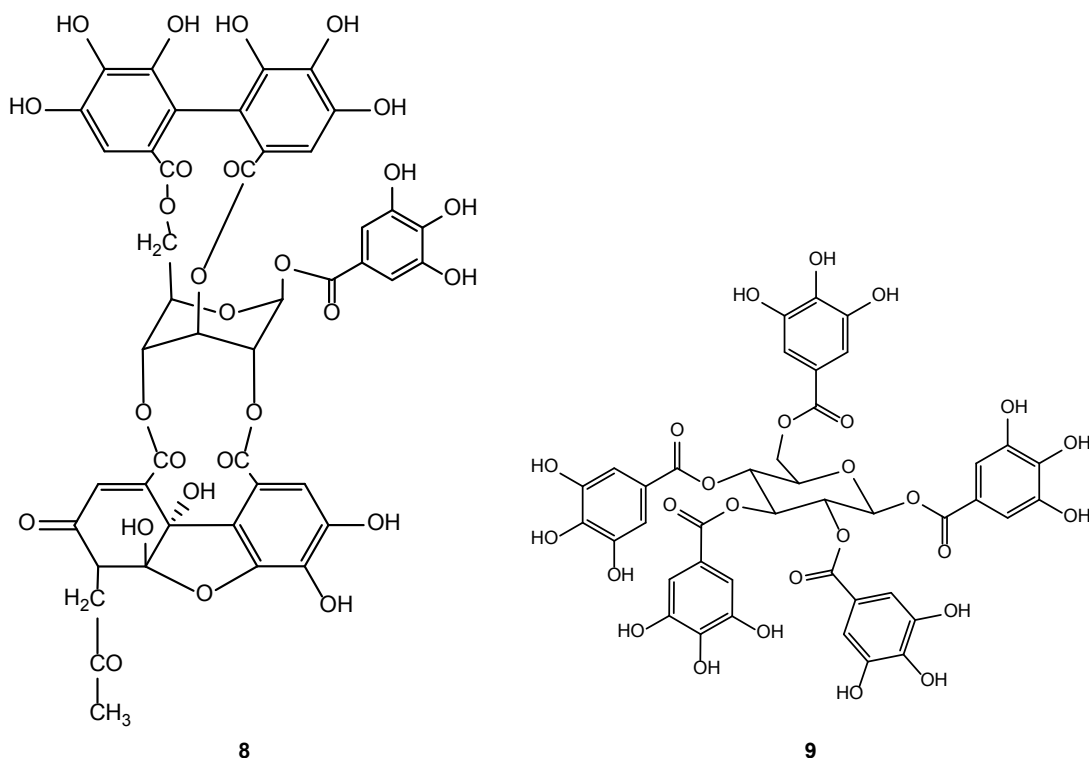
All the substances isolated in this study are structurally represented (**FIGURE 1**).

UN11-12 from the MPLC contained a pure compound according to the TLC and HPLC analysis, which chemical structure was confirmed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR results plus comparison with literature data<sup>[17]</sup>, and was proved to be the substance quercitrin (quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside) (**1**).

TLC analysis of UN07-10 suggested a mixture of flavonoids (orange fluorescence in a 365 nm UV lamp after NP/PEG reagent suggesting luteolin, quercetin or myricetin derivatives) and cinnamic derivatives (blue fluorescence spots in 365 nm UV lamp after NP/PEG reagent). By HPLC analysis, it was possible to verify that the UV spectra of some components were very similar to rutin standard. Therefore, a portion of this fraction (570.0 mg) was submitted to semi-preparative HPLC yielding five fractions, FR1 to FR5, that were dried in rotavapor: FR1 20.0 mg (pale yellow solid), FR2 30.0 mg (yellow solid), FR3 30.0 mg (yellow solid), FR4 10.0 mg (yellow solid), and FR5 20.0 mg (yellow solid).

FIGURE 1: Substances isolated from *Euphorbia heterophylla* in the present study.





Legend: Quercitrin (quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside) **1**, Hyperin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside) **2**, Isoquercitrin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) **3**, Isoquercitrin 6''-malonate (quercetin 3-O- $\beta$ -D-(6''-malonate)-glucopyranoside) **4**, *trans*-Caffeic acid **5**, Aesculetin **6**, Geraniin **7**, Phyllantusiin D **8**, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranoside **9**.

Except for the FR1, the fractions presented separated compounds with high purity grade by TLC and HPLC and were submitted to  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis. The proposed structures were confirmed by comparison with literature: hyperin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside) (FR2, compound **2**)<sup>[17]</sup>, isoquercitrin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) (FR3, compound **3**)<sup>[17]</sup>, isoquercitrin 6''-malonate (quercetin 3-O- $\beta$ -D-(6''-malonate)-glucopyranoside) (FR4, compound **4**)<sup>[18, 19]</sup> and compound **1** (FR5)<sup>[16]</sup>.

The flavonoid glycosides **1-4** were submitted to hydrolysis and the products of the reactions were analyzed by TLC. The resulting compounds were co-chromatographed with quercetin presenting same  $R_f$  and color (solvent system C,  $R_f$  0.80, orange fluorescence in UV 365 nm light after NP/PEG reagent). The malonic acid was identified by co-chromatography with standard (system C,  $\text{KMnO}_4$ - $\text{NaCO}_3$ -bromocresol green-bromothymol blue, white spot in blue background). The sugars  $\beta$ -D-glucose (Glc),  $\beta$ -D-galactose (Gal) and  $\alpha$ -L-rhamnose (Rha) were identified by co-chromatography (system C, sulfuric orcinol,  $R_f$  0.38, 0.30 and 0.64, respectively).

The identity of the epimeric forms of the free sugars Glc and Gal, after reduction and silylation were confirmed by GC against standards in individual injections as well co-injections ( $t_R$  Glc 17.93 min and  $t_R$  Gal 18.19 min).

Flavonoids are known to be very bioactive substances making them good candidates for therapeutic agents<sup>[20]</sup>. These substances have recently been targeted by *in vitro* studies aimed at combating the fungus *Candida albicans*, which causes lethal opportunistic infections in people with immune deficiencies such as

that caused by the HIV virus<sup>[21]</sup>. Kaempferol, quercetin and some of its glycosylated derivatives have shown considerable effects against this species of fungus<sup>[21]</sup> and can then explain the use of *E. heterophylla* as antifungal agent.

#### Isolation and characterization of *trans*-caffeic acid and aesculetin

FR1, that presented two spots of blue fluorescence in UV 365 nm light after NP/PEG reagent, was subjected to a new chromatographic separation by semi-preparative HPLC and two fractions were collected, evaporated, and analyzed by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. NMR spectra were compared with literature data<sup>[22,23]</sup> allowing the identification of *trans*-caffeic acid (compound **5**, 1.4 mg) and the coumarin aesculetin (6,7-dihydroxycoumarin) (compound **6**, 4.0 mg). Possessing strong antioxidant activity, literature sources show that the compound **5** increase collagen production and prevention of premature aging<sup>[24]</sup>. This phenolic compound also demonstrated antimicrobial activity and may be a promise in the treatment of skin diseases<sup>[24]</sup>. Many pharmacological activities such as anti-inflammatory, anticoagulant, antioxidant, liver-protective, antidiabetic, antibacterial and antitumor is attributed to the coumarin **6**<sup>[25]</sup>.

#### Isolation and characterization of hydrolysable tannins

TLC of UN20-50 (system A, acetic acid/NaNO<sub>2</sub> reagent, brown colors) indicated the presence of ellagitannins. This fraction was subjected to semi-preparative HPLC, yielding three other fractions, which were collected and dried in rotavapor. Each fraction presented high purity by TLC and HPLC analyses and were submitted to <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR analyses. The data were compared with literature<sup>[13,26,27]</sup> confirming the proposed structures: the dehydroellagitannins geraniin (FRB 1, compound **7**, beige solid, 65.2 mg) and phyllantusiin D (FRB 2, compound **8**, beige solid, 8.6 mg) as well as 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucopyranoside (FRB 3, compound **9**, white solid, 19.3 mg).

The dehydroellagitannin **7** was previously isolated from *Phyllanthus amarus* and demonstrated protection of mouse liver slices against ethanol-induced cytotoxicity<sup>[28]</sup>. A review on this substance demonstrated that it is a suitable candidate for further study into its potential pharmaceutical, nutritional, cosmetic and industrial application<sup>[29]</sup>. This tannin exists in two isomeric forms, as shown above (**FIGURE 1**). Compound **8** is an uncommon hydrolysable tannin previously isolated from *Phyllanthus amarus*<sup>[30]</sup> and has been considered an artefact by some researchers, generated during acetone extraction<sup>[27]</sup>. Literature data suggested that this tannin has strong antioxidant activity<sup>[31]</sup>. In addition, several *in vitro* studies and some *in vivo* studies showed that compound **9** exhibits multiple biological activities making it of great potential in the therapy and prevention of several serious diseases such as cancer and diabetes<sup>[32-34]</sup>.

Spectroscopic data obtained for the isolated compounds by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR are shown below.

Quercitrin (quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranoside) (**1**): <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz, TMS, δ): 7.28 (*dd*, *J* = 1.99/5.55 Hz, H-6'), 7.22 (*d*, *J* = 1.99 Hz, H-2'), 6.86 (*d*, *J* = 8.24 Hz, H-5'), 6.38 (*d*, *J* = 1.61 Hz, H-8), 6.20 (*d*, *J* = 1.61 Hz, H-6), 5.26 (*d*, *J* = 1.33 Hz, H-1'' Rha), 4.80-3.00 (*m*, H-2'' to H-5'' Rha). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 50 MHz, TMS, δ): 177.67 (C-4), 164.09 (C-7), 161.22 (C-5), 157.50 (C-2), 156.37 (C-9), 148.35 (C-4'), 144.11 (C-3'), 134.19 (C-3), 121.02 (C-1'), 120.71 (C-6'), 115.39 (C-5'), 115.63 (C-2'), 101.79 (C-1'' Rha), 104.03 (C-10), 98.61 (C-6), 93.54 (C-8), 71.70 (C-4'' Rha), 70.80 (C-3'' Rha), 70.46 (C-2'' Rha), 69.98 (C-5'' Rha), 17.14 (C-6'' Rha).



Hyperin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside) (**2**):  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 200 MHz, TMS,  $\delta$ ): 7.66 (*dd*,  $J = 2.04/8.44$  Hz, H-6'), 7.54 (*d*,  $J = 2.14$  Hz, H-2'), 6.82 (*d*,  $J = 8.54$  Hz, H-5'), 6.42 (*s*, H-6), 6.22 (*s*, H-6), 5.38 (*d*,  $J = 6.66$  Hz, H-1 Gal), 5.10-3.40 (*m*, H-2 to H-6 Gal).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 50 MHz, TMS,  $\delta$ ): 177.48 (C-4), 164.14 (C-7), 161.22 (C-5), 156.30 (C-2), 156.22 (C-9), 148.46 (C-4'), 144.82 (C-3'), 133.38 (C-3), 121.09 (C-1'), 121.99 (C-6'), 115.94 (C-5'), 115.19 (C-2'), 101.79 (C-1 Gal), 103.91 (C-10), 98.68 (C-6), 93.51 (C-8), 75.84 (C-5 Gal), 73.18 (C-3 Gal), 71.21 (C-2), 67.92 (C-4 Gal), 60.14 (C-6 Gal).

Isoquercitrin (quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) (**3**):  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 200 MHz, TMS,  $\delta$ ): 7.62 (H-2' and H-6'), 6.88 (*d*,  $J = 8.92$  Hz, H-5'), 6.46 (*d*,  $J = 1.74$  Hz, H-8), 6.24 (*d*,  $J = 1.74$  Hz, H-6), 5.50 (*d*,  $J = 7.37$  Hz, H-1'' Glu), 5.20-3.10 (*m*, H-2'' to H-6'' Glu).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 50 MHz, TMS,  $\delta$ ): 177.39 (C-4), 164.08 (C-7), 161.19 (C-5), 156.28 (C-2), 156.28 (C-9), 148.41 (C-4'), 144.76 (C-3'), 133.31 (C-3), 121.55 (C-1'), 121.14 (C-6'), 116.18 (C-5'), 115.17 (C-2'), 100.88 (C-1'' Glu), 103.93 (C-10), 98.61 (C-6), 93.45 (C-8), 77.50 (C-3'' Glu), 76.49 (C-5'' Glu), 74.07 (C-2'' Glu), 69.92 (C-4'' Glu), 60.95 (C-6'' Glu).

Isoquercitrin 6''-malonate (quercetin 3-O- $\beta$ -D-(6''-malonate)-glucopyranoside) (**4**):  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 200 MHz, TMS,  $\delta$ ): 7.54 (*d*,  $J = 2.22$  Hz, H-6'), 7.48 (*d*,  $J = 2.26$  Hz, H-2'), 6.86 (*d*,  $J = 8.25$  Hz, H-5'), 6.42 (*d*,  $J = 1.86$  Hz, H-8), 6.22 (*d*,  $J = 1.86$  Hz, H-6), 5.38 (*d*,  $J = 6.79$  Hz, H-1'' Glu), 4.40-4.00 (*large*, H-2'' to H-6'' Glu).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 50 MHz, TMS,  $\delta$ ): 177.29 (C-4), 167.93 (C-3''' malonyl), 166.95 (C-1''' malonyl), 164.18 (C-7), 161.16 (C-5), 156.31 (C-2), 156.69 (C-9), 148.55 (C-4'), 148.88 (C-3'), 133.11 (C-3), 121.34 (C-6'), 120.98 (C-1'), 121.34 (C-6'), 116.21 (C-5'), 115.41 (C-2'), 101.09 (C-1'' Glu), 103.83 (C-10), 98.67 (C-6), 93.54 (C-8), 76.15 (C-3'' Glu), 73.90 (C-2'' and C-5'' Glu), 69.47 (C-4'' Glu), 63.34 (C-6'' Glu), 41.77 (C-2''' malonyl).

*trans*-Caffeic acid (**5**):  $^1\text{H-NMR}$  (acetone- $d_6$ , 200 MHz, TMS,  $\delta$ ): 7.41 (*d*,  $J = 15.90$  Hz, H-7), 7.04 (*d*,  $J = 2.10$  Hz, H-2), 6.90 (*dd*,  $J = 1.90/8.30$  Hz, H-6), 6.74 (*d*,  $J = 8.20$  Hz, H-5), 6.14 (*d*,  $J = 15.80$  Hz, H-8).

Aesculetin (6,7-dihydroxycoumarin) (**6**):  $^1\text{H-NMR}$  (acetone- $d_6$ , 200 MHz, TMS,  $\delta$ ): 7.77 (*d*,  $J = 9.70$  Hz, H-4), 7.05 (*s*, H-5), 6.80 (*s*, H-8), 6.15 (*d*,  $J = 9.70$  Hz, H-3).

Geraniin (**7**):  $^1\text{H-NMR}$  (acetone- $d_6$  + D<sub>2</sub>O, 400 MHz, TMS,  $\delta$ ): a form, 7.26 (*s*, H-3 D ring), 7.19 (*s*, H-2 and H-6 galloyl A ring), 7.13 (*s*, H-3/3' B/C ring), 6.65 (*s*, H-3/3' B/C ring), 6.54 (*br s*, H-1 Glu), 6.51 (*s*, H-3' E ring), 5.51 (*br s*, H-2 Glu), 5.50 (*br s*, H-4 Glu), 5.40 (*br s*, H-3 Glu), 5.15 (*s*, H-1' E ring), 4.20 - 4.40 (*m*, H-6 Glu); b form, 7.34 (*s*, H-3 D ring), 7.17 (*s*, H-2 and H-6 galloyl A ring), 7.07 (*s*, H-3/3' B/C ring), 6.64 (*s*, H-3/3' B/C ring), 6.54 (*br s*, H-1 Glu), 6.51 (*s*, H-3' E ring), 6.24 (*d*,  $J = 1.34$  Hz, H-3' E ring), 5.51 (*br s*, H-2 Glu), 5.50 (*br s*, H-3 Glu), 5.40 (*br s*, H-4 Glu), 4.92 (*d*,  $J = 1.34$  Hz, H-1' E ring), 4.76 (*m*, H-5 Glu) 4.20 - 4.40 (*m*, H-6 Glu).  $^{13}\text{C-NMR}$  (acetone- $d_6$  + D<sub>2</sub>O, 100 MHz, TMS,  $\delta$ ): a form, 191.81 (C-4' E ring), 168.43 (C-7 C ring), 166.18 (C-7 B ring), 165.57 (C-7' E ring), 165.39 (C-7 D ring), 164.72 (C-7 A ring), 154.38 (C-2' E ring), 145.95 (C-3 and C-5 A ring), 145.76 (C-4 D ring), 145.40 (C-4 C ring), 145.25 (C-6 B/C ring), 144.67 (C-4 B ring), 143.33 (C-6 D ring), 139.87 (C-4 A ring), 139.04 (C-5 D ring), 137.86 (C-5 B ring), 136.46 (C-5 C ring), 128.61 (C-3' E ring), 125.50 (C-2 C ring), 124.52 (C-2 B ring), 120.06 (C-1 A ring), 119.26 (C-2 D ring), 117.13 (C-1 B ring), 115.72 (C-1 D ring), 115.29 (C-1 C ring), 113.38 (C-3 D ring), 110.79 (C-2 and C-6 A ring), 110.59 (C-3 B ring), 107.79 (C-3 C ring), 96.21 (C-5' E ring), 92.37 (C-6' E ring), 90.79 (C-1 Glu), 72.55 (C-5 Glu), 69.93 (C-2 Glu), 65.86 (C-4 Glu), 63.79 (C-6 Glu), 63.25 (C-3 Glu), 46.09 (C-1' E ring); b form, 194.56 (C-4' E ring), 168.43 (C-7 C ring), 166.18 (C-7 B ring), 165.71 (C-7' E ring), 164.98 (C-7 D ring), 164.87 (C-7 A ring), 149.12 (C-2' E ring), 147.05 (C-6 D ring), 145.95 (C-3 and C-5 A ring), 145.67 (C-

4 D ring), 145.25 (C-4 C ring), 145.25 (C-6 B/C ring), 144.59 (C-4 B ring), 139.87 (C-4 A ring), 137.49 (C-5 D ring), 137.86 (C-5 B ring), 136.46 (C-5 C ring), 125.03 (C-3' E ring), 125.35 (C-2 C ring), 124.35 (C-2 B ring), 120.06 (C-1 A ring), 119.92 (C-1 D ring), 117.13 (C-1 B ring), 116.92 (C-2 D ring), 115.18 (C-1 C ring), 113.38 (C-3 D ring), 110.79 (C-2 and C-6 A ring), 110.32 (C-3 B ring), 108.00 (C-3 C ring), 92.37 (C-5' E ring), 92.37 (C-6' E ring), 91.77 (C-1 Glu), 73.17 (C-5 Glu), 70.45 (C-2 Glu), 66.79 (C-4 Glu), 63.79 (C-6 Glu), 62.29 (C-3 Glu), 51.89 (C-1' E ring).

Phyllantusiin D (**8**): <sup>1</sup>H-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O, 400 MHz, TMS, δ): 7.15 (s, H-3 D ring), 7.10 (s, H-2 and H-6 galloyl A ring), 6.95 (s, H-3/3' B/C ring), 6.60 (s, H-3/3' B/C ring), 6.50 (*br s*, H-1 Glu), 6.21 (s, H-3' E ring), 5.50 (*br s*, H-2 Glu), 5.43 (*br s*, H-3 Glu), 5.37 (*br s*, H-4 Glu), 4.85 (*br s*, H-1' E ring), 4.80 (*t*, *J* = 9.00 Hz, H-5 Glu), 4.71 (*t*, *J* = 9.00 Hz, H-6 Glu), 4.34 (*dd*, *J* = 7.90/10.60 Hz, H-6 Glu), 3.40 (*d*, *J* = 15.90 Hz, H-7' acetylonyl), 2.93 (*d*, *J* = 15.90 Hz, H-7' acetylonyl), 2.14 (s, H-9' acetylonyl). <sup>13</sup>C-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O, 100 MHz, TMS, δ): 165.42 (C-7 A ring), 165.40 (C-7 D ring), 145.75 (C-3 and C-5 A ring), 144.73 (C-4 B ring), 126.74 (C-3' E ring), 119.68 (C-1 A ring), 110.63 (C-2 and C-6 A ring), 110.28 (C-3 B ring), 107.78 (C-3 C ring), 91.83 (C-1 Glu), 81.00 (C-5' E ring), 72.88 (C-5 Glu), 70.07 (C-2 Glu), 66.48 (C-4 Glu), 63.67 (C-6 Glu), 62.14 (C-3 Glu), 51.68 (C-1' E ring), 50.00 (C-7' acetylonyl), 31.88 (C-9' acetylonyl).

1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucopyranoside (**9**): <sup>1</sup>H-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O, 400 MHz, TMS, δ): 7.17 (s, H-2 and H-6 galloyl), 7.10 (s, H-2 and H-6 galloyl), 7.05 (s, H-2 and H-6 galloyl), 6.97 (s, H-2 and H-6 galloyl), 6.33 (*d*, *J* = 8.40 Hz, H-1 Glu), 6.00 (*t*, *J* = 9.80 Hz, H-3 Glu), 5.63 (*m*, H-2, H-4 and H-5 Glu), 4.55 (*d*, *J* = 12.5 Hz, H-6 Glu), 4.38 (*dd*, *J* = 4.50/12.50 Hz, H-6 Glu). <sup>13</sup>C-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O, 100 MHz, TMS, δ): 166.37 (C=O galloyl), 165.92 (C=O galloyl), 165.71 (C=O galloyl), 165.65 (C=O galloyl), 164.96 (C=O galloyl), 145.97 (C-3 and C-5 galloyl), 139.76 (C-4 galloyl), 139.10 (C-4 galloyl), 138.97 (C-4 galloyl), 121.33 (C-1 galloyl), 120.53 (C-1 galloyl), 120.44 (C-1 galloyl), 119.83 (C-1 galloyl), 110.05 (C-2 and C-6 galloyl), 93.29 (C-1 Glu), 73.90 (C-5 Glu), 73.25 (C-3 Glu), 71.10 (C-2 Glu), 69.25 (C-4 Glu), 62.76 (C-6 Glu).

## Conclusion

The presence of the substances isolated in this study represents additional information on the chemistry of the species, since there is no report in the literature of their isolation from *E. heterophylla*. Furthermore, important biological activities related to those compounds could contribute to justify the medicinal use of *E. heterophylla* by some populations.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Eduardo M. B. da Silva, Francisco Santos, Maria Cristina H. P. Lima and Elimar Brand (*in memoriam*) from Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais Walter B. Mors, UFRJ for obtaining the spectra, Dr. Luci de Senna Valle and Dr. Arline Souza Oliveira from Departamento de Botânica of the Museu Nacional do Rio de Janeiro, UFRJ for help in identifying the plant material and CNPq, FINEP and FUJB Brazil for financial support.

## References

1. The Plant List. Version 1.1. Published on the Internet. Accessed on: Feb 23, 2019. [\[Link\]](#).

2. Cruz GL. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. 5<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil; 1995. ISBN: 9788528602609.
3. Babili FE, Moulis C, Bon M, Respaud M-J, Fourasté I. Three furano-diterpenes from the bark of *Croton campestris*. **Phytochemistry**. 1998; 48(1):165-169. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)].
4. Rizzini CT, Mors WB. **Botânica Econômica Brasileira**. 2<sup>nd</sup> ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural; 1995. ISBN: 9788586742187.
5. Hawash SI, Abdel Kader E, El Diwani G. Biodiesel production from *Jatropha* seeds using heterogeneous integrated extraction reaction process. **Afinidad**. 2015; 72:150-154. ISSN: 2339-9686. [[Link](#)].
6. Kumar S, Malhotra R, Kumar D. *Euphorbia hirta*: Its chemistry, traditional and medicinal uses, and pharmacological activities. **Pharmacog Rev**. 2010; 4(7):58-61. ISSN: 0976-2787. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
7. Wilson AK. *Euphorbia heterophylla*: A review of distribution, importance and control. **Trop Pest Manag** 1981; 27(1):32-38. ISSN: 13665863. [[CrossRef](#)].
8. Lorenzi H. **Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas: Plantio Direto e Convencional**. 4<sup>a</sup> ed. Nova Odessa: Plantarum. 1994. ISBN: 9788586714450.
9. Nalule AS, Mbaria JM, Kimenju W. *In vitro* anthelmintic potential and phytochemical composition of ethanolic and water crude extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn. **J Med Plants Res**. 2013; 7(43):3202-3210. ISSN: 1996-0875. [[CrossRef](#)][[Link](#)].
10. El-Emary NA, Makboul MA, Abdel-Hafiz MA, Farag SF. Phytochemical study of *Euphorbia heterophylla* L. cultivated in Egypt. **B Pharm Sci, Assiut Univ**. 1990; 13:51-58. ISSN: 1110-0052.
11. Tiwari KP, Kumar P, Minocha PK, Massod M. Chemical constituents of *Euphorbia heterophylla* Linn. and *Euphorbia parviflora*. **Proc Natl Acad Sci, India, Sect. A Phys Sci**. 1981; 51:213-214. ISSN: 0369-8203.
12. Wagner H, Bladt S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Analysis Atlas**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 1991. ISBN: 0-387-13195-7.
13. Yoshida T, Itoh H, Matsunaga S, Tanaka R, Okuda T. Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants. IX. Hydrolyzable tannins with <sup>1</sup>C<sub>4</sub> glucose core from *Phyllanthus flexuosus* Muell. Arg. **Chem Pharm Bull**. 1992; 40(1):53-60. ISSN: 0009-2363. [[CrossRef](#)][[Link](#)].
14. Bate-Smith EC. Detection and determination of ellagitannins. **Phytochemistry**. 1972; 11(3):1153-1156. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)].
15. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Kinneary JF. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 12<sup>th</sup> ed. New Jersey: Merck & Co; 1996. ISBN: 0911910-12-3.
16. Yoshida T, Namba O, Chen L, Liu Y, Okuda T. Ellagitannins monomers and oligomers from *Euphorbia prostrata* Ait. and oligomers from *Loropetalum chinense* Oliv. **Chem Pharm Bull**. 1990; 38(12):3296-3302. ISSN: 0009-2363. [[CrossRef](#)][[Link](#)].

17. Markham KR, Chari VM, Mabry TJ. **Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids**. In: Harborne, JB, Mabry, TJ, editors. The flavonoids - Advances in Research. Authors, London: Chapman & Hall; 1982. Chapter Two. p. 19-134. ISBN-13:978-0-412-22480-5.
18. Agrawal PK. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. In: Studies in Inorganic Chemistry. 1<sup>st</sup> ed. Vol. 39. Amsterdam: Elsevier Science; 1989. ISBN: 9781483290744.
19. Almeida AP, Miranda MMFS, Simoni IC, Wigg MD, Lagrota MHC, Costa SS. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. **Phytother Res**. 1998; 12(8):562-567. ISSN: 0951-418X. [[CrossRef](#)]
20. Prasain JK, Barnes S. **Uptake and Metabolism of Dietary Proanthocyanidins**. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editors. Polyphenols in human health and disease. San Diego: Academic Press. 2013. Chapter 41. p. 553–560. ISBN: 9780123984678.
21. Seleen D, Pardi V, Murata RM. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. **Arch Oral Biol**. 2017; 76:76-83. ISSN: 0003-9969. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
22. Hahn R, Nahrstedt A. Hydroxycinnamic acid derivatives, caffeoylmalic and caffeoylaldonic acid esters, from *Chelidonium majus*. **Planta Med**. 1993; 59(1):71-75. ISSN: 0032-0943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
23. Steck W, Mazurek M. Identification of natural coumarins by NMR spectroscopy. **Lloydia**. 1972; 35(4):418-439. ISSN: 0163-3864. [[PubMed](#)].
24. Magnani C, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN. Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics. **Anal Methods**. 2014; 6:3203-3210. ISSN: 1759-9679. [[CrossRef](#)].
25. Liang C, Ju W, Pei S, Tang Y, Xiao Y. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: A mini-review. **Molecules**. 2017; 22(3):387. ISSN: 1420-3049. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
26. Tanaka T, Nonaka G-I, Nishioka I. Punicafolin, an ellagitannin from the leaves of *Punica granatum*. **Phytochemistry**. 1985; 24(9): 2075-2078. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)].
27. Berlinck RGS, Okuda T, Yoshida T, Hatano T. **Hydrolyzable Tannins and Related Polyphenols**. In: Herz W, Kirby W, Moore RE, Steglich W, Tamm C, editors. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. New York: Springer-Verlag; 1995. Vol. 66, p.1-117. ISBN: 978-3-7091-9363-1. [[CrossRef](#)].
28. Londhe JS, Devasagayam TPA, Foo LY, Shastry P, Ghaskadbi SS. Geraniin and amariin, ellagitannins from *Phyllanthus amarus*, protect liver cells against ethanol induced cytotoxicity. **Fitoterapia**. 2012; 83(8):1562-1568. ISSN: 0367-326X. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
29. Perera A, Ton SH, Palanisamy D. Perspectives on geraniin, a multifunctional natural bioactive compound. **Trends Food Sci Technol**. 2015; 44(2):243-257. ISSN: 0924-2244. [[CrossRef](#)]
30. Foo LY, Wong H, Phyllantusiin D. An unusual hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**. 1992; 31(2):711-713. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)].

31. Londhe JS, Devasagayam TPA, Foo LY, Ghaskadbi SS. Antioxidant activity of some polyphenol constituents of the medicinal plant *Phyllanthus amarus* Linn. **Redox Rep.** 2008; 13(5):199-207. ISSN: 1351-0002. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
32. Zhang J, Li L, Kim S-H, Hagerman AE, Lü J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. **Pharm Res.** 2009; 26(9):2066-2080. ISSN: 0724-8741. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
33. Sancheti S, Sancheti S, Um B-H, Seo S-Y. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. **S Afr J Bot.** 2010; 76(2):285-288. ISSN: 0254-6299. [[CrossRef](#)]
34. Santos RT, Hiramoto LL, Lago JHG, Sartorelli P, Tempone AG, Pinto EG, et al. Anti-trypanosomal activity of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiaceae). **Quim Nova.** 2012; 35(11):2229-2232. ISSN: 1678-7064. [[CrossRef](#)].

---

**Histórico do artigo | Submissão:** 14/11/2018 | **Aceite:** 14/03/2019 | **Publicação:** 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Tostes JBF, Silva AJR, Kuster RM. Isolation and characterization of polyphenols from *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae) leaves. **Revista Fitos.** Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 49-60. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/696>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.



# Multiplicação da planta medicinal *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura

*Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) medicinal plant multiplication in culture medium

DOI 10.17648/2446-4775.2019.671

**Carneiro, Maurízia Fátima<sup>1</sup>; Duarte, Edson Ferreira<sup>2</sup>; Vargas, Laureano Magno<sup>1</sup>; Sibov, Sérgio Tadeu<sup>2</sup>; Conceição, Edemilson Cardoso da<sup>3</sup>; Nogueira, João Carlos Mohn<sup>4</sup>.**

<sup>1</sup>Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária/ Estação Experimental Nativas do Cerrado, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal. Rua R2, 1328, Chácara Califórnia, CEP: 74690-815, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Samambaia, Av. Esperança s/n. CEP: 74690-900, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Av. Universitária com 5ª Avenida s/n, Setor Leste Universitário, CEP: 74605-220, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Estadual de Goiás, Campus Palmeiras, Rua S-7, S/Nº, Setor Sul, CEP: 76190-000. Palmeiras de Goiás, GO.

\*Correspondência: [maurizia@emater.go.gov.br](mailto:maurizia@emater.go.gov.br)

## Resumo

Diante da importância da mama-cadela no tratamento do vitiligo, este estudo teve como objetivo aprimorar técnicas de micropropagação para a produção *in vitro* a partir de sementes e segmentos nodais. Plant Preservative Mixture (PPM) e Hipoclorito de Sódio, em diferentes concentrações, foram usados para desinfestação de segmentos nodais e sementes. As sementes com tegumento, sem tegumento e eixo epicótilo-radícula foram testadas em meio 1/2 Murashige e Skoog (MS) para determinar a germinação. Para a multiplicação e enraizamento foram usados segmentos nodais axênicos jovens e/ou lignificados, em meio 1/2 MS contendo diferentes concentrações de citocininas e auxinas. Constatou-se que o PPM a 4,0 e 5,0 mL.L<sup>-1</sup> proporcionou os menores graus de contaminação, enquanto o hipoclorito não se mostrou efetivo. As sementes sem tegumento apresentaram 100% de germinação. Plântulas jovens cultivadas em meio 1/2 MS com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP produziram maior número de brotos, mas estes não apresentaram um crescimento adequado. O melhor crescimento de brotos e raízes foi obtido quando se usaram segmentos nodais lignificados em meio 1/2 MS com BAP, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA. O maior potencial de multiplicação ocorreu para sementes sem tegumento e com segmentos nodais lignificados.

**Palavras-chave:** Mama-cadela. Fitoterápico. Biotecnologia. Cultura de tecidos. Fitoreguladores.

## Abstract

Due mama-cadela importance to treatments against vitiligo, in this study the aim was to improve micropropagation techniques to *in vitro* propagation with seeds and nodal segments. Plant Preservative Mixtures (PPM) and Sodium hypochlorite in different concentrations were used to disinfection of nodal segments and seeds. Seeds with and without tegument and epicotyl-radicle axis were tested in 1/2 Murashige & Skoog (MS) medium to determine the germination. For multiplication and rooting, youths and lignified axenic nodal segments was used in 1/2 MS medium with different cytokinins and auxins concentrations. The PPM at 4.0 and 5.0 mL.L<sup>-1</sup> proportioned lower contaminations levels, but the hypochlorite was not effective. The seeds without tegument showed 100% of germination. Young plants cultivated in 1/2 MS with BAP 1.0 mg.L<sup>-1</sup> showed higher numbers of shoots, but it did not grow properly, however the better grow of shoots and roots was obtained when was used nodal segments lignified in 1/2 MS with BAP and AIA at 1.0 mg.L<sup>-1</sup> and 2.0 mg.L<sup>-1</sup>. The higher potential of multiplication occur to seeds without tegument and with nodal lignified segments.

**Keywords:** Mama-cadela. Phytotherapeutic. Biotechnology. Tissue culture. Phyto regulators.

---

## Introdução

*Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae) é encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, conhecida vulgarmente como mama-cadela, mamica-de-cadela, conduru e inharé<sup>[1]</sup> entre outros nomes populares. Estudos fitoquímicos realizados<sup>[2]</sup> indicam a presença de psoralenos e bergaptenos, pertencentes a classe das furanocumarinas, em todas as partes do vegetal, com predominância no córtex da raiz. Essas substâncias são usadas para o tratamento do Vitiligo e outras enfermidades, através de aplicação tópica e ingestão do medicamento<sup>[3-9]</sup>.

A demanda por estes fármacos é considerada grande, e a sua obtenção se dá pela retirada de parte ou até mesmo pela coleta da planta inteira pelas populações locais e também por laboratórios farmacêuticos. Esta prática extrativista vem, ao longo do tempo, diminuindo o número de plantas de mama-cadela na natureza<sup>[6-10]</sup>. Outro fator é a sua inserção no cerrado, que está em constante mudança pela expansão da fronteira agrícola e por queimadas naturais, podendo levá-la à extinção nesse domínio fitogeográfico, assim como nos outros em que a espécie ocorre. Estudos sobre a conservação e propagação desta espécie ajudam a minimizar a perda da biodiversidade e a sua manutenção na natureza<sup>[8]</sup>.

Os métodos usuais para obtenção de mudas de espécies nativas são por sementes, estaquia, borbulhia e micropropagação. A micropropagação é uma ferramenta bastante significativa para acelerar a multiplicação e produção de número considerável de novos indivíduos, bem como para propagar espécies de difícil multiplicação obtendo mudas selecionadas, sadias, livre de fungos, vírus, bactérias e com alta qualidade genética<sup>[11-13]</sup>. A dificuldade desta técnica está na taxa de multiplicação *in vitro* não apresentar resultados satisfatórios, principalmente quando as sementes são recalcitrantes, apresentarem baixa longevidade e alto índice de contaminação endógena<sup>[5,14]</sup>.

Existem vários protocolos que foram estudados para diversas espécies vegetais, porém o sucesso do procedimento não depende só do protocolo, mas sim de alguns fatores importantes, como o tamanho de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz,

explante no momento da coleta e a época da coleta<sup>[15,16,13]</sup>. Neste sentido, estudos de germinação de sementes e propagação por brotações *in vitro*, se tornam tão importantes<sup>[14]</sup>.

Embora existam meios de cultura específicos para espécies arbóreas, o mais usual na multiplicação *in vitro* da mama-cadela é o MS (Murashige e Skoog)<sup>[16]</sup>, que contém substâncias essenciais para o crescimento e o desenvolvimento dos explantes, que aliado ao balanço entre a citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) e as auxinas ANA (ácido naftalenoacético), AIB (Ácido indolil-3-butírico) e AIA (ácido indol-3-acético), promove uma maior taxa de multiplicação e enraizamento<sup>[17]</sup>. No entanto, as pesquisas já realizadas, para multiplicação *in vitro* de mama-cadela não conseguiram estabelecer um protocolo eficiente, principalmente por suas sementes e propágulos apresentarem um alto índice de contaminantes e o desenvolvimento das plântulas muito lento. Estes dois fatores têm impedido a obtenção de uma boa taxa de multiplicação e dificultado o processo de enraizamento das plântulas em laboratório<sup>[18,19,9]</sup>. Considera-se que as sementes de *B. gaudichaudii* são recalcitrantes, perdendo a sua viabilidade após secagem<sup>[9]</sup>. O objetivo deste trabalho foi contribuir para estabelecimento de um protocolo para a germinação, multiplicação e enraizamento de mama-cadela utilizando diferentes meios de cultura com concentrações variáveis de citocinina e de auxina.

## Material e métodos

Para a condução dos estudos sobre micropropagação de mama-cadela foram usados segmentos nodais de brotações jovens e sementes. As brotações foram obtidas de plantas de mama-cadela da área arborizada da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, no município de Goiânia, Goiás, no mês de outubro de 2017. As sementes foram obtidas de frutos coletados no município de Mairipotaba, localizado na Mesorregião Sul Goiano do estado de Goiás, situado na latitude S17°12'13", longitude W49°33'53,8" e altitude de 657 m. Os frutos foram colhidos no mês de setembro de 2016. Para a multiplicação e enraizamento *in vitro*, foram usados segmentos nodais axicênicos de plântulas de laboratório em diferentes estágios de lignificação.

O trabalho de micropropagação foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Emater, localizado na Estação Experimental Nativas do Cerrado, em Goiânia, Goiás.

Utilizaram-se os meios de cultura MS - Murashige e Skoog e WPM - Wood Plant Medium em diferentes concentrações, de acordo com os objetivos desejados. O meio MS foi suplementado com 6,5 g de ágar, 30 g de sacarose e o pH aferido para 5,7-5,8. No meio WPM, somente a sacarose foi alterada para 20 g. Os meios após serem distribuídos em recipientes de vidro de 250 mL e, ou tubos de ensaios de 16 cm x 2,5 cm foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C. Após o estabelecimento das sementes e/ou segmentos nodais, em câmara de fluxo laminar, os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , à temperatura de 25  $\pm$  1 °C e fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro).

## Experimentos de desinfestação química

Os segmentos nodais contendo gemas foliares, coletados no campo, passaram por processos de desinfestação química, conforme recomendação do fabricante do PPM - Plant Preservative Mixture<sup>®[20]</sup> em relação a coleta e descanso em laboratório e, em seguida, foram estabelecidos em meio de cultura 1/2 MS contendo diferentes concentrações do PPM<sup>®</sup>. Os segmentos uniformizados para 2,0 cm foram estabelecidos em tubos de ensaio com 20 mL do meio 1/2 MS e em diferentes concentrações de PPM (1,0;



2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL.L<sup>-1</sup>). Os seguimentos nodais foram inoculados de forma a estarem totalmente imersos no meio de cultura, sendo avaliados quanto ao desenvolvimento de contaminantes, por um período de 30 dias, com relação a: cor do segmento, cor da gema e ocorrência de brotações.

Sementes obtidas de frutos colhidos no ponto de maturação máxima, ou seja, com coloração alaranjada, foram lavadas em água corrente por 10 minutos e imersas em álcool 70% durante 1 minuto. Após a limpeza, estas foram usadas para teste de desinfestação, em concentrações diversas de hipoclorito (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 % de cloro ativo) e tempo de imersão de 10, 20 e 60 minutos e de 12 e 24 horas. Após aplicação dos tratamentos e em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e, em seguida, retirado o seu tegumento e então, inoculadas em frascos de vidro de 250 mL, com 40 mL do meio 1/2 MS, sem uso de fitoregulador. A avaliação da germinação foi feita aos seis dias, o número de sementes contaminadas por um período de 20 dias e o desenvolvimento das plântulas aos 60 dias conferindo o tamanho do broto, número de folhas e número de gemas.

### **Experimentos de germinação *in vitro***

Para estudos utilizando sementes, selecionou-se uma árvore que fosse representativa da espécie, e a coleta dos frutos foi realizada em uma sequência de três semanas consecutivas, sendo a primeira no dia 17 de setembro de 2016. Na primeira coleta, os frutos se apresentavam na cor verde com pequenos pontos alaranjados (de vez); na segunda coleta os frutos apresentavam cor amarelo–alaranjado (início de amadurecimento) e na terceira coleta os frutos apresentavam de cor alaranjada intensa (ponto máximo de maturação). Para os estudos de germinação e multiplicação foram usadas sementes de frutos da primeira coleta, no ponto de vez.

No laboratório, as sementes extraídas dos frutos, no ponto de vez, foram lavadas em água corrente por 10 minutos e em câmara de fluxo laminar, desinfestadas quimicamente com álcool etílico a 70% por 1 minuto, imersas por 30 minutos em solução de hipoclorito com 2,0% de cloro ativo e lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Em outro experimento, frascos de vidro contendo 40 mL do meio 1/2 MS receberam sementes de mamacadela com o tegumento, sem o tegumento e somente o ápice germinativo, para avaliar as variáveis germinação (%), tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG)<sup>[21]</sup>, por um período de 30 dias. Aos 60 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao número e tamanho dos brotos, número de gemas e tamanho da raiz, quando se retiraram os segmentos nodais para multiplicação. Em seguida, a planta base, contendo uma gema foliar, foi transplantada para o mesmo meio e mantidas por mais 60 dias, para rebrota, quando se avaliou o número de brotos, número de gemas e o tamanho do maior broto.

Para a germinação e crescimento *in vitro* da mamacadela, sementes com tegumento foram desinfestadas quimicamente e estabelecidas em frascos de vidro com 40 mL de meios MS na concentração normal (MS); metade da concentração salina (1/2 MS) e um terço da concentração salina (1/3 MS), e do meio WPM em concentração normal (WPM) e metade da concentração salina (1/2 WPM). A germinação da semente foi considerada quando se observou o crescimento do eixo epicótilo-radícula, com observações aos 20, 30 e 40 dias. Aos 140 dias aferiu-se o crescimento das plântulas através do número de brotos, número de gemas foliares e o tamanho do maior broto.

Avaliou-se também, a germinação de mama-cadela em diferentes índices de pH. As sementes sem tegumento provenientes da segunda coleta e que apresentavam cor amarelo-alaranjado, ou seja, no início do amadurecimento, foram desinfestadas quimicamente e inoculadas em recipientes de vidro contendo 40 mL de meio 1/2 MS com o pH ajustado para 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,0. Em cada tratamento utilizaram-se sementes com e sem o tegumento e a germinação (em %) foi considerada quando houve a formação de hipocótilo com radícula, observadas por um período de 30 dias.

### **Experimentos de multiplicação com reguladores de crescimento e origem dos explantes**

Na multiplicação e crescimento de mama-cadela foram utilizados segmentos nodais de 2,0 cm, contendo uma gema foliar. Os explantes foram retirados de plântulas de *B. gaudichaudii* axênicas com 60 dias no laboratório, onde foi feito um corte em bisel na sua base e, em seguida, estabelecidos em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio 1/2 MS acrescido de ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup> e BAP (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>). As avaliações do número de brotos gerados foram feitas aos 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 dias.

Os estudos de crescimento e enraizamento de mama-cadela deram-se com segmentos nodais de brotações mantidas em laboratório por 240 dias, que passaram por duas podas apicais que apresentavam lignificação. As brotações foram divididas em: parte basal, mediana e ápice caulinar contendo uma gema lateral. A parte basal foi caracterizada por apresentar as folhas totalmente expandidas; a parte mediana as folhas estando em processo de crescimento e o ápice caulinar (1º entrenó) com as folhas em início de desenvolvimento. Estes explantes foram estabelecidos em tubos de ensaio contendo 20 mL do meio 1/2 MS acrescido de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA). Após 45 dias avaliou-se o número de brotos, tamanho do maior broto, número de folhas, número de gemas, número de raiz e tamanho da maior raiz.

### **Análises estatísticas**

O delineamento experimental, para todos os experimentos, foi o inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada vidro e, ou tubo de ensaio, com um explante, uma repetição. Todos os dados obtidos para os diferentes ensaios foram submetidos à análise não paramétrica, com as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis em nível de 5% de significância<sup>[22]</sup>.

## **Resultados**

### **Desinfestação química**

O uso de PPM, em diferentes concentrações, para impedir o desenvolvimento de contaminantes no processo inicial do estabelecimento de segmentos nodais, colhidos no campo, não foi eficiente, com 100% de contaminação na concentração de 1,0 mL.L<sup>-1</sup> e, nas concentrações mais elevadas, o índice ficou em 30%. Ao final de 30 dias nenhum explante apresentou brotação e apresentavam cor preta indicando morte, provavelmente pela ação fitotóxica do produto sobre os segmentos nodais e as gemas da mama-cadela (TABELA 1).

**TABELA 1:** Efeito do *Plant Preservative Mixture*® (PPM) em diferentes concentrações, na porcentagem de descontaminação, brotação e aspecto dos segmentos nodais e gemas de (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae), aos 30 dias.

Tratamento	Contaminantes (%)	Brotação (%)	Segmentos de cor preta (%)	Gema de cor preta (%)
1/2 MS	100	0	0	0
1/2 MS + PPM 1,0 mL/L <sup>-1</sup>	100	0	0	0
1/2 MS + PPM 2,0mL/L <sup>-1</sup>	60	0	40	40
1/2 MS + PPM 3,0mL/L <sup>-1</sup>	70	0	30	30
1/2 MS + PPM 4,0mL/L <sup>-1</sup>	30	0	70	70
1/2 MS + PPM 5,0mL/L <sup>-1</sup>	30	0	70	70

A ação do hipoclorito de sódio como agente descontaminante de sementes de mama-cadela apresentou diferença significativa entre as várias concentrações de cloro ativo. A contaminação das sementes iniciou com 2 dias após o estabelecimento *in vitro* e com 20 dias a grande maioria apresentou 100% de contaminação (**TABELA 2**) e, portanto, não apresentaram crescimento de plântulas. As sementes que germinaram e não contaminaram somente os tratamentos, com 1,0% de cloro ativo com 20 minutos e 12 horas de imersão e 2% de cloro ativo e 1 hora de imersão, tiveram crescimento das plântulas, mas de forma não satisfatória, indicando o alto grau de contaminantes das sementes retiradas de frutos quando colhidos no ponto máximo de maturação.

**TABELA 2:** Germinação (Ger), Contaminação (%) e desempenho médio de plântulas de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc. - Moraceae) de frutos colhidos no ponto máximo de maturação, quando submetidas ao tratamento com Hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo (Cl) e tempo de imersão das sementes.

Tratamento	Germinação (%)	Contaminação (%)				Desenvolvimento		
	6 dias	2 dias	10 dias	20 dias	TB <sup>□</sup> (cm)	NF	NG	
1,0% Cl por 10 min	40,0 d	30,0 f	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
1,0% Cl por 20 min	10,0 f	40,0 e	80,0 c	80,0 c	0,6 c	0,8 a	0,6 b	
1,0% Cl por 01 hora	10,0 f	50,0 d	90,0 bc	90,0 bc	0,0 d	0,0d	0,0 c	
1,0% Cl por 12 horas	50,0 c	60,0 c	80,0 c	80,0 c	1,9 b	0,3c	0,5 b	
1,0% Cl por 24 horas	0,0 g	60,0 c	60,0 e	100,0 a	0,0 d	0,0d	0,0 c	
2,0% Cl por 10 min	10,0 f	50,0 d	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
2,0% Cl por 20 min	20,0 e	40,0 e	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
2,0% Cl por 01 hora	50,0 c	0,0 h	40,0 f	40,0 e	4,9 a	0,7b	1,5 a	
2,0% Cl por 12 horas	10,0 f	50,0 d	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
2,0% Cl por 24 horas	10,0 f	60,0 c	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 10 min	0,0 g	90,0 b	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 20 min	0,0 g	60,0 c	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 01 hora	10,0 f	90,0 b	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 12 horas	10,0 f	30,0 f	90,0 b	90,0 b	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 24 horas	10,0 f	40,0 e	90,0 b	90,0 b	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 10 min	60,0 b	100,0 a	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 20 min	0,0 g	30,0 f	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 01 hora	10,0 f	50,0 d	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 12 horas	100,0 a	20,0 g	70,0 d	70,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 24 horas	50,0 c	0,0 h	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

\*TB=Tamanho do Broto; NF=Número de Folhas; NG=Número de Gemas.

### Germinação de sementes *in vitro*

No experimento para verificação do efeito do tegumento na germinação da semente e no crescimento *in vitro* da mama-cadela foi possível observar o efeito positivo da remoção do tegumento (**TABELA 3**). As sementes sem o tegumento germinaram 100% até o 5º dia após o estabelecimento, e apresentaram um tempo médio de germinação (TMG) de 5 dias e índice de velocidade de germinação (IVG) igual a 2, ao passo que, as sementes com tegumento iniciaram o processo de germinação no décimo dia, e TMG de 12 dias e IVG de 0,46. Verifica-se, também, que a germinação das sementes com tegumento se deu ao longo do tempo atingindo 70% aos 30 dias, indicando que o tegumento se torna uma barreira, dificultando a uniformidade no processo germinativo.

**TABELA 3:** – Germinação média de sementes de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) com tegumento (SCT), sem tegumento (SST) e, somente, o ápice germinativo (AG) e o vigor representado pelo tempo médio de germinação (TMG) e pelo índice de velocidade de germinação (IVG), ao longo do tempo.

Tratamento	Germinação (%)						Vigor	
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	TMG	IVG
SCT	0,0 b	20,0 b	40,0 a	50,0 b	70,0 a	70,0 a	12a	0,46b
SST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	5b	2a
AG	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	5b	2a

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

O crescimento das plântulas (**TABELA 4**), considerando sementes com tegumento e sementes sem tegumento, diferiu estatisticamente entre si em relação ao número de brotos, tamanho do maior broto, número de gemas e número de raízes, destacando os melhores resultados quando usadas sementes sem tegumento. Enquanto os eixos embriários sem os cotilédones, apesar de germinarem tanto quanto aqueles que tiveram apenas a remoção do tegumento, mas apresentaram menor crescimento em razão da redução das reservas presentes nos cotilédones. Também verificou-se que as plantas, após a repicagem e mantidas por mais 60 dias em laboratório, apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e novamente as brotações advindas de sementes sem tegumento apresentaram os melhores resultados.

**TABELA 4:** Desempenho das plântulas de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) com tegumento (CT), sem tegumento (ST) e somente o ápice germinativo (AG), ao longo do tempo, em relação ao número de brotos (NB), tamanho do maior broto (TMB), número de gemas (NG) e número de raízes (NR).

Tratamentos	NB	TMB(cm)	NG	NR		NB	NG	TMB(cm)
	60 dias após germinação					Rebrota com 140 dias		
Semente com tegumento	0,7 c	4,4 c	4,6 b	0,6 c		1,0 c	0,9 b	3,3 b
Semente sem tegumento	3,3 a	14,2 a	7,5 a	1,0 b		3,1 a	2,1 a	7,0 a
Ápice germinativo	1,6 b	6,0 b	4,6 b	2,7 a		1,5 b	0,1 c	3,2 c

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

A germinação média das sementes com tegumento apresentou uma variação significativa entre os meios MS e WPM nas várias concentrações, por um período de 40 dias, sendo que a germinação mais efetiva foi para o meio WPM (100%). Apesar de a germinação apresentar-se acima de 70%, em todos os tratamentos, observou-se que a germinação das sementes e o crescimento das plântulas foram lentos, demonstrados pelos valores muito pequenos (<2,0) dos números de brotos e de gemas e pelo crescimento dos brotos (**TABELA 5**).

**TABELA 5:** Número total de brotos de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) ao longo do tempo, em diferentes concentrações de BAP, obtidos a partir de plântulas de 60 dias.

Tratamentos	Número de brotos						
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	60 dias
1/2 MS	0 d	1 d	2 c	4 c	4 d	4 d	7 d
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L	1 c	2 c	5 b	8 b	8 b	8 b	13 b
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 1,0 mg/L	4 a	5 b	8 a	10 a	10 a	10 a	20 a
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 2,0 mg/L	0 d	0 d	1 d	4 c	6 c	6 c	11 c
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 3,0 mg/L	2 b	6 a	8 a	8 b	8 b	8 b	14 b

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados em relação ao efeito do pH na germinação e crescimento *in vitro* de mama-cadela, evidenciaram diferenças significativas na germinação para as sementes com tegumento e sem tegumento. A germinação das sementes sem tegumento foi 100% em todos os pH testados, enquanto as sementes com tegumento tiveram os melhores resultados para o pH 4,5 e 5,5 com 90% germinação (TABELA 6). Também foi observado que a germinação das sementes com tegumento só iniciou a partir de 20 dias após o estabelecimento. O crescimento e o desenvolvimento das plântulas não ocorreram de forma uniforme, principalmente pela ação do pH e pelo desenvolvimento de microrganismos contaminantes, em todos os tratamentos, não sendo possível obter dados sobre as características dos brotos.

**TABELA 6:** Germinação média acumulada de sementes de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae), com tegumento (CT) e sem tegumento (ST), em diferentes pH, ao longo do tempo.

Tratamentos		Germinação (%)					
		5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias
pH 3,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	40,0 c	60,0 c	80,0 c
pH 3,5	ST	0,0 b	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
pH 4,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	70,0 b	90,0 b	90,0 b
pH 4,5	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
pH 5,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	30,0 d	60,0 c	90,0 b
pH 5,5	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
pH 6,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 e	30,0 d	50,0 d
pH 6,5	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
pH 7,0	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 e	0,0 e	50,0 d
pH 7,0	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

### Multiplicação com reguladores de crescimento e origem dos explantes

Os resultados da multiplicação e crescimento de mama-cadela por segmentos nodais podem ser conferidos na TABELA 7. Para a variável, quanto ao número de brotos, houve diferença significativa em função da concentração de BAP. Os melhores resultados foram para 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP que atingiu até 20 brotos por segmento nodal, aos 60 dias em laboratório. Também, verifica-se que a taxa mais alta de BAP (3,0 mg.L<sup>-1</sup>) equiparou-se aos resultados do tratamento com ausência deste regulador de crescimento.

**TABELA 7:** Número total de brotos de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) ao longo do tempo, sob diferentes concentrações de BAP, obtidos a partir de plântulas de 60 dias.

Tratamentos	Número de brotos						
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	60 dias
1/2 MS	0 d	1 d	2 c	4 c	4 d	4 d	7 d
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L	1 c	2 c	5 b	8 b	8 b	8 b	13 b
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 1,0 mg/L	4 a	5 b	8 a	10 a	10 a	10 a	20 a
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 2,0 mg/L	0 d	0 d	1 d	4 c	6 c	6 c	11 c
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 3,0 mg/L	2 b	6 a	8 a	8 b	8 b	8 b	14 b

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para as variáveis, de crescimento e enraizamento, foram observadas diferenças significativas entre a posição de retirada dos segmentos nodais da brotação (**TABELA 8**). O melhor crescimento ocorreu para os explantes retirados da parte basal da brotação, onde se verificou maior número de brotações, mais bem estruturadas e um maior tamanho de raízes. A parte apical da brotação destacou-se em relação ao número de folhas e número de raízes, fato que pode ser justificado por ser esta a parte de crescimento do broto, onde as folhas estão no início de desenvolvimento.

**TABELA 8:** Crescimento e enraizamento médio de explantes de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) aos 45 dias, em relação ao número de brotos (NB), tamanho do maior broto (TMB), número de folhas (NF), número de gemas (NG), número de raízes (NR) e tamanho da maior raiz (TMR) de segmentos nodais retirados da parte basal, mediana e apical da brotação de plântulas de laboratório.

Tratamentos	45 dias					
	NB	TMB (cm)	NF	NG	NR	TMR (cm)
Parte basal da brotação	1,7 a	3,4 a	2,2 b	2,2 a	3,6 a	2,6 a
Parte mediana da brotação	0,9 c	1,6 c	1,8 b	0,6 c	2,1 b	0,8 c
Parte apical da brotação	1,4 b	2,4 b	2,9 a	1,9 b	4,5 a	1,9 b

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

A idade do explante nodal se mostrou importante para o estabelecimento, multiplicação e enraizamento da nova plântula. Quando se usaram segmentos nodais de plântulas que estavam lignificadas, mantidas em laboratório por um período mais longo, em torno de 240 dias, foi possível verificar a emissão de brotos, folhas e raízes em menor espaço de tempo e a parte aérea da muda vigorosa. Em relação às raízes, observou-se que são formadas pelas raízes principal e secundária, no entanto, estas eram duras e quebradiças, soltando-se facilmente quando da retirada da muda do meio de cultura. Esta característica das raízes acabou inviabilizando o processo de aclimatização, pois a muda não tinha capacidade de absorção dos nutrientes necessários para o desenvolvimento.

## Discussão

O primeiro aspecto analisado nesse estudo foi a eficácia do PPM sobre a contaminação dos explantes, em que concentrações maiores que 4,0 mL.L<sup>-1</sup> evitaram a contaminação em mais de 70% dos explantes, contudo, os efeitos fitotóxicos do produto ficaram evidentes pela presença de segmentos nodais e gemas enegrecidos e pela ausência de brotação em todos os tratamentos. Estudos com PPM em segmentos de erva-mate

apresentaram sobrevivência<sup>[12]</sup>, no entanto, não foi possível a sua manutenção *in vitro*. Segundo o fabricante, o produto PPM apresenta um pH extremamente ácido (3,8) e que se decompõe em CO e CO<sub>2</sub><sup>[20]</sup>, o que em meio líquido pode acidificar mais pela formação de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Assim, as condições em que os segmentos nodais estavam podem ter se tornado ácidas, o que deve ter gerado efeitos nocivos sobre a capacidade de absorção de água e nutrientes, uma vez que sob pH ácidos as aquaporinas presentes nas membranas plasmáticas das células vegetais tem sua atividade interrompida, bem como a absorção de nutrientes é limitada. O que pode somar à menor disponibilidade de O<sub>2</sub> para a atividade respiratória nos segmentos nodais, pois o CO<sub>2</sub> apresenta maior difusividade em meio aquoso, sendo esses aspectos amplamente conhecidos em vegetais<sup>[23]</sup>. Adicionalmente sabe-se que, de modo geral, a capacidade de tamponamento de meios de cultura é baixa e pode variar ao longo do cultivo, conforme foi demonstrado no cultivo de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em que houve acidificação ao longo do tempo<sup>[24]</sup>. A causa da fitotoxidez observada nos segmentos nodais de mama-cadela pode estar relacionada aos aspectos descritos anteriormente, uma vez que os segmentos nodais ficaram totalmente imersos no meio de cultura. Mas, também revelam certa sensibilidade da espécie às variações no pH durante a micropropagação.

As variações no pH também puderam ser observadas na germinação das sementes, sendo verificado que sob pH mais baixos (3,5) ou mais altos (6,5 e 7,0) houve retardo e/ou redução na germinação das sementes com tegumento, o que também pode ser associado à absorção de água e/ou nutrientes na membrana plasmática de raízes geradas a partir de sementes intactas.

Outros aspectos tem sido observados em experimentos de micropropagação de mama-cadela, como a ocorrência de contaminações que inviabilizaram a avaliação do crescimento<sup>[18,5,19]</sup>. Apesar o meio WPM ter proporcionado a maior germinação em mama-cadela, em outro trabalho<sup>[19]</sup> os autores verificaram que o meio 1/2 MS promoveu um melhor desenvolvimento para as mesmas variáveis avaliadas no presente trabalho, o que sinaliza o efeito positivo desse meio no crescimento dos brotos de outras espécies e de mama-cadela.

Quando avaliados os efeitos da presença/ausência do tegumento, além dos efeitos na germinação e as diferenças no crescimento de brotos, as sementes foram estabelecidas sem o tegumento e foram observadas, também, em relação ao seu aspecto e vigor, indicando que para a multiplicação *in vitro* deve-se retirar o tegumento da semente de mama-cadela. Este fato também foi relatado em outro estudo<sup>[19]</sup>, em que a obtenção de melhores resultados foram obtidos quando usadas as sementes sem tegumento para a multiplicação *in vitro* da mama-cadela. As diferenças encontradas no crescimento das plântulas advindas de sementes sem tegumento, e somente com o eixo embrionário, são devidas às limitações oferecidas pelo tegumento e à quantidade de reserva de nutrientes encontrados nos cotilédones da semente. Esta reserva é composta de amido, proteína e lipídeo, que ajuda na manutenção da plântula até a completa formação de suas raízes<sup>[3]</sup>.

O uso de reguladores de crescimento em experimentos com mama-cadela tem demonstrado efeitos distintos. No presente estudo os melhores resultados de multiplicação foram obtidos com 0,3 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e, também, foram obtidos<sup>[11]</sup> resultados melhores em menores concentrações de reguladores de crescimento, indicando uma tendência na diminuição destes, em meio de cultura<sup>[11]</sup>. Apesar de a mama-cadela apresentar uma boa taxa de multiplicação, isto não significa uma boa produção de mudas viáveis em laboratório, pois os explantes multiplicaram, mas não tiveram um crescimento adequado, não alongaram e não enraizaram por um período de 120 dias. Os resultados das pesquisas de multiplicação de mama-cadela em cultura de tecidos são conflitivos e não conclusivos, em relação à possibilidade de produção de mudas viáveis<sup>[18,5,19]</sup>.

Quanto ao fato das brotações basais de mama-cadela apresentarem melhor desempenho que as medianas e apicais no cultivo *in vitro*, isso possivelmente deve-se à maior acumulação de auxinas naturais nessa região dos explantes, uma vez que são produzidas nos ápices e são transportadas basipetalmente. E como elas apresentam efeitos positivos sobre o enraizamento nas regiões proximais<sup>(24)</sup>, a absorção de água, nutrientes e o crescimento global dos segmentos nodais dessa região devem ter sido afetados positivamente.

## Conclusão

O PPM e o hipoclorito em diversas concentrações e tempo de imersão, não se mostraram eficientes por promoverem fitotoxicidade ou possibilitar o desenvolvimento de contaminações. O tegumento afeta o vigor, o grau de multiplicação e de crescimento das brotações em explantes obtidos de sementes de mama-cadela, comprovando que este é um limitador a germinação uniforme *in vitro*.

O pH afeta a geminação *in vitro* de sementes de mama-cadela, sendo recomendado que esteja entre 4,5 e 6,5 para sementes sem tegumento.

O meio 1/2 MS é mais eficiente na multiplicação da mama-cadela, sendo que o meio de cultura 1/2 MS com 1,0 mg/L<sup>-1</sup> de BAP mostrou-se eficiente para a multiplicação *in vitro*. Os segmentos axênicos e lignificados promovem melhor crescimento das brotações e enraizamento.

Com os resultados obtidos com este estudo, sugere-se que os trabalhos devam continuar, pois a produção de mudas de mama-cadela em cultura de tecidos mostrou-se viável, desde que se façam alguns ajustes na metodologia em relação à concentração dos fitoreguladores para a produção de maior número de raízes e formação de mudas viáveis.

## Referências

1. Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. [\[Link\]](#). Acesso em: 19 Jul. 2018.
2. Pozetti GL. *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae): da planta ao medicamento. **Rev Cien Farm Bas Apl**. 2005; 26 (3): 159-166. ISSN: 1808-4532. [\[Link\]](#).
3. Jacomassi E, Moscheta IS, Machado SR. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul, **Acta Bot Bras**. 2007; 21 (3): 575-597. ISSN: 1677-941X. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).
4. Jacomassi E, Moscheta IS, Machado SR. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). **Rev Bras Bot**. 2010; 33 (1): 115-129. ISSN: 0100-8404. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
5. Lima MR, Santos PDA, Silveira CES, Palhares D, Pereira LAR. Cultivo *in vitro* de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). **Rev Bras Plan Med**. 2014; 16 (2): 462-466. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
6. Silva DB, Bucher JP, Melo DMP, Agostini-Costa TS. *Brosimum gaudichaudii* Mamacadela. In: Vieira RF, Camillo J, Coradin L. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial**:



**Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste.** MMA, Brasília. 2016 (Capítulo 5 – Medicinais). ISBN: 978-85-7738-309-2. [\[Link\]](#).

7. Viu AFM, Costa EA, Viu MAO, Silva JF, Campos LZO. Avaliação do Efeito de Diferentes Substratos Sobre a Germinação e o Crescimento de Plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela), **Rev Bras Bioc.** 2007; 5 (Supl.2): 960-962. ISSN: 1679-2343. [\[Link\]](#).

8. Faria RAPG, Coelho MFB, Martinez ME, Azevedo RAB. Uso de um modelo matemático no estudo do desenvolvimento de mudas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. **Rev Verde Agro Desenv Sustent.** Mossoró. 2011; 6 (5- Ed. Esp.): 54-60. ISSN: 1981-8203. [\[Link\]](#).

9. Silva DB, Vieira RF, Cordeiro MCT, Pereira EBC, Pereira AV. Propagação vegetativa de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela) por estacas de raízes. **Rev Bras Plan Med.** 2011; 13 (2): 151-156. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).

10. Bárbara EPS, Silva AA, Souza MMOR, Gurgel ZER, Marchi MNG, Bellintani MC. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia.** UFPB. 2015; 9 (2): 91-96. ISSN: 1981-1268. [\[Link\]](#).

11. Chaves AC, Schuch MW, Erig AC. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Cienc Agrotec.** 2005; 29 (6): 1281-1287. ISSN: 1981-1829. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).

12. Dutra LF, Hansel FA, Wendling L. **Introdução ao cultivo in vitro de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).** 2008. Colombo: Embrapa Florestas - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 38 (INFOTECA-E) ISSN: 1983-2605. [\[Link\]](#).

13. Oliveira LS, Dias PCD, Brondani GE. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesq Flor Bras.** Embrapa. 2013; 33 (76): 439-453. ISSN: 1983-2605. [\[Link\]](#).

14. Alencar DRC. Calogênese e regeneração *in vitro* de brotos a partir de raiz, entrenó e disco foliares de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). **Rev Elet Bot.** PUC/SP. 2015; 8(3): 288-298. ISSN: 1983-7682. [\[Link\]](#).

15. Gomes LZ. **Propagação in vitro e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae).** Brasília, 95p. Dissertação de Mestrado [Instituto de Ciências Biológicas], Universidade de Brasília, 2008. ISSN: 0102-6992. [\[Link\]](#).

16. Moraes TP, Silva SM, Luz JMQ, Silva AS. Applications of tissue culture in medicinal plants. **Rev Bras Plan Med.** 2012; 14 (1):110-121. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#).

17. Diniz JDN, Almeida JL, Oliveira AB, Vidal FR. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de Minirosa. **Rev Cien Agron.** Centro de Ciências Agrárias. UFC. 2014; 45(1): 68-73. ISSN: 1806-6690. [\[CrossRef\]](#).

18. Fidelis I, Pinto JBP, Castro EM, Souza AV, Lameira AO, Santiago EA, et al. Cultivo *in vitro* da planta medicinal mama-cadela. **Hortic Bras.** 2000; 18(Supl.):885-886. ISSN. [\[Link\]](#).

19. Souza AV, Pinto JEBP, Fidelis I, Lameira AO, Silva G, Santiago EA. Germinação de embrião de mamacadela “*in vitro*”. **Hortic Bras**. 2000; 18(Supl.):886-887. ISSN: 0102-0536. [Link]
20. PPM™ – **Plant Preservative Mixture**. Plant Cell Technology. [Link]. Acesso em: 20 jul 2018.
21. Santana DG, Ranal MA. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Ed. Universidade de Brasília, Brasília. 2004. 248p. ISBN: 8523007911.
22. Pimentel-Gomes F. **Curso de estatística experimental**. 14ª ed., USP/ESALQ, Piracicaba. 2000. 477p. ISBN: 978-85-7133-055-9.
23. Nicoloso FT, Ferrão GE, Castro GY. pH do meio de cultura e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Cien Rural**. 2008; 38(7): 2059-2062. ISSN: 1678-4596. [CossRef].
24. Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª ed. Artmed, Porto Alegre. 2017. 860p. ISBN: 9788582713662.

---

**Histórico do artigo | Submissão:** 17/09/2018 | **Aceite:** 11/03/2019 | **Publicação:** 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Carneiro MF, Duarte EF, Vargas LM, Sibov ST, Conceição EC, Nogueira JCM. Multiplicação da planta medicinal *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 61-73. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/671>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.



# Intensificação de processos e química verde: importância para as indústrias farmacêutica, cosméticos, alimentícia e biorrefinarias

Process intensification and green chemistry: importance for the pharmaceutical, cosmetic, food and biorrefineries industries

DOI 10.17648/2446-4775.2019.704

---

Coutinho, Paulo Luiz de Andrade<sup>1\*</sup>; Bastos, João Bruno Valentim<sup>1,2</sup>; Alijó, Pedro Henrique Rodrigues<sup>3</sup>; Goulart, Adriana Karla<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos, SENAI CETIQT, Rua Magalhães Castro, 174, Riachuelo, CEP: 20961-020, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Ilha do Fundão, CEP: 21941-909, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, CEP: 20550-900, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

\*Correspondência: [pcoutinho@cetiqt.senai.br](mailto:pcoutinho@cetiqt.senai.br)

---

## Resumo

O conceito de intensificação de processos (PI - do inglês, *process intensification*) foi inicialmente colocado visando minimizar os custos operacionais e de capital sem comprometer as metas de produção, através apenas da redução na escala. Os benefícios associados incluem alguns princípios da Química Verde, como a segurança intrínseca, baixo impacto ambiental e o menor consumo material, energético e hídrico. Entretanto, para alcançar drásticas reduções de tamanho são necessárias novas abordagens para o projeto dos equipamentos e processos. Os riscos associados à falta de regulamentação e de um histórico que comprove a eficácia e baixos índices de falhas têm comprometido a aceitação destas tecnologias pelo mercado. Ademais, muitas soluções em infraestrutura e no modelo conceitual dos processos intensivos ainda são necessárias para torná-los mais eficientes, flexíveis e verdes. A superação dessas barreiras permitirá que o Brasil estruture um modelo econômico altamente competitivo, baseado na comercialização de produtos de origem biológica. Dessa forma, o principal objetivo do artigo é descrever a importância da inclusão da PI na política de pesquisa, desenvolvimento e inovação nacional. Com isso, espera-se favorecer a diversificação da indústria farmacêutica, de química fina, de alimentos, e de outras indústrias de base biológica, bem como a estruturação das biorrefinarias a longo prazo.

**Palavras-chave:** Intensificação de Processos. Química Verde. Indústria de base biológica. Biorrefinaria. Química Sustentável.

## Abstract

The concept of process intensification (PI) was initially aimed at minimizing operational and capital costs without compromising production targets by reducing the scale of processes. The associated benefits also include some principles of Green Chemistry, such as intrinsic safety, low environmental impact and lower material, energy and water consumption. However, in order to achieve drastic size reductions, new approaches to the design of equipment and processes are needed. The risks associated with a lack of regulation and a track record of efficiency and low failure rates have compromised the market's acceptance of these technologies. Moreover, many infrastructure solutions and the conceptual model of the intensive processes are still needed to make them more efficient, flexible and green. Overcoming these barriers will allow Brazil to structure a highly competitive economic model, based on the commercialization of biobased products. Thus, the main objective of this article is to describe the importance of the inclusion of IP in national research, development and innovation policy. Therefore, one expects to favor the diversification of the pharmaceutical industry, fine chemicals, food, and others biobased industries, as well as the structuring of biorefineries in the long term.

**Keywords:** Process Intensification. Green Chemistry. Biobased industry. Biorefinery. Sustainable Chemistry.

---

## Introdução

O atual modelo da economia mundial baseado em recursos fósseis, sobretudo petróleo, vem sendo desafiado pelo espectro da escassez e oscilações no preço de óleo, devido a fatores políticos, restrições ambientais e a crescente demanda por produtos sustentáveis. Este cenário estimula a emergência da chamada indústria sustentável - em especial as que utilizam matérias-primas renováveis (MPRs) - e, conseqüentemente, da bioeconomia<sup>[1,2]</sup>.

A bioeconomia é definida<sup>[3]</sup> como sendo a transição da indústria global rumo a sustentabilidade, utilizando recursos renováveis terrestres e aquáticos para produção de energia, intermediários e produtos finais e, assim, gerar benefícios econômicos, ambientais, sociais e de segurança nacional. O desenvolvimento da bioeconomia está sendo tratado por governos ao redor do mundo como uma oportunidade de transformar seus mercados, criar postos de trabalho em zonas rurais e melhorar o desempenho ambiental de suas economias. Para impulsionar esta nova indústria é fundamental a criação de programas de incentivo ao consumo de bioprodutos, a exemplo do *BioPreferred Program* nos Estados Unidos. Neste, o próprio Governo Federal impulsiona esta nova indústria ao direcionar parte de um orçamento anual de 445 bilhões de dólares para compras de bens e serviços com algum grau de conteúdo biotecnológico<sup>[3]</sup>.

Países emergentes, sobretudo os que possuem disponibilidade de biomassa como o Brasil, também veem na bioeconomia uma ótima oportunidade para se desenvolverem. A título de exemplo, um estudo do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos<sup>[4]</sup> do governo brasileiro aponta a bioeconomia e a inovação química como saídas para o agronegócio agregar valor às MPRs, permitindo assim, que a economia de exportação de *commodities* migre para a de produtos inovadores com alto valor agregado. Já o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) publicou um estudo apontando os produtos químicos de origem renovável como sendo uma das principais fontes para diversificação da indústria química brasileira<sup>[5]</sup>.

No cerne da bioeconomia dois conceitos são particularmente importantes: a *Química Verde* e a *Biorrefinaria*. Uma das principais áreas de interesse dentro da Química Verde é o desenvolvimento de tecnologias que utilizem MPRs<sup>[1]</sup>. Tais tecnologias estariam reunidas em uma Biorrefinaria, que pode ser compreendida como sendo uma instalação que integra os processos e equipamentos de conversão da biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir desta, maximizando seu valor e minimizando os resíduos<sup>[3,1]</sup>.

Entretanto, o modelo atual da indústria de processos químicos (baseado no princípio da mega-escala) e suas tradicionais tecnologias não são capazes de atender de maneira plena a aplicação dos princípios da química verde. A conversão de biomassa em produtos químicos também encontra barreiras de escala e desafios tecnológicos que testam a viabilidade das unidades de biorrefino. A Intensificação de Processos, principalmente quando associada à Química Verde, é uma alternativa promissora para lidar de forma efetiva com tais desafios<sup>[6]</sup>.

Embora tal vertente surja de forma recorrente na literatura técnica/científica internacional, ainda é incipiente no Brasil. Neste sentido, serão apresentados os conceitos, as aplicações industriais e a relação entre a Intensificação de Processos e a Química Verde. O objetivo do artigo é alertar sobre a importância da inclusão do tema *intensificação de processo* na agenda de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) da academia, indústria e governo nacional.

## Química verde

A Química Verde pode ser definida como o desenvolvimento de produtos e processos químicos que visam a redução e a eliminação do uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente<sup>[7]</sup>.

A aplicação de práticas mais sustentáveis e seguras pela indústria química foi proposta inicialmente nos anos 1990. O conceito surgiu como uma resposta às consequências negativas de grandes acidentes químicos (como, por exemplo, o desastre de Bhopal, na Índia) e da contaminação por medicamentos (talidomida) e defensivos químicos (agente laranja). Em seguida, foi ampliado em nível mundial pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC) e pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE).

Hoje, as mudanças de paradigmas propostas por diversas organizações governamentais estão associadas: à necessidade de reverter os impactos na economia global da ação humana sobre os fenômenos climáticos e a poluição ambiental, assim como à diminuição progressiva das fontes fósseis de energia, dos recursos hídricos e da produção de alimentos. Tais fatores têm motivado o racionamento da água, da energia, dos insumos químicos e dos recursos naturais nos processos de transformação industrial<sup>[8]</sup>.

A procura por tecnologias e produtos “verdes” (inovadores ou substitutos dos tradicionais não-renováveis) também tem sido impulsionada pelo crescente rigor das regulamentações de substâncias químicas industriais, como o REACH (do inglês *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*) da União Europeia e o Anteprojeto de Lei sancionado no Brasil em 2016<sup>[9,10]</sup>.

Muitos aspectos da indústria, da educação e da pesquisa científica em Química Verde no Brasil estão relacionados com a agricultura, ao extrativismo, aos alimentos e bebidas, o álcool e açúcar, o biodiesel, o

papel e a celulose, os cosméticos, os fármacos, entre outros importantes setores da base econômica nacional<sup>[11,12]</sup>. Entretanto, a inovação tecnológica em Química Verde iniciou-se no país apenas em 2010, duas décadas após a incorporação das suas diretrizes pela indústria estrangeira. As propostas foram idealizadas no estudo realizado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos<sup>[4]</sup> e ganharam destaque na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (Rio+20), realizada vinte anos após a elaboração da Agenda 21 na Rio-92<sup>[13]</sup>.

A potencial integração entre o agronegócio, seus setores correlatos e a indústria química nacional é uma das alternativas para: valorizar as *commodities* atualmente exportadas; o país assumir a liderança em tecnologias sustentáveis no mercado mundial; investir na infraestrutura como saída da crise econômica; e a implantação da bioeconomia. Os exemplos bem-sucedidos desta parceria no Brasil são a produção em larga escala de combustíveis e polímeros de origem biológica, tais como o bioetanol e o polietileno verde produzidos a partir da cana-de-açúcar e o biodiesel oriundo do óleo de soja<sup>[14,15,1,16]</sup>.

Além de fomentar as rotas de transformação das MPRs, os 12 princípios da Química Verde (**FIGURA 1**) são diretrizes e critérios que auxiliam a concepção e o desenvolvimento de produtos e processos químicos otimizados, simples, eficientes a nível molecular e, conseqüentemente, mais econômicos para a indústria química, aumentando a competitividade global desta. Adicionalmente, visam reciclar e reaproveitar recursos e eliminar o uso e a geração de químicos tóxicos e inflamáveis, ou seja, operar com tecnologias mais seguras e pouco poluentes ao longo de todo o ciclo de vida de produção (desde a origem da matéria-prima até o fim da vida útil)<sup>[17]</sup>.

As indústrias farmacêuticas e da química fina, por exemplo, ao contrário das petroquímicas, são as que mais apresentam perdas significativas de rendimento nas etapas de separação, baixa seletividade (em função da formação de coprodutos indesejados), predominância de processos em batelada e elevadas demandas de solventes para purificação, incluindo a energia para a recuperação destes<sup>[18]</sup>.

FIGURA 1 - Os doze princípios da química verde.



Fonte: adaptado de Anastas e Wagner (1998)<sup>[19]</sup>.

O “esverdeamento” e a solução dos entraves tecnológicos destas indústrias (e demais mercados que trabalham com material biológico) estão progredindo de forma independente e baseando-se em conhecimentos e infraestruturas existentes. A morosidade desta transição deve-se a pouca integração dos avanços de vários setores que trabalham com as metodologias sintéticas e áreas relacionadas (como a biomimética, a biotecnologia, os bioprocessos, as reações em cascata, a modelagem molecular, etc.). Os benefícios incluem<sup>[20,21]</sup>:

- a eficiência atômica;
- a preservação da saúde humana e do meio ambiente;
- a redução do número de etapas em uma síntese e, conseqüentemente, da complexidade dos projetos industriais;
- a menor pegada ambiental;

- a eficiência energética, hídrica e material (com o uso de processos de separação por membranas e de alto rendimento, cristalização de proteínas, extração aquosa de duas fases, etc.);
- a inibição da emissão de gases e da geração de poluentes e coprodutos;
- a minimização ou eliminação das etapas de separação e tratamento de efluentes e coprodutos;
- condições mais brandas de operação (aumenta a segurança e a economia de energia e reduz perdas materiais por degradação);
- os custos baixos de produção e capital.

Para torná-las mais verdes e eficientes, é preciso integrar essas tecnologias com os princípios de engenharia e de ciclo de vida. Para tanto, os processos biotecnológicos dependem de inúmeras frentes multidisciplinares de PD&I da Química Verde, tais como: a intensificação dos processos, a biologia sintética e molecular, solventes verdes, catalisadores, síntese orgânica, matérias-primas de base biológica/renováveis, toxicologia, segurança química, engenharia genética, polímeros, ferramentas experimentais, analíticas e de modelagem, etc. [22].

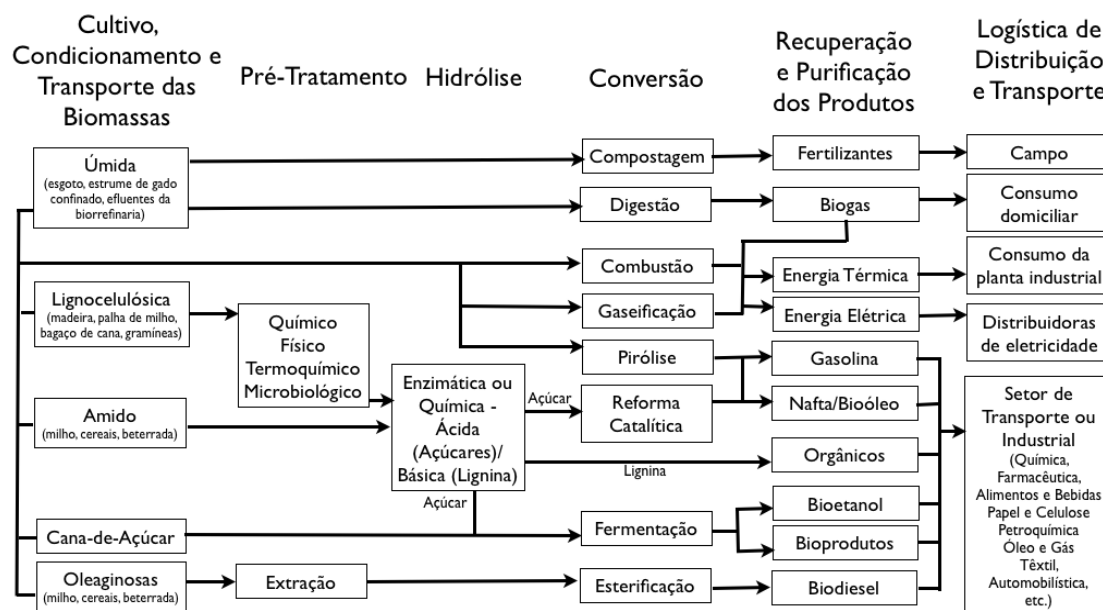
A aquisição de catalisadores e biocatalisadores multifuncionais é uma linha de pesquisa da Química Verde, cuja importância técnica e econômica foi inclusive reconhecida com a entrega do Prêmio Nobel em 2001 para Noyori e Knowles, para aplicação na indústria farmacêutica [23]. Já os fluidos iônicos, aquosos e em condições supercríticas (por exemplo, CO<sub>2</sub> supercrítico) são exemplos de solventes promissores para favorecer os fenômenos de transferência de massa e calor e combinar os processos de conversão e separação do produto. São amplamente utilizados em reações de hidrogenação, alquilação ou acilação de Friedel Crafts, hidroformilação e eterificação [24-27].

Outra frente de trabalho refere-se à viabilização de complexos enzimáticos e microrganismos para a desconstrução e conversão das biomassas em inúmeros produtos plataforma, em uma única etapa de alta eficiência [28-31]. A realização simultânea da sacarificação das matérias-primas vegetais e a fermentação dos seus açúcares em um mesmo reator exige a compatibilidade entre a temperatura, pH e as concentrações do substrato e dos produtos, a fim de evitar a desativação das enzimas e a inibição dos microrganismos [31]. Atualmente, o rendimento do produto e os custos energéticos da separação são favorecidos pela fermentação contínua ou pelo uso de técnicas de micro/ultrafiltração para reciclar açúcares e bioagentes [33,34]. A integração entre a fermentação e a separação contínua do produto é outro recurso usado para reduzir a inibição do crescimento microbológico, por meio da per-vaporação ou osmose reversa, extração líquido-líquido e *gas stripping* [35].

A evolução dos esforços em Química Verde conduzirá a estruturação da Biorrefinaria. A biomassa pode ser de origem animal, vegetal, algas ou rejeitos (industriais, agrícolas, florestais ou urbanos). Logo, apresenta diferentes características (umidade, composição química, teor energético, tamanho físico, etc.) [36-39]. As configurações destas unidades dependerão, portanto, da qualidade, disponibilidade e tipo de matérias-primas cultivadas próximas às usinas, dos requisitos de instalação dos processos escolhidos e dos produtos finais desejados (**FIGURA 2**). Ou seja, não haverá um único processo ou configuração de cadeia de abastecimento capaz de tratar todas as MPRs [40-42].



FIGURA 2 - Matérias-primas de origem biológica e produtos derivados.



Fonte: adaptado de Bmel e Bmu (2012); ABDI e CGEE (2016); Regalbuto (2011).

Uma proposta complementar aos doze princípios para viabilizar os projetos de engenharia intrinsecamente sustentáveis é a Intensificação dos Processos. A criação de tecnologias multifuncionais, compactas, que operam com um grande fluxo contínuo e um curto tempo de residência permite aproveitar ao máximo e em menor quantidade os recursos materiais, hídricos e energéticos. Desta forma, é possível inibir a ocorrência de resultados não-intencionais e indesejados (perdas, coprodutos, efluentes, emissões, etc.) e, sobretudo, consolidar no mercado de indústrias ambientalmente e economicamente favoráveis, incluindo as Biorrefinarias<sup>[6]</sup>. A importância da Integração de Processos e sua relação com a Química Verde serão detalhadas nas próximas sessões.

## Intensificação de processos

Um dos desafios mais importantes, que ora se colocam na agenda dos principais *players* mundiais em ciência, tecnologia e inovação, diz respeito ao projeto de novos equipamentos e técnicas que potencialmente podem transformar o conceito de planta química, conduzindo a processos mais compactos, seguros, energeticamente eficientes, e ambientalmente sustentáveis. Esses desenvolvimentos recebem a designação geral de *intensificação de processos* (PI -do inglês, *process intensification*). Embora se possa destacar alguns processos intensificados há bastante tempo, por exemplo, qualquer processo contínuo representa uma intensificação quando comparado à batelada<sup>[43]</sup> e o extrator centrífugo de Podbielniak<sup>[44]</sup> foi desenvolvido na década de 1930(!), a popularização do termo PI se deu apenas ao final da década de 1970, a partir dos trabalhos pioneiros de Kleemann e Hartmann<sup>[45]</sup> e Ramshaw<sup>[46]</sup>, este último desenvolvido em uma empresa britânica do setor químico (*Imperial Chemical Industries - ICI*), com o objetivo principal de reduzir os custos de capital.

A definição de PI tem sido colocada de diferentes formas ao longo dos anos. Originalmente<sup>[47]</sup>, delimitou-se como uma estratégia de redução do tamanho de uma planta química de forma a atingir um objetivo de produção. Além de restritiva, essa proposta é essencialmente vaga, visto que uma redução de volume da

ordem de 100 ou de 2 vezes implicaria em PI. Parece claro, porém, que são níveis bastante distintos de “intensificação”, sendo ainda controverso o nível de redução a partir do qual podemos afirmar que de fato se trata de uma intensificação de processo.

Hoje muitas definições mais completas são colocadas. A mais estabelecida refere-se a PI como:

“[...] o desenvolvimento de aparatos e técnicas inovadoras que oferecem melhorias drásticas na fabricação e processamento de produtos químicos, reduzindo substancialmente o volume de equipamentos, o consumo de energia, ou a formação de resíduos, e, em última análise, conduzindo a tecnologias mais baratas, seguras e sustentáveis” [48].

Um sumário de algumas das principais e recentes definições, para a intensificação de processos, diversa em natureza, mas sempre com o elo comum da inovação, foi apresentado [49]. Assim, ficou evidente que a PI é uma área de pesquisa em desenvolvimento e ainda longe da maturidade, sendo as definições de suas fronteiras de atuação objetos de frequente reciclagem.

Conforme apresentado na **FIGURA 3**, o vasto campo de atuação da PI costuma ser dividido em duas áreas: *equipamentos*, tais como novos reatores, dispositivos de mistura, transferência de calor e de massa; e *métodos*, estes mais relacionados à integração de operações de reação e separação, separações híbridas, técnicas usando novas fontes de energia, e novos métodos de controle de processos. Naturalmente, existem intersecções nessa classificação, uma vez que novos métodos frequentemente requerem novos equipamentos, e *vice versa* [48].

**FIGURA 3** - Ferramentas de intensificação de processos.



Fonte: adaptado de Keil (2007).

Os autores Van Gerven e Stankiewicz [49] apresentaram uma visão fundamental da PI, baseada em *princípios* gerais, e em *abordagens* para torná-los possíveis nas *escalas* relevantes (**FIGURA 4**). Tais princípios funcionam como um norteador de todo e qualquer processo de PI. Para atingi-los, deve-se

recorrer a uma ou mais abordagens, atuantes em todas as escalas de espaço e tempo relevantes: espacial (estrutura), termodinâmica (energia), funcional (sinergia) e temporal (**FIGURA 5**).

Uma revisão detalhada dessas abordagens e das escalas em que atuam foi apresentada por Van Gerven e Stankiewicz<sup>[49]</sup>. Os autores definiram como relevantes: a escala molecular (colisões, difusão molecular), a mesoescala (partículas, emulsões, bolhas, fases, etc.) e a macroescala (unidades e plantas de processamento). As duas últimas têm sido alvo dos esforços mais relevantes da comunidade de PI nos últimos anos, enquanto abordagens em escala molecular tem ocupado posição periférica. Na opinião dos autores (partilhada por nós) é nessa escala que residem os principais desafios tecnológicos para a consolidação da PI, devendo-se canalizar os esforços em duas principais frentes: fomento a pesquisas fundamentais em nível molecular e na integração de pesquisas já existentes com a meso e macroescala.

**FIGURA 4** – Princípios da intensificação de processos.



Fonte: adaptado de Van Gerven e Stankiewicz (2009).

Outro aspecto que merece destaque é o caráter essencialmente multidisciplinar e agregador das técnicas de PI. Engenharias (especialmente química, elétrica e de materiais), química, catálise, física aplicada, eletrônica, dentre outras, são disciplinas cujo desenvolvimento depende da intensificação de processos. Portanto, é fundamental somar esforços de maneira coordenada, o que a PI pode ajudar a promover.

FIGURA 5 - Áreas de atuação da intensificação de processos.



Fonte: adaptado de ERPI (2008).

Cabe destacar que a intensificação de processos difere essencialmente em natureza da otimização de processos, bem como da engenharia de processos e sistemas (*process systems engineering*), seja no objetivo, no foco e (principalmente) nas interfaces com outras áreas do conhecimento. Enquanto a otimização e a engenharia de processos e sistemas interagem mais fortemente com a matemática aplicada e a informática, a PI é essencialmente multidisciplinar. A **TABELA 1** resume as principais diferenças dessas três áreas da engenharia de processos químicos.

A intensificação de processos promove mudanças de paradigma radicais no projeto de processos e equipamentos que podem beneficiar toda a cadeia produtiva, despesas de capital e operacionais, controle de qualidade dos produtos e sua consistência, geração de resíduo, segurança de processos, dentre outros<sup>[50]</sup>. A **FIGURA 6** esquematiza como a PI pode contribuir para o equilíbrio do tripé *planeta, lucro e pessoas* de forma a promover processos sustentáveis.

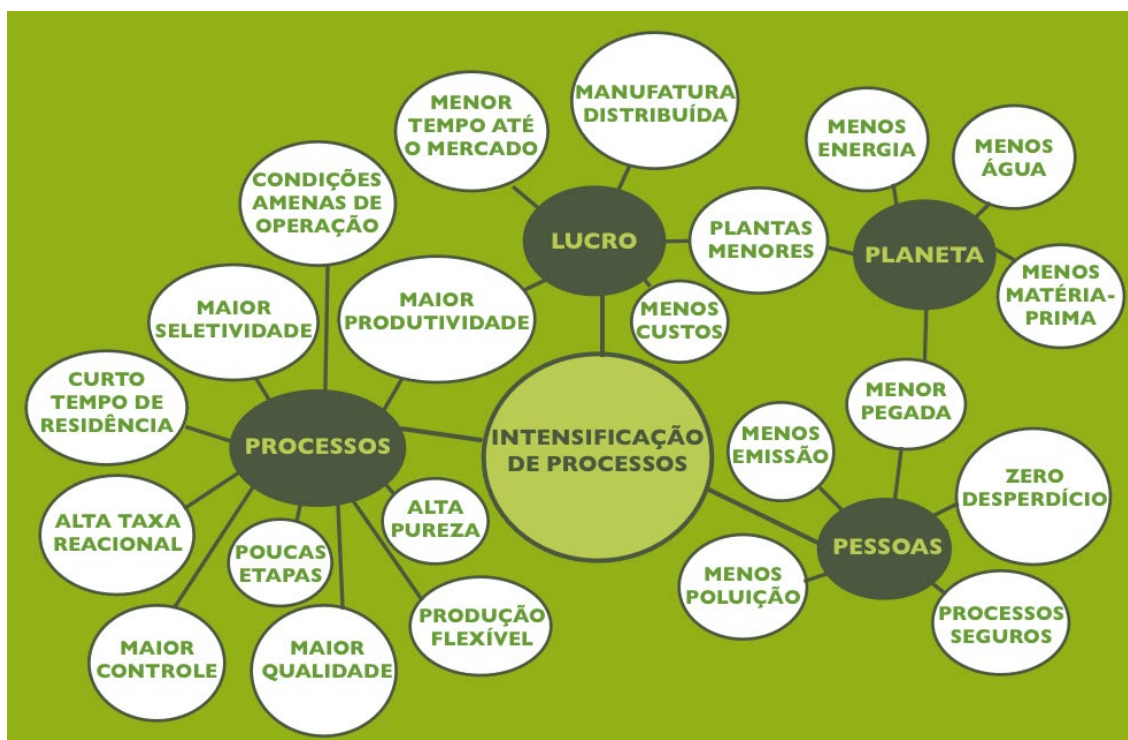
**TABELA 1** - Comparativo entre a otimização de processos, engenharia de processos e sistemas e a intensificação de processos.

Otimização de processos	Engenharia de sistemas e processos	Intensificação de processos
<b>Objetivo</b>		
Melhoria de desempenho de conceitos existentes	Integração em múltiplas escalas de conceitos existentes e novos	Desenvolvimento de novos conceitos de métodos e equipamentos de processo
<b>Foco</b>		
Modelagem e métodos numéricos	Modelagem, <i>software</i> (informática)	Experimento, fenômeno, interface
<b>Interdisciplinaridade</b>		
Fraca (matemática aplicada)	Modesta (matemática aplicada, informática e química)	Forte (química e catálise, física aplicada, engenharias, ciências dos materiais, eletrônica, etc.)

Fonte: adaptado de ERPI (2008).

A redução do tamanho dos principais itens de uma planta química (tais como reatores, trocadores de calor e separadores) resulta diretamente na queda dos custos dos equipamentos individuais. Outra economia considerável está relacionada às despesas de instalação e manutenção (resultam do emprego de menores tubulações, engenharia civil e estruturas de suporte, entre outros itens). Ademais, com a redução de escala de tamanho, as plantas adquirem mobilidade, podendo, em tese, transportar o processo para a localidade de interesse: perto das matérias-primas, do mercado consumidor, onde se pagam menos impostos, etc., simplificando significativamente a logística de produção. Associada a essa vantagem está a possibilidade de se introduzir rapidamente novos produtos no mercado, o que é especialmente benéfico para a indústria farmacêutica e de química fina<sup>[6]</sup>.

**FIGURA 6** - Benefícios da intensificação de processos para o tripé processos, lucro, planeta e pessoas.



Fonte: adaptado de Boodhoo e Harvey (2013); Kumar e Nigam (2012); Erpi (2008).

No que diz respeito ao processo, a redução de volume favorece a transferência de calor e massa, a fluidodinâmica, a velocidade de agitação, a seletividade, o rendimento e as taxas das reações químicas. Outra vantagem está associada à melhoria na segurança com a minimização do manejo de substâncias químicas potencialmente perigosas e o risco de acidentes fatais. Já a implantação da operação contínua favorece a eficiência, principalmente das reações fortemente exotérmicas, em função da remoção constante de calor. Por fim, a combinação das etapas de conversão e separação (ou seja, a remoção *in-situ* do produto no reator) é estratégica para deslocar o equilíbrio, viabilizar reações em que a formação do produto é inibida por componentes do meio reacional (como em processos fermentativos), evitar perdas por degradação dos produtos desejáveis e reduzir o consumo de energia e de solvente e o tempo da operação<sup>[51,52,18]</sup>.

As vantagens ambientais da PI são bastante evidentes. A melhor transferência de calor e massa torna os processos menos intensivos em energia. Ao mesmo tempo, altos rendimentos e seletividades contribuem para eliminar ou reduzir a formação de subprodutos e a demanda energética dos processos de separação e purificação (*downstream*) na especificação do produto final. Ademais, plantas intensificadas ocupam

menos espaço e conseqüentemente são menos invasivas, podendo contribuir para a preservação dos ecossistemas e para a expansão segura e sustentável da produção para áreas ambientalmente sensíveis.

Por essas razões, a intensificação dos processos está sendo tratada como um tema estratégico em todo o mundo. Livros textos têm sido publicados com foco nesta temática<sup>[53,6,43]</sup> e inúmeros grupos de pesquisa têm sido construídos em universidades, centros de pesquisa e empresas. Existe inclusive uma rede de intensificação de processos (*Process Intensification Network*) organizada por pesquisadores britânicos e hospedada na universidade de Newcastle<sup>[55]</sup>, aberta para qualquer pessoa ou instituição (pública ou privada) que tenha interesse na PI. Em abril de 2017, essa rede contava com mais de 250 membros registrados, incluindo acadêmicos e membros do setor industrial, em sua maioria vinculados a instituições europeias, norte-americanas e asiáticas. Uma conferência europeia sobre intensificação de processos (*6<sup>th</sup> European Process Intensification Conference - EPIC6*) vai para sua 6ª edição e será realizada conjuntamente com o 10º congresso mundial de engenharia química em Barcelona, Espanha<sup>[56]</sup>. Neste, foi entregue pela Federação Europeia de Engenharia Química (*European Federation of Chemical Engineering - EFCE*) um prêmio de excelência em intensificação de processos para teses de doutorado de destaque na área<sup>[57]</sup>.

Além disso, em 2008 foi publicado um *roadmap* europeu sobre PI<sup>[50]</sup>, o qual expôs os potenciais benefícios da intensificação de processos e as respectivas ações que deveriam ser tomadas para sua disseminação. O estudo levou cerca de um ano e refletiu o estado da arte da PI nos setores petroquímico, farmacêutico e de especialidades químicas, e na indústria alimentícia (de insumos e produtos finais) para o ano de 2007. Até aquele momento, 72 tecnologias de PI tinham sido identificadas, dentre as quais 46 já possuíam um grau de maturidade mais avançado (caracterizadas por uma descrição tecnológica mais completa).

Em 2015, foi a vez do Departamento de Energia dos Estados Unidos (US Department of Energy) voltar suas atenções para a PI. Em sua revisão tecnológica quadrienal para o ano de 2015<sup>[58]</sup>, a intensificação de processos foi uma das 14 tecnologias listadas no capítulo correspondente às inovações em manufatura avançada de energia limpa. Um panorama bastante completo do grau de maturidade, do potencial, e dos principais gargalos das diversas tecnologias associadas à PI foi apresentado, ressaltando que seu uso pode reduzir significativamente custos e o consumo de energia nas indústrias norte-americanas de alto valor agregado (de químicos, biocombustíveis, refino, mineração e extração de óleo e gás). Adicionalmente, identificou-se o potencial da PI em fornecer soluções inovadoras em face aos problemas ambientais, incluindo o tratamento de água produzida e descartada e captura de carbono.

No Brasil, no entanto, a intensificação de processos não tem recebido a atenção necessária da indústria e da academia. Em geral, os investimentos da indústria em tecnologias para a PI são voltados para necessidades específicas, sempre em parceria com multinacionais que vendem suas tecnologias. No meio acadêmico, até abril de 2017, o diretório de grupos de pesquisa do CNPq registrou apenas 4 grupos de pesquisa, cujo título inclui a intensificação de processos: 1 na Universidade Federal da Paraíba, 1 na Federal do Rio Grande do Sul, e 2 na Federal de Santa Maria. A centralidade do tema certamente merece um cenário mais profícuo para a efetiva inserção da PI na agenda nacional. Por essa razão, o Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos, fundado há cerca de 2 anos no Rio de Janeiro, vem montando uma infraestrutura de ponta, mobilizando recursos humanos, e sensibilizando importantes *players* do setor industrial com caráter estratégico para a intensificação de processos e para o desenvolvimento da indústria nacional, em especial no que diz respeito à efetiva consolidação da indústria química de base renovável, como veremos na seção seguinte.

## Intensificação de processos para a química verde: aplicações e desafios

A intensificação de processos pode contribuir de forma significativa para o desenvolvimento sustentável da indústria de processos químicos. Algumas tecnologias já são recorrentes nas petroquímicas, como é o caso da destilação reativa, trocadores de calor de placas e colunas de destilação com divisória<sup>[59]</sup>. Ainda, segundo o autor<sup>[59]</sup>, os principais incentivos para tal implantação são: o menor consumo de matéria-prima, a redução de custos de capital, a economia de energia e a obtenção de processos inerentemente mais seguros. Verifica-se, portanto, uma estreita relação com alguns dos princípios da Química Verde.

O *roadmap* europeu<sup>[50]</sup> apresenta alguns exemplos sobre aplicações das técnicas de intensificação de processos na indústria que utilizam tecnologias disruptivas. Novamente, é possível verificar que os benefícios estão alinhados com os princípios da Química Verde. O documento cita exemplos como o da DSM no setor de fármacos, em que o processo tradicional utilizava um reator do tipo CSTR, os reagentes eram misturados em um vaso de 10 m<sup>3</sup> e o calor da reação era removido através de uma jaqueta instalada no vaso reacional. Tal processo foi modificado substituindo o reator CSTR por um de microcanais, onde os reagentes são misturados e o calor é removido através dos milhares de microcanais que compõem seu interior. Esta modificação no processo, além de reduzir o volume do equipamento de 10 m<sup>3</sup> para 0,003 m<sup>3</sup>, proporcionou um aumento de 20% na seletividade e no rendimento da reação, mantendo a mesma capacidade de produção (1700 kg/h). Cabe ressaltar, inclusive, o ganho de confiabilidade do processo, uma vez que o mesmo passou a ser contínuo, enquanto na tecnologia tradicional a operação era em batelada<sup>[50]</sup>.

Já a *Dow Chemical* utilizou os princípios da PI para modificar a produção do ácido hipocloroso (HClO), que consistia em colunas de absorção-*stripping*. O ácido hipocloroso é um produto de relativa instabilidade e precisa ser removido do ambiente reacional com certa velocidade, a fim de evitar a decomposição do mesmo. O processo intensificado consiste em uma reação com *stripping* realizada em reatores de alta gravidade com leito rotativo (*High Gravity Rotating Packed Beds* – HIGee, termo técnico em inglês). Neste processo os reagentes são submetidos a um intensivo contato e os produtos são imediatamente removidos através de *stripping*. Tal alteração propiciou uma redução de aproximadamente 40 vezes nas dimensões do equipamento, uma melhoria de rendimento da ordem de 15%, redução de 50% do volume do gás para *stripping* e reduziu em um terço a geração de efluentes do processo, mantendo a mesma capacidade de produção<sup>[50]</sup>.

A PI também eliminou os longos ciclos de limpeza dos equipamentos usados na produção tradicional de alimentos. Foi desenvolvido um método inteligente que utiliza sensores online para a medição da produção e para a avaliação da eficiência desta etapa. Modelos computacionais de auto-aprendizado determinam as condições ótimas da lavagem em função da composição do produto e do grau de incrustação. Como resultados destacam-se: o aumento da capacidade da produção, devido a uma redução de 50% do tempo necessário para limpar os equipamentos; o menor consumo de água e produtos de higienização; e o aumento da flexibilidade da planta, pois as condições da limpeza passaram a ser automaticamente ajustadas para a composição do alimento produzido<sup>[50]</sup>.

A PI otimiza, portanto, vários fatores que interferem no rendimento e na seletividade do produto final e no consumo de recursos, os quais, por consequência, determinam a eficiência e os custos totais do projeto global. Além da economia, os ganhos ambientais e na saúde humana são perceptíveis quando são considerados os princípios da Química Verde no projeto destas tecnologias, como:

- **Segurança intrínseca.** Ao eliminar o uso de condições severas de processamento (temperatura, pressão, pH, tempo da reação) ou de solventes tóxicos/corrosivos/inflamáveis;
- **Eficiência energética.** A redução do consumo de energia e das perdas materiais (ou ganho de produtividade) são possíveis com o acoplamento no reator de membranas, absorvedores ou outros métodos de remoção dos solventes (perdas por transferência de massa), produtos (impede a degradação dos bioprodutos), microorganismos (evita a inibição), catalisadores ou enzimas (reduz a desativação);
- **Catálise, uso de solventes auxiliares, eficiência atômica, evitar a formação de derivados:** A redução da pegada ecológica é possível ao operar em um único passe com eficientes catalisadores, microrganismos ou enzimas, assim como ao excluir solventes das novas rotas sintéticas;
- **Prevenção, desenvolvimento de produtos seguros e uso de matérias-primas renováveis:** a contenção da geração de poluentes, efluentes e emissões é possível ao viabilizar: o uso de materiais biodegradáveis; o uso/reciclo/reuso de solventes "verdes"; a conversão integral das matérias-primas renováveis em produtos substitutos aos de origem fóssil; os processos a seco (etapas de lavagem aumentam o volume de água consumida, de energia para recuperá-la e químicos para tratá-la).

Apesar dos vários benefícios, a aplicação das técnicas de intensificação de processos na indústria ainda é limitada. Diversos autores discutem as razões pelas quais, após duas décadas de desenvolvimento, a adoção deste conceito ainda é relativamente lenta<sup>[6,43,59]</sup>. Os autores ressaltam que a adoção da PI é mais complexa onde existe uma grande quantidade de plantas completamente estabelecidas e depreciadas.

Cabe ressaltar que, usualmente, uma tecnologia é considerada madura pela indústria de processos quando é prevista em normas de projeto. Entretanto, tecnologias em desenvolvimento (como é o caso da PI) ainda não estão contempladas nas normas tradicionais de engenharia. A aversão ao risco por parte da maioria das indústrias de processos, o que é compreensível por se tratar de atividades de capital intensivo, constitui uma importante barreira para PI. Áreas como controle e monitoramento de processos, por sua vez, carecem de desenvolvimento adicional no sentido de viabilizar a utilização de técnicas de PI, uma vez que taxas de transferência de calor e massa em processos intensificados costumam ser consideravelmente maiores, o que exige respostas mais rápidas dos instrumentos de monitoramento e controle. De todo modo, há de se levar em conta que a PI, assim como qualquer tecnologia, possui limitações, e em alguns casos não fornece a solução almejada<sup>[6]</sup>.

Incertezas com a infraestrutura, o atendimento às rigorosas exigências regulamentares dos produtos, a falta de fomentos e incentivos fiscais, os custos adicionais de capital para a implantação e qualificação de mão-de-obra, bem como a falta de um histórico de credibilidade das tecnologias intensivas emergentes são empecilhos adicionais para as indústrias estabelecidas no mercado implantarem novos procedimentos e investirem em equipamentos mais modernos, integrados e otimizados.

Os profissionais da indústria precisam também compreender a aplicação e os mecanismos das novas tecnologias que estão sendo propostas, para então otimizá-las e escaloná-las em regime estacionário. Processos com cinética lenta, por exemplo, não se tornam mais ágeis com a intensificação da transferência de massa e calor. Além disso, há um limite mínimo de escala para que a intensificação tenha custos viáveis.

Outra questão a ser analisada envolve as tecnologias escolhidas para viabilizar as unidades flexíveis de processamento. No caso das indústrias farmacêuticas e da química fina, a produção diversificada impede



o modo contínuo de operação. Porém, a PI permite facilitar, deslocar e agilizar as bateladas, como já foi mencionado. Por outro lado, o uso contínuo de complexos enzimáticos e microrganismos que integram a hidrólise dos vegetais e, ao mesmo tempo, fermentam seus açúcares em diversos produtos, aliado à incineração da lignina remanescente para gerar energia elétrica e térmica para o consumo e a venda do excedente, são desejáveis para um valor de venda competitivo do produto da fermentação.

Vários esforços ainda são necessários para que a PI seja amplamente comercializada como uma tecnologia eficiente, limpa e econômica. Alguns destes incluem:

- Desenvolver polímeros, solventes, enzimas, microrganismos e catalisadores, entre outros insumos com características favoráveis para novas rotas sintéticas mais verdes;
- Superar falhas operacionais em equipamentos contínuos;
- Desenvolver processos integrados de pré-tratamento e conversão para fracionar e transformar qualquer tipo de biomassa, principalmente as vegetais, em produtos diversos. Além de métodos de separação líquido-líquido, gás-líquido e líquido-sólido (principalmente) intensificados, contínuos, eficientes energeticamente, com alta produtividade e de preferência integrados com a etapa de conversão;
- Desenvolver e utilizar ferramentas analíticas para a caracterização das matérias-primas, dos produtos gerados e do desempenho das operações; programas de controle, automação e monitoramento dos processos; softwares para a modelagem matemática e a simulação dos processos intensificados; programas para analisar o mecanismo de funcionamento das novas tecnologias de intensificação; programas preditivos para a seleção/redução/eliminação do uso de solventes;
- Validar e gerar informações sobre a cinética e a termodinâmica das reações em diferentes escalas de operação, assim como sobre as características dos solventes (químicas, reacionais, efeitos, degradabilidade, toxicidade, inflamabilidade, facilidade de reciclagem, entre outros parâmetros que auxiliam a escolha).

Avaliações técnicas e econômicas são decisivas para identificar melhorias de qualidade ou de projeto, realizar escalonamentos e a necessidade de possíveis intensificações sem a execução de repetidos e dispendiosos experimentos laboratoriais. Para isso, são vitais os avanços nos dois últimos tópicos citados na lista dos esforços necessários. Também é preciso realizar a análise do ciclo de vida de toda a cadeia de transformação das biomassas e definir métricas claras sobre as informações requeridas para determinar os impactos ambientais dos projetos de intensificação. Assim, além de identificar novas estratégias de otimização para tornar a produção sempre mais eficiente, econômica e competitiva, a PI irá ponderar (da fase de concepção até de melhorias operacionais) fatores ambientais, sociais, de sustentabilidade, toxicologia e de segurança, como determinam os princípios da Química Verde.

## Conclusão

Apesar de, originalmente, o conceito de intensificação de processos (PI) ter se restringido a equipamentos e metodologias voltadas para a redução de escala de processos a fim de reduzir custos sem impactar nas metas de produção, o espectro do conceito atual é bem mais amplo. Particularmente se destacam as interfaces com a química verde, incluindo-se entre as atribuições da PI a minimização do uso de insumos e energia e da geração de resíduos, de segurança e flexibilidade de processos, dentre outras. A efetiva

aplicação da PI está associada a mudança do paradigma do projeto de plantas químicas (na escala de bilhões de dólares e elevada escala de produção) para projetos de unidades estrategicamente localizadas, menores e menos complexas.

O desenvolvimento das tecnologias de PI tem o potencial de reduzir significativamente custos e consumo de energia em setores industriais importantes como químicos, biocombustíveis, fármacos, dentre outros. Adicionalmente, a PI possui o potencial de gerar soluções inovadoras para os crescentes desafios ambientais, incluindo tratamento de efluentes e captura de carbono. Assim, a intensificação de processos cumpre papel fundamental na viabilização da química verde e da bioeconomia.

Apesar disso, ainda existem muitas barreiras à efetiva implementação da intensificação de processos, dentre as quais se destacam a aversão aos riscos por parte das empresas e a carência de políticas de incentivo capazes de minimizá-los. No Brasil, a situação é ainda mais dramática, já que inexistem esforços concentrados no desenvolvimento e disseminação do conceito de PI. Considerando o elevado potencial brasileiro para desenvolver uma indústria baseada em matérias-primas renováveis, fica evidente a necessidade de se somar esforços coordenados entre os meios acadêmico e industrial, no sentido de suprir a lacuna de conhecimento ora existente no país. Nesse contexto, torna-se possível a construção, no Brasil, de um ambiente propício para a aplicação efetiva dos princípios da química verde.

## Referências

1. ABDI e CGEE. **Agenda Tecnológica Setorial (ATS) Química: Química de Renováveis: Panorama Econômico. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial**, Brasília, Brasil, p. 1-37. 2016. [\[Link\]](#). Acesso em: 28 abr. 2017.
2. WHITE HOUSE. **National Bioeconomy Blueprint Released**. 2012. [\[Link\]](#). Acesso em: 03 mai 2017.
3. Golden JS, Handfied RB, Daystar J, Mcconnell TE. **An Economic Impact Analysis of the U.S. Biobased Products Industry: A Report to the Congress of the United States of America**. 2015. [\[Link\]](#). Acesso em: 03 mai 2017.
4. CGEE. **Química Verde no Brasil: 2010 – 2030**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Brasília, Brasil, p.1-438. 2010. ISBN: 978-85-60755-31-8.
5. Bain & Company, Gas Energy e BNDES. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira: relatório final**. Bain & Company, Rio de Janeiro, Brasil, p. 1-58. 2014b. [\[Link\]](#). Acesso em: 28 abr 2017.
6. Boodhoo K, Harvey A. (Eds.) **Process intensification technologies for green chemistry: engineering solutions for sustainable chemical processing**. John Wiley & Sons: West Sussex. 2013. ISBN: 9780470972670.
7. Anastas PT, Heine LG, Williamson TC. **Green Chemical Syntheses and Processes: Introduction**. In: Anastas, P. T.; Heine, L. G.; Williamson, T. C. (org.). **Green Chemical Syntheses and Processes**. American Chemical Society. Washington, DC. 2000. p. 1-6. ISBN: 9780841218208. [\[CrossRef\]](#).

8. Goulart AK, Figueiredo ACM, Nascimento RC, Seidl PR. Ensino em Química Verde. Caderno de Química Verde, ano 2, n. 4. **Rev Quim Ind (RQI)**, Rio de Janeiro/RJ. 2017; 754(12):14.1-20. ISSN: 2358-1697. [\[Link\]](#). Acesso em: 30 abr 2017.
9. REACH - Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals. 2017. [\[Link\]](#). Acesso em: 02 abr. 2017.
10. Brasil. **Anteprojeto de Lei que dispõe sobre o cadastro, a avaliação e o controle de substâncias químicas industriais**, Brasília, DF, 28 de junho de 2016. [\[Link\]](#). Acesso em: 26 abr 2017.
11. Seidl PR, Freire E, Borschiver S. **Non-fuel Applications of Sugars in Brazil**. In: Murzin D, Simakova O. **Biomass Sugars for Non-Fuel Applications**. Royal Society of Chemistry. Cambridge. 2015; p. 228-257. ISBN: 978-1-78262-207-9. [\[CrossRef\]](#).
12. Seidl PR, Freire E, Borschiver S, Leite LF. **Introducing Green Chemistry into Graduate Courses at the Brazilian Green Chemistry School**. In: ZUIN, V.; MAMMINO, L. (org.). **Worldwide Trends in Green Chemistry Education**. Royal Society of Chemistry. Cambridge. 2015. p. 266-277. ISBN: 978-1-84973-949-8. [\[CrossRef\]](#)
13. Brasil. Senado Federal. **Temas e agendas para o desenvolvimento sustentável**. Brasília: Senado Federal. Subsecretaria de Edições Técnicas, p.263. 2012. ISBN: 978.85.7018-464-1 [\[Link\]](#). Acesso em: 02 mai. 2017.
14. Carioca JOB, Friedrich HE, Ehrenberger S. In: **Biofuels: From Hopes to Reality. Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, InTech, Rijeka, Croatia, p. 521-546. 2011. ISBN: 978-953-307-478-8. [\[CrossRef\]](#).
15. Bain & Company, Gas Energy e BNDES. Potencial de diversificação da indústria química brasileira: relatório 4: Químicos com base em fontes renováveis. **Bain & Company**, Rio de Janeiro, Brasil, p. 1-58. 2014a. [\[Link\]](#). Acesso em: 27 abr. 2017.
16. CNI. **Bioeconomia: uma agenda para o Brasil**. – Brasília: Confederação Nacional da Indústria. p.1-40. 2013. [\[Link\]](#). Acesso em: 20 abr 2017. ISBN: 978-85-7957-101-5.
17. Clark JH, Macquarrie DJ. (Ed.). **Handbook of green chemistry and technology**. John Wiley & Sons, p. 1-26, 2008. ISBN 978-0-632-05715-3.
18. Jiménez-González, C. et al. Key green engineering research areas for sustainable manufacturing: A perspective from pharmaceutical and fine chemicals manufacturers. **Organic Process Research & Development**. 2011; 15(4):900-911. [\[CrossRef\]](#).
19. Anastas PT, Wagner JC. **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford University Press, New York, US, p.30. 1998. ISBN: 0198502346, 9780198502340.
20. Anastas P, Eghbali N. Green chemistry: principles and practice. **Chem Soc Rev**. 2010. 39(1): 301-312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).

21. Cruz AC, Pereira FS, Costa LM, Silva MFO. **Química verde na ótica dos agentes de mercado**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, Brasil. 2014; (39):5-54. [\[Link\]](#). Acesso em: 28 abr 2017.
22. Lancaster M. **Green Chemistry: An Introductory Text**, 3<sup>rd</sup> Edition. Royal Society of Chemistry: Cambridge. 2016. ISBN: 9781782622949.
23. Borman S. **Asymmetric Catalysis Wins**. *Chem. Eng. News* 2001, 79(42): 5. [\[Link\]](#). Acesso em: 02 mai 2017.
24. Anastas PT, Kirchhoff MM. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc Chem Res*. 2002. p.686-694. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
25. Tundo P (Ed.), Perosa A, Zecchini F. **Methods and reagents for green chemistry: an introduction**. Wiley: Hoboken. 2007. ISBN: 978-0-471-75400-8.
26. Bond JQ, et al. Production of renewable jet fuel range alkanes and commodity chemicals from integrated catalytic processing of biomass. *Energy & Environmental Science*. 2014; 7(4):1500-1523. [\[CrossRef\]](#).
27. Li H, Bhadury PS, Riisagerc A, Yang S. One-pot transformation of polysaccharides via multi-catalytic processes. *Catalysis Science & Technology*. 2014; 4(12): 4138-4168. [\[CrossRef\]](#).
28. Lee JW, Kim HU, Choi S, Yi J, Lee SY. Microbial production of building block chemicals and polymers. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011; 22(6):758-767. [\[CrossRef\]](#).
29. Lynd LR, Van Zyl WH, McBride JE, Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005; 16(5): 577-583. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
30. Berezina N, Martelli SM. Bio-based polymers and materials. *Renewable Resources for Biorefineries*, 2014, p.1-28. ISBN: 978-1-78262-018-1. [\[CrossRef\]](#).
31. Koutinas AA, et al. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chem Soc Rev*. 2014; 43(8):2587-2627. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
32. Geddes CC, Nieves IU, Ingram LO. Advances in ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011; 22(3):312-319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
33. Ishola MM, Jahandideh A, Haidarian B, Brandberg T, Taherzadeh MJ. Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF): a novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Biore tech*. 2013; 133:68-73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
34. Qureshi N, Hodge D, Vertes A. (Ed.). **Biorefineries: Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels**. Newnes. 2014. ISBN: 9780444595041.
35. Morone A, Pandey RA. Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies. *Renew Sust Energ Rev*. 2014; 37:21-35. [\[CrossRef\]](#).

36. Coutinho P, Bomtempo JV. Roadmap Tecnológico em Matérias Primas Renováveis: Uma Base para Construção de Políticas e Estratégias no Brasil. **Quim Nova**. 2011; 34(5):910-916. [[CrossRef](#)].
37. Chen H-G, Zhang Y-HP. New biorefineries and sustainable agriculture: Increased food, biofuels, and ecosystem security. **Renew Sust Energ Rev**. 2015; 47:117-132. [[CrossRef](#)].
38. Choi S, Song CW, Shin JH, Lee SY. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. **Metab eng**. 2015; 28:223-239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
39. Regalbuto JR. The sea change in US biofuels' funding: from cellulosic ethanol to green gasoline. **Biof Biop Bioref**. 2011; 5(5):495-504. [[CrossRef](#)].
40. Seidl PR, Goulart AK. **Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts**. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry. 2016; 2:48-53. [[CrossRef](#)].
41. Bmel BMBF, Bmu BMWi. **Biorefineries Roadmaps part of the German Federal Government action plans for the material and energetic utilisation of renewable raw materials**. German. 2012; p. 5-96. [[Link](#)]. Acesso em: 26 abr. 2017.
42. Bidy MJ, Scarlata C, Kinchin C. **Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential**. National Renewable Energy Laboratory (NREL). 2016; 10:1-90. [[Link](#)]. Acesso em: 28 abr 2017.
43. Reay D, Ramshaw C, Harvey A. **Process Intensification, engineering for efficiency, sustainability and flexibility**, Second Edition. Butterworth-Heinemann: Kidlington, 2013. ISBN: 978-0-08-098304-2.
44. Podbielniak WJ. Method of securing counter current contact of fluids by centrifugal action. **US Patent 2044996**. 1935.
45. Kleemann G, Hartmann K, Wiss Z. "Techn. Hochschule "Carl Schorlemmer", Leuna Merseburg. 1978; vol.20. p.417.
46. Ramshaw C. Hige distillation - an example of process intensification. **Chemical Engineering**, London, 1983; vol. 389, p.13.
47. Cross WT, Ramshaw C. Process Intensification - laminar-flow heat-transfer. **Chem Eng Res Design**. 1986; vol. 64, p.293.
48. Stankiewicz AI, Moulijn JA. Process intensification: transforming chemical engineering. **Chem Eng Progress**. 2000; 96(1):22-34. [[Link](#)]. Acesso em: 03 mai 2017.
49. Van Gerven T, Stankiewicz A. Structure, Energy, Synergy, Times - The Fundamentals of Process Intensification. **Industrial & Chemical Engineering Research**, 2009; 48(5):2465-2474. [[CrossRef](#)].
50. ERPI. European Roadmap for Process Intensification. **Creative Energy - Energy Transition**. 2008. [[Link](#)]. Acesso em: 30 abr 2017.

51. Kumar V, Nigam KDP. Process intensification in green synthesis. **Green Proc Synth**. 2012; 1(1):79-107. ISSN: 2191-9550. [[CrossRef](#)].
52. Hessel V, Löwe H, Hardt, S. **Chemical micro process engineering: fundamentals, modelling and reactions**. John Wiley & Sons, 2004. p.17 e 67-70. ISBN: 978-3-527-60537-8. [[CrossRef](#)].
53. Hessel V, Gürsel IV, Wang Q, Noël T, Lang J. Potential analysis of smart flow processing and micro process technology for fastening process development: use of chemistry and process design as intensification fields. **Chem Eng Techn**. 2012; 35(7):1184-1204. [[CrossRef](#)].
54. Keil FJ. (Ed.). **Modeling of Process Intensification**. Wiley: Weinheim, 2007. ISBN: 978-3-527-31143-9.
55. PIN - **Process Intensification Network**. [[Link](#)]. Acesso em: 27 abr 2017.
56. WCCE10 - **10<sup>th</sup> World Congress of Chemical Engineering**, 1<sup>st</sup> - 5<sup>th</sup> October, 2017. Barcelona, Spain. [[Link](#)]. Acesso em: 27 abr 2017.
57. EFCE - **European Federation of Chemical Engineering. Excellence Award in Process Intensification**. 2017. [[Link](#)]. Acesso em: 27 abr 2017.
58. QTR - **Quadriennial Technology Review 2015**. Chapter 6: **Innovating Clean Energy Technologies in Advanced Manufacturing, Technology Assessments, 6J Process Intensification**. U.S. Department of Energy. [[Link](#)]. Acesso em: 01 mai 2017.
59. Harmsen J. Process intensification in the petrochemicals industry: Drivers and hurdles for commercial implementation. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**. 2010. p.70-73. [[CrossRef](#)].

---

Histórico do artigo | Submissão: 03/07/2018 | Aceite: 14/11/2018 | Publicação: 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Coutinho PLA, Bastos JBV, Alijó PHR, Goulart AK. Intensificação de processos e química verde: importância para as indústrias farmacêutica, cosméticos, alimentícia e biorrefinarias. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 74-93. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/704>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.



## Revista Fitos

e-ISSN: 2446-4775 e ISSN: 1808-9569

Endereço: Av. Comandante Guarany, 447, Jacarepaguá, CEP 22775-903, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Telefone: 21- 3348.5598

E-mail: [revistafitos@far.fiocruz.br](mailto:revistafitos@far.fiocruz.br).

[Visualizar versão vigente online](#)

Última atualização: 05/04/2019

## Normas para submissão e apresentação do manuscrito

A Revista Fitos publica artigos científicos originais sobre Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) em medicamentos da diversidade vegetal, nas seguintes áreas do conhecimento: **Agroecologia, Botânica, Ciências Farmacêuticas** (Farmácia; Farmacotecnia; Análise e Controle de Medicamentos e afins), **Educação e Conhecimento, Etnociências** (Etnobotânica e Etnofarmacologia), **Engenharia de Medicamentos e Produtos Naturais, Farmacologia** (Farmacologia Clínica), **Política e Gestão** (Políticas Públicas; Política e Planejamento Governamental; Crescimento Econômico e Saúde Pública), **Química, Toxicologia** e outras áreas afins.

São aceitos manuscritos em **português, inglês e espanhol**, nos seguintes formatos: artigo original de pesquisa, revisão crítica, relato de experiência, comunicação breve, monografia de plantas medicinais, perspectiva, resenha e carta.

- **Artigo de pesquisa:** resultado de pesquisa, respeitando fundamentação teórica e metodologia científica, com o máximo de 6.000 palavras.
- **Revisão:** revisão crítica e sistematizada da literatura sobre temas pertinentes ao escopo da revista, no máximo 8.000 palavras. O(s) autor(es) deve(m) apresentar os métodos e procedimentos utilizados na revisão, a qual deve basear-se em literatura atualizada. A submissão de revisões está sujeita somente ao convite ou à consulta prévia pelo editor de área.
- **Relato de Experiência:** descrição de experiência que contribui de forma relevante para a área de atuação. É elaborado de modo contextualizado, com objetividade e aporte teórico. O relato inclui introdução com marco teórico; os objetivos; as metodologias empregadas, incluindo descrição do contexto e dos procedimentos; os resultados e as considerações tecidas a partir dos mesmos, com o máximo de 6.000 palavras.
- **Comunicação Breve:** relato de resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados como revisão ou na estrutura de artigo, mas de forma sucinta, com o máximo de 1.700 palavras.

- **Monografia de Plantas Mediciniais:** visam agrupar, padronizar e sistematizar o conhecimento das características e propriedades das plantas medicinais para orientar registro nos órgãos de regulamentação. Texto contendo, no máximo, 3.500 palavras.
- **Perspectivas:** análises de temas conjunturais, de interesse imediato e sobre a importância do tema, em geral a convite da equipe editorial, com o máximo de 2.200 palavras.
- **Resenhas:** resenha crítica de livro, dissertações, teses e outros, publicado nos últimos dois anos, com o máximo 1.200 palavras.
- **Cartas:** crítica a artigo publicado em números anteriores da Revista Fitos, com no máximo 700 palavras.

## 1. Informações gerais do manuscrito

- São publicados manuscritos científicos inéditos e originais e que não estejam em avaliação simultânea em nenhum outro periódico.
- Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico, o manuscrito será desconsiderado.
- O Termo de Cessão de Direitos Autorais deverá ser preenchido e assinado individualmente (por todos os autores) e inserido no sistema no momento da submissão do manuscrito.
- Todo conceito e opiniões expressos nos manuscritos, bem como a exatidão e a procedência das citações, são de exclusiva responsabilidade dos autores.
- Informar, no formulário de submissão, qualquer conflito de interesse que envolva o manuscrito.
- Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado de auxílio à pesquisa.
- Caso não tenha recebido financiamento, os autores devem declarar esta informação.
- Caso o trabalho envolva estudos em humanos ou animais, os manuscritos deverão estar acompanhados dos respectivos Pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa, emitidos pela instituição de origem do(s) autor(es).
- Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem, obrigatoriamente, estar acompanhados do número e o nome da entidade/instituição de registro do ensaio clínico.
- As autorizações para acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado devem ser apresentadas.

## 2. Formatação do manuscrito

- Redigidos em Word do MS Office doc, docx ou Write do Libre Office.
- Não serão recebidos artigos em formatos fechados para edição como PDF ou similares.
- **Página A4**, margem de **2 cm** em cada um dos **quatro lados**, incluindo **figuras, quadros e tabelas**.
- Letra em fonte **Arial**, tamanho **12**.
- Espaçamento **duplo** entre linhas em todo o artigo, incluindo os resumos e referências.
- Texto **justificado**.



- No manuscrito submetido, não deverão conter os dados de autoria e afiliação, para atender à avaliação às cegas. Porém, esses dados deverão ser inseridos, de forma completa no passo 3. Inclusão de Metadados, no momento da submissão. A descrição de afiliação deve conter o máximo de conteúdo para comunicação com os autores a exemplo de laboratório, departamento, unidade, instituição, sala, prédio, endereço, bairro, código de endereçamento postal, caixa postal, cidade, estado, país. Incluir os telefones para contato.

### **3. Estrutura do manuscrito**

- Não serão aceitas notas de rodapé.
- Siglas devem ser escritas por extenso, quando aparecem a primeira vez, no resumo, no abstract e no restante do manuscrito.

#### **3.1. Título**

- Escrito, em negrito, no idioma do manuscrito (português, inglês ou espanhol) e em inglês, com o máximo de 120 caracteres, incluindo espaços.
- Estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o escopo da Revista.
- Somente a 1ª letra da primeira palavra do título deverá ser escrita em letra maiúscula.
- A versão do título em inglês deverá conter as mesmas características da apresentação do título original.
- Os subtítulos que identificam cada item do manuscrito deverão ser escritos em negrito com a 1ª letra da primeira palavra em maiúscula e sem numeração.

#### **3.2. Resumo e abstract**

- Só não se aplica a perspectiva, resenha e carta.
- Apresentação concisa dos pontos relevantes do trabalho em um único parágrafo, expondo objetivo, metodologia, resultados e conclusão.
- Texto com, no máximo, 200 palavras.
- O resumo no idioma original deverá também ser inserido nos metadados (formulário de submissão do manuscrito).
- Terminada a inserção do resumo no formulário, o responsável pela submissão deverá alterar o idioma do formulário e preencher os campos traduzidos.
- No abstract, evitar traduções literais. Quando não houver domínio do idioma, consultar pessoas qualificadas.

### 3.3. Palavras-chave

- Inserir de quatro (4) a oito (8) palavras-chave que representem o conteúdo do manuscrito e facilite a recuperação da informação. As palavras-chave deverão ser escritas em português ou espanhol e inglês, fazendo a alteração de idioma do formulário, com somente a primeira letra em maiúscula e separadas por ponto.

### 3.4- Itens em Artigos, Revisão, Relato de Experiência e Comunicação Breve

- Esses manuscritos, com caráter de apresentação de resultados, devem apresentar os itens de Introdução, Fundamentação teórica, Metodologia, Resultados e/ou Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas.
- A introdução deverá apresentar o problema da investigação, estabelecer com clareza o objetivo e a contextualização do trabalho.
- A fundamentação teórica deve estar baseada em bibliografia atualizada.
- A Metodologia deverá descrever os instrumentos de coleta de dados, os materiais usados e os mecanismos de análise dos dados, incluindo a metodologia, e a ferramenta de cálculo, para a análise estatística. Deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a compreensão de todas as etapas do trabalho.
- Os Resultados deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou de interpretação pessoal, com suporte no referencial teórico. Sempre que necessário, deverão estar acompanhados de tabelas e figuras adequadas.
- A Discussão deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos, mas confrontando aos dados e teoria já estudados, publicados e referenciados. Resultados e/ou Discussão poderão ser apresentados num único item.
- A conclusão deverá ser destinada ao desfecho do raciocínio do(s) autor(es), ressaltando as consequências do seu argumento e as principais contribuições da pesquisa para a comunidade científica e/ou para a sociedade.

### 3.5. Figuras/Tabelas

- Os enunciados das tabelas e figuras (gráficos, fotografias, desenhos, mapas, estruturas químicas), deverão ser citados no texto, indicados em letras maiúsculas, seguidas por algarismo arábico, em negrito e entre parênteses; como exemplos **(TABELA 1)** e **(FIGURA 1)**
- As tabelas, e figuras deverão ser inseridos pelos próprios autores nos locais adequados, tão logo após a citação, e não no final do manuscrito.
- **Acima das tabelas e figuras** deverá ser informado o enunciado.
- Abaixo das **tabela e figuras** deverão ser informadas a legenda, e a fonte caso tenha, no tamanho 10, espaço simples.

- As informações dentro das tabelas e figuras deverão ser apresentadas com caractere tamanho 10 e espaço simples.
- As tabelas não poderão conter linhas verticais nas laterais.
- Os itens que compõem as figuras deverão estar legíveis e em boa resolução gráfica.
- Fotos com pessoas ou marcas identificáveis ou em lugares não públicos deverão ter autorização do uso de imagem.

### 3.6. Agradecimentos

- Neste item poderá ser informado o nome da instituição de fomento e/ou pesquisador que deu apoio ao desenvolvimento da pesquisa. É opcional, porém necessário, e deverá vir antes das Referências.

### 3.7. Comunicações Verbais

- A transcrição de comunicação verbal, decorrente de entrevistas, ou similar, deverá estar em itálico ou entre aspas, no tamanho 10, com recuo de 4 cm, na sequência do texto.
- A comunicação verbal (discurso) não poderá ser identificada.

### 3.8 Citações

- Deverão seguir a norma Vancouver;
- Todas as citações deverão estar informadas no texto;
- Todas as citações deverão ser numeradas, entre chaves e na sequência da sua apresentação no texto.
- No caso de mais de duas citações sequenciais ou citações múltiplas, os respectivos números deverão ser separados por vírgula;
- Nas citações diretas, de até três linhas, deverão ser transcritas no mesmo parágrafo, entre aspas;
- As citações diretas, com mais de três linhas, deverão ser transcritas em parágrafo independente, com recuo de margem de 4 cm à direita, fonte 10, espaço 1, sem aspas.

### 3.9. Referências

- Nas referências, item final do manuscrito, todas as citações deverão ser listadas em ordem numérica, na sequência em que aparecem no texto e alinhadas à margem esquerda.
- A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).
- As referências deverão apresentar: autor(es), relacionados até seis (caso ultrapasse inserir a expressão et al.); título do artigo pesquisado; nome da revista/periódico, livro ou outros, volume,

número, páginas (em caso de livro ou trabalhos, como: TCC, dissertação ou tese, informar o número de páginas); ano de publicação.

- A inserção do link: <https://doi.org/número> DOI (identificador digital para trabalhos científicos), deverá ser feita com hyperlink [CrossRef].
- Caso a referência citada possua o número DOI (Identificador de Objeto Digital) o seu endereço terá o formato <https://doi.org/númeroDOI>.
- Inserir o ISSN (identificador de revista/periódico) e o ISBN (identificador de livros).
- Para a inserção do link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>, informar com o hiperlink [PubMed].
- Os demais endereços eletrônicos, site original de editora ou do texto consultado, deverão ser apresentados com o hyperlink [Link].

Exemplo:

Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Rodrigues E, Tabach R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Rev Bras Farmacogn.** 2010; 20 (2): 140-6. ISSN: 0102-695X . [\[CrossRef\]](#)

- Destacar em negrito: o título de livro, o nome da revista/periódico em estudo científico (citada/o) e o tipo e número em legislação.
- No caso de uso de software de gerenciamento de referências bibliográficas (EndNote, Zotero ou outros), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.

## 4. Processo de Submissão

Para submeter um manuscrito à Revista Fitos, o autor deverá possuir cadastro no sistema de editoração eletrônica da revista (faça aqui o seu cadastro) e estar logado no sistema (efetue aqui seu login).

Após efetuar o login, o autor deverá acessar o item “Página do usuário” no menu de navegação e, na página carregada, clicar no link “Nova submissão”, ao lado do perfil Autor.

### 4.1 – Passo 1. Iniciar Submissão

- **Seção:** o autor deverá selecionar a seção correspondente ao formato de seu manuscrito.
- **Idioma da submissão:** o autor deverá selecionar o idioma principal de seu manuscrito.
- **Condições para submissão e Declaração de Direito Autoral:** para avançar no processo de submissão, o autor deverá estar de acordo com todas as condições apresentadas.

### 4.2 – Passo 2. Transferência do Manuscrito

- O autor deverá selecionar o arquivo e clicar sobre o botão **TRANSFERIR**.

- Em seguida, quando o manuscrito aparecer sob o título “Arquivo submetido”, o autor poderá clicar sobre **SALVAR E CONTINUAR**.

#### 4.3 – Passo 3. Inclusão de Metadados

O preenchimento dos metadados deverá ser realizado em 2 idiomas: idioma do manuscrito e inglês. Para isso, insira todas as informações solicitadas, volte ao início da página, altere o idioma e insira os dados traduzidos. Manuscritos em inglês dispensam o preenchimento dos metadados no segundo idioma.

##### 4.3.1 - Autores e afiliação

- Os dados de todos os autores deverão ser preenchidos **somente** no formulário de metadados da submissão, presente no passo 3 do processo de submissão do site da Revista Fitos ([www.revistafitos.far.fiocruz.br](http://www.revistafitos.far.fiocruz.br)), sendo dados obrigatórios: nome e sobrenome por extenso e e-mail.
- Preenchimento dos dados complementares dos autores: obrigatoriamente, número do ORCID ou ResearchID ou perfil no Google Acadêmico; e opcionalmente, Link do CV Lattes, Link do repositório Institucional, Link do site ou blog do grupo de pesquisa, Link do site do autor.
- Os demais autores deverão ser incluídos no mesmo formulário (Clicar no botão “incluir autor”)
- A ordem dos autores no formulário deverá corresponder à ordem de autoria do trabalho.
- As afiliações devem ser incluídas em hierarquias institucionais, com os endereços completos e seguidas dos telefones de contato.
- Não colocar titulações e funções junto às afiliações.
- Em caso de duplo vínculo do autor, colocar somente o vínculo no qual a pesquisa foi desenvolvida.
- Em caso de cooperação, poderá colocar as duas instituições. Ressalta-se que a primeira deverá ser a de maior vínculo.
- Terminado o cadastramento de todos os autores, o responsável pela submissão **deverá alterar o idioma do formulário e preencher os campos traduzidos**.

##### 4.3.2 - Título

- O título deverá ser inserido uma única vez para cada idioma no campo correspondente do Passo 3.
- Para alterar o idioma do formulário, vá ao topo da página e, no canto superior direito, selecione o idioma desejado e clique em SUBMETER.
- O procedimento deverá ser repetido para cada idioma.
- O título do estudo no formulário de submissão deverá corresponder ao título informado no manuscrito.
- Todas as características descritas no item 4 destas Instruções deverão ser observadas também no formulário de submissão.

#### 4.3.3 - Resumo e abstract

- Os resumos em português, inglês e espanhol (Abstract) deverão ser inseridos também no formulário de submissão (Passo 3).
- Apresentação concisa dos pontos relevantes do trabalho em um único parágrafo, expondo metodologia, resultados e conclusão.
- Deve conter no máximo 200 palavras.
- No abstract, evitar traduções literais. Quando não houver domínio do idioma, consultar pessoas qualificadas.
- O resumo deverá ser inserido uma única vez para cada idioma no campo correspondente.
- Para alterar o idioma do formulário, vá ao topo da página e, no canto superior direito, selecione o idioma desejado e clique em SUBMETER.
- O procedimento deverá ser repetido para cada idioma.
- Só não se aplica a resenhas e cartas.

#### 4.3.4 - Indexação:

- **Área do Conhecimento:** o autor deverá informar a que área pertence seu manuscrito: **Agroecologia, Botânica, Ciências Farmacêuticas** (Farmácia; Farmacotecnia; Análise e Controle de Medicamentos e afins); **Educação e Conhecimento; Etnociências** (Etnobotânica e Etnofarmacologia); **Engenharia de Medicamentos e Produtos Naturais; Farmacologia** (Farmacologia Clínica); **Política e Gestão** (Políticas Públicas; Política e Planejamento Governamental; Crescimento Econômico e Saúde Pública); **Química, Toxicologia ou outras áreas afins.**
- **Palavras-chave:** escolha de palavras que resumem os temas principais do manuscrito para possibilitar a busca da informação e, conseqüentemente do manuscrito e autores.

#### 4.4 – Passo 4. Transferência de Documentos Suplementares

- Arquivos suplementares contendo, por exemplo, figuras, tabelas, documentos com assinatura, etc, poderão ser transferidos nesta etapa.

#### 4.5 – Passo 5. Confirmação da Submissão

- Para concluir a submissão do manuscrito pelo sistema da Revista Fitos, o autor deverá clicar sobre o botão CONCLUIR SUBMISSÃO.

## Exemplos de referências

### Artigo de Periódico

Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Rodrigues E, Tabach R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Rev Bras Farmacogn.** 2010; 20 (2): 140-6. ISSN: 0102-695X. [[CrossRef](#)]

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood-leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. **Br J Cancer** 1996; 73 (8):1006-12. [[PubMed](#)]

Se o número for suplementar ou especial, indique-os respectivamente pelos termos “Supl” ou “(nº esp.)” após o volume.

### Artigo de periódico eletrônico

Autor. Título do artigo. Título da publicação seriada. [tipo de suporte]. Ano. Volume (n.º) [acesso dia, mês e ano]; paginação ou indicação de tamanho. Disponibilidade de acesso.

Clark SC. The industrial arts paradigm: adjustment, replacement or extinction?. *Journal of Technology Education* [online]. 1989 Fall [acesso 15 mar. 1995]; 1(1). Disponível em: URL: <http://scholar.lib.vt.edu/ejournals/JTE/v1n1/backup/clark.jte-v1n1.html>.

### Artigo de jornal

Santos JA. Por que luta Portugal na África. *O Estado de São Paulo* 1967 maio 28; p. 64.

Biblioteca climatiza seu acervo. *O Globo*, Rio de Janeiro, 1985 mar 4.; p.11, c.4.

### Livro completo

Iverson C, Flanagan A, Fontanarosa PB, Glass RM, Glitman P, Lantz JC, et al. **American Medical Association Manual of Style: a guide for authors and editors.** 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. ISBN-13: 9780195176339.

### **Livro em formato eletrônico**

Autoria. Título. [suporte]. Produtor. Edição. Versão. Local (cidade): Editora; ano [acesso dia, mês e ano]. Disponibilidade de acesso.

Killings DB, ed. Anglo-Saxon chronicle [on-line]. Berkeley, United States: Berkeley Digital Library; 1995 July [acesso em 03 nov. 1998] Disponível em: URL: <http://sunsite.berkeley.edu>.

### **Capítulo de livro**

Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia básica**. 2ª ed. São Paulo: Elsevier; 2007. ISBN: 9788535254914.

### **Capítulo de livro cujo autor é o mesmo da obra**

Ronan CA. **História ilustrada da Ciência da Universidade de Cambridge**. Rio de Janeiro: Zahar; 1983. p. 30-5. ISBN: 9788585061685.

### **Capítulo de livro - autor/colaborador**

Zanella MT. **Obesidade e fatores de risco cardiovascular**. In: Mion Jr D, Nobre F, editores. Risco cardiovascular global: da teoria à prática. 2ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2000. p. 109-25.

### **Tese/Dissertação/Monografia**

Autor. Título e nº de páginas. Localidade; ano de apresentação. Grau (tese, dissertação ou monografia) [Programa de Pós-Graduação em...] – Instituição onde foi apresentada.

Duque SS. Avaliação técnica de PCR na detecção de fatores de virulência *Escherichia coli* diarreio gênica empregando culturas fecais primárias. Rio de Janeiro; 2000. Mestrado [Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular] - Instituto Oswaldo Cruz.

Lima N. Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem. Campinas, 1991. Tese [Programa de pós-graduação em Ciências Agrárias] Universidade de Campinas.



### Trabalho publicado em anais de eventos científicos

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, eds. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Anais do 4º Congresso Paulista de Saúde Pública; 1993 jul. 10-14; São Paulo, Brasil. São Paulo: Associação Paulista de Saúde Pública; 1995.

### Trabalhos aceitos para publicação (no prelo)

Nascimento E, Mayrink W. Avaliação de antígenos de *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. **Rev Inst Trop** 1984. (No prelo)

### Trabalhos inéditos (submetidos à aceitação de uma editora, sem ter atingido a fase de publicação)

Silvestre P. Golpe de aríete: método gráfico. Belo Horizonte: Ed. UFMG; 1988. (Inédito)

### Patente

Autor(es), seguido da expressão inventor(es); depositante. Título da patente. Sigla do País, seguido da expressão patente, e nº da mesma. Data de publicação da patente.

Paulo César da Fonseca, inventor. Produto Erlan LTDA., depositante. Ornamentação aplicada à embalagem. BR patente C.I.10-3-6. DI2300045. 12 set. 1983; 28 maio 1985.

### Legislativa

Competência (país, estado ou cidade). Título. (especificação da legislação, número e data). Ementa. Título da publicação oficial. Local (cidade), data (dia, mês abreviado e ano). Seção, paginação.

Brasil. Ministério da Educação e Cultura. Secretaria da Cultura. **Portaria n.º 23**, de 26 de outubro de 1982. Modifica o Plano Nacional de Microfilmagem de Periódicos Brasileiros criado pela **Portaria DAC n.º 31**, de 11 de dezembro de 1978. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 1 dez. 1982; Seção 1, v.120, n.227, p.22438.

## Base de Dados

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da saúde. Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Disponível em: [\[Link\]](#) Acesso em: 27 ago. 2009.

## Documentos de Associações/Organizações

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009. Influenza and other Influenza Viruses. 91p. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 28 ago. 2009.

Antes de submeter o manuscrito é importante:

- a) **testar todos os hiperlinks das referências**; passando o mouse por cima dos hiperlinks verifique se os endereços informados estão corretos.
- b) **impessoalidade**: O trabalho é resultado da investigação cientificamente fundamentada do autor sobre determinado assunto, não cabendo um relato pessoal sobre o trabalho, haja vista que o estudo deverá ser acessível à comunidade científica sempre que outro estudioso necessitar explorar o assunto em questão, logo deve ser redigido em terceira pessoa, caracterizando o teor universal da pesquisa desenvolvida;
- c) **estilo científico**: deve ser informativo, racional, baseado em dados concretos, onde podem ser aceitos argumentos de ordem subjetiva, desde que explanados sob um ponto de vista científico;
- d) **vocabulário técnico**: a comunicação científica deve ser feita com termos comuns, que garantam a objetividade da comunicação, sendo, porém que cada área científica possui seu vocabulário técnico próprio que deve ser observado;
- e) **correção gramatical**: a observação da correção do texto deve ser feita com cuidado, evitando-se o uso excessivo de orações subordinadas em único parágrafo, o excesso de parágrafos, lembrando que cada parágrafo encerra uma pequena ideia defendida no texto, logo, encerrada a ideia, muda-se o parágrafo.

# AGRADECIMENTOS

*“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento”.*

Frederick Herzberg

Com as palavras de Herzberg, queremos agradecer aos Editores Científicos, integrantes do Corpo Editorial e Avaliadores da Revista Fitos que ajudaram a elevar a qualidade e o reconhecimento da revista com seu trabalho no ano de 2018. A todos o **nosso muito obrigado**.

## Editores

Emiliano de Oliveira Barreto

Érica Speaglich

Fátima Checheto

Glauco de Kruse Villas-Bôas

Israel Felzenszwalb

Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

João Paulo Viana Leite

José Luiz Mazzei da Costa

Marcelo Neto Galvão

Marcos Sorrentino

Paulo Rogério Lopes

Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu

Vanilde Citadini Zanette

## Corpo Editorial

Benjamin Gilbert

Cecilia Veronica Nunez

Claudia do Ó Pessoa

Edeltrudes de Oliveira Lima

Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha

Jan Carlo Oliveira Bertassoni Delorenzi

Jislaine de Fátima Guilhermino

João Marcos Hausmann Tavares

José Maria Guzman Ferraz

Katia Soares da Poça

Mahabir Prashad Gupta

Maria Aparecida Medeiros Maciel

Maria Augusta Borges Cursino de Freitas Arruda

Maria Cecilia Tomassini Urti

Maria Cristina Marcucci Ribeiro

Nilson do Rosário Costa

Norma Albarello

Sarita Albagli

Sônia Soares Costa

Ulysses Paulino de Albuquerque

## Avaliadores

André Mesquita Marques

Andréia da Silva Fernandes

Andreia Peraro Nascimento

Angela Erna Rossato

Bruna Nunes Luna

Carolina Paula de Souza Moreira

Cecilia Veronica Nunez

César Luis Siqueira Junior

Douglas Costa Gontijo

Emiliano de Oliveira Barreto

Fatima Chechetto

Felipe Rosafa Gavioli

Gabriela Freitas Ferreira

João Henrique Ghilardi Lago  
José Luiz Mazzei da Costa  
Joyce Alves Rocha  
Juliana Pogliа Carini  
Kátia Maria da Silva Parente  
Leda Mathias  
Luciana Moreira Chedier  
Marcelo Neto Galvão  
Maria Carolina Anholeti  
Maria Izabela Ferreira

Maria Helena Duraes Alves Monteiro  
Maria Raquel Figueiredo  
Marisa Alves Nogueira Diaz  
Nilber Gonçalves da Silva  
Paulo Rogério Lopes  
Raquel Elisa da Silva López  
Roberto Luiz Queiroz  
Ronan Batista  
Simone Sacramento Valverde  
Vinícius Bednarczuk Oliveira



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

