

REVISTA

# FITOS<sup>®</sup>

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

Volume 14 - Número 1  
Janeiro - Março 2020

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Medicamentos da Biodiversidade

Foto de capa: coppercrafts.eu - *Malaleuca L.* (Myrtaceae)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz





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**

**Editor de Pesquisa** Maria Helena Monteiro, FIOCRUZ

**Editor de Desenvolvimento** Edemilson Cardoso da Conceição, UFG

**Editor de Inovação** Glauco de Kruse Villas-Bôas, FIOCRUZ

**Editores Associados**

Emiliano de Oliveira Barreto, UFAL

Érica Speaglich, USP

Israel Felzenszwalb, UERJ

Ivaniides Vasconcelos Rodrigues, UFJF

João Paulo Viana Leite, UFV

Marcelo Neto Galvão, FIOCRUZ

Marcos Sorrentino, USP

Marisa Fernandes Mendes, UFRRJ

Paulo Rogério Lopes, UFPR

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

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 Aparecida Medeiros Maciel, UFRN, Brasil

Maria Cecilia 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 online / Online 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

Yolanda de Castro Arruda – Revisão textual e normativa

Eugênio Telles – Editoração digital

## Apoio CIBS

Preciosa de Jesus Meireles de Oliveira – Assessoria de gestão

Denise Monteiro da Silva – Assessoria de comunicação e divulgação

## 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, 2019  
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 14, número 1

Janeiro - Março 2020

## APRESENTAÇÃO

Yolanda Arruda

6-7

## EDITORIAL

### Fitomedicamentos e os desafios atuais na saúde pública no Brasil

8-9

Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu, Maria Helena Durães Alves Monteiro.

## ARTIGO DE PESQUISA

### Atividade antimicrobiana de polifenóis isolados das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (Engl.) guiado por bioautografia

10-25

Antimicrobial activity of polyphenols isolated from the leaves of *Schinopsis brasiliensis* (Engl.) guided by bioautography

Saraiva, Antonio Marcos; Coutinho, Felipe Neves; Silva, Ricardo Oliveira da; Randau, Karina Perrelli; Xavier, Haroudo Satiro; Pisciotano, Maria Nelly Caetano.

### Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* e sua incorporação em um creme mucocutâneo

26-37

Antimicrobial activity of *Melaleuca* essential oil and its incorporation into a mucocutaneous cream

Correa, Leonardo Tibiriçá; Nicoletti, Maria Aparecida; De Amorim, Cledja Soares; Da Costa, Amanda Ramos; Leoni, Luís Antônio Bafille; Munõz; Juliana Weckx Peña, Fukushima, André Rinaldi.

### Determination of aristolochic acids I and II in Brazilian sugar cane spirit infusions “milhomem” commonly used in northeast Brazil as popular drinks

38-44

Moreno, Daniela Sales Alviano; Silva, Davi Oliveira e; Silva, Antonio Jorge Ribeiro da; Alves, Péricles Barreto; Alviano, Celuta Sales; Kaplan, Maria Auxiliadora Coelho.

### Emetine and cephaeline production and regulation by *in vitro* propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes in semi-solid media and temporary immersion bioreactor

45-55

Silva, Simone da; Alencar, Danielle Cardoso; Benevides, Paulo José Coelho; Astolfi-Filho, Spartaco.

### Estratégia de patenteamento de derivados de *Cannabis sativa* para obtenção da anuidade prévia da ANVISA

56-66

*Cannabis sativa* derivatives patenting strategy for ANVISA's previous annuity

Oliveira, Ana Cláudia Dias; Nogueira, Marcelo; Reis, Simone Milezi de Miranda.

**Evaluación de la genotoxicidad de extractos acuosos de hojas de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) utilizando el test de *Allium cepa*** 67-75

Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) leaves using the *Allium cepa* test

Altamirano, Carlos Gustavo; Pozzer, Maria Jose Aguilar; Rebatta, Jose Luis; Semczuk, Rosaura Ines; Florentín, Alejandro Paul; Fernandez, Maria de los Angeles Sandoval.

**Extração de substâncias pécticas do mesocarpo de *Passiflora nitida* Kunth. Passifloraceae** 76-87

Extraction of pectic substances from the mesocarp of *Passiflora nitida* Kunth. Passifloraceae

Gomes, Juliane Tavares; Barroso, Adenilson de Sousa; Monteiro, Carlos Diego Almeida; Mourão, Rosa Helena Veras.

**Obtenção e avaliação de sistemas micelares contendo extrato de frutos do oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]** 88-102

Obtaining and evaluation of micellar systems containing oiti fruit extract [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]

Ramos, Ygor Jessé; Silva, Neilson Queiroz da; Costa-Oliveira, Claudete da; Pereira, Rudá Antas; Motta, Milleno Dantas; Cerqueira-Silva, Lidércia Cavalcanti Ribeiro.

**Uso de plantas medicinales por idosos adscritos à atenção primária em Porto Alegre/RS e potenciais interações planta-medicamento** 103-117

Use of medicinal plants by the elderly at primary health care in Porto Alegre/ RS and potential herb-drug interactions

Scheid, Taina; Fajardo, Ananyr Porto.

## REVISÃO

**Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero *Mikania*** 118-144

Chemical composition, biological activity and safety of use of plants from genus *Mikania*

Coutinho, Lucas Amorim; Gonçalves, Carolina Passarelli; Marcucci, Maria Cristina.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

**Normas para submissão e apresentação do manuscrito** 145-156



É com imensa satisfação que a Revista Fitos publica mais uma edição, volume 14, número 1.

Neste primeiro número do ano apresentamos nove artigos de pesquisa e uma revisão, conforme título e resumos abaixo:

**Atividade antimicrobiana de polifenóis isolados das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (Engl.) guiado por bioautografia** - O objetivo deste estudo foi apresentar a atividade antimicrobiana frente *S. aureus*, *Staphylococcus coagulase*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

**Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* e sua incorporação em um creme mucocutâneo** - Óleos essenciais com atividade antimicrobiana têm despertado interesse como alternativa terapêutica. Esse trabalho teve por objetivo identificar a concentração inibitória mínima (CIM<sub>50</sub>) do óleo de *Melaleuca* frente a três importantes espécies, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

**Determination of aristolochic acids I and II in Brazilian sugar cane spirit infusions “milhomem” commonly used in northeast Brazil as popular drinks** – O objetivo deste trabalho foi apresentar os ácidos aristolóquicos (AA), componentes fitoquímicos encontrados em plantas do gênero *Aristolochia* pertencentes à família Aristolochiaceae. Esses compostos possuem um ácido nítrico fenantreno carboxílico e são relatados como cancerígenos, mutagênicos e nefrotóxicos. As infusões de aguardente de cana-de-açúcar contendo espécies de *Aristolochia* são comumente usadas no Brasil como bebidas populares, na total ausência de informações científicas.

**Emetine and cephaline production and regulation by *in vitro* propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes in semi-solid media and temporary immersion bioreactor** - *Psychotria ipecacuanha* é uma espécie conhecida pelas propriedades medicinais, que está criticamente ameaçada devido à exploração excessiva de suas populações naturais. Embora as dificuldades na propagação convencional por sementes e por propagação vegetativa sejam geralmente entendidas, o presente estudo aprimora nosso conhecimento ao descrever protocolos eficientes de regeneração de plantas e indução de raízes para *P. ipecacuanha*, enquanto compara o conteúdo de alcalóides (emetina e cefelina) em tecidos derivados *in vitro*.

**Estratégia de patenteamento de derivados de *Cannabis sativa* para obtenção da anuência prévia da ANVISA** - O uso de *Cannabis sativa* de forma medicinal tem aumentado a cada ano, principalmente pela capacidade de proporcionar alívio imediato dos sintomas de problemas de saúde, tais como convulsões, depressão e insônia. O objetivo deste artigo é apresentar estratégias de patenteamento de produtos e processos à base de fitocanabinoides para obtenção da anuência prévia de pedidos de patentes pela ANVISA.

**Evaluación de la genotoxicidad de extractos acuosos de hojas de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) utilizando el test de *Allium cepa*** - *M. oleifera* é uma árvore distribuída em áreas tropicais e subtropicais amplamente utilizada na medicina tradicional para tratar várias afecções. As maiores concentrações dos extratos aquosos testados mostraram maior inibição da mitose em relação aos controles, mas não foram encontrados efeitos genotóxicos, embora as concentrações utilizadas no experimento não sejam usuais para *M. oleifera* na medicina tradicional.

**Extração de substâncias pécticas do mesocarpo de *Passiflora nitida* Kunth. Passifloraceae** - *Passiflora nitida* Kunth. (maracujá-do-mato) nativa do Brasil com ocorrências nas regiões norte, nordeste e centro-oeste. O objetivo deste estudo foi extrair substâncias pécticas do mesocarpo de *P. nitida*.

**Obtenção e avaliação de sistemas micelares contendo extrato de frutos do oiti (*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch)** - O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar formulações de sistemas micelares, organogéis e emulsões (O/A), veiculados ou não ao extrato etanólico do fruto do oiti (*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch), visando seu uso tópico.

**Uso de plantas medicinais por idosos adscritos à atenção primária em Porto Alegre/RS e potenciais interações planta-medicamento** - O objetivo deste estudo foi pesquisar a utilização de plantas medicinais por idosos diabéticos, hipertensos e polimedicados vinculados à Unidade de Saúde Costa e Silva, Porto Alegre/RS e descrever potenciais interações entre as plantas e os medicamentos utilizados, conforme literatura. Demonstrou-se que além dos medicamentos prescritos estes idosos têm como prática de cuidado o uso de chás medicinais, destacando-se a marcela (*Achyrocline satureioides*) e a camomila (*Matricaria chamomilla*).

**Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero *Mikania*** - *Mikania*, o guaco é utilizado popularmente há muitos anos, devido às propriedades medicinais atribuídas às folhas, incluindo a ação tônica, depurativa, antipirética e broncodilatadora, além de estimulante do apetite e antigripal. Nesse trabalho, apresentou-se uma revisão sobre plantas do gênero *Mikania*, incluindo a farmacobotânica, a composição química, atividades biológicas e farmacológicas, interações medicamentosas, toxicidade e controle de qualidade.

Agradecemos a colaboração de toda a equipe editorial da Revista Fitos que colaborou para este resultado e, em especial, aos autores pela prontidão e interação nas avaliações de edição de texto e leituras de provas, quando solicitados.

Yolanda Arruda



## Fitomedicamentos e os desafios atuais na saúde pública no Brasil

Em 2020, faz 10 anos que a Revista Fitos passou a ser editada pelo Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde (NGBS), hoje, Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde (CIBS), de Farmanguinhos/Fiocruz, cuja missão é promover a pesquisa, o desenvolvimento e a inovação em medicamentos da biodiversidade brasileira, contribuindo para a formulação de políticas de Ciência, Tecnologia e Inovação, através do sistema nacional de redes – RedesFito <https://redesfito.far.fiocruz.br>.

A Revista Fitos, inicialmente publicada pela ALANAC é, hoje, o periódico científico oficial do Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, utilizado como meio de divulgação do conhecimento científico em pesquisa, desenvolvimento e inovação em biodiversidade e saúde. Enquanto periódico institucional incorporou o desenvolvimento da área de biodiversidade e saúde na publicação científica de acesso aberto, em atendimento à Política de Acesso Aberto da Fiocruz. Para tanto, tornou-se uma publicação *online* em 2014.

A evolução do periódico tem sido importante, mesmo frente aos desafios das crises econômicas, das exigências na área da publicação científica, da evolução tecnológica, entre outros. Ajustou-se o escopo algumas vezes, ampliando a aceitação de artigos que traduzam a visão interdisciplinar do processo de pesquisa, desenvolvimento e inovação em biodiversidade e saúde. Está indexada em diferentes bases (Google Acadêmico, Portal de Periódicos Fiocruz, ARCA Fiocruz, Portal de Periódicos CAPES, Diadorim, BVS, Microsoft Academic, Latindex, Oasis/IBICT, Journal4Free, CrossRef, Dimensions e LivRe) e, em avaliação na LILACs e na Redalib. Sua visibilidade tem sido ampliada pela divulgação de notícias em redes sociais – Facebook, Twitter, Instagram, LinkedIn, WhatsApp, seguindo a tendência da altmetria.

O início de 2020 está marcado por importantes desafios na área da saúde, tanto no âmbito internacional, quanto no nacional e local. A pandemia da COVID-19, causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), tem gerado uma revolução em todo o mundo, na medida em que se observam profundos impactos nas diferentes áreas do fazer humano, gerados pela rápida e ampla disseminação do vírus. A área da saúde está em polvorosa diante do desconhecido. Corre-se contra o tempo para a descoberta de vacina e/ou de fármacos que possam atuar na recuperação dos infectados, de maiores esclarecimentos sobre o vírus e na elaboração de diferentes protocolos para atendimento às pessoas contaminadas e sadias, visando o controle da pandemia. Novos comportamentos sociais emergem. Sentimentos de medo, ansiedade, indignação, colaboração, empatia, solidariedade, são vivenciados no planeta. Circulam informações corretas, mas também muitas mentiras e boatos. É premente, portanto, que as autoridades divulguem para a sociedade informações confiáveis, ou locais onde se possam obter tais informações, uma vez que a mídia comum nem sempre revela o necessário, mas o espetáculo. Esperam-se respostas rápidas e eficazes da área da pesquisa e na divulgação dos resultados que minimizem a sensação de insegurança estabelecida no planeta, que anseia por uma solução que impeça a disseminação da doença e a cura dos acometidos por ela.

É neste contexto que a comunidade científica uniu esforços estabelecendo uma rede de cooperação internacional, empenhada na pesquisa e divulgação de resultados e informações pertinentes para a sociedade, que abreviem o curso da pandemia.

Ainda, no sentido de manter o seu compromisso em contribuir com a pesquisa, desenvolvimento e inovação em biodiversidade e saúde, vem ratificar o posicionamento da Organização Mundial da Saúde (OMS) que sustenta não haver remédio ou medicamento eficaz para tratamento de pacientes acometidos pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), capaz de prevenir ou curar a doença. A OMS não recomenda a automedicação com nenhum medicamento, de origem sintética ou natural, incluindo antibióticos, como prevenção ou cura para a COVID-19.

Assim, a Revista Fitos convida pesquisadores que estejam desenvolvendo trabalhos, especialmente aqueles da área de produtos naturais (autores usuais da revista), a publicarem estudos que contribuam para a prevenção e manutenção da saúde dos indivíduos, assim como para a melhoria dos sintomas dessa pandemia.

Por outro lado, mesmo nesse estado de guerra que se instalou no mundo, há que se dar continuidade às ações voltadas para as doenças que atingem a população nacional/local. No caso do Rio de Janeiro, os casos de Sarampo, de Dengue, Zika e Chikungunya, precisam estar também na mira da saúde pública. A Revista Fitos estimula que trabalhos sobre esses temas sejam submetidos para publicação.

Que esse momento tão difícil traga para a humanidade muita reflexão, uma avaliação de como temos usado o nosso planeta, da forma como se buscam as riquezas, o poder, enfim, uma revisão de ser humano e sua ação em sua casa maior, a Terra.

Pesquisadores, aguardamos sua contribuição. Boa leitura!

Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu, Editora Executiva  
Maria Helena Durães Alves Monteiro, Editora Científica

# Atividade antimicrobiana de polifenóis isolados das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (Engl.) guiado por bioautografia

Antimicrobial activity of polyphenols isolated from the leaves of *Schinopsis brasiliensis* (Engl.) guided by bioautography

DOI 10.32712/2446-4775.2020.850

Saraiva, Antonio Marcos<sup>1\*</sup>; Coutinho, Felipe Neves<sup>2</sup>; Silva, Ricardo Oliveira da<sup>3</sup>; Randau, Karina Perrelli<sup>2</sup>; Xavier, Haroudo Satiro<sup>2</sup>; Pisciotano, Maria Nelly Caetano<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UF/PE), Laboratório de Análises Clínicas, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Várzea, CEP 50670-901, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Rua Professor Artur de Sá, s/n, CDU, Cidade Universitária, CEP 50740-520, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química Fundamental, Avenida Professor Luiz Freire, s/n, Laboratório de RMN, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brasil.

\*Correspondência: [saraivas2@yahoo.com.br](mailto:saraivas2@yahoo.com.br).

## Resumo

O extrato metanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* apresentou atividade antimicrobiana com concentração mínima inibitória de 31,15 µg/mL frente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. A prospecção fitoquímica das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (Engl.) guiado pelo método bioautográfico permitiu isolar duas moléculas (galato de metila - GM and β-1,2,3,4,6-Pentagaloiil-D-Glicose - PGG), as quais apresentaram atividade antimicrobiana frente *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Enterococcus faecalis*, com halos de ordem de 14 a 20 mm. Ainda, PGG apresentou atividade antimicrobiana frente *Pseudomonas aeruginosa* com halos da ordem de 21 mm e GM com halos de ordem de 17 a 18 mm frente *Escherichia coli*. Novos estudos, tais como a quantificação dos compostos antimicrobianos e identificação de outros metabólitos secundários das folhas de *S. brasiliensis*, são necessários pelos presentes resultados.

**Palavras-chave:** β-1,2,3,4,6-Pentagaloiil-D-Glicose. *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistente. *Pseudomonas aeruginosa*. Bioautografia.

## Abstract

The methanolic extract of the leaves of *Schinopsis brasiliensis* presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* with minimum inhibitory concentration of 31.15 µg/mL. Phytochemical prospecting of *Schinopsis brasiliensis* (leaves)

guided by the bioautographic method allowed to isolate two molecules (methyl gallate - GM and  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagalloyl-D-Glucose - PGG), which showed antimicrobial activity against *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci and *Enterococcus faecalis* with inhibition zones of 14 to 20 mm. Furthermore, PGG presented antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* showed inhibition zone of 21 mm and GM showed inhibition zone of 17 to 18 mm against *Escherichia coli*. Further studies, such as quantification of antimicrobial compounds and identification of other secondary metabolites of leaves of *S. brasiliensis* are necessary due to the present results.

**Keywords:**  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagalloyl-D-Glucose. *Staphylococcus aureus* multiresistant MRSA. *Pseudomonas aeruginosa*. Bioautography.

---

## Introdução

O crescimento da resistência bacteriana aos antibióticos é uma ameaça à população mundial. A multirresistência de bactérias virulentas e de alta prevalência nas infecções nosocomiais e comunitárias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, entre outras) [1] torna incerta a eficácia dos antimicrobianos. As recorrências nas doenças infecciosas causam prolongamento do tempo de internação hospitalar, bem como têm levado a mortes prematuras de várias pessoas. Por tudo isso, se faz necessário e essencial, a descoberta de novas classes de antimicrobianos, em particular, aquelas oriundos das plantas, que é uma fonte inesgotável de novas moléculas [2].

*Schinopsis brasiliensis* Engl. é popularmente conhecida por “braúna”, “baraúna”, “braúna-do-sertão” e “braúna-parda”, “quebracho”, “chamacoco” e “chamucoco” [3,4]. Na medicina popular são usadas das folhas, casca, caule, entrecasca, resina e fruto de *S. brasiliensis* como antiinflamatório em geral, gripe, febre, tosse, diarreia, disenteria, impotência sexual, fraturas [5-7], como antiséptico natural no tratamento de micoses superficiais e feridas [8].

Em estudo do extrato das folhas de *S. brasiliensis* por Saraiva [9] foi observada importante atividade antioxidante e alto teor de polifenóis. Também foi relatada boa atividade antimicrobiana frente cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, como as cepas de *Staphylococcus coagulase* negativo e menor atividade antimicrobiana frente às cepas de *Enterococcus faecalis*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Na planta tem sido identificado e/ou isolado a partir das folhas e caule de *S. brasiliensis* os seguintes metabolitos secundários: ácido gálico, galato de metila, quercetina, quercetina-3-O- $\beta$ -D-xilopiranosídeo 5,6,7,8,3', 4'-hexahidroxi-flavonol, 5,7,4',5'-tetrahidroxiflavon-3'-o- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, megastigmona, gallic acid 4-O-b-D-gluco-pyranoside, gallic acid 4-O-b-D-(60-Ogalloyl)-gluco-pyranoside, ethyl-O-b-D-(6'-O-galloyl)-gluco-pyranoside, 2-hydroxy-4-methoxyphenol, 2-hydroxy-4-methoxyphenol 1-O-b-D-(6'-O-syringoyl) - gluco-pyranoside, ácido elágico, 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi-flavonol, aquil e alquênil fenóis,  $\beta$ -sitosterol, estigmast-4-en-3-ona, estigmast-4-em-ona-6- $\beta$ -ol, entre outros [4,9-12].

A pesquisa dos componentes com propriedade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* tomou como indicador os fatores de retenção (Rf) destes, por meio da técnica bioautográfica, referentes às zonas de inibição frente o inóculo de *Staphylococcus aureus* [2].

## Material e Método

### Químicos e reagentes

Os reagentes e solventes empregados neste estudo foram: ácido fórmico (Vetec), ácido acético glacial (Merck, 99,8%), n-hexano (Vetec, 99%), acetato de etila (Vetec, 99,5%), metanol (Vetec, 99,8%), dimetilsulfoxido (Vetec, 99,9%), Tween 80 (Vetec), 2,3,5-cloridrato de trifeniltetrazólio (Sigma), 2-Aminoetildifenil borinato. Como padrões foram utilizados: ácido gálico (Sigma) e tetraciclina (Sigma).

### Amostra vegetal e obtenção das frações

A amostra foliar de *S. brasiliensis* foi coletada na fazenda Cacimba Nova, localizada no município de Mirandiba/PE (08°07'13"S x 38°43'46"W, 450 m) no mês de março de 2008<sup>[13]</sup>. O material testemunho foi identificado pelo curador A. Bocage e incorporado ao herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob nº 70.007. As amostras foram estabilizadas durante três dias a 45 ± 5°C em estufa e posteriormente pulverizadas em triturador, obtendo-se granulometria de 16 Mesh.

Os extratos foram obtidos por maceração fracionada com n-hexano, seguido por metanol, sendo descartada a fração hexânica. O extrato metanólico de *S. brasiliensis* (ExmSb) foi filtrado e evaporado (Marconi MA-120) sob pressão reduzida, obtendo rendimento de 26,27%. A escolha do metanol tem sido recomendada para a extração de compostos fenólicos em tecidos vegetais devido à sua capacidade de inibir a oxidação de polifenóis, que podem alterar a atividade antioxidante <sup>[14]</sup>.

### Linhagens microbianas

Os microrganismos utilizados nos ensaios pertencem à coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - Brasil (código: **AM**). Foram eles:

- *Staphylococcus aureus*: MRSA (Clone Epidêmico Brasileiro - AM858, AM793; Clone Pediátrico - AM642 e AM922; MSSA (AM632, AM672) e Padrão (AM103-ATCC 6538);
- *Staphylococcus coagulase negativo* (AM789), *Staphylococcus saprophyticus* (AM245), *Staphylococcus epidermidis* (AM235), *Staphylococcus sp.* (AM109);
- *Enterococcus faecalis* (AM997; AM1056 - ATCC 51299);
- *Pseudomonas aeruginosa* (AM428; AM458; AM460; ATCC 14502 - AM206);
- *Escherichia coli* (AM161; AM167; AM251; AM247; AM1050 - ATCC 35218);
- *Klebsiella pneumoniae* (AM339; AM342; AM379; AM410);
- *Salmonella spp.* serotype Montevideo (AM1046; ATCC 8387 - AM149);
- ATCC – American Type Culture Collection.

### Preparo dos inóculos

Os inóculos foram preparados a partir de culturas de 24 h em agar Mueller-Hinton (Himedia), e suspendidas em soro fisiológico estéril, ajustando a turvação dos inóculos a da escala 0,5 McFarland (10<sup>8</sup> UFC/ml) <sup>[15]</sup>.

## Método Bioautográfico

Na cromatografia em camada delgada (CCD) (GF<sub>254</sub> - Merck), o extrato metanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* na concentração de 20 mg/mL foi aplicado, tendo como fase móvel o sistema cromatográfico acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:3:3:3, v/v). As CCD foram eluídas em duplicata, sendo uma usada como referência cromatográfica (CCD<sup>a</sup>) e a segunda para bioautografia (CCD<sup>b</sup>).

## Bioautografia

A CCD<sup>b</sup> ficou sob corrente de ar por 8 horas. Após esse período foi instalada numa placa de Petri e recoberta com 20 mL de meio fundido de ágar Mueller Hinton (Himedia®), inoculado com uma suspensão salina de *S. aureus* ATCC 6538 ou AM793 (10<sup>8</sup> UFC/ml) [12]. Após solidificação do meio de cultivo, a placa foi incubada por 24 horas a 37±1°C. Passado este período, a bioautografia foi revelada com uma solução de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 2,5 mg/mL e reincubada por 4 horas. A presença de zona de inibição indica a existência de compostos ativos [16].

## Isolamento dos constituintes com potencial antimicrobiano das folhas

A prospecção de metabólitos secundários do extrato metanólico da folha de *S. brasiliensis* (ExmSb) deu partida com o particionamento de 40 g de ExmSb, que se iniciou com n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol (3 x 150 mL), obtendo-se, respectivamente as partições hexânica (ExmSb/PH), clorofórmica (ExmSb/PC), em acetato de etila (ExmSb/PAE) e finalmente a partição metanólica (ExmSb/PM). Das partições obtidas, a trabalhada foi a ExmSb/PAE, peso 16,17 g.

## Isolamento de S1

A partir de 1 g da ExmSb/PAE fez-se cromatografia em coluna (CC) tendo como fase estacionária a Sephadex LH-20® e sistema eluente (acetona: triclorometano: metanol - 200:100:150, v/v), obtendo-se 102 frações com volume médio de 7 mL. Com as frações 82-102 (F1') (240 mg), fez-se nova CC tendo como fase estacionária Sephadex LH-20 e sistema eluente: (acetona:diclorometano:metanol-200:100:150, v/v), obtendo-se 25 frações, média de 10 mL de volume. A partir das frações F21-24 (F2') (146 mg) e seguindo-se os passos anteriores, obteve-se 15 frações, média de 10 mL de volume, observou o isolamento de S1 nas frações 7-13 (F3') (89 mg). Sendo realizadas análises espectrais (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, Cosy, HSQC, HMBC e Dept 135 - Bruker, modelo Avance DRX-500), cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (Shimadzu LC-MS-IT-TOF) e Infravermelho com transformada de Fourier (IVTF Bruker® modelo IFS66) para elucidação estrutural.

## Isolamento de S2

A partir de 1 g do ExmSb/PAE foi realizado o isolamento da molécula dois de polifenol em coluna cromatográfica, tendo como fase estacionária a Sephadex (LH-20), e como sistema eluente Acetona:Diclorometano:Metanol (200:100:150, v/v), obtendo-se 52 frações com volume médio de 10 mL. Seguiu-se nova coluna em Sephadex (LH-20), a partir das frações 22-26 (57 mg), e com novo sistema eluente (Acetona:Diclorometano: Metanol) na proporção de (150:100:150, v/v), onde obteve-se 39 frações, média de 10 mL, onde, na primeira fração (14,7 mg) evidenciou-se o isolamento da molécula (S2), quando foram realizado os espectros de RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) (Varian Unity Plus 300 MHz spectrometer) e determinação

do comprimento de onda da molécula por varredura num espectrofotômetro UV-Visível (Agilent 8453 UV-Visible spectrophotometer).

### **Atividade Antimicrobiana**

Os estudos se basearam em dois métodos de ensaios: medida do halo de inibição por técnica de poços/difusão em agar e concentração mínima inibitória (CMI) por diluição em ágar.

### **Preparação das soluções e diluições das frações**

O extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis* (ExmSb) foi ressuspenso em dimetilsulfóxido (DMSO):água (20%, v/v) [17]. A diluição do extrato para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi 10 mg/mL (fator de diluição = 2) [8]. O antibiótico padrão foi tetraciclina (TET) (Sigma) nas concentrações de 0,31 µg/ml a 640 µg/ml (fator de diluição = 2).

Os metabólitos secundários isolados das folhas de *Schinopsis brasiliensis* foram solubilizados em solução aquosa de DMSO (20%, v/v) [17] nas concentrações de 750-6000 µg/mL, para S2 e de 250-2000 µg/mL, para S1 (fator de diluição = 2). O antimicrobiano controle foi a tetraciclina (300 µg/mL). Os controles negativos para ambas as técnicas (DMSO e Tween 80) foram preparados.

### **Determinação do Halo de Inibição**

Após o semeio dos inóculos bacterianos em placas, com agar Mueller-Hinton, foram realizadas perfurações (6 mm de diâmetro) e aplicação dos produtos testes (100 µl por poço), nas concentrações de 75, 150, 300 e 600 µg/poço para o isolado S2 e de 25, 50, 100 e 200 µg/poço para o isolado S1. O antibiótico padrão foi tetraciclina (30 µg / poço). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C ± 1 por 24 h [17]. Os ensaios foram realizados em duplicata.

### **Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)**

A avaliação da CMI foi determinada pela metodologia da microdiluição em caldo proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute [15] modificada.

Microplacas estéreis com 96 orifícios foram utilizadas. Cada orifício recebeu 160 µL de meio de cultura líquido caldo Mueller-Hinton (Himedia), 20 µL do inóculo a 0.5 da escala McFarland (10<sup>8</sup> UFC/mL) e 20 µL das soluções de diferentes concentrações de ExmSb (31.25 a 1000.0 mg/mL). Como controles foram utilizados: 20 µL de soro fisiológico, 160 µL de caldo Mueller-Hinton e 20 µL do inóculo (controle de crescimento microbiano); 20 µL de soro fisiológico e 180 µL de caldo Mueller-Hinton (controle de esterilidade); solução aquosa de tetraciclina nas concentrações de 0.125 µg/mL a 64.0 µg/mL (controle positivo); 160 µL de meio de cultura líquido caldo Mueller-Hinton, 20 µL do inóculo a 0.5 da escala McFarland e 20 µL DMSO (40%, v/v) (controle negativo). As microplacas foram incubadas a 37±1°C por 24 horas e, após esse período, foram adicionados 20 µL da solução aquosa de resazurina 0,2% como revelador.



## Resultados e Discussão

A avaliação da atividade antimicrobiana de um extrato é determinada pela presença de metabólitos secundários com toxicidade as cepas microbianas. Estes compostos, contidos nas plantas e adquiridos por processos extrativos, são concentrados e testados frente estudos biológicos. A classificação quanto ao potencial antimicrobiana tomou como referência a classificação de Saraiva<sup>[8]</sup> - CMI < 100 µg/mL, muito ativo; CMI entre 100 e 500 µg/mL, ativo; CMI > 500 e ≤ 1000 µg/mL, moderadamente ativo; CMI > 1000 e ≤ 2000 µg/mL, pouco ativo; e aqueles com CMI > 2000 µg/mL, inativos.

Na determinação das CMI das folhas de *S. brasiliensis* (TABELA 1 e 2) foram observadas as menores CMI, classificadas como muito ativos<sup>[8]</sup>, com valores de 31,25 µg/mL frente *S. aureus* e *Staphylococcus* (sp.) com valores de 500 µg/mL frente *E. coli* classificado como ativo.

**TABELA 1:** Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (ExmSb) frente a bactérias Gram-positivas.

Produtos	MIC - Bactérias Gram Positivas (AM)							
	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Staphylococcus</i> <sup>2</sup>			
	103 <sup>1</sup>	672	642	793	235	245	109	789
ExmSb (µg/mL)	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
Tet (µg/mL)	16	2	1	1	0,5	0,5	0,25	<0,062

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; Tet: tetraciclina; <sup>1,2</sup>: Os números abaixo de cada espécie são códigos de identificação que começa com as letras AM e são descritos em detalhe na secção **Linhagens microbianas**.

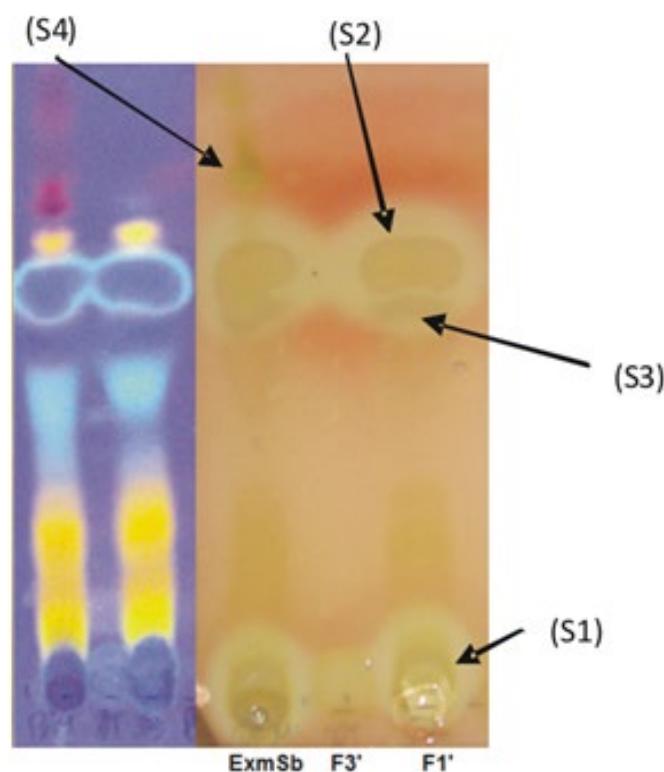
**TABELA 2:** Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (ExmSb) frente a bactérias Gram-negativas.

Produtos	CMI - Bactérias Gram Negativas (AM)													
	<i>E. coli</i>				<i>P. aeruginosa</i>				<i>K. pneumoniae</i>				<i>Salmonella</i>	
	1050 <sup>1</sup>	167	251	161	206	428	458	460	342	379	410	339	149	1046
ExmSb (µg/mL)	500	500	500	500	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Tet (µg/mL)	1	1	0,5	8	4	32	32	32	4	2	>64	4	2	2

*E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; Tet: tetraciclina; <sup>1</sup>: Os números abaixo de cada espécie são códigos de identificação que começa com as letras AM e são descritos em detalhe na secção "Linhagens microbianas".

No estudo bioautográfico observou-se três zonas de inibição, sendo compatível há pelo menos quatro compostos com potencial antimicrobiano frente às duas linhagens de *Staphylococcus aureus* (A: AM103 e B: AM793) testadas. Dois destes compostos (S1, Rf 0,1 e S2, Rf 0,71) foram isolados e suas estruturas elucidadas. O metabólito secundário S3 (Rf 0,60) foi identificado, presuntivamente, utilizando o ácido gálico (Sigma) como padrão de referência por cromatografia em camada delgada (CCD), já tendo sido isolado por Souza<sup>[9]</sup> e Moreira<sup>[10]</sup>. O quarto metabólito secundário (S4), observado no Rf 0,83, ainda não foi identificado (FIGURA 1).

FIGURA 1. Bioautografia das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (ExmSb)



**S1, S2, S3 e S4:** halos de inibição referente a moléculas com potencial antibacteriano por bioautografia; **ExmSb:** extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis*; **F1'** e **F3'**: frações de ExmSb.

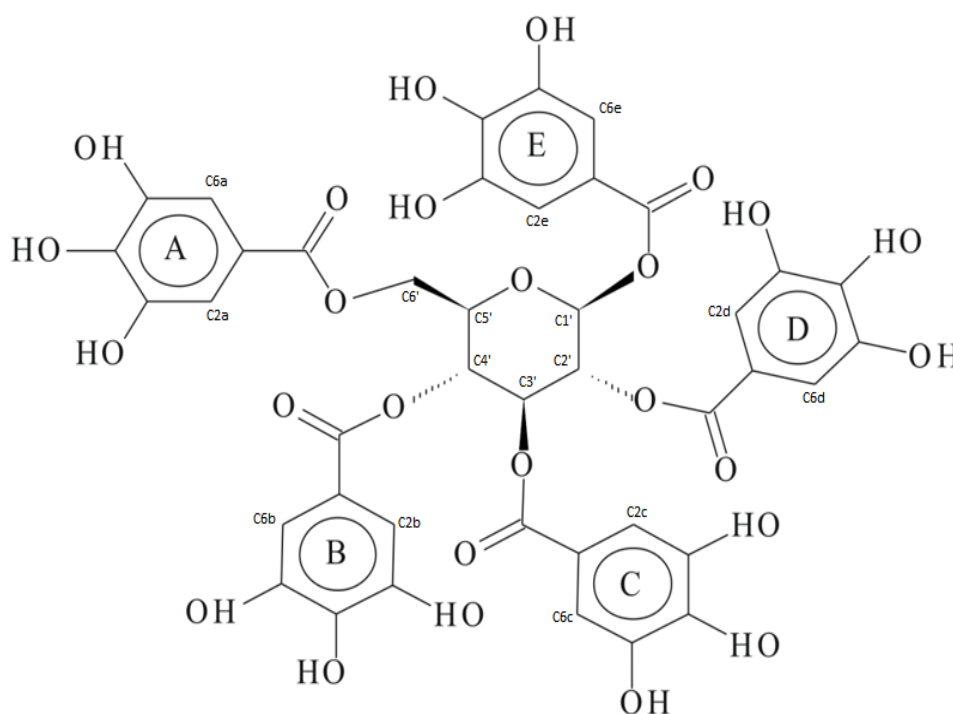
O fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis*, guiado por bioautografia, resultou no isolamento de dois compostos fenólicos:  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloi-D-Glicose (PPG) ou  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloi-D-piranoose e galato de metila, cujas estruturas foram identificadas com base na análise dos dados espectrais por  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  RMN, com apoio do espectro de infravermelho e GC-MS, para S1 e determinação do comprimento de onda ( $\lambda$ ) por varredura no espectrofotômetro de UV-visível e confirmados com os dados da literatura<sup>[9,19-21]</sup>.

### S1 - $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloi-D-Glicose

O composto S1 apresentou-se como um pó amorfo de coloração esbranquiçada. Os dados obtidos por espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) foi caracterizado como uma substância do grupo dos taninos hidrolisáveis, devido a presença de singletos, referente a dois prótons  $^1\text{H}$  entre 6,91 e 7,12 ppm do espectro (6,91 ppm – H-2c, H-6c; 6,96 ppm – H-2e, H-6e; 6,98 ppm – H-2d, H-6d; 7,06 ppm – H-2b, H-6b; 7,12 ppm – H-2a, H-6a), magneticamente equivalentes nas posições C-2 e C-6 de cada anel aromático do galoil, grupo dos fenóis, e sete sinais de prótons alifáticos provenientes de uma porção de açúcar foram observados entre as regiões 4,3 à 6,3 ppm do RMN  $^1\text{H}$ . A ressonância do próton ( $^1\text{H}$ ) anomérico em 6,24 (C-1') e os sinais na região de próton ( $^1\text{H}$ ) 5,59 (C-2'); 5,91 (C-3'); 5,62 (C-4'); 4,42 (C-5'); 4,39-4,52 (C-6') em conjunto com as ressonâncias observada pelos RMN bidimensionais (2D)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  - COSY,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  - HSQC e HMBC, respectivamente, confirmaram a presença da unidade glicopiranoose na estrutura de S1, sendo sua configuração  $\beta$  determinada com base na constante de acoplamento do próton anomérico ( $J = 8,4 \text{ Hz}$ )<sup>[21]</sup>.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e DEPT 135 de S1 mostrou trinta e um sinais representando quarenta e um carbonos, dos quais, cinco são carbonos alquila terciário e um alquila secundário compoendo a molécula da glicose. Dos trinta e cinco carbonos restantes, que fazem parte de cinco grupos galoiil, tem-se trinta carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  (110,79 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(2\text{b})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(6\text{b})$ ]; 110,50 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(2\text{c})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(6\text{c})$ ]; 110,63 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(2\text{d})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(6\text{d})$ ]; 110,54 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(2\text{a})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(6\text{a})$ ]; 110,57 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(2\text{e})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(6\text{e})$ ]; 146,67 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(3\text{b})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(5\text{b})$ ]; 146,40 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(3\text{c})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(5\text{c})$ ]; 146,49 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(3\text{d})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(5\text{d})$ ]; 146,59 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(3\text{a})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(5\text{a})$ ]; 146,55 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(3\text{e})$ ,  $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(5\text{e})$ ], 140,92 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(4\text{b})$ ], 140,27 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(4\text{c})$ ], 140,45 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(4\text{d})$ ], 140,15 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(4\text{a})$ ], 140,50 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(4\text{e})$ ]; (120,34 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(1\text{b})$ ], 120,34 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(1\text{c})$ ], 120,49 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(1\text{d})$ ], 121,18 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(1\text{a})$ ], 120,27 ppm [ $\text{R}'\text{-C}=\text{R}(1\text{e})$ ]) e cinco carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  (acila) (166,37 ppm [ $\text{R,R}'\text{C}=\text{O}(7\text{b})$ ], 168,08 ppm [ $\text{R,R}'\text{C}=\text{O}(7\text{c})$ ], 167,16 ppm [ $\text{R,R}'\text{C}=\text{O}(7\text{d})$ ], 168,55 ppm [ $\text{R,R}'\text{C}=\text{O}(7\text{a})$ ], 167,44 ppm [ $\text{R,R}'\text{C}=\text{O}(7\text{e})$ ]) (FIGURA 2)<sup>[19-21]</sup>.

FIGURA 2:  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloiil-D-Glicose (S1) ( $\lambda$ ) 229 nm



As atribuições completas de S1 foram confirmadas pelos RMN 2D COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), HSQC e HMBC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ). Estas indicaram claramente que os sítios de acilação do núcleo da glicopiranosose foram referentes às correlações de acoplamento ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ) observadas no RMN HMBC ( $J^2$  e  $J^3$ ) entre prótons de glicopiranosose e grupo carbonila de cada galoiil correspondente, respectivamente 2H-6' acoplado com R,R'C=O (7a) (168,55 ppm); H-4' acoplado com R,R'C=O (7b) (166,37 ppm); H-3' acoplado com R,R'C=O (7c) (168,08 ppm); H-2' acoplado com R,R'C=O (7d) (167,16 ppm); H-1' acoplado com R,R'C=O (7e) (167,44 ppm) para cada unidade gálica (E, D, C, B e A) ligadas a glicopiranosose, respectivamente em C-1, C-2, C-3, C-4 e C-6 (TABELA 3)<sup>[21, 22]</sup>.

**TABELA 3:** Dados do RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) [ $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm),  $m$  (Multiplicidade)] de substância 1(S1).

Molécula Carbono	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$J^{2,3}_{\text{CH}}$
Glicose			
C1'	6,24 <i>d</i> (8,4)	93,96	1H-2'; 1H-5'
C2'	5,59 <i>dd</i> (8,4/9,8)	72,33	1H-3'
C3'	5,91 <i>dd</i> (9,8/9,7)	74,25	1H-4'; 1H1'
C4'	5,62 <i>dd</i> (9,8/9,7)	69,95	1H-3'; 1H-6 <sup>1,2</sup> '
C5'	4,42 <i>m</i>	74,54	2H-6a'; 6b'
C6'	4,39 <i>dd</i> (4,0/12,4) <sup>1</sup>	63,26	1H-4'
	4,52 <i>dd</i> (11,5/12,4) <sup>2</sup>		
Anel Galoil A			
C1a		121,18	1H-2a; 1H-6a
C2a	7,12 <i>s</i> (a)	110,54	1H-6a
C3a		146,59	1H-2a
C4a		140,15	1H-2a; 1H-6a
C5a		146,59	1H-6a
C6a	7,12 <i>s</i> (a)	110,54	1H-2a
C7a		168,55	1H-2a; 1H-6a; 2H-6 <sup>1,2</sup> '
Anel Galoil B			
C1b		120,37	1H-2b; 1H-6b
C2b	7,06 <i>s</i> (b)	110,79	1H-6b
C3b		146,67	1H-2b
C4b		140,92	1H-2b; 1H-6b
C5b		146,67	1H-6b
C6b	7,06 <i>s</i> (b)	110,79	1H-2b
C7b		166,37	1H-2b; 1H-6b; 1H-4'
Anel Galoil C			
C1c		120,34	1H-2c; 1H-6c
C2c	6,91 <i>s</i> (c)	110,50	1H-6c
C3c		146,40	1H-2c
C4c		140,27	1H-2c; 1H-6c
C5c		146,40	1H-6c
C6c	6,91 <i>s</i> (c)	110,50	1H-2c
C7c		168,08	1H-2c; 1H-6c; 1H-3'
Anel Galoil D			
C1d		120,49	1H-2d; 1H-6d
C2d	6,98 <i>s</i> (d)	110,63	1H-6d
C3d		146,49	1H-2d
C4d		140,45	1H-2d; 1H-6d
C5d		146,49	1H-6d
C6d	6,98 <i>s</i> (d)	110,63	1H-2d
C7d		167,16	1H-2d; 1H-6d; 1H-2'
Anel Galoil E			
C1e		120,27	1H-2e; 1H-6e

C2e	6,96 s (e)	110,57	1H-6e
C3e		146,55	1H-2e
C4e		140,50	1H-2e; 1H-6e
C5e		146,55	1H-6e
C6e	6,96 s (e)	110,57	1H-2e
C7e		167,44	1H-2e; 1H-6e; 1H-1'

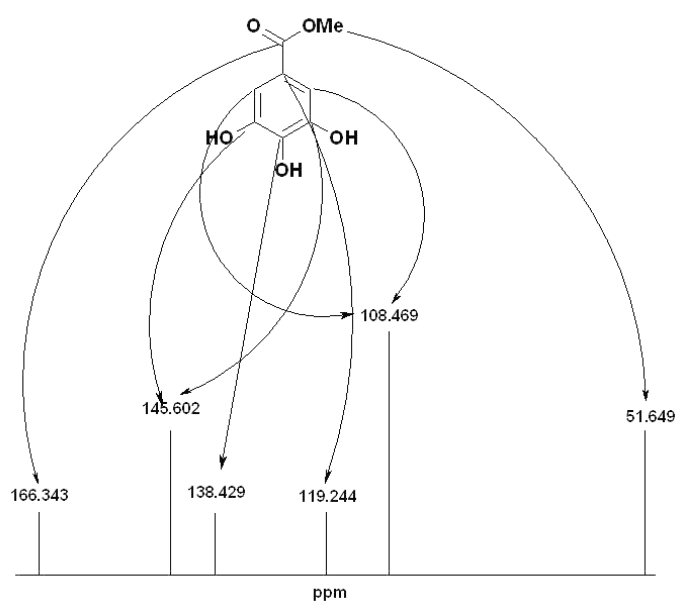
A massa molecular 940 de S1 foi determinada por GC-MS, sendo 940 [*M*] (100); 887 [*M* C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>] (32); 770 [*M*-ácido gálico] (12); 635 [*M*-(OH)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>COO-(OH)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>CO] (50); 518 [*M*-ácido elágico (-H)-(OH)-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO] (15), em intensidade moderada. No espectro de Infravermelho (IV) observou-se os grupamentos OH [3325, 964 cm<sup>-3</sup>], CH<sub>2</sub> [2931, 2861 cm<sup>-3</sup>], C=C do Anel aromático [1609, 1534, 1448, 678 cm<sup>-3</sup>], carbonila [C=O] do éster [1698 cm<sup>-3</sup>], COO [1310, 1189 cm<sup>-3</sup>], CO [1091, 1025 cm<sup>-3</sup>], CH de um metileno [2931, 817, 758, 671 cm<sup>-3</sup>] [23,19].

## S2 - Galato de Metila

No espectro de RMN (300 MHz) de <sup>1</sup>H [DMSO-d<sub>6</sub>] observou-se um singlete em δ<sub>H</sub> 6,93 ppm, com integral referente a dois prótons <sup>1</sup>H, sendo um em C-2 e um em C-6 de um anel aromático. Um singlete em δ<sub>H</sub> 3,74 ppm, com integral referente a três prótons <sup>1</sup>H no C-8. Um singlete em δ<sub>H</sub>: 9,19 ppm, correspondente a três hidrogênios relativos a três grupo hidroxila (3OH), cada uma ligada a um carbono sp<sup>2</sup> nas posições C-3, C-4 e C-5 de anel aromático (fenol).

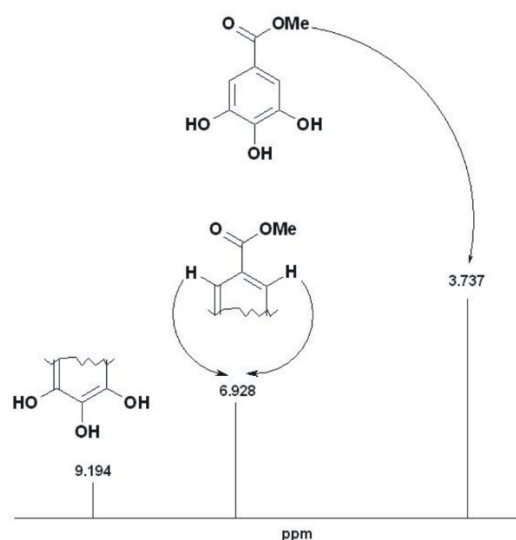
No RMN (75 MHz) de <sup>13</sup>C [DMSO-d<sub>6</sub>] de S2 observaram-se seis carbonos com hibridização sp<sup>2</sup> (145,60 ppm [R'-C=R(3), R'-C=R(5)]; 138,43 ppm [R'-C=R (4)]; 119,24 ppm [R'-C=R (1)]; 108,47 ppm [R'-C=R(2), R'-C=R(6)]), um carbono com hibridização sp<sup>2</sup> (haleto de acila) (166,34 ppm [R,R'C=O(7)]) e um carbono com hibridização sp<sup>3</sup> (alquila primário) (51,65 ppm [C-8, CH<sub>3</sub>]). O comprimento de onda (λ) de S2 foi 274 nm, que corresponde ao do galato de metila (FIGURA 3 e 4) [24].

FIGURA 3: Galato de Metila (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) <sup>13</sup>C RMN: *M* 184,146; λ = 274 nm (S2)



<sup>13</sup>C RMN (75 MHz; DMSO): δ<sub>C</sub> 119,24 ppm [R'-C=R (1)]; δ<sub>C</sub> 108,47 ppm [R'-C=R (2), R'-C=R (6)], δ<sub>C</sub> 138,43 ppm [R'-C=R (4)], δ<sub>C</sub> 145,60 ppm [R'-C=R (3), R'-C=R (5)], δ<sub>C</sub> 166,34 ppm [R,R'C=O (7)], δ<sub>C</sub> 51,65 ppm [-CH<sub>3</sub>(8)]; ppm: partes por milhão.

FIGURA 4: Galato de Metila (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>) <sup>1</sup>H RMN: M 184,146; λ = 274 nm (S2)



<sup>1</sup>H RMN (300 MHz; DMSO): δ<sub>H</sub> 3,74 ppm (H-8a, H-8b, H-8c, s, 3H), δ<sub>H</sub> 6,93 ppm (H-2, H-6, s, 2H), δ<sub>H</sub> 9,19 ppm (OH-3, OH-4, OH-5, s, 3H); ppm: partes por milhão.

#### Atividade antimicrobiana

No estudo da atividade antimicrobiana de S1 (β-1,2,3,4,6 - pentagaloi-D-glicose - PGG) isolado das folhas de *S. brasiliensis* frente a bactérias anteriormente ensaiadas para o ExmSb, onde observou-se halos de inibição da ordem de 18 mm (200 µg/poço) e de 14 mm (50 µg/poço), ativos, frente as cepas de *S. aureus* (ATCC 6538), de 16 mm (200 µg/poço) e 13 mm (50 µg/poço), ativos, frente *S. saprophyticus* e de 14 mm (200 µg/poço), ativo, e 12 mm (50 µg/poço), pouco ativo, frente cepas *E. faecalis* (AM997) (TABELA 4).

TABELA 4: Atividade antimicrobiana de β-1,2,3,4,6-Pentagaloi-D-glicose frente cepas Gram positivas por poços difusão em ágar

Amostras	<i>S. aureus</i>					<i>Staphylococcus</i> <sup>2</sup>			<i>E. faecalis</i>	
	103 <sup>1</sup>	642	632	858	922	789	235	245	997	1056
PGG	200	18*	16	15	19	16	16	16	14	14
	100	16	14	13	16	14	14	14	12	12
	50	13	12	12	14	12	-	12	13	10
	25	10	10	10	11	10	-	10	11	-
Tet*	30	30	34	33	16	34	36	34	34	-

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*; \*: µg/poço; Tet: Tetraciclina; <sup>1,2</sup>: Os números abaixo de cada espécie são códigos de identificação que começa com as letras AM e são descritos em detalhe na seção "Linhagens microbianas"; -: Sem formação de Halo de inibição;

Nos resultados da atividade antimicrobiana de PGG frente bactérias Gram negativas observou-se, com halos de inibição da ordem de 21 mm (200 µg/poço), muito ativo, e 14 mm (25 µg/poço), ativo, frente cepas de *P. aeruginosa*. Não foram observados halos de inibição nas concentrações ensaiadas frente *E. coli* e *K. pneumoniae* (TABELA 5).

**TABELA 5:** Atividade antimicrobiana de  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloi-D-glicose frente cepas Gram negativas por poços difusão em ágar.

		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		
Amostras		1050 <sup>1</sup>	247	460	428	339	379	
PGG	200	-	-	21*	21	-	-	
	100	-	-	18	19	-	-	
	50	-	-	16	16	-	-	
	25	-	-	14	14	-	-	
Tet*		30	28	24	13	14	28	27

*E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; \*:  $\mu\text{g/poço}$ ; Tet: Tetraciclina; <sup>1</sup>: Os números abaixo de cada espécie são códigos de identificação que começa com as letras AM e são descritos em detalhe na secção "Linhagens microbianas"; -: Sem formação de Halo de inibição.

Os resultados da atividade antimicrobiana do galato de metila (GM), molécula isolada das folhas de *S. brasiliensis* frente cepas Gram positivas e Gram negativas de interesse clínico, foram observados halos de inibição da ordem de 19 mm (600  $\mu\text{g/poço}$ ), muito ativo, de 12 mm (150  $\mu\text{g/poço}$ ) frente às cepas de *S. aureus* (ATCC 6538), pouco ativo. Halos de 20 mm (600  $\mu\text{g/poço}$ ), muito ativo, de 13 mm (150  $\mu\text{g/poço}$ ) frente a cepa de *Staphylococcus coagulase negativo* (AM789). Em relação *E. coli* (AM1050) o galato de metila obteve halos de 17 mm (600  $\mu\text{g/poço}$ ) e 14 mm (150  $\mu\text{g/poço}$ ), ativos [24]. Frente às cepas *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* não foi observado halos de inibição nas concentrações ensaiadas (TABELA 6 e 7).

**TABELA 6.** Atividade antimicrobiana de galato de metila frente cepas Gram positivas por poços difusão em ágar.

		<i>S. aureus</i>				<i>Staphylococcus</i> <sup>2</sup>			<i>E. faecalis</i>		
Amostra		103 <sup>1</sup>	642	632	922	789	235	245	997	1056	
GM	600	19*	17	19	17	20	17	16	-	-	
	300	17	13	15	14	16	13	14	-	-	
	150	12	-	11	-	13	-	10	-	-	
	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tet*		30	31	28	28	28	35	28	29	-	-

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*; \*:  $\mu\text{g/poço}$ ; Tet: Tetraciclina; <sup>1,2</sup>: Os números abaixo de cada espécie são códigos de identificação que começa com as letras AM e são descritos em detalhe na secção "Linhagens microbianas"; -: Sem formação de Halo de inibição;

**TABELA 7:** Atividade antimicrobiana de galato de metila frente cepas Gram negativas por poços difusão em ágar.

		<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		
Amostra		161 <sup>1</sup>	1050	247	460	428	339	379	
GM	600	18*	17	17	-	-	-	-	
	300	16	14	12	-	-	-	-	
	150	13	-	-	-	-	-	-	
	75	-	-	-	-	-	-	-	
Tet		30	26	27	26	-	-	20	22

*E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; \*:  $\mu\text{g/poço}$ ; Tet: Tetraciclina; <sup>1</sup>: Os números abaixo de cada espécie são códigos de identificação que começa com as letras AM e são descritos em detalhe na secção "Linhagens microbianas"; -: Sem formação de Halo de inibição.

A atividade antimicrobiana das várias frações de *Schinopsis brasiliensis*, aqui estudados, pode ser justificada pela alta presença de taninos nas espécies do gênero *Schinopsis*[26], inclusive na espécie de



*Schinopsis brasiliensis* (Engl.), que também apresenta relevante concentração de flavonoides<sup>[8,27,28]</sup>, entre estes quercetina. Ainda, ácidos fenólicos, como ácido gálico, galato de metila, ácido elágico<sup>[10,9,29,30]</sup> e sitosterol<sup>[11,31]</sup>.

O  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloi-D-Glicose (PGG) já tinha sido isolado antes na família Anacardiaceae, nas folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. (aroeira)<sup>[32]</sup>.

O proposto mecanismo de ação de PGG estaria relacionado na inibição da síntese de ácidos graxos das células bacterianas. Também é relatado que o PGG possuía propriedade antiviral, antidiabética<sup>[33]</sup>, antiangiogênica *in vitro* e *in vivo*, que diminui a expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) e da densidade microvascularização e do fator de crescimento vascular, redução do crescimento tumoral e aumento da apoptose das células tumorais<sup>[34,35]</sup>. Os ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido gálico e galato de metila) têm seu mecanismo de ação na modulação do potencial da membrana plasmática (MP) devido à acidificação na interface da MP, implicando distúrbios de bombas e canais proteicos de membrana, na complexação de íons metálicos, inibição de proteínas carreadoras de nutrientes e cofatores enzimáticos. Tudo isso leva a inibição do crescimento bacteriano, diminuição da resistência da bactéria aos agentes antimicrobianos podendo causar morte da célula bacteriana<sup>[29,36]</sup>.

## Conclusão

Os estudos com o extrato metanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* proporcionaram isolar, guiado pelo método bioautográfico, dois metabólitos com potencial antimicrobiano:  $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloi-D-Glicose (PGG) e galato de metila (GM). Estes isolados apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo. Ainda, apresentou boa atividade antimicrobiana frente *P. aeruginosa* e *E. faecalis* para PGG e frente *E. coli* para o GM. A atividade antimicrobiana de PGG frente às linhagens de *S. aureus* (uma ATCC 6538 - cepa padrão e outra AM858 - Clone Epidêmico Brasileiro multirresistente) sugere que os mecanismos de ação dos compostos isolados são diferentes daqueles, aos quais, as linhagens multirresistentes desenvolveram resistência, já que os halos observados foram equivalentes, em média, entre as cepas responsivas testadas, o que, em tese, revela uma janela de possibilidades para a pesquisa de um mecanismo de ação alternativo, vislumbrando o desenvolvimento de uma nova classe de antimicrobianos. Ainda, para novas pesquisas que quantifiquem os compostos com propriedade antimicrobiana das folhas de *S. brasiliensis*, como a identificação de outros metabólitos secundários e estudos de suas propriedades farmacológicas, são necessários os resultados apresentados.

## Agradecimentos

Aos Professores Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil), Dr. Edilberto Rocha Silveira (Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil) e Dr. Pedro José Rolim Neto (Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil).

## Referências

1. Singh AK, Venkatesh V, Singh RP, Singh M. Bacterial and antimicrobial resistance profile of bloodstream infections: A hospital-based study. **J Health Res.** 2014; 1(3):140-144. [[CrossRef](#)]
2. Saraiva AM, Saraiva CL, Gonçalves AM, Soares RR, Mendes FO, Cordeiro RP. Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. Braz. **J Pharm Sci.** 2012; 48(1): 147-154. ISSN 2175-9790.
3. Prado MCG, Barbosa DCA, Alves JLH. Aspecto Morfo-Estruturais da Unidade de Dispersão de *Schinopsis brasiliensis* Engl. "Baraúna" (Anacardiaceae). **Bol Soc Brot. Coimbra.** 1995; 67(2): 187-197. ISSN 0081-0657.
4. Cardoso MP, David JM, David JP. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Nat Prod Res.** 2005; 19(5):431-433. [[CrossRef](#)].
5. Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol.** 2007; 114(3):325–354. [[CrossRef](#)].
6. Albuquerque UP. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **J Ethnomed.** 2006; 2:30. [[CrossRef](#)].
7. Almeida CFCBR, Silva TCL, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **J Arid Environ.** 2005; 62(1):127-142. [[CrossRef](#)].
8. Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC et al. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **Afr J Pharm Pharmacol.** 2011; 5:1724-1731. ISSN 1996-0816.
9. Souza ON. **Chemical Constituents of the Leaves of *Schinopsis brasiliensis*.** 1990. These of Philosophy Doctor. The Polytechnic of North London, London. 207p.
10. Moreira BO. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânicos e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae).** 2009. 103p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal da Bahia, Salvador. [[Link](#)].
11. Cardoso MP. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae).** 2001. 106p. Dissertação de Mestrado. [Programa de pós-graduação em Química], Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
12. Santos CCS, Masullo M, Cerulli A, Mari A, Estevam CS, Pizza C, Piacente S. Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochem.** 2017; 140:45-51. [[CrossRef](#)].
13. Brasil. MME (Ministério de Minas e Energia). **Diagnóstico do município de Mirandiba.** Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 15 ago. 2019.
14. Yao L, Jlang Y, Datta N, Singanusong R, Liu X, Duan J. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. **Food Chem.** 2004; 84:253-263. [[CrossRef](#)].
15. CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico.** 6ª ed. M7-A6. 2003; 23(2):49. [[Link](#)].

16. Pessini GL, Holetz FD, Sanches NR, Cortez DA, Dias Filho BP, Nakamura CV. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Rev Bras Farmacogn.** 2003; 13(suppl.1):21-24. ISSN 0102-695X.
17. Sakagami Y, Linuma M, Piyasema KGNP, Dharmaratne HRW. Antibacterial activity of  $\alpha$ -mangostin agins vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. **Phytomedicine.** 2005; 12(3):203-208. [[CrossRef](#)].
18. CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão – Norma M2-A8.** 8ª ed. ANVISA/MS – CLSI, 2003. [[Link](#)].
19. Cho JY, Sohn MJ, Lee J, Kim WG. Isolation and identification of pentagalloylglucose with broad-spectrum antibacterial activity from *Rhus trichocarpa* Miquel. **Food Chem.** 2010; 123: 501-596. [[CrossRef](#)].
20. Cannell RJP, Farmer P, Walker JM. Purification and characterization of pentagalloylglucose, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. **Biochem J.** 1988; 255:937-941. [[CrossRef](#)].
21. Söhretoglu D, Sakar MK, Sabuncuoglu SA, Özgünes H, Sterner O. Polyphenolic Constituents and Antioxidant Potential of *Geranium stepporum* Davis. **Rec Nat Prod.** 2001; 5(1):22-28. ISSN 1307-6167.
22. Beretta G, Artali R, Caneva E, Facino RM. Conformation of the tridimensional structure of 1,2,3,4,6-pentagalloyl- $\beta$ -D-glucopyranose (PGG) by 1H NMR, NOESY and theoretical study and membrane interaction in a simulated phospholipid bilayer: a first insight. **Magn Reson Chem.** 2011; 49:132-136. [[CrossRef](#)].
23. Khanbabaee K, Lötzerich K. Efficient Total Synthesis of the Natural Products 2,3,4,6-Tetra-O-galloyl-D-glucopyranose, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose and the Unnatural 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- $\alpha$ -D-glucopyranose. **Tetrahedron.** 1997; 53:10725-10732. [[CrossRef](#)].
24. Moura ACS; Vilegas W; Santos LC. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* linn. (*Fabaceae*) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Quim Nova.** 2011; 34(7):1136-1140. ISSN 0100-4042.
25. Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grand TSM, Smônia FA, Smânia Jr. A et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Rev Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2000; 95: 367-373. ISSN 1678-8060.
26. Roux DG, Paulus E. Condensed Tannins - The isolation and distribution of interrelated heartwood components of *Schinopsis* spp. **Biochem J.** 1961; 78:785-789. [[PubMed](#)].
27. Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque UP. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **J Ethnopharmacol.** 2000; 120:72–80. [[CrossRef](#)].
28. Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA. Natural Flavonoids as Antimicrobial Agents. **J. Am Nutr Assoc.** 2004; 7(2): 24-31. [[Link](#)].
29. Vatten DA, Shetty K. Biological functionality of ellagic acid: review. **J Food Biochem.** 2005; 29: 234-266. [[CrossRef](#)].
30. Akiyama H, Fuji K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother.** 2001; 48:487-491. [[CrossRef](#)].
31. Virtuoso S, Davet A, Dias JFG, Cunico MM, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Rev Bras Farmacogn.** 2005; 15: 137-142. ISSN 1981-528X

32. Carvalher-Machado SC, Rosas EC, Brito FA, Heringe AP, Oliveira RR, Kaplan MAC et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **Int Immunopharmacol**. 2008; 8: 1552–1560. [[CrossRef](#)].
33. Zhang J, Li L, Kim S, Hagerman AE, Lü J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. **Pharm. Res.**, 2009; 26: 2066. [[CrossRef](#)].
34. Chai Y, Lee HJ, Shaik AA, Nkhata K, Xing C, Zhang J et al. Penta-O-Galloyl- $\beta$ -D-glucose induces G<sub>1</sub> arrest and DNA replicative S-phase arrest independently of P21 cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, P27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B and P53 in human breast cancer cells and is orally active against triple-negative xenograft growth. **Breast Cancer Res**. 2010; 12: R67. [[CrossRef](#)].
35. Huh J, Lee E, Kim M, Kang S. Penta - O -galloyl-beta- D -glucose suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen-activated protein kinase pathways. **Carcinogenesis**. 2005; 26(8): 1436-1445. [[CrossRef](#)].
36. Zaidi-Yahiaoui R, Zaidi F, Bessai AA. Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. chrysanthemi). **Afr J Biotechnol**. 2008; 7(4): 482-486. ISSN 1684-5315.

---

**Histórico do artigo | Submissão:** 29/09/2019 | **Aceite:** 05/02/2020 | **Publicação:** 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Saraiva AM, Coutinho FN, Silva RO, Randau KP, et al. Atividade antimicrobiana de polifenóis isolados das folhas de *Schinopsis brasiliensis* (Engl.) guiado por bioautografia. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 10-25. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/850>>. 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.



# Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* e sua incorporação em um creme mucocutâneo

Antimicrobial activity of *Melaleuca* essential oil and its incorporation into a mucocutaneous cream

DOI 10.32712/2446-4775.2020.818

Correa, Leonardo Tibiriçá<sup>1</sup>; Nicoletti, Maria Aparecida<sup>2</sup>; De Amorim, Cledja Soares<sup>1</sup>; Da Costa, Amanda Ramos<sup>1</sup>; Leoni, Luís Antônio Bafille<sup>3</sup>; Munõz; Juliana Weckx Peña<sup>4</sup>, Fukushima, André Rinaldi<sup>4,5</sup>.

<sup>1</sup>Universidade São Judas Tadeu. Rua Taquari, 546, Mooca, CEP 03166-000, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia. FARMUSP. Avenida Professor Lineu Prestes, 580, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Universitário das Américas (Reitoria). Rua Augusta, 1508, Centro, CEP 01305-100, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Butantã, CEP 05508-010, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências da Saúde IGESP (FASIG), Departamento de Pesquisa e Extensão. Rua da Consolação, 1025. Centro, CEP 01301-000, São Paulo, SP, Brasil.

\*Correspondência: [maria-nicoletti@uol.com.br](mailto:maria-nicoletti@uol.com.br).

## Resumo

Óleos essenciais com atividade antimicrobiana têm despertado interesse como alternativa terapêutica. Esse trabalho teve por objetivo identificar a concentração inibitória mínima (CIM<sub>50</sub>) do óleo de *Melaleuca* frente a três microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, com a finalidade de incorporá-lo em um creme O/A com atividade antimicrobiana e avaliar sua estabilidade preliminar durante 10 dias, utilizando métodos estatísticos para concluir este estudo. A metodologia utilizada foi realizada por meio de microdiluição seriada em placa de ELISA estéril. Os microrganismos foram suspensos em solução salina utilizando a escala McFarland (10<sup>6</sup> para fungo e 10<sup>3</sup> para bactéria). A CIM<sub>50</sub> correspondeu a redução em 50% do halo de crescimento na menor concentração de emulsão de óleo de *Melaleuca*. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações mínimas inibitórias para os microrganismos avaliados foram 9,0 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, 4,5 mg/mL para *Escherichia coli* e 4,5 mg/mL para *Candida albicans*. O creme desenvolvido não apresentou alterações significativas em relação à densidade e pH bem como às características físicas avaliadas. Com os resultados obtidos conclui-se que é promissor o desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas com a incorporação do óleo de *Melaleuca* como possível nova alternativa terapêutica frente aos microrganismos estudados.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Candida albicans*. Óleo de *melaleuca*. Agentes antimicrobianos.

## Abstract

Essential oils with antimicrobial activity have aroused researchers' interest for being a therapeutic alternative when properly studied. To identify the minimal inhibitory concentration (MIC<sub>50</sub>) of *melaleuca* oil against three microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, when incorporated in O/W cream to evaluate its preliminary stability for 10 days, using statistical methods to complete this study. The assay was performed by serial micro-dilution in a sterile ELISA plate. The microorganisms were suspended in saline solution by using the McFarland scale (10<sup>6</sup> for fungus and 10<sup>3</sup> for bacteria). CIM<sub>50</sub> corresponded to 50% reduction of growth halo in the lowest concentration of *melaleuca* O/W cream. The minimum inhibitory concentrations for the evaluated microorganisms were 9.0 mg/mL for *Staphylococcus aureus*, 4.5 mg/mL for *Escherichia coli* and 4.5 mg/mL for *Candida albicans*. The developed cream did not show significant changes in density, pH or in its physical characteristics. The obtained results are promising for the development of pharmaceutical semi solid dosage forms with the incorporation of *melaleuca* oil as a possible new therapeutic alternative against the microorganisms studied.

**Keywords:** *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Candida albicans*. *Melaleuca* oil. Antimicrobial agentes.

---

## Introdução

*Escherichia coli* (*E. coli*) é um dos principais microrganismos causadores de infecções hospitalares, sobretudo infecções intestinais e urinárias, em muitos países. São bactérias, em geral, anaeróbicas facultativas e Gram-negativas. *E. coli* possui ampla gama de diversidade patogênica, compreendendo cinco categorias de amostras que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e espécies associadas a meningites, infecções extra intestinais e infecções urinárias, entretanto, é membro da microbiota intestinal normal do ser humano<sup>[1]</sup>.

As infecções do trato urinário (ITU) podem ser assintomáticas quando há apenas colonização (aumento de número) de bactérias, denominada de bacteriúria ou sintomática, de ocorrência mais comum na população, onde se divide de acordo com a localização da infecção como: cistite e apresenta disúria, polaciúria, hematúria e dor suprapúbica e lombar e, em pielonefrite, desencadeando sintomas como febre, dor na lombar e nos flancos, náuseas e vômito, havendo risco de evolução para sepse<sup>[2,3]</sup>.

Os estafilococos são cocos Gram-positivos que apresentam ampla gama de condições ambientais e considerável faixa de pH de sobrevivência. São comumente encontrados na microbiota humana do tipo comensal, entretanto, *Staphylococcus aureus* demonstra ser um patógeno oportunista. Quando instalada a infecção considera-se três categorias diferentes de doenças: superficiais (infecção supurativa em tecidos moles), profundas (disseminação sistêmica por bacteremia) e toxigênica (síndrome de produção de toxinas por ação sistêmica ou à distância)<sup>[4]</sup>.

Em estudo realizado no hospital universitário<sup>[5]</sup> foram analisadas 512 fichas de notificação de infecção hospitalar ocorridas ao longo de 2007. Destas infecções, 20% correspondiam ao agente causador

*Staphylococcus aureus*, 10% *Escherichia coli* e 9% *Candida* sp. *Staphylococcus aureus* dispunha resistência a eritromicina (66,0%), oxacilina (77,3%) e penicilina (84,9%)<sup>[5]</sup>.

A candidíase, também conhecida como candidose é uma infecção oportunista causada por fungos do gênero *Candida*, sendo o mais conhecido, a espécie *Candida albicans*. Ela tem sido isolada da boca, trato gastrointestinal, orofaringe, vagina e pele de indivíduos saudáveis. Em maior frequência, a candidíase é do tipo endógena, por exemplo, doenças crônicas, neoplasias, tuberculose, uso de antibióticos, introdução de sonda, traumatismos, dentre outras em decorrência da diminuição da resistência do hospedeiro, tendo poder invasivo principalmente em pacientes debilitados (antibioticoterapia ou imunossupressores). Em nível sistêmico é grave e de difícil isolamento a partir do sangue. Atualmente trata-se com nistatina, fluconazol, anfotericina B por via oral<sup>[6]</sup>.

### Fundamentação Teórica

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em relação às Práticas Integrativas e Complementares, as plantas medicinais são instrumentos importantes da assistência farmacêutica considerando que em países em vias de desenvolvimento depende delas na área de Atenção Primária à Saúde (Atenção Básica) e nos países industrializados o uso de produtos da medicina tradicional tem sido empregado por 70 a 90% da população. No Brasil, cerca de 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais em cuidados com a saúde<sup>[7]</sup>.

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos<sup>[8]</sup>. O gênero *Melaleuca* pertence à família Myrtaceae, incluindo, aproximadamente, 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. *Melaleuca artemifolia* (*M. artemifolia*) é comumente conhecida como “Árvore de chá” (*Tea Tree*) florescendo em áreas de pântano. Seu óleo é extraído da planta por hidrodestilação (destilação por arraste a vapor). Possui atividade bactericida e fungicida contra diversos patógenos humanos, sendo utilizados em formulações de uso tópico<sup>[9-11]</sup>. Apresenta como marcadores fitoquímicos:  $\alpha$ -Terpinene,  $\gamma$ -Terpinene e Terpinen-4-ol<sup>[12]</sup>.

Conforme revisão de literatura<sup>[11]</sup> realizada para a *Melaleuca artemifolia*, os estudos iniciais da atividade antimicrobiana da planta foram com a utilização de *Trichomonas vaginalis*. Atualmente, possui cerca de 100 componentes, sendo alguns utilizados como marcadores para controle de qualidade e relatados no laudo de análise emitido por fornecedores como, por exemplo, Terpinen-4-ol, o mais abundante ( $\geq 30\%$ ) e conhecido no óleo essencial de melaleuca e que possui maior atividade antimicrobiana, induzindo perda de membrana e interferindo na integridade e fisiologia bacteriana. Outros componentes como o 1,8 cineol, que é considerado irritante à pele, aumenta a permeabilidade de membrana, facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos, sendo descrito como detentor de efeito antimicrobiano marginal<sup>[11]</sup>.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi demonstrar, por meio de teste *in vitro*, a concentração inibitória mínima (CIM<sub>50</sub>) frente aos microrganismos de interesse clínico: uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*), uma Gram-negativa (*Escherichia coli*) e um fungo (*Candida albicans*) para desenvolver formulação de creme mucocutâneo com a incorporação de óleo de *melaleuca* e determinar sua estabilidade preliminar.



## Materiais e Métodos

### Microrganismos utilizados

*Staphylococcus aureus* NEWP 0023 (procedência: NewProv – Produtos para Laboratório Ltda. – cód PA263 – lote 6550 – microrganismo padrão estabilizado);

*Candida albicans* NEWP 0031 (procedência: NewProv – Produtos para Laboratório Ltda. – cód PA249 – lote 4785 – microrganismo padrão estabilizado);

*Escherichia coli* beta lactamase NEWP 0018 (procedência: NewProv – Produtos para Laboratório Ltda. – cód PA254 – lote 4213 – microrganismo padrão estabilizado);

Óleo essencial de *Melaleuca* fornecido por ENGETEC® R. Comercial S/C Ltda – especificações: lote: FRAJUN/21, *INCI name: Melaleuca alternifolia* Leaf Oil, *CAS number: 68647-79-4*, origem: Austrália. Obtido por destilação a vapor d'água da folhagem; Índice de refração 1,4801; Densidade (20 °C) 0,8990; Cineol 3,73%;  $\alpha$ -terpinene 9,80%;  $\alpha$ -terpineol 5,95%;  $\gamma$ -terpinene 20,53%; Terpinolene 3,20%; Limonene: 2,98;  $\alpha$ -pinene: 5,15; Terpinen-4-ol 37,20% e p-Cymene 3,86%;

Placa Elisa de fundo arredondado com 96 poços, ágar CLED (Kasvi - lote 092117505), ágar Sabouraud-Dextrose (Oxoid – lote 1729730), ágar MacConkey (Kasvi – lote 010919511);

Nistatina 100.000 unidades internacionais – (UI) / mL (Suspensão Oral – Prati-Donaduzzi – medicamento genérico – lote L18F112);

Enrofloxacino 5% injetável (Baytril® – Bayer® - lote 001/14);

Caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (Sigma-Aldrich);

Matérias-primas para formulação do creme, segundo *Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI): Aqua, Cetearyl alcohol, Glycerin, Disodium EDTA, Lactic acid, Cetareth-20, Glyceryl stearate, Caprylic/capric triglyceride, Ethylhexyl Palmitate, Isopropyl Myristate, Olea Europaea (Olive) Fruit Oil, Hydrogenated Vegetable Oil, BHT, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben (and) phenoxyethanol, Cyclopentasiloxane, Imidazolidinyl urea.*

### Preparo dos microrganismos

Foram identificados e isolados de acordo com método de diagnósticos descritos em protocolos e literatura, seguindo suas características já mencionadas anteriormente. Para crescimento e nutrição utilizou-se ágar CLED para *Staphylococcus aureus*, ágar MacConkey para *Escherichia coli* e ágar Sabouraud-Dextrose para *Candida albicans* pela técnica de esgotamento.

### Preparo de soluções

Para o preparo da emulsão utilizou-se 0,8mL do óleo essencial de *melaleuca*, 4,2 mL de água e 0,05 mL de polisorbato 80 e agitado no vórtex por 5 minutos, obtendo-se uma emulsão com 16% de óleo de

*melaleuca* (144 mg/mL). Para controle da atividade do adjuvante, foi preparada solução contendo 0,05 mL de polisorbato 80 em 4,2 mL de água e agitado no vórtex por 5 minutos.

#### **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM<sub>50</sub>)**

Foi realizada por meio de microdiluição seriada em placa de ELISA estéril. Os microrganismos foram suspensos em solução salina utilizando a escala McFarland ( $10^6$  para fungo e  $10^3$  para bactéria).

Na coluna 1, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de emulsão de óleo de *melaleuca* e 10µL da suspensão de *Staphylococcus aureus*.

Na coluna 2, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de emulsão de óleo de *melaleuca* e 10µL da suspensão de *Escherichia coli*.

Na coluna 3, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de emulsão de óleo de *melaleuca* e 10 µL da suspensão de *Candida albicans*.

Na coluna 5, realizou-se o controle positivo. Linha A para *Staphylococcus aureus*, linha B para *Escherichia coli* e linha C *Candida albicans*, ou seja, pipetou-se 100 µL de caldo BHI e 10 µL de cada microrganismo em seu respectivo poço citado. Havendo crescimento, ou seja, formação de halo de crescimento no fundo do poço, considera-se como marcador de controle de qualidade do método a fim de verificação da viabilidade de cada microrganismo<sup>[13-15]</sup>.

Ainda nesta coluna, foi realizado o teste de controle de interferência de adjuvantes, com a finalidade de verificar se há interferência do polisorbato 80 na atividade antimicrobiana do óleo essencial de *melaleuca*. Para isto, na linha E, pipetou-se 100 µL de caldo BHI, 100 µL de solução água + polisorbato 80 e 10 µL da suspensão de *Staphylococcus aureus*. Na linha F, repetiu-se o processo, porém trocando o microrganismo para *Escherichia coli* e na linha G para *Candida albicans*.

Na coluna 7, realizou-se o controle de esterilidade do caldo BHI, ou seja, pipetou-se somente 100 µL de caldo. Havendo ausência de crescimento de qualquer microrganismo para controle de qualidade do método, descartando interferentes e contaminações.

Na coluna 9, utilizou-se como controle negativo Nistatina e Enrofloxacino, sendo então 100 µL de caldo BHI, 100 µL de cada fármaco e 10 µL de cada microrganismo, seguindo a sequência como na coluna 5.

A diluição seriada foi realizada através de 100 µL do conteúdo ao tubo subsequente até o poço da linha H, descartando 100 µL finais a fim de igualar os volumes dos poços.

O procedimento está indicado a seguir no **QUADRO 1**.

**QUADRO 1:** Esquema da Placa de ELISA após pipetagem.

	1	2	3	5	7	9	10
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	Controle +	Controle estéril	Controle -	Controle do Adjuvante
A	8%	8%	8%	+	∅	-	+
B	4%	4%	4%	+		-	+
C	2%	2%	2%	+		-	+
D	1%	1%	1%	+			+
E	0,5%	0,5%	0,5%	+			+
F	0,25%	0,25%	0,25%	+			+
G	0,125%	0,125%	0,125%	+			+
H	0,025%	0,025%	0,025%				

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

O **QUADRO 2** demonstra a diluição seriada segundo linha, porcentagem e concentração em mg/mL de emulsão de óleo de *melaleuca*.

**QUADRO 2:** Diluição seriada das concentrações da emulsão de óleo de *melaleuca*.

Linha	Concentração em %	Concentração em mg/mL
A	8%	72,0
B	4%	36,0
C	2%	18,0
D	1%	9,0
E	0,5%	4,5
F	0,25%	2,25
G	0,125%	1,125
H	0,025%	0,5625

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

Após a finalização da pipetagem, cobriu-se com papel filme e colocou-se na estufa bacteriológica para incubação a 37°C por 48 horas. A CIM<sub>50</sub> correspondeu à redução em 50% do halo de crescimento na menor concentração de emulsão de óleo de *melaleuca* [13,15-17].

### Preparo do creme O/A

O creme foi preparado por meio da adição de fase aquosa sobre a oleosa, sob agitação, à temperatura entre 75° a 80°C. As matérias-primas para composição do creme, bem como, a porcentagem presente e a função correspondente estão descritas a seguir (**QUADRO 3**) sendo separadas nas fases A (aquosa) e B (oleosa) com as respectivas funções. A fase C foi adicionada após o sistema ter sido emulsificado.

**QUADRO 3:** Formulação do creme com respectivas fases, matérias-primas, porcentual na formulação e função.

Fase	INCI*	%	Função
A	<i>Aqua</i>	69,45	Veículo
A	<i>Disodium EDTA</i>	0,10	Sequestrante
A	<i>Glycerin</i>	2,50	Umectante
B	<i>Cetearyl alcohol</i>	10,00	Espessante
B	<i>Ceteareth-20</i>	3,00	Emulsificante
B	<i>Glyceryl stearate</i>	2,50	Co-emulsificante
B	<i>Caprylic/capric triglyceride</i>	2,50	Emoliente
B	<i>Isopropyl Myristate</i>	4,00	Emoliente
B	<i>Ethylhexyl Palmitate</i>	2,00	Emoliente e modificador sensorial
B	<i>Olea Europaea (Olive) Fruit Oil, Hydrogenated Vegetable Oil</i>	1,30	Modificador sensorial
B	<i>BHT</i>	0,05	Antioxidante
B	<i>Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben (and) phenoxyethanol</i>	1,00	Conservante
C	<i>Cyclopentasiloxane</i>	1,00	Modificador sensorial
C	<i>Imidazolidinyl urea</i>	0,60	Conservante

Fonte: elaborado pelos autores, 2019. \*(INCI) = Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients

A Fase A foi aquecida até 80°C e a Fase B até 75°C. Ao atingirem suas respectivas temperaturas foi vertida a Fase A sobre a B sob agitação de um agitador vertical mecânico por 5 minutos. Foi resfriado em banho de gelo, sob agitação, até atingir a temperatura de 40°C. Após resfriamento foram adicionados os componentes da Fase C e realizada a homogeneização. Foram preparados 100 g de creme.

#### Incorporação do óleo de *Melaleuca*

Incorporação realizada pela adição do óleo à emulsão já finalizada, sob agitação contínua até homogeneização da mistura. Em seguida, adicionou-se ácido láctico para ajuste de pH na faixa entre 4,5 e 5,0.

#### Teste de estabilidade preliminar

Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA<sup>[18]</sup>, realizou-se o teste de estabilidade preliminar, que serve como teste de triagem para verificação da estabilidade de um produto em um curto prazo.

Para esse procedimento, a amostra manteve-se condicionada em pote de 150 g de Polietileno de Baixa Densidade (PEBD). Teste de aspecto, cor e odor foram avaliados por meio da verificação se houve ou não alteração das características iniciais. A avaliação do pH foi realizada em um potenciômetro (pHmetro). Para densidade, foi utilizado um picnômetro (com o resultado da diferença da massa final e a tara do picnômetro, dividido pela capacidade deste material, chega ao valor da densidade do produto).

Inicialmente, foram anotadas especificações com as características esperadas para que fossem mantidos parâmetros de controle de qualidade durante toda a análise de estabilidade e, em seguida, realizou-se a leitura inicial já com o óleo incorporado, ou seja, as características físicas da emulsão sem a incorporação do óleo para serem consideradas como parâmetros de controle após a incorporação do óleo. Após isso, dentro do período de 10 dias foram feitos ciclos alternados diariamente de estufa (50°C ± 2°C) e freezer (-5°C ± 2°C), com análises físico-químicas diárias. Na leitura inicial, no 5º dia e no 10º dia, foram realizados esfregaços em vidro de relógio com 0,2 g de creme para melhor verificação da homogeneidade e formação de grumos (**QUADRO 4**).

**QUADRO 4:** Cronograma das condições diárias da amostra.

Dia	Condição da amostra
Leitura inicial	Temperatura ambiente
1º dia	Estufa
2º dia	Freezer
3º dia	Estufa
4º dia	Freezer
5º dia	Estufa
6º dia	Freezer
7º dia	Estufa
8º dia	Freezer
9º dia	Estufa
10º dia	Freezer

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

### Contagem de microrganismos viáveis

Utilizou-se 8,8 mL de solução salina estéril e 0,2 mL de polisorbato 80 e 1,0 g de creme, para que pudesse ser inativado o sistema conservante da formulação. Foi homogeneizado com bastão de vidro estéril e posteriormente submetido à agitação mecânica no vórtex por um minuto, resultando em uma diluição 1:10 ( $10^{-1}$  g/mL). As sucessivas diluições foram empregadas sobre mistura de solução salina estéril e polisorbato 80, transferindo-se 1 mL da mistura anterior, resultando em misturas com concentração 1:100 ( $10^{-2}$  g/mL) e 1:1000 ( $10^{-3}$  g/mL), em duplicata<sup>[19]</sup>.

Para análise microbiológica, as misturas foram semeadas em ágar Sabouraud-Dextrose, CLED e MacConkey, pela técnica de esgotamento com alça bacteriológica. Para controle de qualidade do método, também foi realizado controle negativo para os ágar e para semeadura em placa, contendo somente solução salina e polisorbato 80. As placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para pesquisa de bactérias e  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para pesquisa de bolores e leveduras. A viabilidade dos ágar já fora testado anteriormente quando cultivado os devidos microrganismos. A contagem foi realizada com auxílio de lupa eletrônica e em duplicata para cada diluição<sup>[19,20]</sup>. Os resultados seguem a RDC 481/99, que estabelece o limite máximo da contagem total de microrganismos aeróbicos de 500 UFC/g<sup>[21]</sup>.

### Análise estatística

Após a realização dos 10 dias de ciclos alternados, os dados foram tabulados e verificado se houve variação significativa em aspecto, cor e odor como, por exemplo, formação de grumos ou separação de fases. Para pH e densidade, foi aplicado teste estatístico de hipótese (Teste t).

## Resultados e Discussão

### Concentração Inibitória Mínima

Tendo controle positivo com presença de crescimento de cada microrganismo e controle de esterilidade a ausência de contaminantes, conclui-se que os resultados abaixo são fidedignos.

A determinação de CIM<sub>50</sub> se dá na redução do halo em 50%, determinando assim a dose mínima para inibir 50% da formação de colônias. Para este resultado, determina-se por meio da observação a olho nu, comparando a formação de halo entre o controle positivo e os ensaios de diluições<sup>[13,15,17]</sup>. A seguir, estão demonstrados os resultados obtidos em mg/mL para cada microrganismo (**TABELA 1**).

**TABELA 1:** Resultados de MIC<sub>50</sub> em mg/mL de óleo de *melaleuca*.

Microrganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Concentração	9,0 mg/mL	4,5 mg/mL	4,5 mg/mL

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

Em estudo de atividade antimicrobiana da emulsão incorporada com o óleo essencial, não foi observada diferença de resultados quando comparado ao óleo de *melaleuca*.

### Teste de estabilidade preliminar

As **TABELAS 2 e 3** mostram os resultados das análises físico-químicas ao longo de 10 dias de análise.

**TABELA 2:** Resultados da estabilidade preliminar da leitura inicial ao 4º dia.

Parâmetro	Especificações	Leitura inicial	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
Aspecto	Creme	N	N	N	N	N
Cor	Branco	N	N	N	N	N
Odor	Característico	N	N	N	N	N
pH	4,5 – 5,0	4,68	4,67	4,65	4,62	4,57
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,91 – 0,99	0,9316	0,9301	0,9318	0,9599	0,9672

Fonte: elaborado pelos autores, 2019. Legenda: N – normal / sem alterações.

**TABELA 3:** Resultados da estabilidade preliminar da leitura do 5º dia ao 10º dia.

Parâmetro	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia
Aspecto	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N
pH	4,65	4,66	4,60	4,67	4,55	4,68
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,9692	0,9798	0,9754	0,9778	0,9798	0,9673

Fonte: elaborado pelos autores, 2019. Legenda: Aspecto: N – Normal/ sem alterações / SF- Separação de fases / FG – Formação de grumos. Cor/ odor: N – Normal/ característico / LM – Levemente modificado / M – Modificado / IM – Intensamente modificado.

### Observações em vidro de relógio

Leitura inicial (Tempo zero): Aspecto homogêneo característico de emulsão O/A e sem presença de grumos.

5º dia: Ausência de grumos e aspecto característico de emulsão O/A.

10º dia: Presença de pouquíssimos grumos, mas permanece aspecto característico de emulsão O/A.

A análise microbiológica foi realizada ao término da análise de estabilidade preliminar, havendo resultado inferior a 10 UFC/g para todos os ágaros (metodologia descrita anteriormente).

Após o término das análises, os valores de pH e densidade foram tabulados e aplicados média, desvio padrão e teste de hipóteses (Teste t) a fim de verificar se há variações significativas entre si, ressaltando  $n = 11$  (leitura inicial ao 10º dia).

A seguir estão representados dos resultados de média, desvio padrão, graus de liberdade e o resultado do Teste t (TABELA 4).

**TABELA 4:** Parâmetros estatísticos para avaliação da variação de pH e densidade.

Parâmetro	pH	Densidade
Média	4,64	0,9609 g/mL
Desvio padrão	0,0452	0,0200 g/mL
Graus de liberdade	-1,812	1,812
Teste t	-8,333	1,804

Fonte: elaborado pelos autores, 2019.

Os microrganismos demonstraram sensibilidade frente ao óleo de *melaleuca*. Entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* o resultado foi semelhante, entretanto, o microrganismo *Staphylococcus aureus* demonstrou maior resistência, sendo necessário dobrar a dosagem, o que era de se esperar, pois há crescente resistência desse microrganismo frente a agentes antimicrobianos<sup>[22]</sup>.

Mesmo havendo variação na sensibilidade, os resultados são positivos como novas possibilidades de combater estas infecções e, neste caso, frente a infecções de pele e infecções geniturinárias, utilizando o creme mucocutâneo.

Já no teste de estabilidade, concluiu-se que o creme com óleo de *melaleuca* está em conformidade segundo os critérios de avaliação do Guia de Estabilidade da ANVISA<sup>[18]</sup>, uma vez que não houve alterações significativas no aspecto, cor e odor e não houve rejeição da hipótese nula, uma vez que  $t_{crit} > t_{calc}$ , logo não houve variação nos valores obtidos de pH e densidade. O creme também foi considerado aprovado por conta do resultado ser inferior ao limite estabelecido pela RDC 481/99. Certamente, haverá necessidade em outra etapa do desenvolvimento, a condução de teste de estabilidade acelerada (duração de 90 dias) e teste de prateleira (2 anos).

## Conclusão

O óleo de *melaleuca* mostrou ter atividade antimicrobiana frente aos microrganismos estudados. Na emulsão elaborada, de acordo com as condições estabelecidas para a realização deste estudo, a incorporação do óleo de *melaleuca* foi satisfatória considerando que a emulsão permaneceu estável com aspecto agradável para o usuário. Os resultados obtidos mostraram-se promissores para o desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas com a incorporação do óleo de *melaleuca* como possível nova alternativa terapêutica frente aos microrganismos estudados.



## Agradecimentos

O grupo de autores agradece ao técnico José Maria da Costa Júnior, da Universidade São Judas Tadeu, que dispôs do seu tempo e dedicação no auxílio do preparo de meio de cultura, incubação, esterilização em autoclave, além de mais atividades necessárias ao desenvolvimento deste estudo.

## Referências

1. Martinez MB, Taddei CR. Enterobacteriaceae. *In*: Trabulsi LR, Altertum F. (Orgs.). **Microbiologia**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap. 35, p.293-302.
2. Heilberg IP, Schor N. Abordagem, Diagnóstico e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – (ITU). **Rev Assoc Med Bras**. Jan./mar. 2003; 49(1):109-16. ISSN 1806-9282. [[CrossRef](#)].
3. Hasenack BS, Marquez AS, Pinheiro EHT, Guilherme, RL, Frasson FT, Avelar GS. Disúria e polaciúria: sintomas realmente sugestivos de infecção do trato urinário? **Rev Bras Anal Clin**. 2004; 36(3):163-6. [[Link](#)].
4. McCulloch JA, Mamizuca EM. *Staphylococcus aureus*. *In*: Trabulsi LR, Althertum F. (Orgs.). **Microbiologia**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap. 20, p.179-188.
5. Nogueira PSF, Moura ERJ, Costa MMF, Monteiro WMS, Brondi L. Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital Universitário. **Rev Enferm UERJ**. Jan./mar. 2009; 17(1):96-101. [[Link](#)].
6. Gomperitz OF, Valderez G, Paula CR. Micoses oportunistas e outras micoses: candidíases, aspergilose, mucormicose, fusariose, pneumocistose, peniciliose, tricosporonose, oculomicose e otomicose. *In*: Trabulsi LR, Alterthum F, Correa B, Paula CR. (Orgs.). **Microbiologia**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap.70, p.601-608.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). **Cadernos de Atenção Básica, nº 31**.
8. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa-Júnior AM et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**. Jan./mar. 2007; 17(1):108-113. ISSN 1981-528X. [[CrossRef](#)].
9. Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Lett. Appl. Microbiol**. 1998; 26:194-8. [[CrossRef](#)].
10. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob Agents Chemother**. 2002; 46(6):1914-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
11. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev Bras PI Med**. 2011; 13(4):492-496. ISSN 1516-0572. [[CrossRef](#)].
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. **Monografia M47. Melaleuca alternifolia**. Disponível em: [[Link](#)].
13. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**. 2011; 20(52):68-73. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].

14. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev Bras Farmacogn**. 2006; 16(2):197-201. ISSN 0102-695X. [\[Link\]](#).
15. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou JB. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. **J Agric Food Chem**. 2001; 49(9):4168-70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
16. Pozzatti P, Loreto ES, Lopes PGM, Athayde ML, Santurio JM, Alves SH. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**. Jan. 2009; 53(1):12-5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
17. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 ISBN 1-56238-486-4. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1ª ed. Brasília: ANVISA, 2004. 52p.
19. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Brasília. 2010; vol. 2. 546p.
20. Rosa AM, Chang MR, Sposito FLE, da Silva CG, Miyagusku L, Sversut RA et al. Análise microbiológica de xampus e cremes condicionadores para uso infantil. **Rev Cienc Farm Básica Apl**. 2015; 36(1):43-49. ISSN 2179-443X
21. Brasil. **Resolução RDC nº 481**, de 23 de setembro de 1999. Aprova “Parâmetros de Controle Microbiológico para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 15 jan. 2019.
22. Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina na América Latina. **Braz J Infect Dis**. 2010; 14(2). ISSN 1413-8670. [\[CrossRef\]](#).

---

**Histórico do artigo** | **Submissão:** 05/07/2019 | **Aceite:** 10/01/2020 | **Publicação:** 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Correa LT, Nicoletti MA, De Amorim CS, Da Costa AR et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca* e sua incorporação em um creme mucocutâneo. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 26-37. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/818>>. 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.



# Determination of aristolochic acids I and II in Brazilian sugar cane spirit infusions “milhomem” commonly used in northeast Brazil as popular drinks

DOI 10.32712/2446-4775.2020.808

**Moreno, Daniela Sales Alviano<sup>1</sup>; Silva, Davi Oliveira e<sup>1,2</sup>; Silva, Antonio Jorge Ribeiro da<sup>2\*</sup>; Alves, Péricles Barreto<sup>3</sup>; Alviano, Celuta Sales<sup>1</sup>; Kaplan, Maria Auxiliadora Coelho<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Laboratório de Superfície de Microrganismos. Av. Carlos Chagas Filho, 373. Prédio do CCS, bloco I. CEP 21941-902. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter B. Mors. Av. Carlos Chagas Filho, 373. Prédio do CCS, bloco H, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Sergipe (UFS), Departamento de Química (DQI), Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, Campus Universitário. CEP 49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil.

\*Correspondência: [ajorge@ippn.ufrj.br](mailto:ajorge@ippn.ufrj.br).

## Abstract

Aristolochic acids (AA) are phytochemicals found in plants of the genus *Aristolochia* belonging to the family Aristolochiaceae. These compounds bear a nitrophenanthrene carboxylic acid skeleton and are reported to be carcinogenic, mutagenic, and nephrotoxic. Sugar cane spirit infusions containing *Aristolochia* species are commonly used in Brazil as popular drinks, in total absence of scientific information. The presence aristolochic acids was confirmed in samples collected in popular markets of the city of Aracaju, Sergipe, Brazil. The aristolochic acids quantitative estimation was made in five samples of sugar cane spirit infusions obtained from different places of that city and were performed by high-performance liquid chromatography. The samples analyzed contained aristolochic acids I and II in concentrations ranging between 1.96 and 6.10 µg/ml for AA I and 2.22 and 11.55 µg/ml for AA II. The immediate banning of such popular drinks is recommended in view of the danger to ingest aristolochic acids, botanical products containing aristolochic acids or herbal products containing plants belonging to Aristolochiaceae family.

**Keywords:** Milhomem. Sugar cane spirit infusion. Aristolochic acid I. Aristolochic acid II. Quantitative analysis.

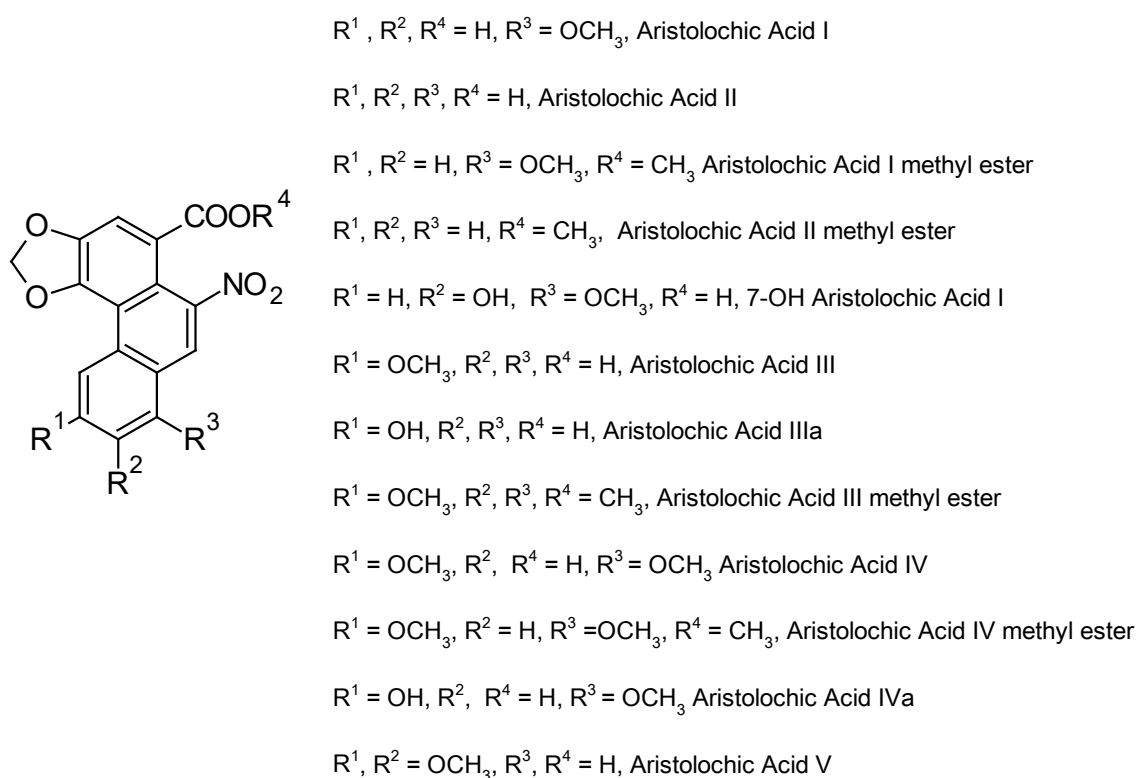
## Introduction

Many plants have been used for centuries in Brazilian folk medicine to treat several human ailments. Different types of preparations, such as water infusions (referred to as “teas”), hydroalcoholic extracts and juices among others are usual on these therapies. “Garrafadas” are mixed medicinal plants extracts that use sugar cane spirit, a typical Brazilian alcoholic beverage called “aguardente” or “cachaça” or wine as vehicle<sup>[1]</sup>. A very popular herbal preparation referred to as “milhomem” (obtained by infusion of several *Aristolochia* plant species, such as *A. cymbifera*, *A. gigantea*, *A. birostris* with sugar cane spirit) is used to treat liver and

stomach disorders, snake bites, fever and ulcer for example<sup>[2-4]</sup>. With about 490 species spreading around the tropical areas<sup>[5]</sup> plants of genus *Aristolochia* (Aristolochiaceae) are known to contain nitrophenanthrene carboxylic acid compounds known as aristolochic acids (AA).

Aristolochic acids are strongly recorded as responsible for the nephrotoxic and genotoxic effects associated with the use of some herbal preparations<sup>[6,7]</sup>. The first evidence about the nephrotoxicity of aristolochic acids I and II was published in 1963<sup>[8]</sup>. In addition, some types of cancer specially occurring in the urinary tract have also been linked to the ingestion of AA's present in these products<sup>[9,10]</sup>. Several analogs of AA are described, but aristolochic acids I and II (**FIGURE 1**) have particular significance for their common occurrence<sup>[11,12]</sup>.

**FIGURE 1:** Aristolochic acid structures.



Notwithstanding the fact that FDA suggested the removal of herbal products suspected to contain aristolochic acids from the market since 2001<sup>[13]</sup>, some of these products are still available for consumption<sup>[14]</sup>. Taking into consideration the risk of using products containing AA's, this work aims to evaluate the presence and levels of AA I and AA II on handmade alcoholic drinks sold in popular markets of Aracaju, capital of Sergipe, a state of the Brazilian Northeast region.

## Material and Methods

### General

Reagents and solvents were PA grade (Tedia Brazil) except those used for HPLC, analysis that were UV/HPLC grade (Merck). The ultrapurified water used was obtained with a Milli-Q apparatus (Millipore). Aristolochic acids I and II standards were obtained from Sigma-Aldrich. Analytical data was processed using Minitab 17 statistical software (Minitab Inc. 2006, State College, PA, USA).

### Sample collection and preparation

Samples of sugar cane spirit infusions (n = 5) were collected on different places at the city of Aracaju during the year of 2017. The undiluted samples were directly filtered through PTFE syringe filters (0.22 µm pore size, Tedia Brazil) to 2 mL vials and submitted to HPLC analysis.

### Quantitation

Calibrating solutions were prepared by using a standard of aristolochic acids purchased from Sigma (a mixture of 28% AA I and 66% AA II). Dilutions were made with aliquots of a stock solution (10 mg/100 mL of methanol) transferred to 50 ml volumetric flasks and added with methanol to a final volume. The solutions (made in triplicate) were submitted to HPLC analysis (see conditions below), the peak areas of AA I and AA II were integrated using the software and used to build a calibration curve ( $R^2 = 0.999$ ; limits of detection = 0.025 (AA I) and 0.041 (AA II) µg/mL); the limits of quantitation were determined as 0.27 (AA I) and 0.38 (AA II) µg/mL. The sample solutions (made in triplicate) were submitted to HPLC analysis (see conditions below).

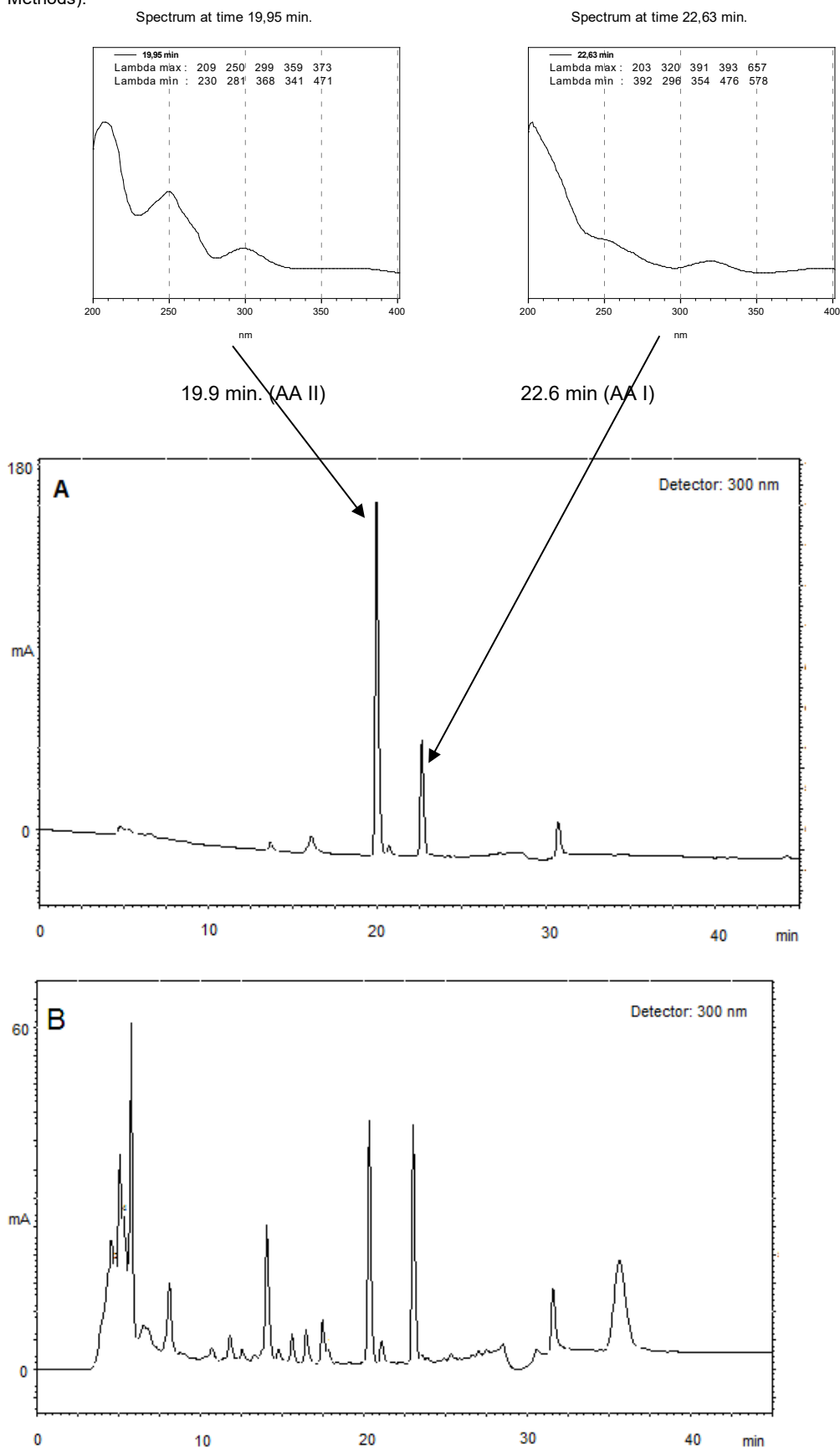
### HPLC analysis conditions

An HPLC Agilent 1200 series equipped with photodiode array detector was used for sample analysis. The method was as follows: column: RP18 Waters XTerra, 4.6 mm x 250 mm, 5 µm particle size; mobile phase, aqueous 0.5 % acetic acid (A) and methanol 0.5% acetic acid (B); gradient elution: 60% to 100% of B in 21 minutes; flow rate, 1.0 mL/min.; injection volume: 20 µL. UV detection, 254, 300 and 320 nm; retention times AA I: 22.6 min and AA II: 19.9 min. The retention times and UV spectra of samples and standards were compared in order to confirm identification [\[19\]](#).

## Results and Discussion

Five samples were tested for the presence of AA I and AA II. Quantitative analysis was carried out on all samples. Typical chromatograms are displayed (**FIGURE 2**).

**FIGURE 2:** Retention data and ultraviolet absorption spectra of aristolochic acids. **A:** Sigma Standard (levels: AAI: 28 µg/mL; AAI: 66 µg/mL); **B:** sample 5. Retention times: 19.9 min. (AAII); 22.6 min. (AAI). Conditions: (see Material and Methods).



The quantitation results are summarized in **TABLE 1**, where it is seen the simultaneous occurrence of both aristolochic acids in all of them. The concentrations found ranged between 1.96 and 6.10 µg/mL for AAI and 2.22 and 11.55 µg/mL for AAI. In the present work we have set the UV detector to wavelengths 300 and 320 nm, respectively for AAI and AII, instead of 224 and 254 nm as described by Schaneberg & Khan<sup>[14]</sup>. The choice was made to allow absorbance detection in peak maxima (see **FIGURE 2**).

**TABLE 1:** Amount of AAI and AII present in samples evaluated.

Sample	AAI		AII	
	(%)	(µg/ml)	(%)	(µg/ml)
1	0.023	2,39	0.067	6,71
2	0.044	4,42	0.061	6,16
3	0.019	1,96	0.024	2,46
4	0.027	2,75	0.022	2,22
5	0.061	6,10	0.115	11,55

The quantitative analysis of the “milhomem” infusion samples collected in Aracaju, Brazil showed an expressive content of both AAI and AII. These results suggest that a systematic assessment of the content of aristolochic acids has also to be done in the following species, all of them used as medicinal plants in Brazil (Mors et. al): *Aristolochia birostris*, *A. cordigera*, *A. cymbifera*, *A. elegans*, *A. esperanzae*, *A. gigantea*, *A. triangularis*, *A. trilobata*, among others. Screening these plants for the presence of AA is needed to evaluate whether their use pose any potential human health risk. Regarding the plants used to prepare the infusions the producers of the drink refer to the plants as “milhomem”. Of the plants listed above, only *A. birostris* is not popularly referred to as “milhomem”. All the others are known as “milhomem”<sup>[16]</sup>.

Although regulatory agents, such as FDA in 2001, advised about the risk of using products suspected to contain AA's, several herb products are marketed without control. In Brazil, it is easy to access these plants in popular markets either as fresh plants or as in preparations such as the ones analyzed here. Many *Aristolochia* species are popularly recommended as medicines to treat snakebites, malaria, intestinal worms and so on<sup>[2,18-21]</sup>.

Governmental agencies of different parts of world are banning products suspect to containing AA's. Several countries, such as UK, USA, Canada, Australia and New Zealand have suggested to reduce or prohibit the sale of herbal products containing aristolochic acids<sup>[13,22,23]</sup>.

## Conclusion

Aristolochic acids I and II were detected and quantified in samples of herbal preparations (“milhomem” sugar cane spirit infusions) collected in several popular markets in Aracaju, Sergipe, Brazil. In spite of the risks of consuming such preparations, the “milhomem” sugar cane spirit infusions has been used as a very popular drink, maybe due to the lack of scientific information on its dangers. The results found in the present work highlights the need that Brazilian public health authorities issue a warning on health risks involved in such practice. Thus, an urgent communication of these results to the community is strongly recommended and necessary to ensure a safe use of Brazilian medicinal plants.



## Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, FAPERJ and CAPES.

## References

1. Ferreira LAQ, Marques CA. Garrafadas: uma abordagem analítica. **Rev Fitos**. 2018; 12(3):243-262. ISSN 2446-4775. [\[CrossRef\]](#).
2. Ortencio WB. 1997. **Medicina Popular do Centro-Oeste**, 2<sup>nd</sup> ed. Editora Thesaurus, Brasília, Brazil. ISBN 8570620729.
3. Van Wyk B, Wink M. 2004. **Medicinal Plants of the World: An Illustrated Scientific Guide to the Important Medicinal Plants and Their Uses**. Timber Press, Portland, OR, USA. ISBN 0881926027.
4. Giorgetti M, Negri G, Rodrigues E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system – a study of historical sources from the 16<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> century. **J Ethnopharmacol**. 2007; 109(2):338-347. ISSN 0378-8741. [\[CrossRef\]](#).
5. Kelly LM, González F. Phylogenetic relationships in Aristolochiaceae. **Systematic Botany**. 2003; 28(2):236-249. ISSN 0363-6445. [\[CrossRef\]](#).
6. Kumar V, Poonam P, Prasad AK, Parmar VS. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acid and dioxoaporphines and their biological activities. **Nat Prod Rep**. 2003; 20:565-583. ISSN 0265-0568. [\[CrossRef\]](#).
7. Zhang H, Cifone MA, Murli H, Erexson GL, Mecchi MS, Lawlor TE. Application of simplified *in vitro* screening test to detect genotoxicity of aristolochic acid. **Food Chem Toxicol**. 2004; 42(12):2021-2028. ISSN 0278-6915. [\[CrossRef\]](#).
8. Peters G, Hedwall PR. Aristolochic Acid Intoxication: A New Type of Impairment of Urinary Concentrating Ability. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. 1963; 145(1):334-55. ISSN 0301-4533.
9. Cui M, Liu Zhi-Hong, Qiu Q, Li L, Li Lei-Shi. Tumor induction in rats following exposure to short-term dose aristolochic acid I. **Mutagenesis**. 2005; 20(1):45-49. ISSN 0267-8357. [\[CrossRef\]](#).
10. Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MSJ. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephropatic aristolochic acid 1 and 2 – a global assement based on bibliographic sources. **J Ethnopharmacol**. 2009; 125(1):108-144. ISSN 0378-8741. [\[CrossRef\]](#)
11. Kessler DA. Cancer and Herbs. **N Engl J Med**. 2000; 342(23):1742-1743. ISSN 0028-4793. [\[CrossRef\]](#).
12. Arlt N M, Stiborova M, Schmeiser H H. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal medicines: a review. **Mutagenesis**. 2002; 17(4):265-277. ISSN 0267-8357. [\[CrossRef\]](#).
13. Food and Drug Administration [\[www.fda.gov\]](http://www.fda.gov). **FDA concerned about botanical products, including dietary supplements, containing aristolochic acid**. Access in: Jan. 2012. Available in: [\[Link\]](#).
14. Schaneberg BT, Khan IA. Analysis of products suspected of containing *Aristolochia* or *Asarum* species. **J Ethnopharmacol**. 2004; 94(1-2):245-249. ISSN 0378-8741. [\[CrossRef\]](#).
15. Ioset JR, Raelison GE, Hostettmann K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. **Food Chem Toxicol**. 2003; 41(1):29-36. ISSN 0278-6915. [\[CrossRef\]](#).

16. Mors WB, Rizzini, CT, Pereira, NA. 2000. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Michigan. ISBN 0917256425.
17. Lorenzi H, Matos FJA 2002. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Inst Plant, Nova Odessa. ISBN 8586714283.
18. Wu TS, Damu AG, Su CR, Kuo PP. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. **Nat Prod Rep**. 2004; 21(5):594-624. ISSN 0265-0568. [[CrossRef](#)].
19. Cardoso DR, Frederiksen AM, Silva AA, Franco DW, Skibsted LH. Sugarcane spirit extract of oak and Brazilian woods: antioxidant capacity and activity. **Eur Food Res Technol**. 2008; 227(4):1109-1116. ISSN 1438-2377. [[CrossRef](#)].
20. Toledo CEM, Britta EA, Ceole LF, Silva ER, Mello JCP, Filho BPD et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian Cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **J Ethnopharmacol**. 2011; 133(2):420-425. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
21. Therapeutical Goods Administration. *Aristolochia* fact sheet. Available in: [[Link](#)]. Access in: January 2012.
22. Health Canada [<http://www.hc-sc.gc.ca>]. 2002. Warning not to consume Longdan and Lung Tan Xie Gan products. Available in: [[Link](#)]. Access in: January 2012.
23. New Zealand Medicines and Medical Devices Safety Authority [<http://www.medsafe.gov.nz>]. **Herbal, traditional and complementary medicines**. [[Link](#)]. Access in: January 2012.

---

**Histórico do artigo** | **Submissão:** 17/06/2019 | **Aceite:** 06/01/2020 | **Publicação:** 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Moreno DSA, Silva DO, Silva AJR, Alves PR et al. Determination of aristolochic acids I and II in Brazilian sugar cane spirit infusions "milhomem" commonly used in northeast Brazil as popular drinks. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 38-44. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/808>>. 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.



# Emetine and cephaeline production and regulation by *in vitro* propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes in semi-solid media and temporary immersion bioreactor

DOI 10.32712/2446-4775.2020.799

Silva, Simone da<sup>1</sup>; Alencar, Danielle Cardoso<sup>2</sup>; Benevides, Paulo José Coelho<sup>2</sup>; Astolfi-Filho, Spartaco<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia da Amazônia, Coordenação de Biotecnologia Vegetal, Avenida Governador Danilo de Matos Areosa, 690, Distrito Industrial, CEP 69075-351, Manaus, AM, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia da Amazônia, Coordenação de Química e Farmacognosia, Avenida Governador Danilo de Matos Areosa, 690, Distrito Industrial, CEP 69075-351, Manaus, AM, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Av. Gen. Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Prédio da Reitoria, 1º andar, Setor Norte, *Campus* Universitário, CEP 69080-900, Manaus, AM, Brasil.

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

## Abstract

*Psychotria ipecacuanha*, is a plant species with known medicinal properties that is critically endangered due to overexploitation of natural populations. Although the difficulties in conventional propagation by seed and by vegetative propagation are generally understood, the present study enhances our knowledge by describing efficient plant regeneration and root induction protocols for *P. ipecacuanha* while comparing alkaloid content (emetine and cephaeline) in *in vitro*-derived tissues. Stem node explants were cultured on MS medium MS supplemented with indolbutiric acid (IBA) in semi-solid media and the RITA<sup>®</sup> temporary immersion bioreactor. The highest root formation (81%) was in MS + 1.5 mg L<sup>-1</sup> IBA in the bioreactor. After 24 months of acclimatization, the plants cultivated in MS + 0.50 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of IBA had the highest number of roots (3), with mean values of 10.47 and 9.40 cm, respectively. The cultures coming from 1.0 mg L<sup>-1</sup> and 0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA in the bioreactor contained higher cephaeline content, with a relative area of 14.2 and 14.9%, respectively. For emetine, the 1.0 mg L<sup>-1</sup> IBA cultures in the bioreactor, 0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA and MS0 cultures contained higher content than the other treatments, with a relative area of 10.2, 10.2 and 10.1%, respectively.

**Keywords:** Plant biotechnology. Tissue culture. Ipecac. Temporary immersion. Secondary metabolites.

## Introduction

*Psychotria ipecacuanha* Brot. Stokes (Rubiaceae), commonly known as ipeca or poaia, is recognized worldwide as one of the most important medicinal plant species in the pharmaceutical industry due to the presence of bioactive alkaloids in the roots, primarily emetine, cephaeline and psychotrine<sup>[1,2]</sup>. Alkaloids have emetic action in bronchial diseases (e.g., anti-inflammatory properties) and can combat both fever and

malaria, and also act as inhibitors of protein and DNA synthesis<sup>[3,4]</sup>. In addition, the root extract of this species is used and recognized in the Pharmacopoeia as an amebicide and expectorant<sup>[5-8]</sup>.

Several substances are found in poaia roots: starch, reducing sugars, resins, tannins, malic acid, citric, ipecacuanic, and the alkaloids that justify the plant therapeutic properties: emetine, cephaeline, psychotrine, emetamine o-methyl psicotrin, and proto-emetim. The alkaloids correspond to 2 to 3% of the root dry weight and are mainly located in the cortical parenchyma (2.5%) and in small quantities in the woody zone <sup>[9]</sup>.

*Psychotria ipecacuanha* occurs in highly shaded underbrush areas in Central America (Nicaragua, Costa Rica and Panama) and northern South America (Colombia), the southwestern part of the Brazilian Amazon forest (Rondônia and Mato Grosso States) and the Brazilian Atlantic forest, especially in the States of Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, and Bahia<sup>[1,6,10,11]</sup>. Brazilian ipecac is the preferred species in the world market because it has a higher concentration of emetic alkaloids, which has led Brazil to become one of the main exporters of this product<sup>[12]</sup>.

International demand for ipecac leads to a profitable crop, yet the Brazilian producer (collector/intermediary) receives only USD \$ 24.31/kg root tissue (Ethnobotanical Gardener, 2016). This species is threatened by genetic erosion or extinction in Brazil because it has undergone an intense extraction process in the past two centuries, expanding agricultural frontiers with consequent reduction of habitat<sup>[13]</sup>.

Seed propagation in *P. ipecacuanha* easily lose viability after collection, have a low rate of germination, and show slow growth and premature death of plants under natural conditions<sup>[14-17]</sup>. Vegetative propagation is limited by the slow growth of plants. Consequently, there is an urgent need for the development of a protocol for large-scale propagation of selected material aimed at the reintroduction into the habitat as well as the production of material with a higher alkaloid content, mainly for the establishment of the best crop yield for supplying pharmaceutical industries.

*In vitro* culture techniques are presented as an alternative for the mass propagation and conservation of endangered, rare or endemic species<sup>[18]</sup>. Among other advantages, these techniques improve upon conventional propagation due to the generation of seedlings with apical meristem and root simultaneously (i.e., so that a later phase of rooting is not needed) in addition to ease of scheduling and less probability of genetic variation<sup>[18-20]</sup>. Despite these advantages, this process should be "personalized" considering the differential responses of each genotype, growth regulators, explant type, donor plant age, and growth conditions, among other factors<sup>[18]</sup>.

Biotechnology provides the opportunity through *in vitro* culture to use cells, tissues, organs, or even the entire organism by genetically manipulating them to obtain the desired substances<sup>[21,22]</sup>. In some cases, the production of biomolecules has been achieved via cell culture on an industrial scale, such as shiconin, berberine and taxol, or for biomass as in the case of ginseng roots. However, for many of the drugs of interest, production is rare to absent in plant cell culture, typically because production is controlled in specific ways in the tissues. In this way, the lack of differentiation would result in the loss of productive capacity; thus, many studies currently aim to optimize the means of growth and production or to select more productive cell lines. In addition, other approaches such as the growth of differentiated cells (root and shoot culture) and the induction of biosynthetic pathways using stimulators are strategies that have shown excellent results within plant tissue culture<sup>[23]</sup>.

The use of natural products as a model for drug synthesis or simple use by the population is a growing trend, and many studies have evaluated these products. In relation to *P. ipecacuanha*, most studies have addressed chemical and pharmacological properties<sup>[9]</sup>.

Literature review reveals a high medicinal and commercial value of *Psychotria ipecacuanha* roots, but there is a strong variability in the production of the chemical compounds of interest (emetine and cephaeline) and little information on the standardization of treatment of raw plant material to increase these plant constituents. The aim of this study was to develop a protocol to produce *in vitro* seedlings and roots of *P. ipecacuanha* with subsequent chemical characterization in order to obtain standardized extracts. These results will help to stimulate the commercial cultivation of this species with selected seedlings and higher productivity of the pharmacological compounds of interest.

## Material and Methods

### Plant material

*In vitro* cultures acquired from the germplasm bank of the Embrapa Amazônia Oriental (identified by the IAN Herbarium - Embrapa Amazônia Oriental) were used to obtain the plant material for the establishment of micropropagation and root culturing protocols of *Psychotria ipecacuanha*, which were used as donors of explants for the tests with different concentrations of the growth regulator Indolbutiric Acid (IBA)<sup>[24,25]</sup>.

### Treatment with growth regulator in semi-solid culture media in the temporary immersion bioreactor

Regenerated plantlets from nodal segments were tested in culture media according Murashige and Skoog, 1962 (MS) with different concentrations (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) of the growth regulator Indolbutiric Acid (IBA) and the control (MS0) in semi-solid media and RITA<sup>®</sup> (Vitropic S/A) temporary immersion bioreactors (n=30 per treatment) to evaluate root production<sup>[26]</sup>.

Glass vials containing 40 mL of semi-solid medium and RITA<sup>®</sup> (Vitropic S/A) temporary immersion bioreactors containing 250 ml of liquid medium (n=30 per treatment) were used. The immersion frequency used for the bioreactor system was ten seconds every three hours. The cultures were maintained under white light illumination (Sylvania fluorescent tubes) under 1.6 W m<sup>-2</sup>, 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with a daily photoperiod of 16 hours at 25 ± 1 °C, for 10 days. After this period, the explants were transferred to flasks containing 40 mL of MS medium free of growth regulators (MS0) and kept in the growth room.

After 60 days, the following parameters were evaluated: rooting percentage, average number of roots per plant, and mean root compliance.

### Statistical analysis

The effect of different concentrations of the growth regulator IBA on root development per explant was evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by a Tukey-Kramer test at a significance level of 5%. These analyses were performed using Graph Pad in Stat version 3.01. In the analysis of the rooting percentages according to the medium used, we ran a percentage difference test (p1 and p2) at 5% significance level using Statistica for Windows<sup>TM</sup>, 5.0 version.

We used a completely randomized 5 x 6 factorial experimental design consisting of two types of containers (250 mL flasks and the RITA<sup>®</sup> bioreactor) with three replicates per treatment and 30 explants per replicate, which were evaluated at 60 days after transfer to the MS0 medium.

### Acclimatization

Plantlets grown in all *in vitro* treatments were transferred to polypropylene bags (1 kg) containing substrate and remained for 30 days in a greenhouse with a fogging system. At the end of this period, the plants were transferred to another greenhouse with a micro sprinkler system where they remained for another 23 months. At the end of this period, the plants were used as root donors for the phytochemical tests.

### Alkaloid content analysis

The roots of acclimatized plants (500 mg) were air dried for a period of 5 days and submitted to extraction according Silva et al. (2016). Each root sub-sample (500 mg) was vortexed for one minute with a mixture of 10% ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) (5 mL) and ethyl ether ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O) (5 mL) in a glass container. The organic phase was transferred to another glass vessel and vortexed for one minute with 10% acetic acid (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) (5 mL). The aqueous phase was removed and treated with NH<sub>4</sub>OH to pH 10 and then vortexed for 1 minute with ethyl ether ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O) (5 mL).

The chromatographic method was developed for relative qualitative analysis of the fractions using high-efficiency thin layer chromatography (HPTLC) with densitometry.

The chromatoplaques (normal phase) were eluted in an 8:2 chloroform/methanol mixture and developed with UV light at 254 and 366 nm.

The relative quantification of the alkaloids (emetine and cephaeline) was based on the calculation of the spot absorption area. Using a densitometer, the density of the applied samples was analyzed comparing the different concentrations of the standard on the chromatographic plate. The absorption area of the respective retention factors (R<sub>f</sub>s) of the alkaloids were used to calculate the percentages as follows: [Area of each sample (R<sub>f</sub> area of emetine or cephaeline) / Total area] x 100 = % of alkaloids.

## Results and Discussion

Data from development in different culture media were compared with those obtained from plantlets treated with MS0.

The addition of 1.5 mg L<sup>-1</sup> IBA to bioreactor MS medium resulted in 81% rooting of the explants with an average yield of 3.41 roots of 0.6 cm at 60 days after transfer to MS0. The semi-solid culture medium supplemented with 1.5 mg L<sup>-1</sup> IBA led to 20% rooting of the seedlings, with a mean root yield of 1.8 roots of 0.46 cm (**TABLE 1**). Regarding the use of MS0, in both treatments there were no signs of rooting.

**TABLE 1:** Effect of different concentrations of Indolbutiric Acid (IBA) on the root development of *Psychotria ipecacuanha* grown *in vitro* in semi-solid media and bioreactor.

Culture Media	Rooting (%)	Root Number	Root Length (cm)
MS0	0	-	-
MS0_bioreactor	0	-	-
0.5 mg L <sup>-1</sup> IBA	13 <sup>h</sup>	1.00 <sup>g</sup>	0.25 <sup>f</sup>
0.5 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	43 <sup>b</sup>	2.83 <sup>c</sup>	0.54 <sup>c</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup> IBA	36 <sup>d</sup>	2.22 <sup>e</sup>	0.47 <sup>d</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	30 <sup>e</sup>	3.38 <sup>b</sup>	0.64 <sup>a</sup>
1.5 mg L <sup>-1</sup> IBA	20 <sup>g</sup>	1.80 <sup>f</sup>	0.46 <sup>d</sup>
1.5 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	81 <sup>a</sup>	3.41 <sup>b</sup>	0.60 <sup>b</sup>
2.0 mg L <sup>-1</sup> IBA	40 <sup>c</sup>	2.50 <sup>d</sup>	0.31 <sup>e</sup>
2.0 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	23 <sup>f</sup>	4.00 <sup>a</sup>	0.57 <sup>b</sup>

\*Values in the same column followed by the same letter do not differ statistically from each other (significance level 5%).

Bioreactors may serve as an alternative for preserving viability in the micropropagation technique of several species, primarily by eliminating and/or automating some steps of plant propagation; this is because the temporary immersion system provides a highly aerobic system for plant growth through forced ventilation through the vessel lid. However, the immersion times and duration and frequency of immersion are the most decisive parameters for successful micropropagation, as they influence nutrient and water uptake and consequently, hyperhidrosis of the cultured material<sup>[27-29]</sup>.

According to Smet and Beeckman<sup>[30]</sup>, adventitious root initiation involves meristematic cell niche formations (initial cells and/or target cells) which are dependent on external and internal factors. The differentiation of the meristematic cell niche and the formation of new roots involves stem tissue disruptions to form connections with the conductive vascular tissues induced by auxins<sup>[31,32]</sup>. Brondani et al.<sup>[33]</sup>, working with *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, observed that the ½ MS culture medium supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> IBA induced 75% rooting of micro-cuttings.

According to Souza e Pereira<sup>[34]</sup>, the most common auxins used for rooting are naphthalene acetic acid (NAA), indolbutiric acid (IBA) and indolacetic acid (IAA). The main differences among them are molecular structure and the stability, where NAA is more stable than IAA; thus, most *in vitro* rooting protocols use NAA and IBA auxins.

Regardless of the auxin formula, excessive concentration in the culture medium can be toxic, promoting callus formation at the micro-cutting bases and compromising rooting and shoot growth. Generally, the root and shoot vascular concentration is very fragile and callus formation can compromise adventitious root functionality<sup>[31]</sup>. However, callus formation was not observed on explants of *Psychotria ipecacuanha*. Based on these results, the treatment in the bioreactor in MS media with 1.5 mg L<sup>-1</sup> IBA is considered the most suitable for *in vitro* rooting of *Psychotria ipecacuanha*, resulting in 81% rooting.

The plantlets produced in all test treatments can be acclimatized from 60 days of cultivation, since 100% survival was obtained after 24 months of acclimatization (**FIGURE 1**).



**FIGURE 1:** Acclimatized *Psychotria ipecacuanha* plants 24 months after transfer to the greenhouse.



After 12 months of acclimatization in the greenhouse, the plants cultivated in MS medium supplemented with 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of IBA had a higher number of roots (3 roots each) with mean lengths of 10.47 and 9.4 cm, respectively (**TABLE 2**).

**TABLE 2:** Effect of different concentrations of Indolbutiric Acid (IBA) on the root development of *Psychotria ipecacuanha* grown *in vitro* in semi-solid media and bioreactor after two years in the greenhouse.

Culture Media	Rooting (%)	Roots Number	Roots Length (cm)
MS0	100	2.33 <sup>c</sup>	12.29 <sup>a</sup>
MS0_bioreactor	100	3.00 <sup>a</sup>	10.47 <sup>c</sup>
0.5 mg L <sup>-1</sup> IBA	100	3.00 <sup>a</sup>	9.40 <sup>d</sup>
0.5 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	100	2.33 <sup>c</sup>	11.70 <sup>ab</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup> IBA	100	2.33 <sup>c</sup>	9.96 <sup>cd</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	100	2.66 <sup>b</sup>	9.83 <sup>d</sup>
1.5 mg L <sup>-1</sup> IBA	100	1.66 <sup>d</sup>	11.13 <sup>b</sup>
1.5 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	100	2.33 <sup>c</sup>	7.96 <sup>f</sup>
2.0 mg L <sup>-1</sup> IBA	100	2.66 <sup>b</sup>	8.58 <sup>e</sup>
2.0 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	100	2.33 <sup>c</sup>	9.76 <sup>d</sup>

\*Values in the same column followed by the same letter do not differ statistically from each other (significance level 5%).

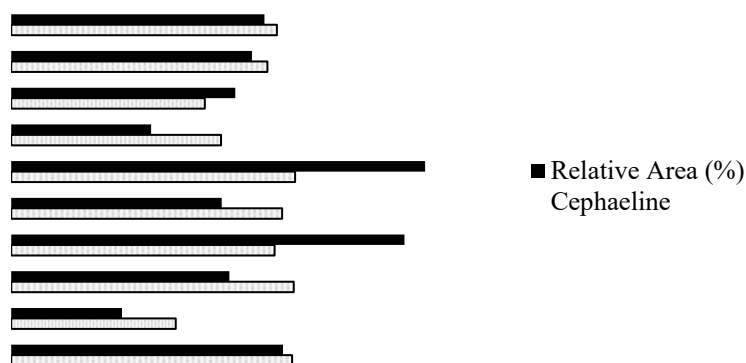
According to HPTLC alkaloid fraction analyses, there is a direct dependence on the composition and content of growth regulators in culture media, and the system used (**TABLE 3** and **FIGURE 2**). The principal components of alkaloids of *P. ipecacuanha* roots are presented in **TABLE 2**: Emetine (10.12; 5.93; 10.18; 9.49; 9.76; 10.23; 7.56; 6.97; 9.23 and 9.57%) and cephaeline (9.79; 3.99; 7.86; 14.17; 7.58; 14.91; 5.04; 8.07; 8.67 and 9.12) in plants cultured on MS0 media, and MS + 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg L<sup>-1</sup> IBA in semisolid and bioreactor conditions, respectively. Comparative analysis of the HPTLC profiles showed high percentage of emetine and cephaeline in the MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> IBA treatment in the bioreactor, compared to other treatments.

**TABLE 3:** Emetine and cephaeline percentage in root extracts from *in vitro* plantlets cultivated in different media: MS0 (control), MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA, MS + 1.0 mg L<sup>-1</sup> IBA, MS + 1.5 mg L<sup>-1</sup> IBA and 2.0 mg L<sup>-1</sup> IBA, in semi-solid media and bioreactor (after 2 years of acclimatization).

Culture Media	Relative Area (%)	
	Emetine	Cephaeline
MS0	10.12 <sup>a</sup>	9.79 <sup>b</sup>
MS0_bioreactor	5.93 <sup>e</sup>	3.99 <sup>g</sup>
0.5 mg L <sup>-1</sup> IBA	10.18 <sup>a</sup>	7.86 <sup>e</sup>
0.5 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	9.49 <sup>b</sup>	14.17 <sup>a</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup> IBA	9.76 <sup>ab</sup>	7.58 <sup>e</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	10.23 <sup>a</sup>	14.91 <sup>a</sup>
1.5 mg L <sup>-1</sup> IBA	7.56 <sup>c</sup>	5.04 <sup>f</sup>
1.5 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	6.97 <sup>d</sup>	8.07 <sup>e</sup>
2.0 mg L <sup>-1</sup> IBA	9.23 <sup>b</sup>	8.67 <sup>d</sup>
2.0 mg L <sup>-1</sup> IBA_bioreactor	9.57 <sup>b</sup>	9.12 <sup>c</sup>

\*Values in the same column followed by the same letter do not differ statistically from each other (significance level 5%).

**FIGURE 2:** Percentage (%) of the alkaloids emetine and cephaeline in *Psychotria ipecacuanha* roots extracts.



Due to growth conditions used in this work, the light levels, temperature, mineral composition of growth regulators, pH, and age of the explants was completely controlled.

The results show that the addition of MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> IBA in the culture medium in the bioreactor induced the increase of these alkaloids, but when the concentration of this growth regulator was increased the alkaloids decreased.

Root growth and the composition of the root alkaloids of *P. ipecacuanha* can be altered by addition of selected phytohormones to the nutrition medium.

The effects of auxin on gene activity, especially in the epidermis, explains the quantitative variation promoted by addition of auxin<sup>[35]</sup>. Auxins may affect the types of proteins formed in a plant cell before or as soon as growth promotion starts, which may explain the changes in the level of some substances through the modification of cell enzymatic patterns<sup>[36]</sup>.

The effect of auxin on the levels of secondary metabolites has been previously observed. Auxin is able to stimulate the synthesis of some essential oil compounds and indole alkaloids<sup>[36,37]</sup>.

The results from the present study suggest that the growth regulator IBA influences *P. ipecacuanha* alkaloid composition. This is an interesting result since emetine and cephaeline have great commercial value and are mainly utilized in the phytopharmaceutical industry.

## Conclusion

The use of MS0 in temporary immersion bioreactor and semisolid MS medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of indolebutyric acid favored greater root production by providing 3 roots each of *Psychotria ipecacuanha* seedlings. However, for increased emetine and cephaeline production, the treatment producing the best results was supplementation of MS medium with 1.0 mg L<sup>-1</sup> IBA in the temporary immersion bioreactor, with a production of 10.23 and 14.91%, respectively. Although this treatment promoted only 30% *in vitro* rooting of the seedlings, 100% survival was observed in the acclimatization process of all seedlings tested regardless of *in vitro* rooting, with no detectable morphological anomalies or variation. We therefore conclude that there is no dependence of rooting in the *in vitro* phase for acclimatization success.

The micropropagation protocol established here was adequate for *P. ipecacuanha* seedling production because it uses low concentrations of IBA (1.0 mg L<sup>-1</sup>) and results in seedlings with higher production of emetine and cephaeline, with an average yield of 10.23 and 14.91%, respectively, at 24 months after acclimatization.

## Acknowledgements

We are grateful for the financial support from the Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA), the Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), the Universidade Federal do Amazonas (UFAM) and the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Ocidental).

## References

1. Assis, MC, Giulietti, AM. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha" - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Braz J Botany**. 1999; 22 (2): 205-216. ISSN 1806-9959. [[CrossRef](#)].
2. Rossi AAB, Oliveira LO, Venturini BA, Silva RS. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genetica - An Inter J Genetics Evol**. 2009; 13: 57-67. ISSN 1573-6857. [[CrossRef](#)].
3. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacog**. July/Sept. 2008; 18: 472-508. ISSN 1981-528X. [[CrossRef](#)].
4. Burhans WC, Vassiley LT, Wu JM, Nallaseth FS, Depamphilis ML. Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replication by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation. **EMBO J**. 1991; 10: 4351-4360. [[CrossRef](#)].
5. Akinboye E, Bakare O. Biological activities of emetine. **The Open Nat Prod J**. 2011; 4: 8-15. ISSN 1874-8481. [[Link](#)] [[CrossRef](#)].

6. Nomura T, Kutchan T. Three new o-methyltransferases are sufficient for all o-methylation reactions of ipecac alkaloid biosynthesis in root culture of *Psychotria ipecacuanha*. **The J Biol Chem**. 2010; 285 (10): 7722–7738. [[CrossRef](#)].
7. Brandão M, Zanetti N, Oliveira A, Graef C, Santos A, MonteMór R. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **J Ethnopharmacol**. 2008; 120: 141–148. [[CrossRef](#)].
8. Ideda K, Teshim D, Aoyama T, Satake M, Shimomura K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. **Plant Cell Reports**. 1988; 7: 288-291. [[CrossRef](#)].
9. Lameira OA. Cultivo da ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. **Circular Técnica**. 2002; 28: 1-4. [[Link](#)]
10. Skorupa LA, Assis MC. Collection and conserving Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. **Economic botany**. 1998; 52 (2): 209-210. [[CrossRef](#)].
11. Alves GR, Oliveira L, Alves MM, Silva BW. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). **Biochem System Ecol**. 2005; 33: 233-243. [[CrossRef](#)].
12. Vieira LS. **Manual da medicina popular**. Belém: Agronomia Vozes. 1991; 247. [[Link](#)].
13. Rocha TT, Lameira OA. Avaliação do período de floração e frutificação do BAG *ipecacuanha*. Em: 15° Seminário de Iniciação Científica da Embrapa. Belém, PA. **Anais do 15° Seminário de Iniciação Científica da Embrapa**: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. [[Link](#)].
14. Satoko I, Kaori T, Koichiro S. Gibberellic acid improved shoot multiplication in *Cephaelis ipecacuanha*. **In vitro Cel Develop Biol Plant**. 2007; 44 (3): 216-220. [[CrossRef](#)].
15. Chatterjee K, Nandi P, Ghosh C. Cultivation and utilization of ipecac In West Bengal. In: Atal CK, Kapur BM. eds. **Cultivation and utilization of medicinal plants**. Jammu-Tawi, India: CSIR, Regional Research Laboratory. 1982; p.295-301. 877p. [[Link](#)].
16. Rout GR, Samantaray S, Das P. *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. **Sci Horticolt**. 2.000; 86: 71-79. [[CrossRef](#)].
17. Jha S, Jha T. Micropropagation of *Cephaelis ipecacuanha* Rich. **Plant Cell Reports**. 1989; 8: 437-439. [[CrossRef](#)].
18. Robinson P, John JBS, Balakrishnan V. Regeneration of Plants Through Somatic Embryogenesis in *Emilia zeylanica* C. B. Clarke a Potential Medicinal Herb. **Bot Res Inter**. 2009; 2 (1): 36-41. [[Link](#)].
19. Khadke S, Kuvalekar A. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf and Stem Explants of *Nothapodytes foetida*: A Critically Endangered. Plant Species. **Inter J Plant Anim Environ Sci**. 2013; 3 (1): 257-264. ISSN 2231-4490. [[Link](#)].
20. Aiqing J, Xueqing G, Yan Z, Hongyan Y, Guoliang W. Advances in Somatic Embryogenesis Research of Horticultural Plants. **American J Plant Sci**. 2011; 2: 727-732. [[CrossRef](#)].
21. Rao SR, Ravishankar GA. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. **Biotechnol Adv**. 2002; 20: 101-153. [[CrossRef](#)].
22. Verpoorte R, Memelink J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Cur Opin Biotechnol**. 2002; 13: 181-187. [[CrossRef](#)].
23. Lourenço MV. Biotecnologia de Plantas Medicinais: Produção de Biomoléculas. **Biológico**. 2003; 65 (1/2): 63-65. [[Link](#)].

24. Silva S, Pinheiro EN, Assunção LM, Silva EL, Rodrigues DC, Ferreira FF, Astolfi-Filho S. *In vitro* propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes under different concentrations of Indoleacetic Acid. **Rev Fitos**. 2018; 12 (3): 263-268. [[CrossRef](#)].
25. Silva S, Astolfi-Filho S. Effect of indolebutyric acid on *in vitro* root production of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Rev Fitos**. 2018; 12 (3): 218-226. ISSN 2446-4775. [[CrossRef](#)].
26. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol Plantarum**. 1962; 15: 473-497. [[Link](#)].
27. Oliveira ML, Xavier A, Filho RMP, Otoni WC, Teixeira JB. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em bioreactor de imersão temporária. **Rev Árvore**. 2011; 35 (6): 1207-1217. [[CrossRef](#)].
28. Berthouly M, Etienne H. Temporary immersion system: a new concept for use of liquid medium in mass propagation. In: International Symposium on Liquid Systems for *in vitro* Mass Propagation of Plants. **Norway Proceedings**. Norway: Cost 843 Working Group. 2002; 1: 37-38. [[Link](#)] [[CrossRef](#)].
29. Watt MP. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African J Biotechnol**. 2012; 11 (76): 14025-14035. [[CrossRef](#)].
30. Smet I, Beeckman T. Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. **Nature Rev Mol Cell Biol**. 2011; 12 (3): 177-188. [[CrossRef](#)].
31. Li SW, Xue L, Xu S, Feng H, Na L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **Botanical Review**. 2009; 75 (2): 230-247. ISSN 1874-9372. [[CrossRef](#)].
32. Brondani GE, Baccarin FJB, Wit Ondas HW, Stape JL, Gonçalves AN, Almeida M. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. **J Forestry Res**. 2012; 23 (4): 583-592. [[CrossRef](#)].
33. Brondani GE, Dutra LF, Wendling I, Grossi F, Hansel FA, Araujo MA. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scient**. 2011; 33 (4): 655-663. [[CrossRef](#)].
34. Souza AV, Pereira MAS. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Rev Bras Plantas Med**. 2007; 9 (4): 103-117. [[Link](#)].
35. Biddington NL, Thomas TH. A modified *Amaranthus betacyanin* bioassay for the rapid determination of cytokinins in plant extracts. **Planta**. 1973; 111: 183-186. [[CrossRef](#)].
36. Mérillon JM, Liu D, Huguet F, Chénieux JC, Rideau M. Effect of calcium entry blockers and calmodulin inhibitors on cytokinin enhanced alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell cultures [indole alkaloids, calcium uptake]. **Plant Physiol Biochem**. 1991; 29: 289-296. [[Link](#)].
37. Silva S, Lage CLS, Esquibel MA, Gil RASS, Sato A. *In vitro* propagation of *Melissa officinalis* L. and production of essential oil. **Plant Cell Culture e Micropropag**. 2006; 2(2): 53-60. [[Link](#)].

---

**Histórico do artigo** | **Submissão:** 20/05/2019 | **Aceite:** 10/01/2020 | **Publicação:** 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Silva S, Alencar DC, Benevides PJC, Astolfi-Filho S. Emetine and cephaline production and regulation by *in vitro* propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes in semi-solid media and temporary immersion bioreactor. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 45-55. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/799>>. 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.





# Estratégia de patenteamento de derivados de *Cannabis sativa* para obtenção da anuência prévia da ANVISA

*Cannabis sativa* derivatives patenting strategy for ANVISA's previous annuity

DOI 10.32712/2446-4775.2020.855

Oliveira, Ana Cláudia Dias<sup>1\*</sup>; Nogueira, Marcelo<sup>1</sup>; Reis, Simone Milezi de Miranda<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Associação Brasileira da Indústria de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades – ABIFINA (Consultoria Técnica), Av. Churchill, 129, CEP 20020-050, Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), COOPI. Avenida Graça Aranha, 206, sobreloja, Centro, CEP 20030-001, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*Correspondência: [consultoria.tecnica@abifina.org.br](mailto:consultoria.tecnica@abifina.org.br).

## Resumo

O uso de *Cannabis sativa* de forma medicinal tem aumentado a cada ano, principalmente pela capacidade de proporcionar alívio imediato dos sintomas de problemas de saúde, tais como convulsões, depressão e insônia. A potencialidade dos fitocanabinoides da espécie para regulação da saúde mental e física tem sido comprovada por meio de estudos publicados em artigos científicos e patentes. O objetivo deste artigo é apresentar estratégias de patenteamento de produtos e processos à base de fitocanabinoides para obtenção da anuência prévia de pedidos de patentes, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e prosseguimento ao exame pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). A busca foi realizada na base de dados do INPI, por meio de palavras-chaves *Cannabis* e fitocanabinoides. Foram triados os pedidos depositados no INPI e encaminhados para anuência prévia da ANVISA, no período de janeiro de 2018 a julho de 2019. Foram encontrados 87 documentos, sendo apenas 5 pedidos enviados para análise da ANVISA. Ficou demonstrado que as tecnologias pleiteadas estão entrando em domínio público pela não anuência da ANVISA e conseqüente arquivamento definitivo dos pedidos de patentes pelo INPI, o que pode acarretar em perda de informação e de oportunidades de mercado.

**Palavras-chave:** *Cannabis*. Patente. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

## Abstract

The use of *Cannabis sativa* medicinally has increased every year, mainly for the ability to provide immediate relief of symptoms of health problems, such as seizures, depression and insomnia. The potential of



phytocannabinoids of the species for regulation of mental and physical health has been proven through studies published in scientific articles and through patents. The aim of this paper is to present patenting strategies for phytocannabinoids products and processes to obtain prior approval of patent applications by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) and further examination by Brazilian National Institute of Industrial Property (INPI). The search was performed in the INPI database, using the keywords Cannabis and phytocannabinoids. The applications filed with the INPI and sent to ANVISA for prior approval from January 2018 to July 2019 were screened. There were 87 documents, of which only 5 applications were submitted for analysis by ANVISA. It has been demonstrated that the technologies applied for are entering the public domain through the non-acceptance of ANVISA and consequent final filing of patent applications by INPI, which can lead to loss of information and market opportunities.

**Keywords:** *Cannabis*. Patent. Brazilian Health Regulatory Agency. Brazilian National Institute of Industrial Property.

---

## Introdução

A espécie *Cannabis sativa* é conhecida medicinalmente pela capacidade de proporcionar alívio imediato dos sintomas relacionados a problemas de saúde. Tais como convulsões, depressão e insônia. As comprovações de sua eficácia têm aumentado a cada ano, o que evidencia a potencialidade dos fitocanabinoides da espécie para regulação da saúde mental e física<sup>[1]</sup>.

O canabidiol (CBD)<sup>[2]</sup> e o delta 9-tetrahydrocannabinol (THC)<sup>[3]</sup> foram isolados na década de 60, por Raphael Mechoulam, professor do Departamento de Química Medicinal e Produtos Naturais da Escola de Medicina da Universidade Hebraica de Jerusalém. A partir dos anos 90, o uso medicinal ganhou destaque após a descrição científica do sistema endocanabinoide como um sistema que modula vários processos fisiológicos e que se constitui em “alvo terapêutico” para o tratamento de condições patológicas, dentre elas crises convulsivas.

Com a descoberta dos fitocanabinoides canabidiol (CBD) e  $\Delta^9$ -tetraidrocanabidiol (THC), o sistema endocanabinoide pôde ser melhor compreendido, como o sistema constituído pelos receptores canabinoides CB1 e CB2, os endocanabinoides anandamida e 2-arachidonil-glycerol e suas enzimas de síntese e degradação<sup>[4]</sup>. A ativação e/ou bloqueio destes receptores pelos fitocanabinoides, tais como THC, CBD, THCa (forma ácida do THC), CBDA (ácido canabidiólico), CBG (canabigerol) dentre outros mais de 100 fitocanabinoides, produz efeitos biológicos que podem trazer alívio para uma série de doenças relacionadas ao sistema biológico envolvido.

Os fitocanabinoides agem no Sistema Nervoso Central (SNC) por meio da ligação específica com um receptor de membrana celular denominado CB1. As maiores concentrações deste tipo de receptor foram encontradas nos gânglios da base (estruturas do cérebro relacionadas com os movimentos), no cerebelo, nos neurônios piramidais do hipocampo (envolvidos na formação de novas memórias, aprendizagem e emoções), no giro denteado e no córtex cerebral. A localização dos receptores pode ressaltar a relação existente entre algumas doenças que podem ser alvo terapêutico dos derivados fitocanabinoides. Por exemplo, a degeneração dos gânglios da base está relacionada à síndrome de Parkinson e a degeneração dos neurônios piramidais do hipocampo está relacionada à síndrome de Alzheimer. Por outro lado, os receptores CB1 estão ausentes, no tronco cerebral, bulbo (responsável pelas funções autônomas como,

por exemplo, a respiração) e hipotálamo (responsável pelo equilíbrio das funções internas corporais e do ambiente), o que pode trazer certa segurança ao uso terapêutico e recreativo da *Cannabis*, uma vez que o risco de parada cardiorrespiratória induzida por fitocanabinoides é praticamente impossível.

É interessante assinalar que nos estados norte-americanos em que o uso medicinal (e mesmo o recreativo) foi legalizado, houve diminuição da prescrição de opioides, cujo vício é considerado um problema de saúde pública<sup>[5]</sup>. Outra pesquisa demonstrou que os estados que legalizaram o uso medicinal da maconha apresentaram 25% menos mortes por overdose de opioides, que têm um potencial de causar dependência muito maior do que a *Cannabis*, além de provocar efeitos colaterais desagradáveis, como problemas gastrointestinais<sup>[6]</sup>. Nove estados e o distrito federal norte-americano já legalizaram os usos medicinal e recreativo, e 20 outros estados legalizaram apenas o uso medicinal. No Brasil, não é permitido o cultivo de *Cannabis*, nem para fins medicinais nem para fins recreativos. Recentemente, em junho de 2019, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) abriu consulta pública para abordar requisitos técnicos e administrativos para o plantio de *Cannabis* para fins medicinais, mas apenas para pessoas jurídicas, ainda não havendo previsão acerca do cultivo doméstico.

### Aspectos regulatórios

No Brasil, o estudo regulatório da *Cannabis* para uso medicinal vem avançando. Em 2015, a ANVISA simplificou o procedimento de importação de produtos à base de canabidiol, em associação com outros fitocanabinoides, dentre eles o tetrahydrocannabinol (THC), por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado para tratamento de saúde, conforme Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA (RDC) nº 17/2015<sup>[7]</sup>. A autorização excepcional concedida pela ANVISA possui validade de um ano e, durante o período de validade desta autorização, para a importação dos quantitativos necessários, os pacientes ou responsáveis legais devem apresentar a prescrição médica com o quantitativo previsto para o tratamento, diretamente nos postos da ANVISA localizados nos aeroportos, para a internalização do produto no país.

Segundo a RDC nº 17/15, os produtos à base de canabidiol são industrializados e tecnicamente elaborados, constantes do Anexo I da referida RDC, atualizada pela RDC nº 128/16<sup>[8]</sup>, que possuem em sua formulação o canabidiol em associação com outros fitocanabinoides, dentre eles, o THC (**TABELA 1**), não sendo registrados no país e, portanto, não possuindo eficácia e segurança avaliadas pela ANVISA.

**TABELA 1:** Lista de produtos à base de canabidiol em associação com outros fitocanabinoides, dentre eles o THC.

Nome do Produto	Nome da Empresa
Cibdex Hemp CBD Complex	Hemp Meds Px
Hemp Blend	Bluebird Botanicals
Real Scientific Hemp Oil (RSHO) CBD	Hemp Meds Px
Revivid Hemp Tincture	Revivid LLC
CBDRX CBD Oil	CBDRX
Charlotte Web Hemp Extract	CW Botanicals
Endoca Hemp Oil	Endoca
Elixinol Hemp Oil CBD	Elixinol
EVR Hemp Oil CBD	EVR
Mary's Elite CBD Remedy Oil	Mary's Nutritionals
Purodiol CBD	Purodiol Limited UK

Em maio de 2017, a ANVISA atualizou a lista das Denominações Comuns Brasileiras (DCB) com a inclusão de 19 novas substâncias entre produtos biológicos, princípios ativos, excipientes e plantas de interesse da indústria farmacêutica. A atualização da lista DCB é uma rotina da ANVISA, mas a alteração chamou a atenção pela inclusão da *Cannabis sativa*. Essa inclusão não altera as regras para importação de medicamentos com canabidiol ou outros extratos da *Cannabis*. A medida também não é uma autorização ou reconhecimento da *Cannabis* como planta medicinal. Isso porque a DCB é uma lista de nomes oficiais para todas as substâncias que são ou podem vir a ser de interesse da indústria farmacêutica no Brasil e a designação de uma DCB para uma planta não implica em reconhecer que ela é planta medicinal, mas sim que ela tem potencial para ser planta medicinal, ser reconhecida e importada como planta medicinal ou, ainda, ser utilizada como insumo de um medicamento que receba registro.

As proibições fazem com que os pacientes tenham que importar os medicamentos. Em 2018, a ANVISA contabilizou 2.371 novos pedidos de licença para importação da substância e 1.242 revalidações. Já no primeiro trimestre de 2019, a agência permitiu que 885 brasileiros passassem a importar o canabidiol<sup>[9]</sup>.

A burocracia e os altos custos financeiros da importação fazem com que muitos tenham que buscar o Poder Judiciário. Inicialmente, estes pacientes buscavam o Estado para que arcasse com as despesas de importação e de provimento de óleo com CBD ou THC. Foram obtidas decisões favoráveis, mas a demora agravava a situação de saúde dos pacientes. Em razão disso, foi adotada a estratégia do *Habeas Corpus* para o auto cultivo em que os pacientes buscam um salvo-conduto para plantar e extrair o óleo domesticamente. A ideia é respaldar o paciente para que não seja preso e para evitar que as plantas sejam apreendidas. Existem precedentes favoráveis apontando a omissão constitucional ao não garantir o direito à saúde e à dignidade da pessoa humana. Considerando que em muitas dessas demandas é a saúde de crianças que está em jogo, ainda se deve argumentar que o artigo 227 da Constituição atribui à família o dever de assegurar à criança o direito à vida e à saúde<sup>[10]</sup>.

O único medicamento registrado no Brasil é o Mevatyl<sup>®</sup>, obtido a partir de extratos isolados da *Cannabis* que contém como princípios ativos o tetraidrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD). Na época do registro, a planta ainda não constava na lista DCB. O tratamento varia no valor e na forma de obtenção dos ativos. Uma caixa com três frascos de spray de Mevatyl<sup>®</sup>, com 10 mL - suficiente para, cerca de, 45 dias de tratamento - pode custar um pouco menos de R\$ 3 mil. Por importação, o custo mensal da terapia gira em torno de R\$ 1.500,00.

O mercado de medicamentos feitos com a droga pode chegar a US\$ 40 bilhões até 2023. Segundo estudo das consultorias *New Frontier* e *Green Hub*, o Brasil possui cerca de 3,4 milhões de pacientes que poderiam ser beneficiados por esse tipo de terapia, movimentando cerca de US\$ 1,4 bilhão por ano. Mas, até dezembro de 2018, apenas 3.182 pessoas usavam legalmente medicamentos à base da planta no Brasil, ou seja, menos de 0,1%<sup>[11]</sup>.

### **Propriedade intelectual de derivados de fitocannabinoides**

Além das dificuldades advindas de conflitos éticos e sociais e dos requisitos regulatórios para comprovar a qualidade e eficácia dos medicamentos à base de *Cannabis*, a pesquisa e o desenvolvimento de produtos e processos para saúde à base de fitocannabinoides têm sofrido impacto também no patenteamento.

O art. 10, inciso IX, da Lei de Propriedade Industrial (LPI) brasileira, Lei nº 9.279/1996<sup>[12]</sup> define que:

Não se considera invenção nem modelo de utilidade: [...] (IX) o todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ou ainda que dela isolados, inclusive o genoma ou germoplasma de qualquer ser vivo natural e os processos biológicos naturais.

O art. 18, III, da LPI define que:

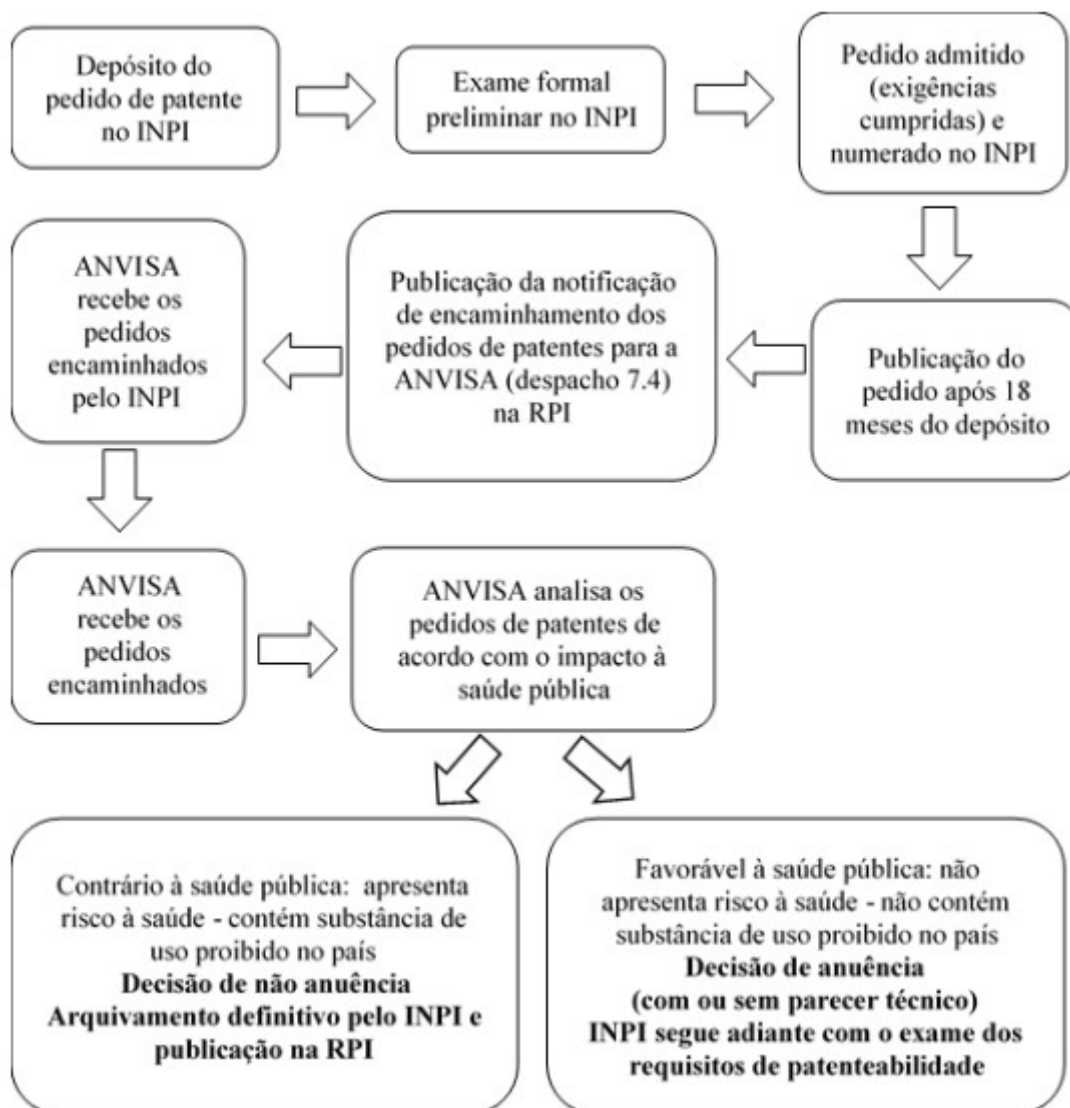
Não são patenteáveis: III - o todo ou parte dos seres vivos, exceto os microrganismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade - novidade, atividade inventiva e aplicação industrial - previstos no art. 8º e que não sejam mera descoberta.

Assim, alguns pedidos de patentes de derivados de fitocanabinoides podem ser indeferidos por infringir tanto o artigo 10, IX, como o artigo 18, III, da LPI, por pleitear proteção para matérias tais como extratos de canabinoides *per se*, cultivares vegetais de espécies de *Cannabis* e variedades vegetais de espécies de *Cannabis*.

Adicionalmente, pedidos de patentes de derivados de espécies de *Cannabis* podem conter substâncias que apresentem risco à saúde, o que poderá levar ao seu arquivamento no INPI. Isso ocorre porque o exame de pedidos de patentes de interesse para a saúde apresenta um trâmite administrativo diferenciado dos demais setores, que inclui a anuência prévia da ANVISA para posterior análise de patenteabilidade pelo INPI. O artigo 229-C da LPI, incluído pelo artigo 1º da Lei nº 10.196/01, determina que a concessão de patentes de invenção aos pedidos referentes a produtos e processos farmacêuticos dependerá da prévia anuência da ANVISA<sup>[13]</sup>. A Portaria Conjunta INPI/ANVISA nº 1/17<sup>[14]</sup> estipula, no seu artigo 2º que, realizado o exame formal pelo INPI, o procedimento para a concessão da prévia anuência será iniciado após o requerimento do pedido de exame, de acordo com o artigo 33 da LPI. Assim, o INPI publica a notificação de encaminhamento dos pedidos de patente para a ANVISA na Revista Eletrônica da Propriedade Industrial (RPI) e, quando aplicável, as decisões sobre a priorização de exame. O procedimento administrativo relativo à prévia anuência da ANVISA foi estabelecido pela RDC nº 168/17<sup>[15]</sup>.

Ficou definido na Portaria Conjunta nº 1/17 que o INPI deve encaminhar oficialmente para a ANVISA uma lista dos pedidos de patentes, concomitantemente à publicação do encaminhamento para a agência, ou da concessão do exame prioritário, na RPI. O artigo 4º define que após recebimento dos pedidos de patente encaminhados pelo INPI, a ANVISA analisará tais pedidos à luz da saúde pública, mediante decisão consubstanciada em parecer técnico emitido pela unidade organizacional competente no âmbito da agência. Considera-se que o pedido de patente será contrário à saúde pública quando o produto ou o processo farmacêutico contido no mesmo apresentar risco à saúde. No contexto da portaria, o risco à saúde será caracterizado quando o produto farmacêutico compreender, ou o processo farmacêutico resultar em substância cujo uso tenha sido proibido no país. Quando a análise da ANVISA concluir pela não anuência, o pedido será encaminhado ao INPI, que publicará a denegação da anuência e o arquivamento definitivo na RPI. O resumo das principais etapas do trâmite administrativo de pedidos de patentes de produtos e processos farmacêuticos no INPI e na ANVISA pode ser visualizado na **FIGURA 1**, abaixo.

FIGURA 1: Trâmite administrativo de pedidos de patentes de interesse do Ministério da Saúde.



Fonte: elaboração dos autores.

No contexto da análise de pedidos de patente de produtos e processos farmacêuticos à luz da saúde pública, a Orientação de Serviço nº 51/18<sup>[16]</sup> DIARE/ANVISA foi publicada para detalhar os parâmetros para exame dos pedidos de patentes com esse propósito. O risco à saúde pública, previsto no artigo 4º da RDC nº 168/17 será caracterizado quando o produto farmacêutico compreender, ou o processo farmacêutico resultar, em substância presente na Lista E (Lista de plantas proscritas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas) ou na Lista F (Lista das substâncias de uso proscrito no Brasil), da Portaria SVS/MS 344/98<sup>[17]</sup>, que trata de plantas e substâncias, incluindo seus sais e isômeros, de uso proibido no Brasil. O artigo 61, da Portaria SVS/MS 344/98 define que as plantas constantes da Lista E (plantas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas) e as substâncias da Lista F (substâncias de uso proscrito no Brasil), deste regulamento técnico e de suas atualizações, não poderão ser objeto de prescrição e manipulação de medicamentos alopáticos e homeopáticos.

A espécie *Cannabis sativa* é a primeira espécie da lista de plantas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas, conhecida como Lista E, que inclui, ainda, seus sais e isômeros. Na lista F, o derivado presente é o tetraidrocanabinol, conhecido como THC.

Conforme mencionado, a pesquisa e o desenvolvimento de produtos e processos para saúde à base de fitocanabinoides podem sofrer entraves adicionais no patenteamento, uma vez que a análise da ANVISA de substâncias que acarretam risco à saúde pública pode determinar o arquivamento dos pedidos de patentes pelo INPI.

Neste contexto, o objetivo deste artigo é apresentar estratégias de patenteamento de produtos e processos à base de fitocanabinoides para obtenção da anuência prévia de pedidos de patentes pela ANVISA e prosseguimento do exame pelo INPI.

## Metodologia

Foi realizado um mapeamento de pedidos de patentes no INPI contendo as palavras-chaves *Cannabis* ou fitocanabinoides(s) no título ou resumo, uma vez que não é possível a busca no quadro reivindicatório. Essa busca foi efetuada sem data limite de depósito e os resultados excluem os pedidos não publicados, devido ao prazo de sigilo de 18 meses, previsto na LPI.

Adicionalmente, foi realizado um mapeamento dos pedidos de patentes contendo fitocanabinoides, depositados no INPI e encaminhados para anuência prévia da ANVISA, no período de janeiro de 2018 a 30 de junho de 2019.

A busca foi realizada, por meio de palavras-chaves (*Cannabis*, fitocanabinoides) na base de dados do INPI ([www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)) e na base de dados MAP (Mapeamento Anuência Prévia) ([www.abifina.org.br](http://www.abifina.org.br)), da Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (ABIFINA).

Foi elaborada uma planilha em Excel com a triagem dos documentos de interesse e, posteriormente, para cada pedido de patente verificou-se o último despacho emitido pelo INPI e seu respectivo andamento administrativo. Como o objetivo do artigo foi mapear os pedidos contendo derivados de *Cannabis* que já tivessem sido enviados para análise sobre risco à saúde pela anuência prévia da ANVISA, o critério de exclusão foi de pedidos de patentes que tivessem sido enviados e analisados pela área de propriedade intelectual da ANVISA. Os pedidos de patentes foram analisados quanto ao conteúdo do quadro reivindicatório, que inclui as matérias que o requerente está tentando proteger, e pela análise dos pareceres de exigência e de não anuência da ANVISA.

## Resultados e Discussão

Na busca geral de pedidos de patentes, depositados no INPI, contendo *Cannabis* ou fitocanabinoides no título e/ou resumo, encontrou-se 87 pedidos de patentes. Desses documentos encontrados, alguns não entraram no escopo de avaliação da ANVISA, como, por exemplo, os pedidos de patentes de melhoramento vegetal, outros ainda não foram encaminhados para anuência prévia e outros foram para anuência antes da Portaria Conjunta nº 1/17 entrar em vigor.

Na busca realizada, de triagem da ANVISA, foram encontrados 16 pedidos de patentes encaminhados à agência, no período de janeiro de 2018 a julho de 2019, considerados contrários à saúde pública por conterem substâncias proibidas no país. Dos documentos contrários à saúde pública, 5 pedidos de patentes incluíam, nos respectivos quadros reivindicatórios, derivados de *Cannabis* sp. (BR0518011-2, BR0821461-2, BR0910094-6, BR112013018253-9 e BR112013029773-5), os quais são analisados abaixo.

O pedido de patente BR0518011-2, depositado em 15.11.2005 pela empresa *GW Pharma*, pleiteia proteção para uso de um ou mais fitocanabinoides, preferencialmente a tetrahydrocannabinina (THCV) para fabricação de medicamentos para uso no tratamento de doenças e condições que se beneficiam do antagonismo neutro do receptor de canabinoide CB como, por exemplo, esquizofrenia, epilepsia e Alzheimer. O requerente foi cientificado pela ANVISA em 03.10.2018 (Parecer 321/18) de que todas as reivindicações compreendiam o uso de substâncias proscritas no Brasil, sendo apenas os compostos derivados dos fitocanabinoides canabidiol (CDB) e tetrahydrocannabinol (THC) não eram considerados proscritos no Brasil, desde que observadas as condições estabelecidas na RDC nº 227/18<sup>[18]</sup>. Não houve manifestação do requerente e a ANVISA entendeu pela não concessão da anuência ao pedido de patente. A notificação de não concessão da anuência prévia foi publicada na RPI nº 2530, de 02.07.2019 e, o pedido será arquivado definitivamente.

O pedido de patente BR0821461-2, depositado em 17.12.2008 pela empresa *GW Pharma* (GB), solicita proteção para uso de fitocanabinoides que incluem a tetrahydrocannabinina (THCV) e o canabidiol (CBD) em conjunto com um medicamento antipsicótico como o aripiprazol e a formulação farmacêutica contendo o fitocanabinoide e o aripiprazol. O pedido ainda reivindica método de tratamento ou prevenção de psicose por meio do medicamento. A ANVISA apontou a presença da substância tetrahydrocannabinina (Parecer 145/19), substância relacionada entre aquelas proibidas no país, o que torna não patenteável a invenção, de acordo com o artigo 18, I, da LPI. Apesar de o requerente ter sido cientificado pela agência em 15.03.2019, não foi apresentada manifestação ao parecer dentro do prazo. O parecer da ANVISA ainda não foi publicado, porém o pedido de patente será arquivado pelo INPI.

O pedido de patente BR0910094-6, depositado em 26.03.2009 pela empresa *Stichting Sanammad* (NL), pleiteia proteção para composição de goma de mascar para tratamento da dor. O quadro reivindicatório originalmente depositado possuía 12 reivindicações, sendo 8 de composição, 3 de uso da composição para alívio da dor e 1 reivindicação de embalagem. Neste processo administrativo, a ANVISA deu ciência ao requerente em 09.04.2018 (Parecer 086/18) informando que as substâncias fitocanabinoides e seus derivados, em especial o THC, contidas nas composições pleiteadas, estariam relacionadas entre as substâncias proibidas no país, de acordo com a Lista E e F da Portaria SVS/MS nº 344/1998, o que tornaria parte da invenção não patenteável por ser contrária à saúde pública, nos termos do art. 18, I, da LPI. Foi feita exigência para que o quadro reivindicatório fosse reformulado, de forma a excluir composições contendo substâncias proscritas. Em 07.06.2018, a requerente apresentou manifestação com novo quadro reivindicatório excluindo a substância THC. Entretanto, a ANVISA concluiu que a requerente não atendeu à exigência, pois manteve o termo “canabinoide ou derivado do mesmo” que engloba uma série de substâncias ainda presentes na Lista F mencionada acima. O parecer da ANVISA foi pela denegação da anuência ao pedido de patente. Apesar de o parecer da ANVISA ainda não ter sido publicado na *homepage* do INPI, o pedido de patente será arquivado, conforme determinado pela Portaria Conjunta nº 01/2017.

O pedido de patente BR112013018253-9, depositado em 18.01.2012 pela empresa *Claremont Collection Handelsgesellschaft e Gallathea Ute* (DE), pleiteia proteção para método de obtenção de suco de cânhamo



(*Cannabis sativa*) e uso do suco de cânhamo para produção de bebidas que podem ser utilizadas na fabricação de cremes e géis para fins médicos, tais como cicatrização de feridas ou eczemas da pele. A ANVISA emitiu parecer em 26.03.2018 (Parecer 079/18), apontando que o quadro reivindicatório continha produtos produzidos a partir de planta proscrita no Brasil, de acordo com a Lista E da Portaria SVS/MS nº 344/1998. O requerente não apresentou manifestação e, em virtude da ausência de resposta do requerente, a ANVISA concluiu pela não concessão da anuência ao pedido de patente. A notificação de não anuência foi publicada na RPI nº 2508, de 29.01.2019 e o pedido foi arquivado definitivamente em 02.04.2019.

O pedido de patente BR112013029773-5, de titularidade das empresas *GW Pharma* e *Otsuka Pharmaceutical*, depositado em 18.05.2012, pleiteia proteção para fitocanabinoides que incluem canabigerol (CBG), canabicromeno (CBC), canabidivarina (CBDV) ou tetra-hidrocanabivarina (THCV) para tratamento de dor neuropática. A ANVISA cientificou o requerente em 04.06.2018 (Parecer 196/18) de que o quadro reivindicatório continha substâncias obtidas de plantas proscritas, de acordo com a Lista E da Portaria SVS/MS nº 344/1998, que tornavam a invenção não patenteável, por ser contrária à saúde pública, nos termos do art. 18, I, da LPI. O requerente não apresentou qualquer manifestação ao parecer dentro do prazo e a ANVISA concluiu pela não concessão da anuência ao pedido de patente. O parecer de não anuência da ANVISA foi publicado na RPI nº 2518, de 09.04.2019 e, o pedido de patente será arquivado, conforme determinado pela Portaria Conjunta 01/2017.

Conforme explicitado acima, todos os pedidos contendo substâncias proscritas no Brasil receberam notificações da ANVISA solicitando restrição do quadro reivindicatório às substâncias não proibidas como tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD) e nenhum requerente se manifestou adequadamente. O requerente do pedido de patente BR0910094-6, a empresa *Stichting Sanammad* (NL), poderia ter se manifestado restringindo a goma de mascar às substâncias permitidas por meio da RDC nº 227/2018, tais como tetrahydrocannabinol ou canabidiol, ambos em concentração máxima de 30 mg/ml. A empresa restringiu o quadro reivindicatório, porém manteve o termo “canabinoides ou derivados dos mesmos”, o qual não foi aceito por aumentar o escopo de proteção aos derivados não permitidos. Os demais requerentes poderiam ter se manifestado, restringindo o escopo de proteção, porém não apresentaram suas manifestações, levando ao arquivamento dos respectivos pedidos de patentes.

## Conclusão

A análise dos processos administrativos de pedidos de patentes solicitando proteção para produtos ou processos contendo fitocanabinoides e derivados dos mesmos demonstrou que a maioria dos documentos ainda será encaminhada para anuência prévia da ANVISA. Dentre os encaminhados após a Portaria Conjunta 01/17, ficou demonstrado que as tecnologias pleiteadas estão entrando em domínio público pela não anuência da ANVISA e conseqüente arquivamento definitivo dos pedidos de patentes pelo INPI. O arquivamento definitivo pode estar ocorrendo por ausência de correspondência entre os escritórios de Propriedade Intelectual no Brasil e os requerentes (todos estrangeiros) ou por desconhecimento da legislação regulatória brasileira que contém as substâncias proibidas no Brasil.

Neste contexto, a questão mais problemática é a entrada em domínio público de tecnologias pleiteadas por ausência de manifestação para adequação. Essas tecnologias podem ser inovadoras, mas agora estão



sem proteção no país e, infelizmente, o Brasil não possui uma estratégia usual de prospecção tecnológica que possa usufruir de tecnologias não protegidas para gerar inovações.

As empresas e instituições de pesquisa e desenvolvimento que desejarem proteger invenções, contendo derivados de *Cannabis sativa*, devem estar atentas às legislações brasileiras, tanto as regulatórias como as de propriedade intelectual. E mais ainda, devem estar atentas às notificações enviadas pela ANVISA para restrição de escopo de reivindicações às substâncias permitidas no Brasil.

## Referências

1. Stith SS, Vigil JM, Brockelman F, Keenan K, Hall B. Patient-reported symptom relief following medical cannabis consumption. **Fron Pharmacol**. 2018; 9: 916. ISSN 2168-6114. [[CrossRef](#)].
2. Mechoulam R, Shvo Y. **The structure of cannabidiol. Tetrahedron**. 1963; 19(12):2073-2078. Pergamon Prem Ltd. Printed in Northern Ireland. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
3. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **J Am Chem Soc**. 1964; 86(8):1646-1647. [[CrossRef](#)].
4. Devane WA, Hanus L, Breuer A. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Sci**. 1992 Dec 18; 258(5090):1946-1949. ISSN 1095-9203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
5. Hill KP, Saxon AJ. The Role of Cannabis Legalization in the Opioid Crisis. **JAMA Intern Med**. 2018; 178(5): 679-680. ISSN 2168-6114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
6. Bachhuber MA, Saloner B, Cunningham CO, Barry CL. Medical Cannabis Laws and Opioid Analgesic Overdose Mortality in the United States, 1999-2010. **JAMA Intern Med**. 2014; 174(10):1668-1673. ISSN 2168-6114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
7. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada (**RDC**) nº 17, de 06 de maio de 2015. Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. Diário Oficial União. 8 mai. 2015. [[Link](#)].
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada (**RDC**) nº 128 de 02 de dezembro de 2016. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Produtos à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, dentre eles o THC, em conformidade com o capítulo I - seção II da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, de 6 de maio de 2015. Diário Oficial União. 5 dez. 2016. [[Link](#)].
9. Cunha J, Soprana P. ANVISA dá primeiro passo para regular plantio de maconha no Brasil. **Folha de São Paulo**. 04 jun. 2019. [[Link](#)].
10. Lambert L, Martins, L. O Poder Judiciário como balcão de direitos: reflexões sobre as estratégias jurídicas para a garantia do uso medicinal da maconha. **Rev Dep Ciên Sociais** – PUC Minas. 2018; 1(1):190-207. [[Link](#)].
11. Araujo T. Maconha medicinal impulsiona indústria bilionária. **Valor Econômico**. 22 fev. 2019. [[Link](#)].
12. Brasil. Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, **Lei nº 9.279** de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Diário Oficial União. 15 mai. 1996. [[Link](#)].

13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Lei nº 10.196** de 14 de fevereiro de 2001. Altera e acresce dispositivos à Lei no 9.279, de 14 de maio de 1996, que regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, e dá outras providências. Diário Oficial União. 16 fev. 2001. [\[Link\]](#).
14. Brasil. Ministério da Saúde. **Portaria Conjunta nº 1** de 12 de abril de 2017. Regulamenta os procedimentos para a aplicação do artigo 229-C da **Lei nº 9.279**, de 14 de maio de 1996, acrescido pela **Lei nº 10.196**, de 14 de fevereiro de 2001, e dá outras providências. Diário Oficial União. 13 abr. 2017. [\[Link\]](#).
15. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada (**RDC**) nº **168**, de 8 de agosto de 2017. Dispõe sobre o procedimento administrativo relativo à prévia anuência da ANVISA para a concessão de patentes para produtos e processos farmacêuticos, regulamentado pela Portaria Conjunta ANVISA-INPI nº 01, de 12 de abril de 2017. Diário Oficial União. 10 ago. 2017. [\[Link\]](#).
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Orientação de Serviço nº 51/2018 DIARE/ANVISA**. Detalha os parâmetros para o exame de pedidos de patente de produtos e processos farmacêuticos à luz da saúde pública. [\[Link\]](#).
17. Brasil. Ministério da Saúde. **Portaria nº 344** de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Diário Oficial União. 19 mai. 1998. Republicação Diário Oficial União. 31 dezembro 1998. [\[Link\]](#).
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada (**RDC**) nº **227** de 17 de maio de 2018. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Lista de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998. Diário Oficial União. 22 mai. 2018. [\[Link\]](#).

---

**Histórico do artigo** | **Submissão:** 24/09/2019 | **Aceite:** 06/01/2020 | **Publicação:** 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Oliveira ACD, Nogueira M, Reis SMM. Estratégia de patenteamento de derivados de *Cannabis sativa* para obtenção da anuência prévia da ANVISA. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 56-66. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/855>>. 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.



# Evaluación de la genotoxicidad de extractos acuosos de hojas de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) utilizando el test de *Allium cepa*

Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) leaves using the *Allium cepa* test

DOI 10.32712/2446-4775.2020.809

Altamirano, Carlos Gustavo<sup>1</sup>; Pozzer, María Jose Aguilar<sup>1</sup>; Rebatta, Jose Luis<sup>1</sup>; Semckzuk, Rosaura Ines<sup>1</sup>; Florentín, Alejandro Paul<sup>1</sup>; Fernandez, María de los Angeles Sandoval<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Departamento de Farmacia. Laboratorio de Farmacobotánica, "Dr. Anibal Amat". 5<sup>o</sup> piso, Laboratorio 21. Felix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.

\*Correspondência: [carlos-altamirano@live.com](mailto:carlos-altamirano@live.com).

## Resumen

Actualmente el uso corriente de plantas medicinales para el tratamiento de las diferentes afecciones se ha incrementado y en la mayoría de los casos se comercializan sin previos estudios de toxicidad. *M. oleifera* es un árbol distribuido en zonas tropicales y subtropicales, muy utilizado en la medicina tradicional para tratar múltiples afecciones. En el marco del Proyecto de Investigación incentivado 16Q626 "Evaluación de la Genotoxicidad de Extractivos de Especies Medicinales de uso corriente para las afecciones más frecuentes en la Ciudad de Posadas Provincia de Misiones Argentina", en esta instancia se propuso analizar la genotoxicidad de extractos acuosos de *M. oleifera* por medio del test de *Allium cepa*. El experimento consistió en dos etapas, donde además de determinar la concentración que detiene el crecimiento de las raíces un 50% en comparación con los controles y las anomalías macroscópicas, se buscaron los biomarcadores predeterminados de genotoxicidad (cromosomas rezagados, c-mitosis, anafase puente, etc) a concentraciones iguales o superiores a la concentración 50. Las concentraciones más elevadas probadas mostraron mayor inhibición de la mitosis con respecto a los controles, pero no se encontraron efectos genotóxicos, aunque las concentraciones utilizadas en el experimento, no son usuales de *M. oleifera* en la medicina tradicional.

**Palabras-clave:** Genotoxicidad. *M. oleifera*. Extractos acuosos. *A. cepa* test.

## Abstract

Currently the current use of medicinal plants for the treatment of different conditions has increased and in most cases they are commercialized without previous toxicity studies. *M. oleifera* is a tree distributed in tropical and subtropical zones, widely used in traditional medicine to treat multiple conditions. Within the framework of the Research Project incentivized 16Q626 "Evaluación de la Genotoxicidad de Extractivos de

Especies Medicinales de uso corriente para las afecciones más frecuentes en la Ciudad de Posadas Provincia de Misiones Argentina”, in this instance it was proposed to analyze the genotoxicity of aqueous extracts of *M. oleifera* by means of the *Allium cepa* test. The experiment consisted of two stages, where in addition to determining the concentration that stops the growth of the roots by 50% in comparison with the controls and the macroscopic anomalies, the predetermined biomarkers of genotoxicity (lagged chromosomes, c-mitoses, anaphase bridge, etc.) at concentrations equal to or greater than the concentration 50. The highest concentrations tested showed greater inhibition of mitosis with respect to the controls, but no genotoxic effects were found, although the doses used in the experiment are not usual doses of *M. oleifera* in traditional medicine.

**Keywords:** Genotoxicity, *M. oleifer*. Aqueous extracts. *A. cepa* test.

---

## Introducción

*Moringa oleifera* (Lam.) pertenece a la familia Moringaceae, es un árbol de tamaño pequeño o mediano, de raíces tuberosas y corteza fisurada. Sus hojas son compuestas, largamente pecioladas, de color verde opaco. De flores aromáticas, bisexuales, de color blanco-amarillento, agrupadas en panículas. Fruto capsula, multiseminado<sup>[1]</sup>.

Es ampliamente utilizado debido a las numerosas propiedades medicinales que se le atribuyen, como ser para el tratamiento de anemia, asma, catarro, conjuntivitis, diarrea, dolores, fiebre, gonorrea, hinchazón glandular, hipertensión arterial, infecciones cutáneas, llagas, picaduras venenosas, problemas de la vejiga y la próstata, psoriasis, tumores, úlceras, etc.<sup>[2]</sup>. Además es ampliamente utilizada como alimento para el humano y el ganado<sup>[3]</sup>.

Ha sido ampliamente estudiada, los extractos acuosos de las hojas han inhibido el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en pruebas *in vitro* <sup>[4]</sup>, también posee acción hipoglucemiante en ratas aloxano diabéticas<sup>[5]</sup>, antiinflamatoria principalmente sobre vías respiratorias<sup>[6]</sup> y el aceite extraído de sus semillas posee propiedades antioxidantes<sup>[7]</sup>.

Los antecedentes de toxicidad de la droga vegetal son aún escasos, extractos de semilla han sido evaluados a una concentración de 0,2 µg/µL por medio los ensayos de Ames, Kado y análisis de ADN plasmídico, no encontrando efectos genotóxicos<sup>[8]</sup>. También se ha estudiado el potencial de toxicidad de nutraceuticos a base de *M. oleifera* en niveles de supra-suplementación, encontrando efectos genotóxicos en modelos animales a una dosis alta de 3000 mg/kg de peso debido a la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromaticos<sup>[9]</sup>. Los efectos tóxicos del extracto acuoso de las hojas de *Moringa oleifera* fueron evaluados por su toxicidad oral por vía oral y para la toxicidad subaguda en parámetros hematológicos, bioquímicos e histológicos en ratas. En la prueba de toxicidad aguda, el extracto de *M. oleifera* no causó la muerte en animales, incluso a dosis de 2000 mg/kg. Los tratamientos orales en ratas con este extracto a 400, 800 y 1600 mg/kg causaron cambios significativos en los niveles de proteínas totales, enzimas hepáticas, y bilirrubina, pero no se observaron cambios significativos en todos los órganos examinados<sup>[10]</sup>.

Las células de los meristemos apicales de cebolla muestran fácilmente un amplio rango de alteraciones citológicas, lo que constituye el trabajo con raíces de esa especie vegetal en material biológico sensible para detectar sustancias potencialmente peligrosas tanto para la salud humana como para el medio

ambiente en general<sup>[11]</sup>. Se han reportado estudios en los que se han evaluado los efectos citotóxicos de algunos extractos utilizados para fines terapéuticos, como el de *Crecentia cujete*<sup>[12]</sup> y *Maytenus laevis*<sup>[13]</sup>, en los cuales se evidencian efectos citotóxicos y genotóxicos luego de 24 hs de exposición, incluso también en extractos comerciales como el de *Croton lechleri*<sup>[14]</sup>.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la genotoxicidad de los extractos acuosos de las hojas de *Moringa oleifera* (Lam.) por medio del test de *Allium cepa*.

## Materiales y métodos

### Recolección de *M. oleifera*

*M. oleifera* fue recolectado en la Ciudad de Posadas a 27° 22' 19.6" S, 55° 56' 00" W, e identificado por medio de técnicas taxonómicas de rutina. El material de herbario (voucher) fue depositado en el Herbario del Departamento de Farmacia (MNESF) en el Laboratorio de Farmacobotánica "Dr. Aníbal Gumersindo Amat", de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

### Acondicionamiento del material vegetal

Los bulbos de *A. cepa* fueron adquiridos en el comercio local, se seleccionaron unidades de un tamaño homogéneo, de buen aspecto e integridad.

Las hojas de *M. oleifera* fueron limpiadas, y luego secadas a estufa a 45 °C por 48 hs. Posteriormente se trituraron en mortero manual, hasta obtener un tamaño de polvo homogéneo.

### Preparación de extractos de *M. oleifera*

El método extractivo seleccionado fue la infusión, según Farmacopea Nacional Argentina 6<sup>ta</sup> Edición, colocando agua mineral baja en sodio hirviendo, en contacto con la cantidad necesaria de droga previamente molida, por el transcurso de 20 minutos. Posteriormente, se filtró y se lavó el residuo hasta completar el volumen necesario para cada experiencia<sup>[15]</sup>.

### Pretratamiento de bulbos

Los bulbos fueron despojados de sus catáfilas, mas externas, se raspó el disco inferior con cuidado de no dañar la zona meristemática, y fueron lavados con agua corriente durante 2 horas, para eliminar cualquier residuo que pudieran contener provenientes de la actividad comercial<sup>[16]</sup>.

### Test de *A. cepa*

El test de *A. cepa* fue realizado por duplicado, utilizando para todas las diluciones y los controles agua mineral baja en sodio. Fue dividido en dos ensayos (Etapa 1 y Etapa 2), donde en cada experiencia se seleccionaron 5 bulbos de *A. cepa* por cada concentración a ensayar (ensayando 3 concentraciones diferentes en cada experiencia), y 5 bulbos para el control (considerando un total de 20 bulbos por experiencia)<sup>[17]</sup>.

Tanto para la Etapa 1 y la Etapa 2, los bulbos fueron colocados en agua mineral baja en sodio durante 24 horas, a temperatura ambiente, al resguardo de la luz, hasta que liberasen raicillas y estas alcanzaran una longitud promedio de 1 cm.

Para los ensayos se utilizó un dispositivo diseñado para el experimento (**FIGURA 1**) con recipientes de vidrio fijos donde apoyar los bulbos, sumergiendo los discos, provistos de un suministro de aire constante por medio de 2 aireadores impulsando el aire que fue distribuido por mangueras hacia cada uno de los recipientes.

Las distintas concentraciones probadas y el agua mineral baja en sodio fueron reemplazadas cada 24 hs. Los extractos de *M. oleifera* se prepararon al momento de ser utilizados por medio de infusiones, utilizando también agua mineral baja en sodio.

**FIGURA 1:** Diseño del experimento.



### **Etapa 1 y Etapa 2**

Una vez transcurridas las 48 hs y emergidas las raicillas, se procedió a realizar la Etapa 1 primero. En esta instancia se probaron concentraciones de 50 g/L, 100 g/L y 200 g/L.

En Etapa 2 se probaron concentraciones de 25 g/L, 50 g/L y 100 g/L.

En todos los casos, los bulbos estuvieron en contacto con los extractos por 48 hs <sup>[17]</sup>.

### **Obtención de biomarcadores de genotoxicidad**

Para observar el estado de las mitosis en los meristemas de las raicillas de *A. cepa* expuesta a los extractos, se realizaron preparados histológicos *in situ*.

Para ello se cosecharon las raíces, que fueron fijadas en Farmer<sup>[18]</sup> por 24 hs en heladera a -3°C y luego se trasladaron a alcohol 70° donde se mantuvieron hasta el momento de realizar los preparados<sup>[16]</sup>.

Bajo la lupa se seccionó la zona meristemática y se la colocó en un portaobjeto con orceína acética al 2% que fue llevado directo a la llama. Luego se colocó el cubreobjeto y se ejerció una leve presión sobre el preparado ("squash"). Posteriormente se observó en un microscopio óptico motic BA2000 y se tomaron fotografías con cámara MotiC10 para su posterior análisis<sup>[17]</sup>.

### Índices mitóticos

Los índices mitóticos se calcularon como la relación entre las células en división y el total de células. Se contabilizaron un total de 2500 células por cada raicilla, tomando 2 raicillas por cada bulbo de cada uno de los 20 bulbos en total, utilizados para cada experiencia<sup>[17]</sup>.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por medio de Statgraphic 6.0 y GraphPad Prism 6.0.

## Resultados y discusión

### Etapa 1 y determinación de la concentración 50

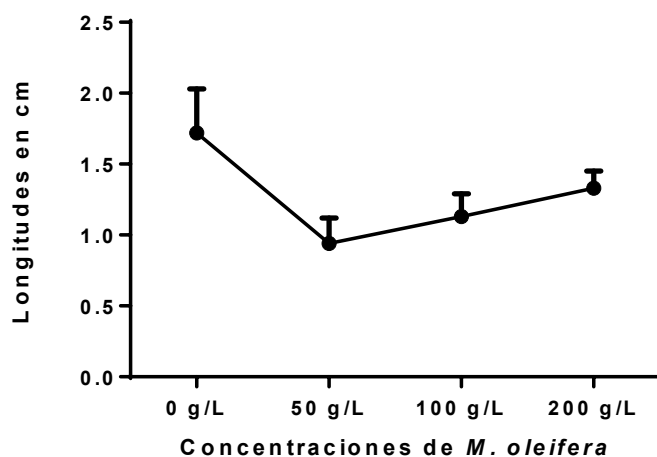
La Etapa 1 se realizó con la finalidad de obtener la concentración 50, que es la concentración de extracto necesaria para que el crecimiento en longitud de las raicillas de *A. cepa*, alcancen un 50% en comparación con las raicillas de los controles.

Los resultados obtenidos se representan en el **GRAFICO 1**. Las longitudes promedio obtenidas menores a 0,5 cm fueron descartadas del análisis.

Como puede observarse en el **GRAFICO 1**, se probaron las concentraciones de 50 g/L, 100 g/L y 200 g/L, resultando ser la concentración de 50 g/L la que logro mayor disminución del crecimiento de las raicillas. Se probaron concentraciones altas en esta instancia para obtener la curva de toxicidad, y determinar la concentración ideal, donde posteriormente buscar biomarcadores de genotoxicidad (en Etapa 2).

**GRAFICO 1:** se observan el promedio de los resultados obtenidos en la Etapa 1, las longitudes promedio y el desvío standard de las raicillas expuestas a las diferentes concentraciones de extractos, y el control en agua baja en sodio.

**Gráfico 1: Promedio de resultados obtenidos en Etapa 1**



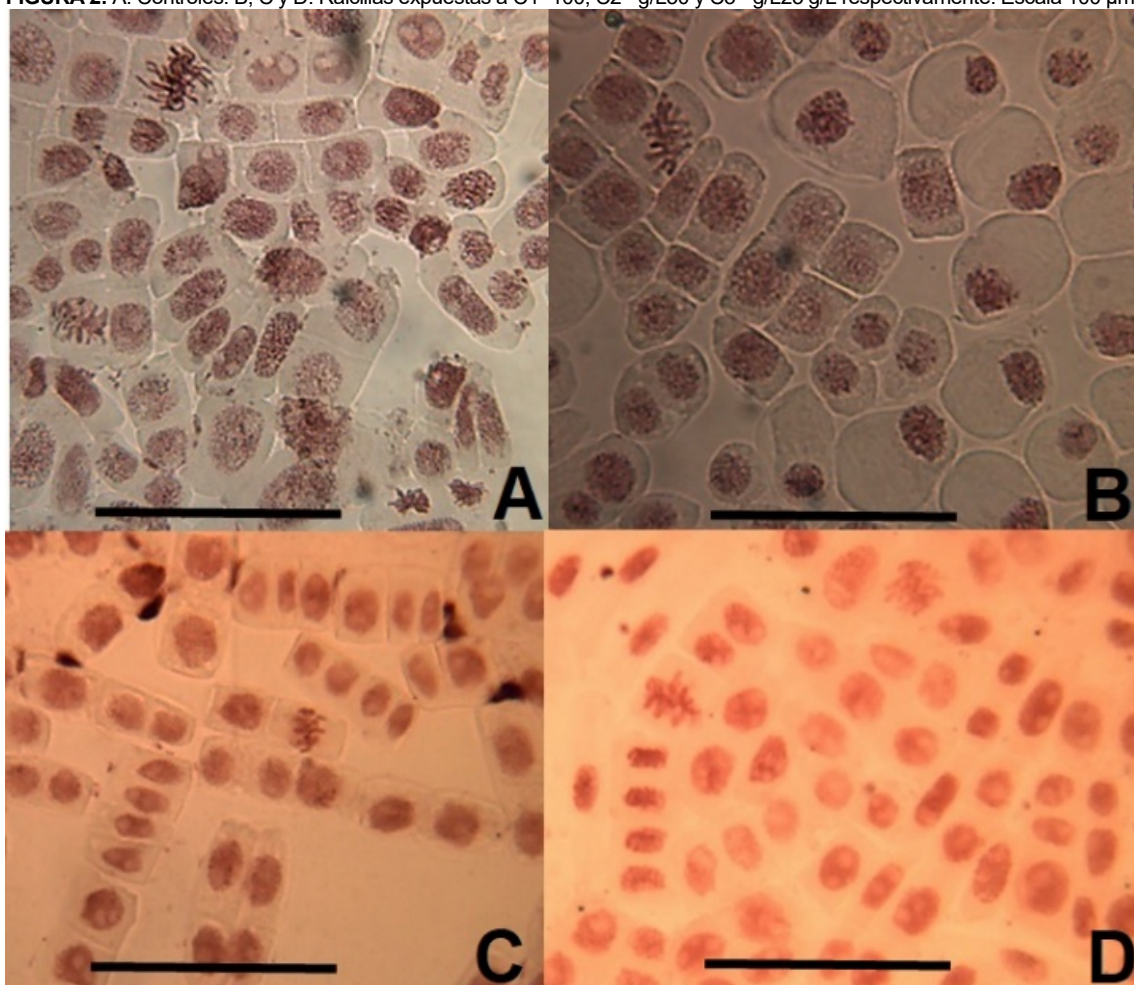


Con los resultados obtenidos en esta etapa, se procedió a diseñar la Etapa 2 considerando abarcar la concentración de 50 g/L, analizando los biomarcadores de genotoxicidad por encima y por debajo de esta concentración, considerando el comportamiento que presentó la curva en esta experiencia y siendo 50 g/L la concentración que mayor inhibición del crecimiento presentó.

### Etapa 2 y Evaluación de la Genotoxicidad de Extractos

En la Etapa 2 se probaron concentraciones de 25 g/L, 50 g/L y 100 g/L, y se analizaron las anomalías microscópicas (aberraciones cromosómicas) y los índices mitóticos, para cada una de las concentraciones estudiadas. Se contabilizaron un total de 2500 células por raíz, de cada bulbo de cada concentración analizada (**FIGURA 2**).

**FIGURA 2:** A. Controles. B, C y D. Raicillas expuestas a C1=100, C2= g/L50 y C3= g/L25 g/L respectivamente. Escala 100  $\mu$ m.



**TABLA 1:** ANOVA para Índice Mitótico por Concentración.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	199,804	3	66,6014	7,69	0,0021
Intra grupos	138,655	16	8,66592		
Total (Corr.)	338,459	19			

En la **TABLA 1** se descompone la varianza del Índice Mitótico en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 7,68544, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del Índice Mitótico entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

**TABLA 2:** Pruebas de Múltiple Rangos para Índice Mitótico por Concentración. Método: 95,0 porcentaje LSD.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	5	10,44	X
50	5	13,68	XX
25	5	15,54	X
0	5	19,85	X

**TABLA 3:** Diferencias estimadas entre cada par de medias.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 25	*	4,112	3,94689
0 - 50	*	5,876	3,94689
0 - 100	*	8,718	3,94689
25 - 50		1,764	3,94689
25 - 100	*	4,606	3,94689
50 - 100		2,842	3,94689

\* indica una diferencia significativa.

En las **TABLAS 2 y 3** se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. En la **TABLA 2** se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado es el de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher donde existe un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. En la **TABLA 3** se muestran las diferencias estimadas entre cada par de medias, el asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

**TABLA 4:** Resumen de resultados obtenidos en E1 y E2.

Concentraciones de extractos de <i>M. oleifera</i>	Longitudes promedio en cm (Etapa 1)	Índices Mitóticos en % (Etapa 2)	Aberraciones cromosómicas observadas (Etapa 2)
0 g/L	1,46 ± 0,36	19,85 ± 3,49	No observadas.
25 g/L	-	15,54 ± 2,43	No observadas.
50 g/L	0,85 ± 0,18	13,68 ± 2,89	No observadas.
100 g/L	0,93 ± 0,18	10,44 ± 3,21	No observadas.
200 g/L	1,15 ± 0,20	-	No observadas.

Los resultados obtenidos son similares a otros estudios<sup>[9,10]</sup>.

## Conclusiones

En la etapa 1 se observa que a medida que la concentración aumenta, también lo hace la longitud de las raíces, por lo que se considera la concentración más tóxica la de 50 g/L (la concentración que más inhibió el crecimiento de las raíces). En la etapa 2 las concentraciones más elevadas mostraron mayor inhibición de la mitosis (I. mitótico=15,54 %; 13,68 % y 10,44 % respectivamente) con respecto a los controles (I. mitótico =19,85 %), donde a mayores concentraciones la mayoría de las células meristemáticas en división permanecieron en interfase. Si bien los índices mitóticos disminuyeron en función del aumento de la concentración del extracto con una diferencia estadísticamente significativa entre la media del Índice Mitótico entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza, no han sido encontrados micronúcleos, anafase puente, cromosomas rezagados ni otros tipos de biomarcadores de genotoxicidad, en los preparados realizados de las raicillas expuestas en las diferentes concentraciones de *M. oleifera*.

Aunque cabe destacar que las concentraciones que han sido utilizadas en el experimento, no son usuales de *M. oleifera* en la medicina tradicional.

Podríamos concluir en base a los resultados planteados en el presente estudio, que los extractos de las hojas de *M. oleifera* cuentan con un relativo grado de seguridad<sup>(19)</sup>, por lo que serían necesarios futuras investigaciones en otros modelos biológicos, a los fines de determinar el grado de toxicidad y genotoxicidad de los extractos de las hojas de *M. oleifera*.

## Referencias

1. Ramachandran C, Peter KV, Gopalakrishnan PK. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Econ Bot.** 1980; 34(3):276-283. [\[Link\]](#).
2. Fuglie LJ. The miracle tree; the multiple attributes of moringa (No. 634.97 M671). **Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation, Wageningen** (Países Bajos). 2001. [\[Link\]](#).
3. Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives.** 2007; 21(1):17-25. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#).
4. Caceres A, Cabrera O, Morales O, Mollinedo P, Mendia P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol.** 1991; 33(3):213-216. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#).
5. Kar A, Choudhary BK, Bandyopadhyay NG. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **J Ethnopharmacol.** 2003; 84(1): 105-108. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#).
6. Mehta A, Agrawal B. Investigation into the mechanism of action of *Moringa oleifera* for its anti-asthmatic activity. **Oriental Pharm Experim Med.** 2008; 8(1):24-31. [\[CrossRef\]](#).
7. Ogbunugafor HA, Eneh FU, Ozumba AN, Igwo-Ezikpe MN, Okpuzor J, Igwilo IO et al. Physico-chemical and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed oil. **Pakistan J Nutrition.** 2011; 10(5):409-414. [\[Link\]](#).
8. Rolim LA, Macêdo MF, Sisenando HA, Napoleão TH, Felzenszwalb I, Aiub CA et al. (2011). Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **J Food Sci.** 76(2):T53-T58. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#)

9. Asare GA, Gyan B, Bugyei K, Adjei S, Mahama R, Addo P et al. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. **J ethnopharmacol.** 2012; 139(1):265-272. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
10. Adedapo AA, Mogbojuri OM, Emikpe BO. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. **J Med Plants Res.** 2009; 3(8):586-591. [[PubMed](#)] [[Link](#)].
11. Andrioli NB, Wulff AF, y Mudry MD. *Allium cepa* como monitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. **Theoria.** 2006; 15(2):9-16. [[Link](#)].
12. Espitia-Baena JE, del Rosario Duran-Sandoval H, Fandiño-Franky J, Díaz-Castillo F, Gómez-Estrada HA. Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L.(totumo). **Rev Cubana Plant Medic.** 2011; 16(4):337-346. [[Link](#)].
13. Freyre S, Estrada M, Bolaños H. Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicidad de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células meristemáticas de *Allium cepa*. **Memorias.** 2009; 5(12):12-17. ISSN 0124-4361. [[Link](#)].
14. Almeida FKVD, Novais VPD, Salvi JDO & Marson. **Rev Fitos.** Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lechleri*). 2019; 13(1):29-37. ISSN 2446-4775. [[CrossRef](#)].
15. **Farmacopea Nacional Argentina** (1978). 6<sup>ta</sup> ed. Buenos Aires.
16. Fiskesjo G. The Allium test in wastewater monitorin. **Environmental Toxicology and Water Quality.** 1993; 8 (3):291-298. [[CrossRef](#)].
17. Mudry MD, Carballo MA. **Genética Toxicológica**, De los Cuatro Vientos Editorial. Buenos Aires, Argentina. 2006. ISBN-987-564-563-X.
18. Zarlavsky GE. **Histología Vegetal: Técnicas simples y complejas**. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires. 2014; p.1-198.
19. Stohs SJ & Hartman MJ. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. **Phytoth Res.** 2015; 29(6):796-804. [[CrossRef](#)].

---

Histórico do artigo | Submissão: 25/06/2019 | Aceite: 24/01/2020 | Publicação: 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Altamirano CG, Pozzer MJA, Rebatta JL, Semczuk RI et al. Evaluación de la genotoxicidad de extractos acuosos de hojas de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) utilizando el test de *Allium cepa*. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 67-75. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/809>>. 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.



# Extração de substâncias pécicas do mesocarpo de *Passiflora nitida* Kunth. Passifloraceae

Extraction of pectic substances from the mesocarp of *Passiflora nitida* Kunth. Passifloraceae

DOI 10.32712/2446-4775.2020.917

Gomes, Juliane Tavares<sup>1\*</sup>; Barroso, Adenilson de Sousa<sup>2</sup>; Monteiro, Carlos Diego Almeida<sup>2</sup>; Mourão, Rosa Helena Veras<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará, Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental. Rua Vera Paz, Salé, CEP 68035-110, Santarém, PA, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Saúde Coletiva. Rua Vera Paz, (Unidade Tapajós), Salé, CEP 68035-110, Santarém, PA – Brasil.

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

## Resumo

*Passiflora nitida* Kunth. (maracujá-do-mato) nativa do Brasil com ocorrências nas regiões norte, nordeste e centro-oeste. O fruto é consumido *in natura*, sendo pouco explorado quanto as suas propriedades funcionais. O objetivo deste estudo, foi extrair substâncias pécicas do mesocarpo de *P. nitida*. O mesocarpo foi desidratado, triturado e obtido um pó de fina granulação, caracterizado quanto a granulometria, índice de intumescência, acidez titulável, cinzas e teor de umidade. Para a extração de substâncias pécicas foi utilizado 4 g do pó em meio ácido. As amostras foram separadas em 2 grupos: grupo 1 foi utilizado ácido L-ascórbico P.A. (marca NEON) e no grupo 2, suco de limão da fruta *in natura*, ambos na concentração de 5% usando a temperatura de 60°C por 120 minutos e 80°C por 60 minutos. O rendimento das substâncias pécicas do grupo 1 foi de 12,2 ± 0,3% a 60°C por 120 minutos e de 12,9 ± 0,2% a 80°C por 60 minutos. Para o grupo 2 foi de 14,3 ± 0,2% e de 17,9 ± 0,3%, respectivamente. O mesocarpo de *P. nitida* poderá ser uma fonte para obtenção de substâncias pécicas.

**Palavras-chave:** Maracujá-do-mato. Pectina. Subprodutos. Amazônia.

## Abstract

*Passiflora nitida* Kunth. (maracujá-do-mato) native to Brazil with occurrences in the north, northeast and midwest regions. The fruit is consumed *in natura*, being little explored as to its functional properties. The aim of this study was to extract pectic substances from the *P. nitida* mesocarp. The mesocarp was dehydrated, crushed and a fine-grained powder was obtained, characterized in terms of granulometry, swelling index, titratable acidity, ash and moisture content. For the extraction of pectic substances, 4 g of the powder was used in an acid medium. The samples were separated into 2 groups: group 1 was used L-Ascorbic Acid P.A.

(brand NEON) and in group 2, fresh fruit lemon juice, both at a concentration of 5% using a temperature of 60°C for 120 minutes and 80°C for 60 minutes. The yield of pectic substances in group 1 was  $12,2 \pm 0,3\%$  at 60°C for 120 minutes and  $12,9 \pm 0,2\%$  at 80°C for 60 minutes. For group 2 it was  $14,3 \pm 0,2\%$  and  $17,9 \pm 0,3\%$ , respectively. The *P. nitida* mesocarp may be a source for obtaining pectic substances.

**Keywords:** Maracujá-do-mato. Pectin. Byproduct. Amazon.

---

## Introdução

As substâncias pécticas constituem uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos, presentes nas paredes celulares das plantas contribuindo na integridade e rigidez do tecido, sendo abundante em muitas frutas<sup>[1-4]</sup>. São polímeros heterogêneos de estrutura complexa constituída de uma cadeia principal linear de unidades repetidas de  $\alpha$ -D-ácido galacturônico, esterificada com grupos metílicos, formando o ácido poligalacturônico ou grupos livres de ácidos<sup>[4-7]</sup>.

Polímeros amplamente utilizados como agente gelificante, emulsificante e estabilizante nas indústrias alimentícias (na produção de goma, geleias, produtos lácteos, entre outros)<sup>[8,9]</sup> e com aplicações crescentes na indústria farmacêutica (como fibras dietéticas solúveis com efeitos benéficos na redução dos níveis de colesterol, lipoproteínas e ácidos biliares)<sup>[10,11]</sup>. As substâncias pécticas podem estar presentes na formulação de medicamentos associadas a polímeros naturais ou sintéticos, como material de revestimento de formas farmacêuticas e em sistemas terapêuticos específicos, naturais ou como compostos derivados, facilitando a liberação de fármacos devido à sua baixa toxicidade, baixo custo e alta estabilidade<sup>[12,13]</sup>.

A exploração de resíduos como matérias-primas estabelece uma das etapas essenciais no processo industrial, evidenciando crescente preocupação com esses materiais, tanto do ponto de vista industrial quanto ambiental<sup>[14]</sup>. Com isso, reduzir os desperdícios de alimentos através do reaproveitamento de matérias-primas tornou-se uma alternativa que tem sido usada no desenvolvimento de novos produtos, mostrando-se uma proposta concreta e rentável, visto que esses resíduos representam relevantes fontes de materiais considerados importantes na produção industrial, como é o caso da pectina<sup>[15]</sup>.

Existem estudos sobre extração de substâncias pécticas de diferentes fontes, ressaltando o aproveitamento de subprodutos na produção de compostos industrialmente relevantes e perfeitamente passíveis de serem incluídos na alimentação humana<sup>[15]</sup>. A maior parte das substâncias pécticas utilizadas pela indústria são originadas de subprodutos como bagaço da maçã e casca de frutas cítricas que são consideradas ricas em pectina<sup>[16,17]</sup>; outras matérias primas como bagaço da laranja<sup>[18]</sup>, miolo do girassol<sup>[19]</sup>, casca da manga<sup>[20]</sup>, casca da banana<sup>[21]</sup>, goiaba<sup>[22]</sup> e casca de maracujá<sup>[14,23-26]</sup> vem sendo estudadas como fontes alternativas para a extração dessas substâncias.

Entre os frutos encontrados na amazônica, destaca-se o *Passiflora nitida* Kunth., Passifloraceae, conhecida popularmente como maracujá-do-mato, maracujá-suspiro, maracujá-de-cheiro e maracujá-de-rato<sup>[27-29]</sup>. A espécie é encontrada dispersa por todo norte da América do Sul<sup>[30]</sup>. O fruto silvestre é apreciado pela população do norte do Brasil com boa aceitabilidade para consumo *in natura*, devido ao seu sabor doce<sup>[29,31]</sup>, não havendo registro de outras formas de consumo (sucos, geleias, cremes, entre outros). Pesquisas sobre a espécie demonstram atividades antimicrobiana<sup>[32]</sup>, antioxidante, anticoagulante e antiagregante plaquetária do extrato das folhas<sup>[30]</sup> ou efeito hipoglicemiante da farinha do mesocarpo desidratado<sup>[33]</sup>.



Existem poucas pesquisas a respeito do fruto *P. nitida* e nenhuma informação sobre a utilização do mesocarpo para extração de substâncias pécticas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi extrair substâncias pécticas da farinha do mesocarpo de *P. nitida* como forma de agregar valor ao fruto e apresentar uma alternativa de aproveitamento do mesocarpo, o qual teria como destino o descarte.

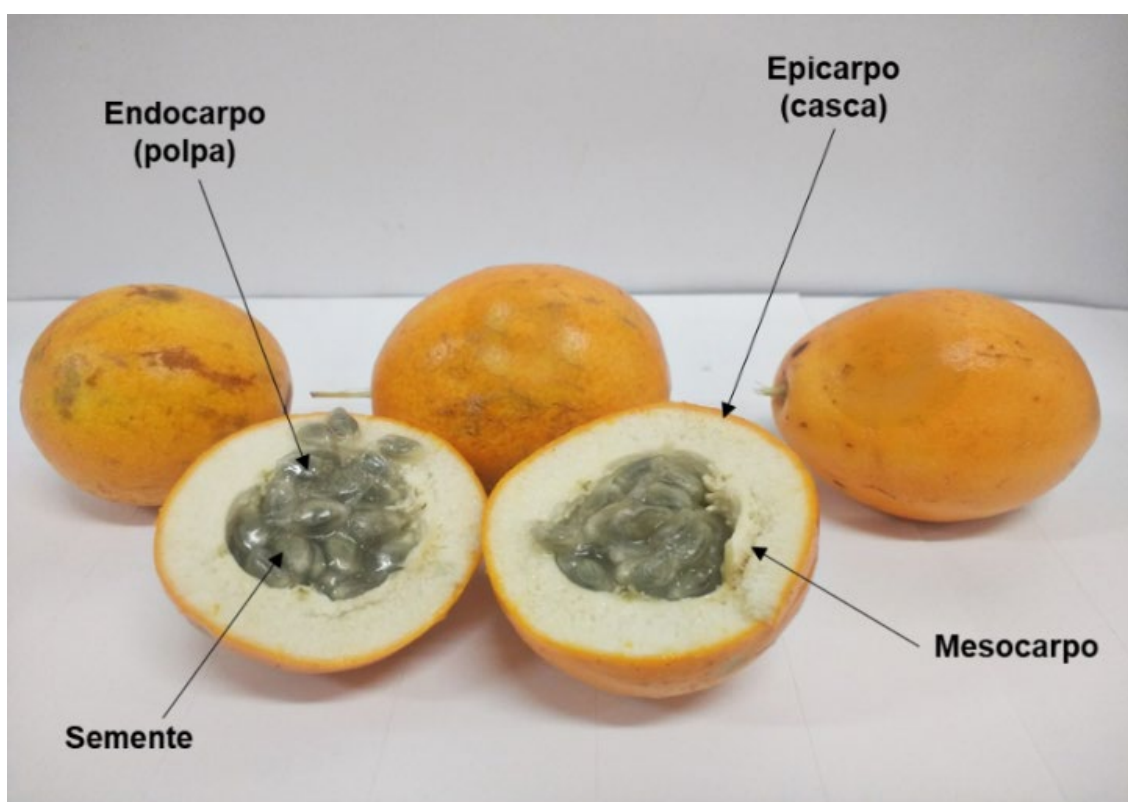
## Material e Métodos

### Coleta dos frutos

Os frutos de *P. nitida* (**FIGURA 1**) foram obtidos comercialmente em feiras livres do município de Santarém-Pará. Os frutos foram higienizados, separadas as suas partes, sendo mensurado o rendimento levando em consideração as seguintes partes dos frutos separadamente: polpa, mesocarpo e casca. A exsicata da espécie foi coletada pela Msc Chienno Shuemitsu e encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará sob o número HSTM 471.

O mesocarpo utilizado para extração de substâncias pécticas foi seco em estufa a 45°C durante 24 horas e, posteriormente, triturado com auxílio do moinho para obtenção de um pó de fina granulação. O pó (farinha) foi armazenado em embalagem de vidro hermeticamente fechado e estocado ao abrigo de luz e umidade para posteriormente ser utilizado como matéria-prima para extração de substâncias pécticas.

**FIGURA 1:** Fruto de *Passiflora nitida* (maracujá-do-mato).

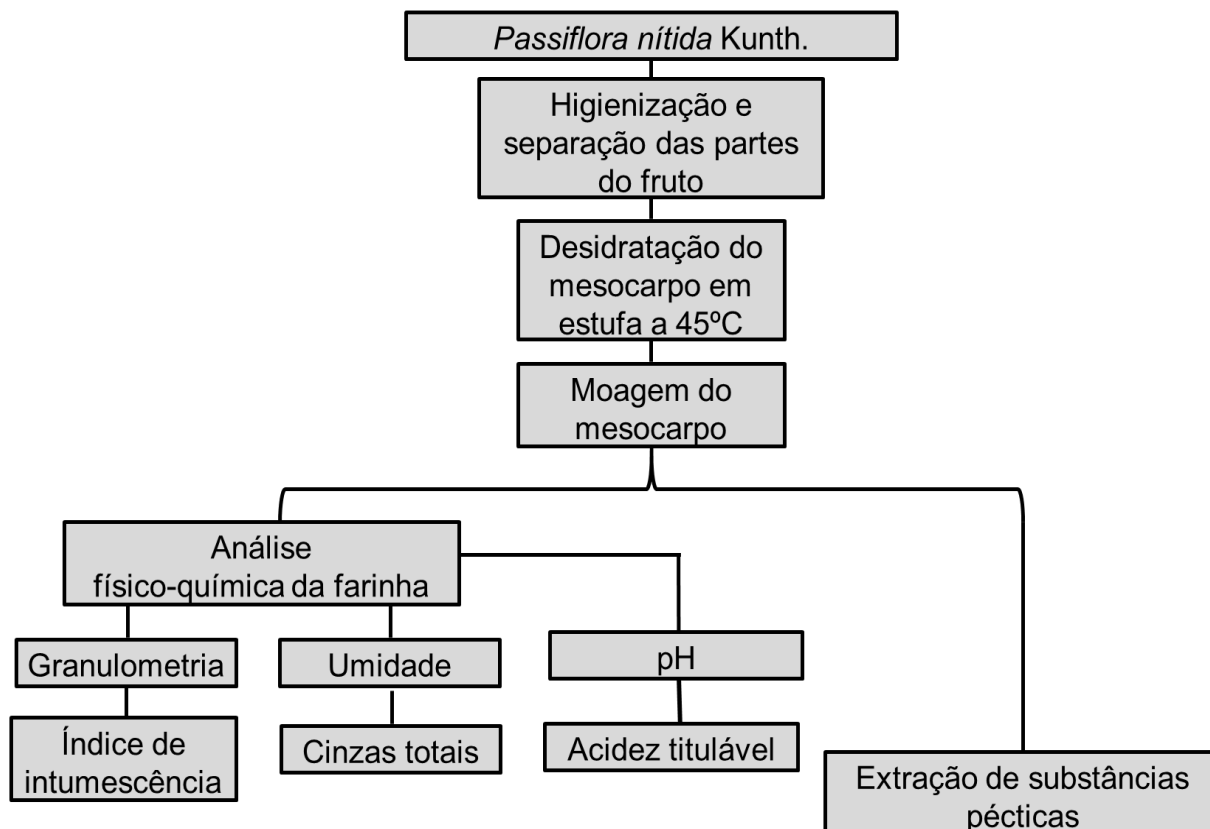




### Caracterização físico-química da farinha (pó) do mesocarpo de *P. nitida*

O fluxograma (FIGURA 2) resume as etapas de caracterização da farinha e extração de substâncias pécicas de *P. nitida*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

FIGURA 2: Obtenção e caracterização da farinha de *P. nitida*.



#### Determinação granulométrica

A análise granulométrica da farinha do mesocarpo de *P. nitida* foi realizada de acordo com metodologia descrita na Farmacopeia<sup>[34]</sup>, com adaptações. Foram utilizados 5 g da farinha, dividida em tamises de aberturas nominais de 250, 180, 125 e 75 µm de diâmetro, com vibração 7 por um período de 15 minutos.

As amostras retidas nas malhas dos tamises foram pesadas com o auxílio de uma balança analítica de precisão, e em seguida, foi realizada a determinação do tamanho das partículas e do percentual de pó retido nos tamises de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P1}{P2} \cdot 100$$

Onde, P1 é o peso da amostra retida em cada tamis (em gramas); P2 é a soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas) e 100 é fator de porcentagem.

### Determinação do índice de intumescência

A determinação do índice de intumescência foi realizada segundo metodologia descrita na Farmacopeia<sup>[34]</sup>. Foi utilizado 1 g de farinha em provetas de 25 mL, com adição de água ultrapura mantidos sob agitação a cada 10 minutos por uma hora. As amostras foram deixadas em repouso por 3 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram verificados os volumes finais ocupados pelas amostras, onde o Índice de intumescência (Ii) foi calculado em mililitros, pela média de 3 determinações segundo a equação abaixo:

$$I_i = V_f - V_i$$

Onde,  $V_f$  corresponde ao volume final ocupado pela amostra (mL);  $V_i$  é o volume inicial ocupado pela amostra (mL).

### Determinação de acidez titulável

A determinação da acidez titulável foi realizada segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz<sup>[35]</sup>. A acidez foi obtida por titulometria com solução padronizada de hidróxido de sódio a 0,1 N, possuindo como indicador a fenolftaleína. Os valores foram expressos em porcentagem de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{V \times F \times 10}{P}$$

Onde,  $V$  é número de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação;  $F$  é fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;  $P$  é número de g da amostra.

### Determinação de umidade

Para a determinação de umidade da farinha foi realizado o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira<sup>[34]</sup>. Os cadinhos foram previamente dessecados a 105°C durante 1 hora. Em seguida, os cadinhos foram resfriados em dessecador por 30 minutos e pesados. Posteriormente, foi pesado 2 g da farinha e levado à estufa a 105°C, após 2 horas sendo monitorados até peso constante. O percentual da perda por dessecação foi calculado pela equação abaixo:

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

Onde,  $P_a$  corresponde ao peso da amostra;  $P_u$  é o peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação;  $P_s$  é peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

### Determinação de cinzas totais da farinha

A análise de cinzas totais da farinha foi realizada conforme descrição na Farmacopeia<sup>[34]</sup>. Foram pesadas 3 g da farinha e em seguida transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram uniformemente distribuídas e incineradas em mufla, aumentando gradativamente (30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C), até 600 ± 25°C durante 3 horas. Os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados em seguida. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à farinha seca ao ar, segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ Cinzas totais} = \frac{(P1 - P3)}{P2} \times 100$$

Onde, P1 corresponde ao peso do cadinho contendo a amostra antes da calcinação; P3 é peso do cadinho contendo a amostra após a calcinação; P2 é o peso da amostra inicial; 100 é fator de porcentagem.

### Extração de substâncias pécnicas

As substâncias pécnicas da farinha do mesocarpo de *P. nitida* foram extraídas de acordo com metodologia descrita por Munhoz et al.<sup>[36]</sup>, com adaptações. Amostras da farinha (4 g) foram dissolvidas em 200 mL de água destilada. As amostras foram separadas em 2 grupos: grupo 1 foi utilizado ácido L-ascórbico P.A. (marca NEON) a 5% e no grupo 2, suco de limão da fruta *in natura* a 5%, ambos usando a temperatura de 60°C por 120 minutos e 80°C por 60 minutos. Após extração ácida, as amostras foram resfriadas a 4°C por uma hora, filtradas em tecido poliéster, com descarte da parte sólida. Ao filtrado foi adicionado álcool etílico (92%) na proporção 1:2 (v/v). Após uma hora, houve a precipitação das substâncias pécnicas, separadas por filtração, em seguida levadas para estufa a 55°C até peso constante. O rendimento de substâncias pécnicas foi determinado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Substâncias pécnicas extraídas} \times 100}{\text{Massa farinha (seca)}}$$

### Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa *Past* (versão 3.26).

## Resultados e Discussão

### Caracterização físico-química da farinha de mesocarpo de *P. nitida*

Como pode ser observado na (TABELA 1) o epicarpo e mesocarpo obtidos de *P. nitida* representam mais de 50% do peso total do fruto. Este é um fruto comercializado e consumido na sua forma *in natura*, resultando no desperdício da casca e mesocarpo. O Brasil apresenta uma expressiva demanda de cultivo e processamento de frutos, sendo caracterizado como um dos países latinos mais predispostos ao desperdício<sup>[15]</sup>. Como resultado da alta demanda na produção surge problemas de geração de resíduos e sua destinação inadequada, apontando a importância do incentivo no desenvolvimento de pesquisas, que identifiquem soluções viáveis para o reaproveitamento desses resíduos como matéria prima para o desenvolvimento de subprodutos<sup>[15]</sup>.

TABELA 1: Partes do fruto *P. nitida*

Passiflora nitida	Componente (%)
Epicarpo	21,8
Mesocarpo	31,7
Polpa (com sementes)	46,5

Na TABELA 2 estão os dados da caracterização físico-química da farinha obtida do mesocarpo. A farinha produzida do mesocarpo de *P. nitida* foi classificada como pó semifino, definido como aquele cujas

partículas passam no máximo 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 180  $\mu\text{m}$ <sup>[34]</sup>. A granulometria refere-se ao grau de divisão de pós-expresso em relação à abertura nominal da malha dos tamises utilizados<sup>[34]</sup>. Esta constitui um aspecto de qualidade importante na padronização de farinhas, a uniformidade o tamanho dos grânulos influência na capacidade de absorção de solventes, na dispersibilidade das partículas e no tempo de extração das substâncias pécicas, interferindo diretamente no rendimento final do produto<sup>[38,39]</sup>.

O índice de intumescência da farinha do mesocarpo de *P. nitida* foi de 2,6 mL  $\pm$  0,5. Este parâmetro é definido como a medida de volume ocupado pelo intumescimento de 1 g da farinha devido à adição de água como agente intumescente<sup>[32]</sup>. O índice de intumescência pode indicar a presença de substâncias pécicas que possuem propriedades de absorção de água. Quando em contato com o solvente resultam no aumento de volume do material que as contenha, tratando-se de um parâmetro importante em processos extrativos, auxiliando na determinação do volume de água a ser adicionado durante a extração de substâncias pécicas<sup>[40]</sup>.

Como pode ser observado na **TABELA 2**, o índice de acidez da farinha do mesocarpo de *P. nitida* foi de 3,5  $\pm$  0,1 com pH de 4,1. Marchi et al. <sup>[41]</sup>, obtiveram valores de acidez titulável para cascas de *P. edulis* (maracujá amarelo) que variaram de 3,91 - 4,68%. A acidez constitui um parâmetro importante na conservação visto que a acidificação desempenha uma função inibidora no crescimento microbiano<sup>[42]</sup>.

O valor obtido quanto a umidade da farinha de *P. nitida* adequa-se ao estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância (ANVISA) que estipula o máximo de 15% para umidade de farinhas vegetais<sup>[43]</sup>. É importante salientar, que a presença de quantidade excessiva de água em farinhas poderá propiciar o desenvolvimento de microrganismos, insetos, a hidrólise e a atividade enzimática com conseqüente deterioração dos constituintes da amostra analisada<sup>[44]</sup>. O processo de secagem foi realizado até peso constante em temperatura de 105°C, com obtenção de uma farinha estável.

O teor cinza para a farinha do mesocarpo de *P. nitida* foi de 3,3%  $\pm$  0,3. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo realizado com o mesocarpo *in natura* de *P. nitida* de 3,1% <sup>[33]</sup>. As cinzas indicam substâncias inorgânicas não voláteis que poderiam estar presentes como constituintes ou contaminantes da amostra<sup>[45]</sup>. É importante salientar que no preparo da farinha foram obedecidas as boas práticas de produção.

**TABELA 2:** Características físico-químicas da farinha do mesocarpo de *P. nitida*.

Características	Farinha
Granulometria (%)	Semifino (32,02 $\pm$ 0,1)
Índice de intumescência (mL)	2,6 $\pm$ 0,5
Acidez total titulável (%)	3,5 $\pm$ 0,1
pH	4,1
Umidade (%)	10,8 $\pm$ 0,1
Cinzas (%)	3,3 $\pm$ 0,3

Os resultados obtidos neste estudo podem ser apresentados como características de qualidade de uma farinha do mesocarpo de *P. nitida*, uma vez que, não há parâmetros descritos para esta matéria prima vegetal.

### Extração de substâncias pécticas

Na **TABELA 3** estão os dados de rendimento de substâncias pécticas obtidos da farinha do mesocarpo de *P. nitida* por extração ácida. Como pode ser observado, embora o suco de limão obtido do fruto *in natura* tenha apresentado maior teor de substâncias pécticas em comparação ao ácido L-ascórbico, torna-se necessário a padronização do suco para sua possível aplicabilidade no processo industrial, uma vez que, dependendo da variedade do limão os índices de acidez e brix poderão variar. No entanto, essa alternativa não deve ser descartada, sendo que, este é de fácil aquisição e poderá diminuir os custos da produção após a sua padronização.

Vale destacar que estes dados são preliminares, devido não ter sido realizada a avaliação do grau de metoxilação (DM) das substâncias encontradas. Este parâmetro determina a proporção de grupos carboxílicos que estão presentes na forma esterificada, possibilitando mensurar o grau e velocidade de gelificação das substâncias pécticas. Porém, por meio da análise em álcool a 96 °GL, foi observado que as substâncias pécticas extraídas tanto usando suco de limão *in natura*, quanto ácido L-ascórbico, apresentaram uma gelificação rápida e firme, o que indica substâncias pécticas com alto grau de metoxilação. Substâncias pécticas com DM maior que 60% de esterificação, apresentam maior rapidez na gelificação sob temperaturas mais altas<sup>[46]</sup>.

A busca de um método adequado para extração de substâncias pécticas é importante na otimização de métodos para sua obtenção, com intuito de minimizar a degradação da molécula, maximizar o rendimento da extração e manter a qualidade do produto. Segundo Pagan et al.<sup>[47]</sup> e Oliveira<sup>[14]</sup>, tempos relativamente longos podem interferir no processo de extração com a degradação das substâncias pécticas com alterações indesejáveis nas suas propriedades físico-químicas e tecnológicas e, conseqüentemente, a diminuição da quantidade a ser precipitada com o álcool, devido a construção de um gel fraco, o que ocasiona redução no rendimento final.

As substâncias pécticas são geralmente extraídas em pH variando de 1 a 3 e em temperaturas de 80°C a 100°C<sup>[47]</sup>. Alguns autores como Mesbahi, et al.<sup>[48]</sup> relataram que temperaturas acima de 90°C podem provocar a hidrólise e degradação das substâncias pécticas, resultando em uma molécula de baixa massa molar.

Para a extração de substâncias pécticas é necessário abordar processos que não geram resíduos poluentes, apresentam bons rendimentos de extração e não alteram a estrutura química do produto final. Normalmente as substâncias pécticas são obtidas na extração com diversos ácidos fortes (tartárico<sup>[49]</sup>, nítrico<sup>[6]</sup>, clorídrico<sup>[48]</sup>, entre outros) apresentando desvantagens por gerarem resíduos tóxicos. Estudos têm apresentado o ácido cítrico como alternativa na extração de substâncias pécticas, como forma de minimizar a geração de resíduos poluentes e melhorar a qualidade<sup>[23,49]</sup>.

Com relação a escolha da concentração de ácido utilizado nas extrações de substâncias pécticas, estudos demonstram que substâncias pécticas extraídas com frações maiores de ácido, podem acarretar ligação do ácido cítrico a estrutura péctica, conseqüentemente na formação de outros compostos, ou ainda, podem favorecer a degradação das moléculas<sup>[18,47,50]</sup>. No estudo com goiaba desidratada, Munhoz et al.<sup>[22]</sup> utilizaram concentrações de ácido cítrico que variavam entre 5 - 7%, apresentando melhores rendimentos de pectina nas extrações a 5% de ácido cítrico durante o período de 60 minutos.

**TABELA 3:** Rendimento da extração de pectina a partir da farinha do mesocarpo de *P. nitida* em função da concentração de ácido cítrico, pH, temperatura e tempo de extração.

Rendimento Médio da Pectina (temperatura/tempo)			
Tratamento	pH	60°C/120 min (%)	80°C/60 min (%)
Ácido L-ascórbico	2,6	12,2 ± 0,3	12,9 ± 0,3
Suco de Limão <i>in natura</i>	2,1	14,3 ± 0,2	17,9 ± 0,3

O rendimento de substâncias pécticas extraída do mesocarpo de *P. nitida* apresentou valor dentro da faixa de subprodutos utilizados nas agroindústrias ricas nessas substâncias com teor superior a 15% em base seca<sup>[9]</sup>. Em estudo de Pinheiro<sup>[23]</sup> com pectina extraída da casca de *P. edulis* a 0,086% de ácido cítrico e tempo de extração 60 minutos a 97°C, obtendo rendimento de 27,4%. Canteri-Schemin et al.<sup>[49]</sup> extraíram e caracterizaram pectina de bagaço de maçã definindo o melhor rendimento de 17,82%, obtido com ácido cítrico a 6,2% a 100°C por 153 minutos. Munhoz<sup>[36]</sup> realizou a extração de pectina da farinha da polpa e da polpa com casca de goiaba (*Psidium guajava* L.), com concentrações de ácido cítrico de 5% a 7%, a 97°C durante 25 a 60 minutos, com rendimentos que variaram de 7,31% a 13,66%.

Apesar dos resultados obtidos neste estudo apresentarem semelhanças com os encontrados na literatura, é necessário a realização de análises cromatográficas para garantir que os teores de substâncias pécticas não correspondam a mucilagens, hemicelulose ou outros compostos.

## Conclusão

O mesocarpo de *P. nitida* poderá ser uma fonte para obtenção de substâncias pécticas, visto, ser um produto de descarte no consumo do fruto *in natura*. Como o cultivo na região amazônica está crescendo, futuramente sua polpa poderá ser amplamente consumida, gerando assim descartes que poderão ser aproveitados na produção de pectinas e seus subprodutos. Os resultados são promissores o que estimula a continuidade dos estudos no sentido de caracterização das substâncias pécticas e sua possível aplicabilidade nos diferentes segmentos das indústrias.

## Referências

1. Voragen AGJ, Coenen GJ, Verhoef RP, Schols HA. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Struct Chem**. 2009; 20(2): 263–75. ISSN 1572-9001. [[CrossRef](#)].
2. Gummadi SN, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review. **Proc Biochem**. 2003; 38(7): 987-996. ISSN 1359-5113. [[CrossRef](#)].
3. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**. 2001; 57(6): 929-967. ISSN 0031-9422. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)].
4. Willats WGT, Knox P, Mikkelsen, JD. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Sci Technol**. 2006; 17(3): 97-104. ISSN 0924-2244. [[CrossRef](#)].
5. Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Mol Biol**. 2001; 47 (1-2): 9-27. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)].

6. Lévine S, Ralet MC, Thibault JF. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydr Polym.** 2002; 19: 145-153. ISSN 0144-8617. [[CrossRef](#)].
7. Yapo BM, Robert C, Etienne I; Wathelet B, Paquot M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chem.** 2007; 100(4): 1356-1364. ISSN 0308-8146. [[CrossRef](#)].
8. Canteri MHG, Moreno L, Wosiacki G, Scheer AP. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros.** 2012, 22(2): 149-157. ISSN 0104-1428. [[CrossRef](#)]
9. Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. Silpakorn **Univ Inter J Bangkok.** 2003; 3: 206–228. [[Link](#)].
10. Piedade J, Canniatti-Brazaca SG. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sanguíneo em ratos. **Ciên Tecnol Alim.** 2003; 23 (2):149-156. [[CrossRef](#)].
11. Hur SJ, Kim YC, Choi I, Lee SK. The effects of biopolymer encapsulation on total lipids and cholesterol in egg yolk during *in vitro* human digestion. **Inter J Mol Sci.** 2013; 14(8): 16333-16347. [[Link](#)].
12. Vandamme TF, Lenourismo A, Charrueau C, Chaumeil J-C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydr Polym.** 2002; 48: 219-231. [[CrossRef](#)].
13. Souto-Maior JPA, Reis AV, Pedreiro LN, Cavalcanti OA. Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados. Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. **Rev Bras Cien Farm J Pharm Sci.** 2008; 44(2): 203-213. [[CrossRef](#)].
14. Oliveira CF. **Aplicação de diferentes tecnologias na extração de pectina presente na casca do maracujá.** Porto Alegre. 2015. 161fs. Tese de Doutorado [Programa de Pós-graduação em Engenharia Química], Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. [[Link](#)].
15. Oliveira L, Nascimento MRF, Borges SV, Ribeiro PCN, Ruback VR. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciên Tecnol Aliment.** 2002; 22(3): 259-62. ISSN 0101-2061. [[CrossRef](#)].
16. Fertoni HCR, Scabio A, Canteri MH, Carneiro EBB, Nogueira A, Wosiacki G. Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. **Semin Ciên Agr.** Londrina. 2006; 27(4): 599-612. [[CrossRef](#)].
17. Gerhardt C, Wiest JM, Girolometto G, Silva MAS da, Weschenfelder S. Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. 4º Simpósio de Segurança Alimentar. FAURGS, Gramado. RS. **Braz J Food Technol.** 2012; 15(sup.): 11-17. [[Link](#)].
18. Calliari CM. **Extração térmica, química e enzimática de pectina de bagaço de laranja.** Londrina. 2004. 90fs. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina. [[Link](#)].
19. Iglesias MT, Lozano JE. Extraction and characterization of sunflower pectin. **J Food Eng.** 2004. 62(3): 215-223. [[CrossRef](#)].
20. Oliveira AN. **Pectinas de casca de manga (*Mangifera Índica* L.) cv. Ubá: otimização da extração, caracterização físico-química e avaliação das propriedades espessantes e gelificantes.** Minas Gerais. 2013. 174fs. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal de Viçosa. [[Link](#)].



21. Rebello LPG. **Avaliação de compostos fenólicos, extração e caracterização de pectina em farinha de casca de banana (musa aaa)**. Minas Gerais. 2013. 105fls. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal de Viçosa. [\[Link\]](#).
22. Munhoz CL. **Efeito das condições de extração sobre rendimento e características da pectina obtida de diferentes frações de goiaba CV Pedro Sato**. 2008. 59fls. Goiânia. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos] – Universidade Federal de Goiás. [\[Link\]](#).
23. Pinheiro ER. **Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*): otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química**. 2007. 79fls. Florianópolis. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos] - Universidade Federal de Santa Catarina. [\[Link\]](#).
24. Kliemann E. **Extração e caracterização da pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*)**. 2006. 77fls. Florianópolis. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos] – Universidade Federal de Santa Catarina. [\[Link\]](#).
25. Casagrande J, Machado ATP, Silva M, Canteri MHG. Extraction, characterization and partial purification of the pectin lyase from *passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg mesocarp. **Rev Virtual Quim**. 2017; 9(6): 2214–25. ISSN 19846835. [\[Link\]](#).
26. Canteri MHG. **Caracterização comparativa entre pectinas extraídas do pericarpo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)**. 2010. 163fls. Curitiba. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos] – Universidade Federal do Paraná. [\[Link\]](#).
27. Reflora. Flora do Brasil 2020 em construção. *Passiflora nitida* Kunth. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. COPPETEC-UFRJ. [acesso em 22 nov. 2019]. [\[Link\]](#).
28. Junqueira KP, Faleiro FG, Ramos JD, Bellon G, Junqueira NTV, Braga MF. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Rev Bras Frutic**. 2007; 29(3): 571-575. ISSN 1806-9967. [\[CrossRef\]](#).
29. Moraes MC, Vieira MLC, Novaes QS, Rezende JAM. Susceptibilidade de *Passiflora nitida* ao Passion fruit woodiness virus. **Fitopatol Bras**. 2002; 27(1): 108-108. ISSN 1678-4677 [\[CrossRef\]](#).
30. Carvalho MJ, Nascimento PT, Guilhon-Simplicio F, Nunez CV, Ohana DT, Meneses PM et al. Estudo farmacognóstico e atividade *in vitro* sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae). **Acta Amaz**. 2010; 40(1): 199-205. ISSN 0044-5967. [\[CrossRef\]](#).
31. Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM, Souza MAD et al. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 1999; 299p. ISBN 180531.
32. Bendini A, Cerretani L, Pizzolante L, Toschi TG, Guzzo F, Ceoldo S et al. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. **Eur Food Res Technol**. 2006; 223(1): 102-109. ISSN 1438-2385. [\[CrossRef\]](#).
33. Lima ES, Schwertz MC, Sobreira CRC, Borrás MRL. Efeito hipoglicemiante da farinha do fruto de maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth) em ratos normais e diabéticos. **Rev Bras Plantas Med**. 2012; 14(2): 383-388. ISSN 1516-0572. [\[CrossRef\]](#).
34. Brasil. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 545. [\[Link\]](#).
35. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. 2008; 1000. [\[Link\]](#).

36. Munhoz CL, Sanjinez-Argandoña EJ, Soares-Júnior MS. Extração de pectina de goiaba desidratada. **Cien Tecnol Aliment**. 2010; 30(1). ISSN 0101-2061. [[CrossRef](#)].
37. Dias LT, Leonel M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciênc Agrotec**. 2006; 30(4): 692-700. ISSN 1981-1829. [[CrossRef](#)].
38. Guerreiro L. **Massa Alimentícias**. Dossiê Técnico: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT. 2006; 40. [[Link](#)].
39. Gomes Neto JNF. **Avaliação do potencial terapêutico da farinha da casca de *Passiflora edulis* nas dislipidemias e diabetes induzidas**. 2009. 112f. Fortaleza. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade Federal do Ceará. [[Link](#)].
40. WHO. **Quality control methods for herbal materials**. World Health Organization, Geneve. 2011; 173. ISBN: 9789241500739. [[Link](#)].
41. Marchi R, Monteiro M, Benato EA, Silva CAR. Uso da cor da casca como indicador de qualidade do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. flavicarpa Deg.) destinado à industrialização. **Ciênc Tecnol Aliment**. 2000, 20 (3); 381-387. ISSN 01012061. [[CrossRef](#)]
42. Jay JM. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. São Paulo: Artmed, 2005. 712p. ISBN: 9788536305073. [[Link](#)].
43. Brasil. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos CNNPA. Normas Técnicas Especiais. **Resolução CNNPA nº 12**, de 27 de julho de 1978. Brasília, 1978. [[Link](#)].
44. Amaral FMM, Coutinho DF, Ribeiro MNS, Oliveira MA. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Rev Bras Farmacogn**. 2003; 13(supl.1): 27-30. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
45. Couto RO, Valgas AB, Bara MTF, Paula JR. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Rev Eletr Farm**. 2009; 6(3): 59-69. [[CrossRef](#)].
46. Brandão EM, Andrade CT. Influência de fatores estruturais no processo de geleificante de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**. 1999; 9(3): 38-44. ISSN 0104-1428. [[CrossRef](#)].
47. Pagan J, Ibarz A, Llorca M, Pagan A, Barbosa-Canovas GV. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. **Food Res**. 2001; 34(7): 605–612. [[CrossRef](#)].
48. Mesbahi G, Jamalian J, Farahnaky A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in foods systems. **Food Hydr**. 2005; 19(4): 731-738. ISSN 0268-005X. [[CrossRef](#)].
49. Canteri-Schemin MH, Fertonani HCR, Waszczyński N, Wosiacki G. Extraction of pectin from Apple pomace. **Braz Arch Biol Technol**. 2005; 48 (2): 259-266. [[CrossRef](#)].
50. Kalapathy U, Proctor A. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. **Food Chem**. 2001; 73 (4): 393-396. [[CrossRef](#)].

---

Histórico do artigo | Submissão: 27/11/2019 | Aceite: 07/02/2020 | Publicação: 31/03/2020

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

Como citar este artigo: Gomes JT, Barroso AS, Monteiro CDA, Mourão RHV. Extração de substâncias pécicas do mesocarpo de *Passiflora nitida* Kunth. Passifloraceae. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 76-87. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/917>>. 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.



# Obtenção e avaliação de sistemas micelares contendo extrato de frutos do oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]

Obtaining and evaluation of micellar systems containing oiti fruit extract [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]

DOI 10.32712/2446-4775.2020.820

Ramos, Ygor Jessé<sup>1\*</sup>; Silva, Neilson Queiroz da<sup>2</sup>; Costa-Oliveira, Claudete da<sup>3</sup>; Pereira, Rudá Antas<sup>1</sup>; Motta, Milleno Dantas<sup>2</sup>; Cerqueira-Silva, Lidércia Cavalcanti Ribeiro<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (IPJBRJ), Centro de Responsabilidade Socioambiental. Rua Pacheco Leão - até 914/915, Jardim Botânico, CEP 22460-030, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento do Medicamento. Rua Barão de Geremoabo, S/N, Campus Universitário de Ondina, Ondina, CEP 40170-290, Salvador, BA, Brasil.

<sup>3</sup>FIOCRUZ, Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Avenida Comandante Guarany, 447, Jacarepaguá, CEP 22775-903, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

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

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar formulações de sistemas micelares, organogéis e emulsões (O/A), veiculados ou não ao extrato etanólico do fruto do oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch], visando seu uso tópico. Estas foram analisadas quanto as suas características organolépticas, macroscópicas e microscópicas. Testes para estabilidade acelerada, ótica, distribuição, tamanho de gotas e potencial zeta foram realizados, assim como avaliações *in vitro* de espalhabilidade e textura. Os organogéis e emulsões de oiti, veiculados ou não, se mantiveram estáveis, dentro da sua faixa ideal de pH; tendo suas características sensoriais apreciáveis por até 90 dias, demonstrando que é possível o desenvolvimento de sistemas organogéis e emulsões a partir do extrato etanólico do pericarpo do oiti, brindando fatores sensoriais que valorizam a flora brasileira, como matéria prima para produção de cosméticos.

**Palavras-chave:** Organogel. Emulsão. Formulação. Estabilidade.

## Abstract

The objective of this study was to develop and characterize thermodynamically stable micellar systems, organogels and emulsions (O / A), with and without ethanolic extracts of the fruit of oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch], for topical use. The formulations were evaluated as their organoleptic, macroscopic, microscopic characteristics. Accelerated stability, optics and distribution, droplet size and zeta potential were tested. Evaluated too its spread ability and texture *in vitro*. The organogels and oxy-emulsions were stable

up to 90 days, within the optimum pH range for topical use, and with appreciable *in vitro* sensory characteristics. Therefore, it is possible to develop organogel systems and emulsions from the ethanolic extract of the oiti pericarp, bringing sensory factors that value the Brazilian flora as raw material for the production of cosmetics.

**Keywords:** Organogel. Emulsion. Formulation. Stability.

---

## Introdução

O oitizeiro [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch] sin. [*Moquilea tomentosa* Benth.], família Chrysobalanaceae, também chamado de goiti e oiti-da-praia, nomes esses derivados da palavra *uĩtĩ*, oriunda do Tupi que significa “de massa branca”, é uma planta endêmica do Brasil e foi difundida com maior facilidade a partir da criação do Jardim Botânico do Rio de Janeiro na metade do século XIX, devido ao seu grande potencial paisagístico<sup>[1-5]</sup>.

Dos extratos provenientes do fruto do oiti já foram identificados os ácidos: caféico, clorogênico, betulínico, elágico, gálico, oleanólico, ursólico, tormêntico; lupeol, licanolídeo, catequina, epicatequina, rutina, quercitrina, quercetina, kaempferol, glicosídeo de kaempferol; ácido graxo como o palmitoleico e hexadecanoico, e esteroides como estigmasterol e sitosterol<sup>[6-11]</sup>.

Também há relatos referentes às substâncias voláteis dos referidos frutos, mostrando uma predominância do hexanol (33,5%), seguido de 3-hexanona-2-ol (21,0%) e hexanal (16,7%). Identificou-se monoterpenos como mirceno (2,1%), terpinen-4-ol (1,0%) e  $\alpha$ -terpineol (0,8%), um alifático e dois oxigenados. Os álcoois alifáticos são as principais substâncias, porém os ésteres demonstraram diversidade: etil butanoato, butil butanoato, pentil butanoato, hexil butanoato e venil butanoato<sup>[9]</sup>. No que se refere à atividades biológicas, foram isolados triterpenóides (ácido betulínico, oleanólico e pomólico), de folhas e frutos da planta em questão, verificando-se atividade antitumoral contra linhagens de células leucêmicas<sup>[12]</sup>. O ácido oleanólico, isolado dos seus frutos, também apresentou atividade leishmanicida<sup>[8]</sup>.

Foram demonstradas atividades antioxidantes significativas para extratos polares das sementes, folhas e pericarpos<sup>[13-15]</sup>, quando comparadas a outros frutos tropicais. As sementes e folhas apresentaram um baixo resultado para atividade antimicrobiana<sup>[15]</sup>. Os extratos das sementes inibiram a atividade de replicação do vírus herpes simples (HSV-1), *in vitro*, em concentrações não tóxicas, com um efeito antiviral bastante acentuado<sup>[16]</sup> e baixa atividade anticolinesterase<sup>[17]</sup>.

O potencial de expansão do mercado mundial de fitoterápicos e de cosméticos vem impulsionando avanços tecnológicos, como o desenvolvimento de sistemas micelares, emulsões, microemulsões, lipossomas e organogéis, cujos benefícios estão associados a uma maior eficácia e segurança no uso de plantas medicinais, formulações dermocosméticas e produtos naturais, através do aumento da biodisponibilidade, liberação controlada do fármaco, redução de efeitos adversos, proteção do fármaco no sistema biológico<sup>[18-21]</sup>, diminuição da dose terapêutica, do número de administração e o aumento da aceitação da terapia pelo paciente<sup>[22,23]</sup>.

As emulsões podem ser definidas como dois líquidos imiscíveis, em que um deles está finamente dividido e distribuído, em forma de gotículas. Esses sistemas são estabilizados por emulsionantes. A fase dispersante é a fase externa, ou contínua, a fase dispersa é a interna. Quando a fase dispersa é oleosa são consideradas emulsões óleo em água (O/A), e quando esta é aquosa, são emulsões água em óleo (A/O).

Dependendo da viscosidade e da composição as emulsões podem ser líquidas ou semissólidas, sendo as semissólidas de aplicação tópica<sup>[19,20]</sup>.

*Pluronic*<sup>®</sup> *Lecithin* Organogel (PLO) é um sistema micelar utilizado para a administração de fármacos pela via transdérmica, podendo carrear diversos tipos de fármacos e/ou bioativos. Os organogéis são sistemas micelares emulsionados, viscoelásticos, com qualidades sensoriais semelhantes a um gel. Possui natureza anfífilica o que lhe confere uma capacidade para entrega de uma ampla variedade de compostos, fármacos polares e apolares. Devido a sua baixa ou nenhuma irritabilidade à pele, se destaca como um sistema promissor para a liberação de fármacos<sup>[24,25]</sup>.

Existem diversos métodos de preparo de organogel, dentre os mais usados, podemos citar o que utiliza força de extrusão, onde a mistura é passada por duas seringas conectadas, com a inserção de uma força necessária para formação de micelas reversas "lipossomais" e conseqüentemente o encapsulamento dos bioativos<sup>[26,24]</sup>. Muitos autores caracterizam os sistemas PLO como uma microemulsão, porém o PLO não pode ser definido como "microemulsão", pois não possui isotropia, nem transparência e o tamanho de suas partículas não atinge níveis nanométricos de forma uniforme, com técnicas convencionais de agitação e mistura.

Assim, a proposta deste trabalho foi a obtenção e caracterização de sistemas micelares estáveis contendo os extratos etanólico do fruto do oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch] para uso tópico.

## Materiais e Métodos

### Obtenção do material botânico e extrato do fruto de oiti

Os frutos maduros do oiti foram coletados na Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia (UFBA) na cidade de Salvador/BA (13°00'00.1"S 38°30'41.2"W). Separou-se 600 g de pericarpos dos frutos. Estes foram cominuídos em liquidificador industrial e submetido à percolação com álcool etílico (70% v/v) por 20 dias. Rotaevaporado, seco em dessecador e armazenado em frascos opacos. A exsicata foi identificada pela Prof.<sup>a</sup> Maria L. S. Guedes e depositada no Herbário Alexandre Leal Costa, no Instituto de Biologia da UFBA, sob o número 113784.

### Obtenção das formulações

Para obtenção das formulações do sistema PLO utilizou-se o sistema de extrusão, constituído de duas seringas acopladas por um adaptador do tipo *luer lock* com capacidade para 60 mL. A fase oleosa composta por lecitina granulada (50%; Embrafarma - lote: 20609FI), palmitato de isopropila (50%; Embrafarma - lote:19966FI), ácido sórbico (1%; Embrafarma - lote: 11455FI), extrato do fruto oiti (EO; 5%) e aquosa, composta por poloxamer 407 (20%; Embrafarma - lote: 19966FI), sorbato de potássio (0,2%; Embrafarma - lote:11209FI), e Keathon CG [INCI: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona e 2-metil-4-isotiazolin- 3-ona] (0,05%; Acofarma - lote: 0044598) e água destilada (*qsp*), foram vertidas da fase oleosa para aquosa<sup>[27]</sup>. Foram preparadas duas formulações, um sistema com extrato (PLO – EO) e um sistema sem o ativo - placebo (PLO-P). Para o preparo das emulsões O/A foi utilizada a metodologia de inversão de fases<sup>[28,29]</sup>. Foram preparadas emulsões base controle - placebo (EBC), emulsão com EO (EEO) e emulsão com o sistema PLO-EO (EPL0). Sendo que a fase oleosa contém cera auto emulsionante (Polawax<sup>®</sup>; 12%; MAPRIC - Lote: AUTO092872), óleo mineral (2% USP – lote: 8485) e a fase aquosa EO (5%), propilenoglicol

(2%; USP– lote: 707001), Keathon CG (0,05% Guinama – lote: 0044598) e água destilada (*qsp*). A incorporação do extrato foi realizada juntamente com a fase aquosa antes da inversão de fases e no sistema PLO por técnica de espatulação em placa de vidro após preparação da emulsão, como é realizado em farmácia magistral.

### Estabilidades e caracterização das formulações

Foram avaliadas suas características físico-químicas, macro e microscópica com a finalidade de verificar sua estabilidade frente ao tempo e a condições extremas<sup>[30]</sup>. Para a realização de tais testes, as amostras preparadas foram separadas e armazenadas em temperatura ambiente (25°C), refrigeração (-5°C) e estufa (40°C) e as formulações foram avaliadas em triplicatas em todas as análises.

As características organolépticas foram avaliadas através da cor, odor e aparência. As análises de pH foram realizadas nos tempos de 0 horas, 1, 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, utilizou-se o pHmetro digital Gehaka® PG 2000 previamente calibrado, e também, foram realizadas medições de pH do extrato em solução a 5%. Para as avaliações microscópicas, utilizou-se microscópio de luz polarizada Carl Zeiss® Axio Scope. A1, observou-se os efeitos do tempo nas estruturas, tamanhos das gotículas/estruturas, fusão de micelas e vesículas, desse incorporado com a base, e como contraste foram utilizados os corantes sudan III e azul de metileno, com e sem diluição em água (1:1 *w/w*), e as imagens passaram por processamento e análises no *AxioVision LE Digital Imaging Software* (AxioVision LE - 64 BIT version, USA).

Para caracterização das dispersões líquidas, os potenciais *zetas* (potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento) foram realizados no aparelho Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instrument, Reino Unido), seguindo metodologia<sup>[31]</sup> as formulações foram avaliadas em 7 e 180 dias<sup>[31]</sup>.

### Avaliações sensoriais *in vitro* das formulações

A espalhabilidade *in vitro* das amostras foi determinada<sup>[32]</sup> através da sobreposição de duas placas de vidro com 10 x 18 cm e 0,5 cm de espessura, sendo a placa base coberta com papel milimetrado, contendo quantidade conhecida, de massa da amostra, de modo a se calcular o alcance da espalhabilidade em milímetros, nos eixos horizontal e vertical. Foi utilizado massa de 0,5 g das amostras das formulações PLO – EO, EBC, EEO e EPLO. A espalhabilidade da formulação (*E<sub>i</sub>*) foi calculada, à temperatura ambiente, por meio da equação<sup>[33]</sup>:

$$E_i = d^2 \times \pi / 4$$

Onde: **E<sub>i</sub>**: espalhabilidade da amostra para o peso *i* (mm<sup>2</sup>)

**d<sup>2</sup>**: diâmetro médio (mm); **π**: 3,14

O fator de espalhabilidade (mm<sup>2</sup>/g)<sup>[29]</sup>, que consiste na relação entre a média da área de espalhamento conseguido com a aplicação de esforço sobre o produto e o esforço limite, também foi determinado.

A textura *in vitro* foi determinada<sup>[34]</sup>, as formulações PLO – EO, EBC, EEO e EPLO foram transferidas para copos plásticos descartáveis PS de 50 mL (CF-052 – Copobras), a análise foi realizada utilizando *Stable Micro Systems* TA-XT2i, Reino Unido, operando nas seguintes condições: Modo de compressão; Sonda cilíndrica de 13 mm (P0.5); Distância de penetração de 10 mm; Velocidade teste de 1 mm/s; Força de gatilho de 0,050 N. Todas as análises de avaliação sensorial *in vitro* foram realizadas no tempo zero hora e em triplicata.

## Resultados e Discussão

Para o processo de extração foi obtido um rendimento, com base no pericarpo do fruto *in natura*, de 76,14% de extrato etanólico após rotaevaporação, valor maior que 70%, encontrado na literatura<sup>[15]</sup>. A percolação<sup>[35]</sup>, como método de extração, tende a possuir maiores rendimentos que outro método utilizado em processo a frio, como a maceração simples. Este fato se justifica, pois o método possibilita um maior contato amostra, por maior tempo de arraste do solvente.

No preparo de uma formulação, as características organolépticas é uma das principais análises para a avaliação, no controle de processo e pós-processo. Possibilitando observar a boa uniformidade do sistema e garantindo a detecção de variações macroscópicas, antes mesmo das análises mecânicas e físicas serem realizadas, trazendo reduções de custos.

Observando as características organolépticas dos sistemas mostradas na **TABELA 1**, pode-se observar de maneira consistente uma estabilidade, em temperatura ambiente, de até 120 dias. Houve um processo de oxidação (rancificação) das formulações PLO – EO e EPLO, essa poderá estar associada a não efetividade da concentração dos agentes antioxidantes, a presença e a concentração elevada de água e aos fosfolípidios<sup>[36]</sup>. Foi observado que este processo foi acelerado com o aumento da temperatura, e reduzido com a diminuição da mesma, isso se deve ao aumento/diminuição da energia cinética, quando há um aumento ou diminuição da temperatura, respectivamente, acelerando as reações e paralelamente aumentando a oxidação<sup>[36]</sup>.

O aumento da temperatura leva a diminuição da viscosidade<sup>[20,37]</sup> aparente e ao aumento da motilidade cinética, em ambas as fases. A diminuição dessa temperatura leva a formulação a cristalizar, desestruturando a formação inicial das micelas, levando a alterações macroscópicas e microscópicas dos sistemas.

A solução a 5% do extrato de oiti apresentou pH de  $4,4 \pm 0,8$ , associando-se este fato a presença dos grupamentos fenólicos dos flavonoides, taninos e outros grupamentos ácidos possivelmente carregados na extração com etanol<sup>[15]</sup>.

Na **FIGURA 1** são apresentadas variações do pH das formulações em diferentes condições de temperatura através do tempo, sendo que as formulações EBC, PLO – EO e EPLO apresentaram variações significativas a partir de 60 dias, este quadro pode ser comparado com as alterações macroscópicas observadas para a formulação PLO –EO em 90 dias, visto que houve uma redução significativa.

O pH é responsável pela manutenção das cargas superficiais das gotículas lipídicas, de forma a garantir a estabilidade do sistema micelar. Alterações no pH podem reduzir o potencial eletrostático, facilitando o processo de coalescência dos glóbulos lipídicos resultando na instabilidade da formulação<sup>[38]</sup>.

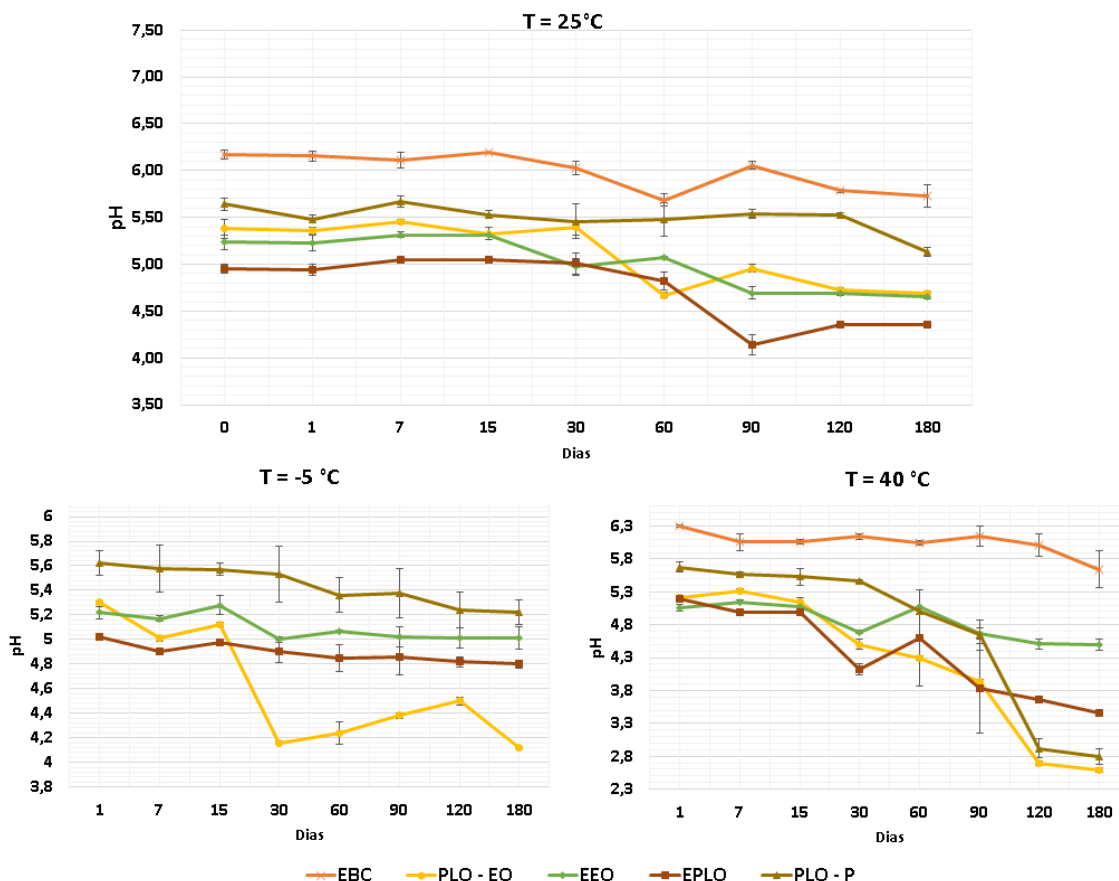


**TABELA 1:** Características organolépticas das formulações PLO-P, PLO-EO, EBC, EEO e EPLO diferentes condições de temperatura. N: Não houve alteração; BL- Bege levemente escuro; BE – Bege escuro; R: Rancificada; LR: Levemente rancificada; HT: Heterogêneo; AL: Amarelo Levemente Escuro; SO: Sem Odor

Formulações	Características	Tempo de análise																									
		Zero Hora			1 dia			7 dias			15 dias			30 dias			60 dias			90 dias			120 dias			180 dias	
	Temperatura (°C)	25	-5	25	40	-5	25	40	-5	25	40	-5	25	40	-5	25	40	-5	25	40	-5	25	40	-5	25	40	
PLO - P	Cor	Bege claro	N	N	BL	N	N	BL	N	N	BL	BL	N	BE	BL	N	BE	BL	N	BE	BL	N	BE	BL	N	BE	
	Odor	Sem odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LR	N	N	R
	Aspectos	Homogêneo	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	
PLO - EO	Cor	Bege	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	BE	N	N	BE	N	N	BE	N	N	BE	N	N	BE	
	Odor	Doce cítrico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SO	N	N	SO	N	N	SO	N	N	SO	N	N	SO	R	R	
	Aspectos	Homogêneo	N	N	N	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	N	N	HT	
EBC	Cor	Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	Odor	Sem odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	Aspectos	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
EEO	Cor	Amarelo Claro	N	N	N	N	N	AL	N	N	AL	N	N	AL	AL	N	AL	AL	N	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	
	Odor	Levemente Doce	N	N	SO	N	N	SO	SO	N	SO	SO	N	SO	SO	N	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	
	Aspectos	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HT	
EPLO	Cor	Branco amarelado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	B	N	N	B	N	N	B	N	N	B	N	N	B	N	N	
	Odor	Sem Odor	N	N	N	N	N	LR	N	N	LR	N	N	LR	N	N	LR	N	N	LR	N	LR	LR	N	LR	LR	
	Aspectos	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	HT	N	N	HT	N	HT	HT	

A formulação EBC, apresenta pH na faixa de 6,0 – 6,5 quando adicionado o ativo (EO), formando EEO, esse pH equilibra-se para uma faixa de 4,5 – 5,0, valor esse denotado ao pH da solução a 5% do extrato de oiti. A formulação EPLO, a redução do pH, pode estar associado a um processo de “rearranjo” do sistema micelar lipídicos do PLO – EO, quando este é incorporado ao EBC, fazendo com que libere esse ativo no meio emulsionado e diminua o pH, consequentemente.

FIGURA 1: Variação do pH das formulações em diferentes condições de temperatura ambiente em relação ao tempo.



Constata-se que não existe diferença entre os valores de pH dos sistemas micelares, PLO – EO em relação a emulsão clássica (EEO), sendo que, os dois mantiveram o pH em um faixa maior que a apresentada na solução a 5% do extrato.

Visualizam-se variações, dos pHs e organolépticas, das formulações PLO-EO, EPLO e PLO-P submetidas a temperaturas de -5°C e 40°C (FIGURA 1), com separação de fase para PLO-EO, EPLO e PLO-P e isto, pode estar associado a diversos fatores, entre eles estão, a oxidações dos triglicerídeos e fosfolipídios, liberando substâncias com características ácidas, como ácidos graxos e aldeídos, a liberação do próprio extrato que já possui concentrações elevadas de substâncias ácidas e no processo de destruição dos glóbulos, características inerentes às propriedades físico-químicas do polímero Poloxamer 407<sup>[36,39]</sup>.

A FIGURA 1 mostra que todas as formulações estão contidas na faixa de pH da pele, 4,1 – 5,8, em condições ambientais, mostrando o potencial dermatológico, desde que se mantenha o acondicionamento adequados desses produtos<sup>[41]</sup>.

Assim como a  $\Delta pH$ , outros fatores podem contribuir para caracterizar as instabilidades dos sistemas micelares, como, o aumento do tamanho das partículas; alargamento da distribuição no tamanho das gotas; e formação de fase separada do líquido livremente. São necessários outros métodos que avaliem essa distribuição, para que se possam afirmar os fenômenos de instabilidade.

A **TABELA 2** avalia os tamanhos dos diâmetros hidrodinâmicos das micelas nos sistemas. Na **FIGURA 2** são apresentados fotomicrografias das formulações testadas. Foi perceptível um aumento significativo das micelas de PLO – P para PLO – EO em 7 dias de preparo. Este aumento pode estar associado ao encapsulamento do extrato de Oiti. Em comparação com o sistema PLO – EO, aos 180 dias houve uma manutenção da média do tamanho da partícula com uma variação.

Quando comparado ao volume de distribuição destas partículas observa-se outro comportamento, que sugere um aumento das partículas em 180 dias proveniente do processo de agregação e coalescência, partindo-se do princípio de formação de uma fase contínua com o sistema disperso, corroborando com o achado na análise macroscópica (**TABELA 1**), a partir de 120 dias. Quando observado na **FIGURA 2** em A2 - 90 dias já na apresentaram sinais de agregação e coalescência, na A3 – 180 dias o número de glóbulos lipídicos já não está presente em igual proporção quando em A1 – 7 dias.

**TABELA 2:** Caracterização granulométrica e potencial zeta das partículas das formulações. TMP – Tamanho médio da partícula; PDI – Índice de polidispersão; DP – Desvio Padrão.

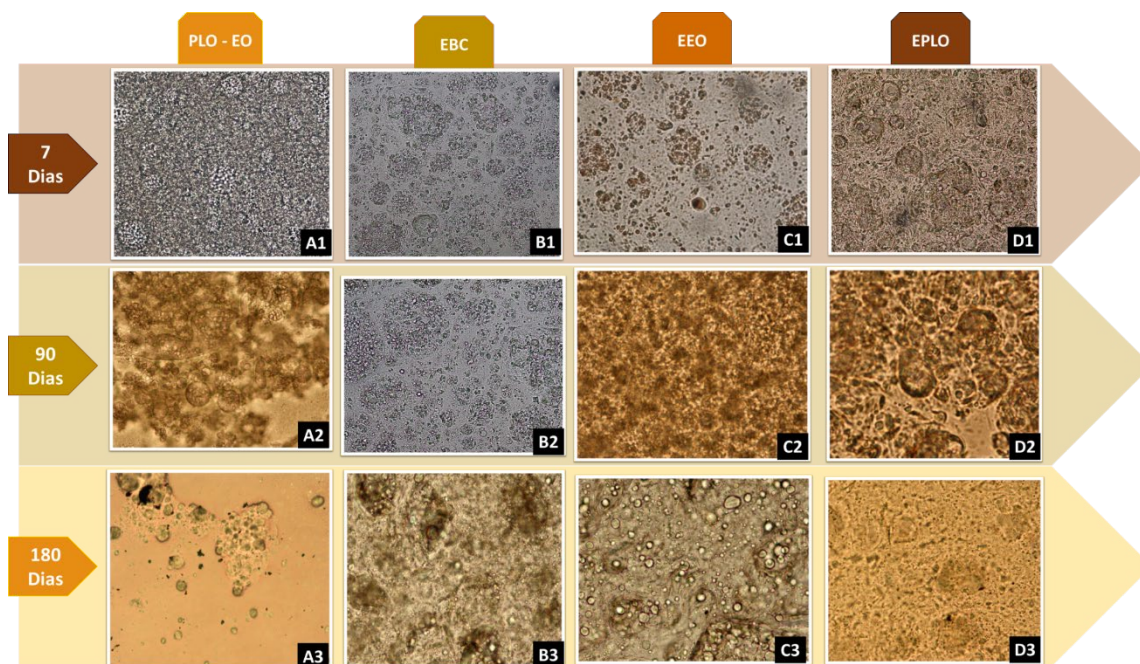
Parâmetro	PLO – P	PLO-EO 7 dias	PLO – EO 180 dias	EBC	EEO	EPLO
TMP $\pm$ DP (nm)	200,3 $\pm$ 6,2	285,7 $\pm$ 2,2	256,3 $\pm$ 27,9	1.959 $\pm$ 57,0	927,2 $\pm$ 43,1	522,9 $\pm$ 65,1
PDI $\pm$ DP	0,307 $\pm$ 0,032	0,407 $\pm$ 0,068	0,487 $\pm$ 0,062	1,000 $\pm$ 0,200	0,983 $\pm$ 0,18	0,729 $\pm$ 0,043
Potencial $\zeta$ $\pm$ DP (mV)	-35,30 $\pm$ 2,14	-40,20 $\pm$ 2,14	-52,79 $\pm$ 2,80	-36,70 $\pm$ 1,41	-45,13 $\pm$ 1,20	-43,81 $\pm$ 0,82

Para os sistemas emulsionados clássicos, EBC, EEO e EPLO. Observou-se a presença de partículas uniformizadas para o EBC, confirmando pelo perfil de distribuição das gotículas e analisando o seus comportamentos na microscopia B1, B2 e B3 (**FIGURA 2**), existem também linearidades nos tamanhos dos glóbulos lipídicos das formulações, justificada pelo não aparecimento  $\Delta pH$  significativo (**FIGURA 1**) e nas suas características organolépticas (**TABELA 1**).

Os métodos de análise utilizando difração<sup>[31]</sup> sofrem desvios para geração de erros na determinação do diâmetro hidrodinâmico da partícula, que é influenciado pela escolha do equipamento. Alguns autores afirmam que o modelo de diluição da amostra pode comprometer a fase dispersa e contínua da formulação levando a leituras errôneas. Outros afirmam que, gotículas da fase dispersa sempre estarão estáveis com a adição de sua fase contínua por tempo determinado, desde que haja compatibilidade<sup>[43]</sup>.

O método de microscopia óptica pode ser uma ferramenta para a avaliação destes erros nos estudos de sistemas micelares, pois possibilitam visualizar de forma direta os aspectos reais das gotículas lipídicas, e consequentemente detectar possíveis alterações<sup>[44]</sup>.

**FIGURA 2:** Fotomicrografias dos glóbulos micelares das formulações em temperatura ambiente avaliada por tempo. A1 – A3: PLO-EO; B1 – B3: EBC; C1 – C3: EEO; e D1 – D3: EPLO em 7, 90 e 180 dias após o preparo.



Nos sistemas micelares, como emulsões e organogéis, os triglicerídeos, ácidos graxos livres e fosfolipídios (lecitina de soja), atuam como agente emulsionantes [20,37,45], os agentes emulsionantes comportam-se de maneira tal, a formar uma barreira alterando a razão de coalescência da fase dispersa, ou criam um filme interfacial que produz forças eletrostáticas repulsivas entre as fases dispersas [20,31,37,38,45].

A **TABELA 2** mostra que os sistemas estão todos superiores a 25 mV em módulo, sistemas micelares lipídicos [46] estão estáveis quando compreendido entre – 30 mV a – 50 mV, observando o sistema PLO – EO 180 dias vemos que o mesmo apresenta valores significativos de instabilidade.

Os resultados somente poderão ser analisados como um todo ao observar-se, microscopia, índice de polidispersão, correlograma, volume de distribuição, potencial zeta e difração de luz, a análise poderá ser invalidada caso sejam observadas alterações discrepantes nas replicatas.

Os resultados de estabilidade comprovam a segurança para uso das formulações em até 90 dias, para produtos preparados em farmácia magistrais, como preconizado para os preparados com a presença de água na composição.

Os resultados de texturas e espalhabilidade das formulações (**TABELA 3**) demonstram que o sistema PLO – EO, a dureza e adesividade apresentaram propriedades e características bem acentuadas para um gel/sol [47], confirmando sua característica emulgel, uma elasticidade bem acentuada em comparação a demais formulações, que possibilitará maior coesividade a região de uso.

**TABELA 3:** Resultados das texturas e espalhabilidade das formulações PLO – EO, EBC, EEO e EPLO.

	PLO – EO	EBC	EEO	EPLO
Dureza (g)	18,5 ± 0,3	57,5 ± 1,6	64,1 ± 2,4	37,8 ± 1,2
Adesividade (g.s)	-16,2 ± 3,4	-377,4 ± 2,6	-377,4 ± 0,2	-179,0 ± 0,3
Elasticidade	1,07 ± 0,01	0,98 ± 0,00	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,01
Gomicidade	17,34 ± 0,12	44,32 ± 3,4	44,32 ± 0,32	27,54 ± 0,27
Coesividade	0,93 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,98 ± 0,01
Resiliência	0,14 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Espalhabilidade (mm <sup>2</sup> )	47,15 ± 8,31	29,20 ± 6,31	17,71 ± 5,11	77,00 ± 9,11
Fator de Espalhabilidade (mm <sup>2</sup> /g)	94,30	58,41	35,42	153,88

A espalhabilidade <sup>[47,48]</sup> do PLO – EO apresenta uma relação positiva, já que o sistema não é fluído e apresenta uma adesividade relativamente baixa. É notório que não há uma relação linear, entre dureza e adesividade, necessitando, assim, de maiores estudos para comprovar tal afirmação.

Quando esse sistema PLO – EO é incorporado ao sistema emulsionado clássico, as propriedades rígidas da formulação EBC são diminuídas, criando um sistema mais fluído, com menor dureza e menor adesividade, sensorialmente, levando a um toque mais leve e menos pegajoso<sup>[47]</sup>.

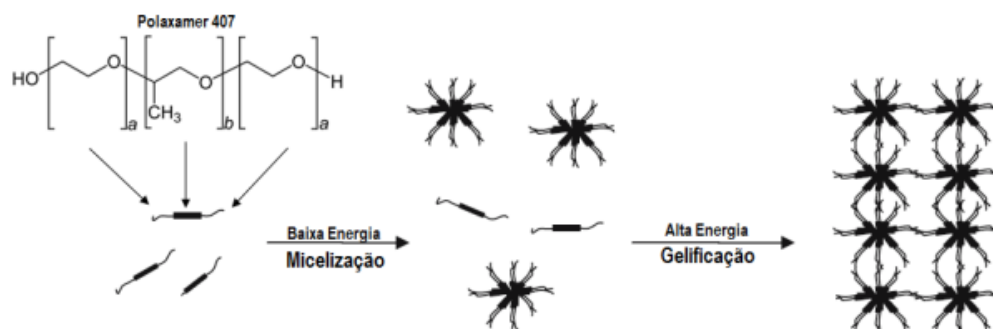
A espalhabilidade da formulação EBC é elevada ao triplo quando ocorre a adição do PLO – EO, e quando comparada a adição do extrato em EBC gerando EEO, observando-se uma diminuição da espalhabilidade, significativa.

Quando aumenta a relação de graxas da composição<sup>[49]</sup> existe um aumento acentuado na espalhabilidade do produto, o que está associado à incorporação do sistema PLO – EO ao EBC, desbalanceado, assim, o sistema graxo, com adição da lecitina de soja, e elevando a espalhabilidade.

O polímero Poloxamer 407 (Polaxamer 407 ou Pluronic<sup>®</sup> F127), presente na formulação, é um co-surfactante não iônico com características hidrofílicas. Este copolímero é composto de um bloco hidrofóbico central de poli(óxido de propileno) (b) e dois blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) na extremidade (a), que possui uma produção em larga escala e que tem aplicação farmacêuticas para diversos sistemas de liberação<sup>[50]</sup>.

Na **FIGURA 3** observa-se a diferença de hidrofobicidade entre os blocos *a* e *b* do polímero, esse rapidamente configura-se em micelas na presença de água, acima de determinada concentração. Quando é fornecida ou tirada energia térmica aos sistemas, esses sofrem o processo de *gelificação*, formando tubos poliméricos. Os poloxamers exibem uma propriedade de transição sol-gel, termo reversível em resposta a mudanças na temperatura, favorecendo a aplicação tópica desses sistemas, uma vez que o contato com a pele promove a formação de um gel não oclusivo, ou seja, sem alteração da perda de água transepidermal, em solvente aquoso a temperaturas próximas à corporal<sup>[50-51]</sup>.

**FIGURA 3:** Estrutura química do polímero, *Poloxamer 407* ( $a=101$ ,  $b=56$ ) e representação esquemática do mecanismo de associação de *Poloxamer 407* em água e na formulação (Adaptado [50]).



Após o preparo, foi obtido um sistema gelificado, opaco, de coloração amarela e mais viscosa. Concentrações altas de água<sup>[26]</sup> tornam-se um fator determinante para a opacidade do sistema, mas em compensação sistemas menos fluidos e mais gelificados facilitarão a adesão sobre os ferimentos, fator necessário na administração do fitocomplexo para o tratamento da HSV-1 labial e leishmaniose cutânea.

Para os preparos das emulsões simples O/A, foi delineado uma formulação com poucos componentes para simular bases de uso comercial, neste sentido, a incorporação do sistema PLO – EO foi realizado com base nas práticas realizadas na farmácia magistral. Na elaboração de uma formulação transdérmica, a preocupação com o tamanho dos glóbulos (partículas), potencial zeta, características organolépticas, pH, espalhabilidade e textura é importante, pois esses fatores conduzirão e facilitarão os mecanismos necessários para se vencer a barreira biológica e para uma maior aceitação do produto pelo pacientes<sup>[28]</sup>.

Em sistemas micelares, como emulsões e microemulsões, considerados estáveis, é possível observar que as gotas dispersas mantêm suas estruturas iniciais e continuam uniformemente distribuídas sobre a fase contínua da formulação. Em um sistema termodinâmico instável, tendem a ocorrer vários tipos de desvios de comportamento que levam ao processo de cremeação, floculação e/ou separação<sup>[19, 20, 28,37]</sup>.

## Conclusão

O estudo demonstrou que é possível o desenvolvimento de sistemas micelares (emulsões clássicas e Pluronic® Lecithin Organogel) a partir de extrato etanólico dos pericarpos do oiti, com estabilidade de 90 dias, o esperado para formulações contendo água, desenvolvidas para farmácia magistral.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à UFBA, CAPES, CNPq e à FAPESB pelos financiamentos concedidos. Às professoras Kelly R. B. Leite, Maria L. S. Guedes e ao Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos/Fiocruz pelo suporte com equipamentos.

## Referências

1. Prance GT, Sothers C. *Licania* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 5 jun. 2014.



2. Almeida DN, Rondon Neto RM. Análise da arborização urbana de três cidades da região norte do Estado de Mato Grosso. **Acta Amaz.** 2010; 40(4): 647-656. ISSN 0044-5967. [[CrossRef](#)].
3. Nepomuceno R. **O Jardim de D. João**: a aventura da aclimação das plantas asiáticas à beira da lagoa e o desenvolvimento do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, que vence dois séculos de umidade, enchentes, transformações da cidade, novos padrões científicos e mantém-se exuberante, com seus cientistas e suas árvores. 2ª ed. Rio de Janeiro: Casa das Palavras; 2008. ISBN-13: 9788577340835.
4. Souza PE, Silva LMM, Sousa FC, Martins JJA, Gomes JP. Características físicas e físico-químicas dos frutos de oiti. **Tecnol Cien Agropec.** 2013; 7(12): 39-43. [[Link](#)].
5. Monteiro KL, Oliveira C, Silva-Silva BM, Môro FV, Carvalho DA. Caracterização morfológica de frutos, de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch. **Cien Rural.** 2012; 42(1): 90-97. ISSN 0103-8478. [[CrossRef](#)].
6. Pessoa PI, Lopes Neto JJ, Almeida TS, Farias DF, Vieira LR, Medeiros JL et al. Polyphenol Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Seeds from Two Underexploited Wild *Licania* Species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. **Molecules.** 2016; 21(12): 1755. ISSN 1420-3049. [[CrossRef](#)].
7. Feitosa EA, Xavier HS, Randau KP. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Braz J Pharmacogn.** Sept./Oct. 2012; 22(5): 1181-1186. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
8. Macedo JBM. **Capacidade antioxidante *in vitro* e avaliação da toxicidade aguda *in vivo* de extratos de folhas de *Licania rigida* Benth., *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch e *Couepia impressa* Prance (Chrysobalanaceae).** Natal, RN. 104f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas], Universidade Federal do Rio Grande do Norte. UFRN, 2011. [[Link](#)].
9. Castilho RO, Kaplan MAC. Volatile components of Oiti fruit (*Licania tomentosa* Benth.). **Rec Nat Prod.** 2010; 4(4): 238-241. ISSN 1307-6167. [[Link](#)].
10. Castilho RO, Oliveira RR, Kaplan MAC. Licanolide, a new triterpene lactone from *Licania tomentosa*. **Fitoterapia.** 2005; 76(6): 562-566. ISSN 0367-326X. [[CrossRef](#)].
11. Castilho RO, Kaplan MAC. Constituintes químicos de *Licania tomentosa* Benth. (Chrysobalanaceae). **Quim Nova.** 2008; 31(1) 66-69. ISSN 1678-7064. [[CrossRef](#)].
12. Fernandes J, Castilho RO, Costa MR, Wagner-Souza K, Kaplan MAC, Gattassa CR. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letter.** 2003; 190(2): 165-169. ISSN 0304-3835. [[CrossRef](#)].
13. Farias DF, Souza TM, Viana MP, Soares BM, Cunha AP, Vasconcelos IM et al. Antibacterial, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Plant Seed Extracts from Brazilian Semiarid Region. **BioMed Res Inter.** 2013; 2013: 1-9. [[CrossRef](#)].
14. Silva JBNF, Menezes IRA, Coutinho HDM, Rodrigues FFG, Costa JGM, Felipe CFB. Antibacterial and antioxidant activities of *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Arch Biol Sci.** 2012; 64(2): 459-464. ISSN 1821-4339. [[CrossRef](#)].
15. Teixeira LL, Silva GA, Macedo JBM, Almeida MG, Moura MFV. Physicochemical Characterization and Phenolic Profile of Oiti Fruits *Licania tomentosa* Benth. Fritsch. **J Nutr Food Technol.** 2019, 2, 7-12. [[CrossRef](#)].
16. Miranda MM, Gonçalves JLS, Romanos MTV, Silva FP, Pinto L, Silva MH, et al. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytochemistry.** 2002; 9(7): 641-645. ISSN 0944-7113. [[CrossRef](#)].



17. Marques THC, Santos PSD, Freitas RMD, Carvalho Rbfd, Melo CHSD, David JPDL et al. Atividade anticolinesterásica e perfil químico de uma fração cromatográfica ativa do extrato etanólico das flores *Bellis perennis* L.(Asteraceae), **Quím Nova**. 2013; 36(4): 549-553. ISSN 0100-4042. [[CrossRef](#)].
18. Pereira NP, Dourado D. The profile of Brazilian agriculture as source of raw material to obtain organic cosmetics. **J Pharm Pharmacogn Res**. 2017; 5: 165-166. ISSN 0719-4250. [[Link](#)].
19. Ansel HC, Popovich NG, Loyd VO. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 9ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. ISBN-13: 9788565852845.
20. Aulton ME. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. ISBN-13: 9788536301525.
21. Buck P. Skin barrier function: effect of age, race and inflammatory disease. **Inter J Aromath**. 2004; 14(2): 70-76. ISSN 0962-4562. [[CrossRef](#)].
22. Pimentel LF, Jacome Junior AT, Mosqueira VCF, Santos-Magalhães NS. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev Bras Cien Farm**. 2007; 43(4): 503-514. ISSN 1516-9332. [[CrossRef](#)].
23. Sakata S, Uchida K, Kaetsu I, Kita Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Rad Physics Chem**. 2007; 76(4): 733-737. ISSN 0969-806X. [[CrossRef](#)].
24. Allen Jr LV. The History of Lecithin Pluronic Organogel. **Inter J Pharm Compoun**. 2003; 7(3): 180-182. [[Link](#)].
25. Jesus PC, João JJ, Silva PLF, Burlin G, Nascimento MG. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **Quím Nova**. 1997; 20(6): 664-672. ISSN 1678-7064. [[CrossRef](#)].
26. Raut AS, Bhadoriyaa SS, Uplanchiwara V, Mishrab V, Gahanea A, Jain SK. Lecithin organogel: a unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. **Acta Pharm Sinica B**. 2012; 2(2): 8-15. ISSN 2211-3835. [[CrossRef](#)].
27. Willmann H, Walde P, Luisi PL, Gazzaniga A, Stroppolo F. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. **J Pharm Sci**. 1992; 81(9): 871-874. [[CrossRef](#)].
28. Prista LNC, Morgado R. **Tecnologia farmacêutica e farmácia galênica**. 2ª ed. v. 2, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008. ISBN: 9789723109757.
29. Zanin SMW, Miguel MD, Chimelli M, Dalmaz AC. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Rev Visão Acad**. 2001; 2(2): 47-58. ISSN 1518-8361. [[CrossRef](#)].
30. International Conference on Harmonization - ICH; Q1A2, **Guidance for Industry - Stability Testing of New Drug Substances and Products**. 2003, Rev. 2. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 10 jan. 2019.
31. Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **Inter J Pharm**. 2003; 263(16): 85-94. ISSN 0378-5173. [[CrossRef](#)].
32. Bachhav YG, Patravale VB. SMEDDS of glyburide: formulation, *in vitro* evaluation, and stability studies. **AAPS PharmSciTech**. 2009; 10(2): 482-487. ISSN 1530-9932. [[CrossRef](#)].
33. Knorst MT. **Desenvolvimento tecnológico de uma forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureoides* (lam.) DC. Compositae (marcela)**. Porto Alegre, 1991. 228p. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas], Universidade Federal do Rio Grande do Sul. [[Link](#)].

34. Krambeck K. **Desenvolvimento de preparações cosméticas contendo vitamina C**. Porto, 2009. 96p. Dissertação de Mestrado [em Tecnologia Farmacêutica], Universidade do Porto. Portugal. [\[Link\]](#).
35. List PH, Schmidt PC. **Phytopharmaceutical technology**. North American ed. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989. ISBN: 0849377099.
36. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quím Nova**, 2006; 29(4): 755-760. ISSN 1678-7064. [\[CrossRef\]](#).
37. Frange RCC, Garcia MTJ. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Rev Cien Farmac Básica Apl**. 2010; 30(3): 263-271. ISSN 1808-4532. [\[Link\]](#).
38. Castagnaro D, Gadotti G, Canabarro IM, Tagliari MP, Silva MAS. Estabilidade físico-química de formulações para nutrição parenteral neonatal manipuladas em hospital universitário. **Rev Cien Farmac Básica Apl**. 2013; 34(2) 275-280. [\[Link\]](#).
39. Ruiz MA, Clares B, Morales ME, Gallardo V. Preparation, rheological study, and characterization of an organogel as a system for transdermal release of active principles. **Pharmac Tevelop Technol**. 2007; 12(6) 637-644. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
40. Segger D, Aßmus U, Brock M, Erasmy J, Finkel P, Fitzner A et al. Multicenter study on measurement of the natural pH of the skin surface. **Inter J Cosmetic Scie**. 2008; 30(1): 75. [\[CrossRef\]](#).
41. Leonardi GR, Gaspar LR, Campos PMBGM. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An Bras Dermatol**. 2002; 77(5): 563-569. ISSN 1806-4841. [\[CrossRef\]](#).
42. Kumar R, Katare OP. Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review. **AAPS PharmSciTech**. 2005; 6(2): 298-310. ISSN 1530-9932. [\[CrossRef\]](#).
43. Oliveira AG. **Caracterização da Distribuição do Tamanho de Gotas em Emulsões Água e Óleo Utilizando Diferentes Técnicas de Medição**. Itajubá, 2010. 144p. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica], Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá/MG. [\[Link\]](#).
44. Gouveia MA. **Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de nimesulida**. São Paulo, 2011. 128p. Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos], Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo/SP. [\[Link\]](#).
45. Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**, v. 2. New York: Marcel Dekker; 1989. ISBN: 9780824797133. [\[Link\]](#).
46. Netz PA, Ortega G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed; 2002. ISBN: 9788536300092.
47. Almeida IFM. **Desenvolvimento e caracterização de oleogeles**, Porto, 2002. 221p. grau de Mestrado [Tecnologia Farmacêutica], Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. Portugal. [\[Link\]](#).
48. Borghetti GS, Knorst MT. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Rev Cien Farmac Bas Apl**. 2006; 42: 531-537. ISSN 1516-9332. [\[CrossRef\]](#).
49. Pereira NP. **Estudo fitoquímico do óleo da semente de [*Camomilla recutita* (L.) Rauschert] camomila, com avaliação de propriedades físico-químicas, biológicas e funcionais em emulsões**. Curitiba, 2008. 192p. Tese de Doutorado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas], Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. [\[Link\]](#).

50. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmac Res.** 2006; 23(12): 2709-2728. ISSN 1573-904X. [[CrossRef](#)].

51. Cuenca CMR. **Micelas poliméricas termo reversíveis como sistemas para liberação modificada de fármacos por via tópica.** Santo André, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso [Curso de Graduação em Química], Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC. [[Link](#)].

---

**Histórico do artigo** | **Submissão:** 19/07/2019 | **Aceite:** 18/11/2019 | **Publicação:** 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Ramos YJ, Silva NQ, Costa-Oliveira C, Pereira RA et al. Obtenção e avaliação de sistemas micelares contendo extrato de frutos do oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 88-102. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/820>>. 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.



# Uso de plantas medicinais por idosos adscritos à atenção primária em Porto Alegre/RS e potenciais interações planta-medicamento

Use of medicinal plants by the elderly at primary health care in Porto Alegre/RS and potential herb-drug interactions

DOI 10.32712/2446-4775.2020.801

Scheid, Taina<sup>1</sup>; Fajardo, Ananyr Porto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Hospital Nossa Senhora da Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Gerência de Ensino e Pesquisa. Rua Francisco Trein, 596, 3º andar, Bloco H, Cristo Redentor, CEP 91350-200, Porto Alegre, RS, Brasil.

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

## Resumo

O objetivo deste estudo foi pesquisar a utilização de plantas medicinais por idosos diabéticos, hipertensos e polimedicados vinculados à Unidade de Saúde Costa e Silva, Porto Alegre/RS e descrever potenciais interações entre as plantas e os medicamentos utilizados, conforme literatura. Vinte e dois idosos foram entrevistados sobre as plantas medicinais utilizadas, forma e frequência de preparo, local de obtenção e conhecimento sobre possíveis efeitos adversos das plantas. Demonstrou-se que além dos medicamentos prescritos estes idosos têm como prática de cuidado o uso de chás medicinais, destacando-se a marcela (*Achyrocline satureioides*) e a camomila (*Matricaria chamomilla*). A prática é exercida através de conhecimentos aprendidos nas famílias e predomina a noção de que as plantas medicinais não oferecem riscos à saúde. Contudo, a maioria das espécies mencionadas possui descrição de potenciais interações com medicamentos (ex. gengibre e anticoagulantes) e/ou modificações fisiopatológicas que podem ser prejudiciais no contexto de polimedicação e doenças apresentadas pelos entrevistados (ex. alecrim e indução do metabolismo de fármacos; poejo e risco de hepatotoxicidade). Conclui-se necessária a avaliação e orientação sobre o uso de plantas medicinais pelos serviços de saúde na atenção aos idosos polimedicados, levando em consideração a maior vulnerabilidade desta população aos potenciais riscos aqui descritos.

**Palavras-chave:** Fitoterapia. Diabetes mellitus. Hipertensão arterial. Polimedicação. *Achyrocline satureioides*. *Zingiber officinale*.

## Abstract

The study aimed to investigate the use of medicinal plants among polimedicated elderly people with diabetes and hypertension from a primary health service in Porto Alegre/RS and conduct literature research on potential herb-drug interactions. Twenty-two elderly were interviewed about medicinal plants, its preparation,

frequency of use, place of acquisition, and knowledge about possible side effects. The results showed that, in addition to the prescribed drugs, these elderly people use medicinal herbs as their self-care practice (mainly marcela, *Achyrocline satureioides* and chamomile, *Matricaria chamomilla*). Knowledge about plants is learned in families and the notion that medicinal plants are harmless prevails. However, most of the species mentioned have a description of potential interactions with drugs and/or physiopathological modifications that may be prejudicial in the context of polypharmacy, diabetes, and hypertension presented by the interviewees. For instance, ginger and anticoagulants; rosemary and drug metabolism induction; pennyroyal and hepatotoxicity risk. The results of this study reinforce the need for guidance of polymedicated elderly on the use of medicinal plants by health services, taking into account the greater vulnerability of this population to the potential risks described here.

**Keywords:** Phytotherapy. Diabetes mellitus. Hypertension. Polypharmacy. *Achyrocline satureioides*. *Zingiber officinale*.

---

## Introdução

Um dos principais desafios a ser enfrentado pela atenção primária à saúde (APS) é o cuidado qualificado da população com múltiplas doenças crônicas, como diabetes mellitus (DM) e hipertensão arterial sistêmica (HAS). DM e suas complicações constituem as principais causas de mortalidade precoce na maioria dos países e, em brasileiros acima de 60 anos, a taxa de mortalidade é ao menos cinco vezes maior do que entre indivíduos entre 30 e 59 anos [1]. A HAS atinge cerca de 30% da população adulta, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para metade das mortes por doença cardiovascular e junto com DM, suas complicações têm impacto elevado na perda da produtividade do trabalho e da renda familiar, redução e/ou perda da autonomia para realização das atividades diárias, piora da qualidade de vida e alto custo para o sistema de saúde [2].

Esta situação vem sendo enfrentada pela Unidade de Saúde Costa e Silva (USCS), localizada em Porto Alegre, RS, em cujo território há, aproximadamente, 1.000 usuários diagnosticados com HAS e DM, correspondendo a cerca de 20% da população cadastrada [3]. Destes, 16% está com 60 anos ou mais de idade, o que traz ainda mais desafios, pois o idoso vivencia diversas modificações fisiológicas próprias desta etapa da vida que exigem medidas diferenciadas de cuidado [4]. Os idosos com HAS e DM geralmente também utilizam vários medicamentos. O uso de cinco ou mais medicamentos (polimedicção) é frequentemente observado na população idosa e predispõe a uma maior ocorrência de efeitos adversos e interações medicamentosas [5].

Diversos estudos têm mostrado que as pessoas utilizam terapias complementares envolvendo o uso de plantas medicinais para o tratamento de suas enfermidades [6-9], algo próximo a 85% da população em países em desenvolvimento [10]. Alguns destes estudos apresentaram dados de prevalência do uso de plantas por pessoas com HAS e DM. É o caso da pesquisa realizada entre usuários de uma unidade de saúde em Passo Fundo/RS, segundo a qual 62,4% dos entrevistados relataram que utilizavam plantas medicinais como adjuvante no manejo de suas doenças [11]. O uso de plantas medicinais, drogas vegetais e preparados delas obtidos para o tratamento de enfermidades é prática milenar denominada Fitoterapia, considerada também uma prática integrativa e complementar, e institucionalizada no âmbito do SUS por meio da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS [12] e da Política Nacional de

Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) [13]. Estas regulamentações vêm ao encontro do que está sendo preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre realizar ações rumo à legitimação das medicinas tradicionais e das práticas integrativas e complementares [10], indicando que o uso de plantas medicinais consiste em uma alternativa terapêutica muito valiosa à APS, dada sua eficácia, baixo custo, facilidade de obtenção e compatibilidade cultural com as pessoas [14].

Uma das propostas que emergiram a partir do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos [15] decorrente da PNPMF, foi a necessidade de promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros. Assim, o presente estudo teve como objetivo aplicar esta proposta no âmbito da APS, buscando-se conhecer o uso popular de plantas medicinais junto a idosos diabéticos, hipertensos e em polimedicação. Os aspectos estudados foram: levantamento das principais plantas medicinais consumidas, forma de preparação, frequência de uso, local de obtenção e o que seus usuários sabem sobre seus benefícios e riscos, visto que muitas pessoas acreditam que as plantas medicinais não oferecem riscos à saúde, como mostrou o inquérito realizado em Passo Fundo/RS [11]. Considerando-se que se trata de um grupo com maior vulnerabilidade à ocorrência de efeitos adversos e interações medicamentosas [5,16,17] realizou-se pesquisa em literatura sobre as potenciais interações planta-medicamento entre as plantas mencionadas com mais frequência e os principais medicamentos prescritos e/ou utilizados pelos idosos. Pretendemos trazer contribuições ao conhecimento sobre a prática popular envolvendo o uso de plantas medicinais, e ao cuidado das pessoas com HAS e DM, incentivando o uso de plantas medicinais de forma racional e segura.

## Materiais e Método

Trata-se de um estudo realizado entre usuários da Unidade de Saúde Costa e Silva (USCS), localizada na zona norte de Porto Alegre/RS. A USCS é uma das doze Unidades de Saúde do Serviço de Saúde Comunitária (SSC) de o Grupo Hospitalar Conceição (GHC). A partir da consulta aos dados do Sistema de Informações do SSC-GHC e prontuários de família em maio de 2017, foram identificados 136 usuários que preenchiam os seguintes critérios de inclusão: homens e mulheres com idade igual ou maior do que 60 anos, portadores tanto de HAS quanto de DM, e em uso de cinco ou mais medicamentos (polimedicados). Através de sorteio (programa Microsoft Excel versão 2007) foram selecionados 54 usuários para participar da pesquisa, resultando em uma lista com 28 mulheres e 26 homens. O número de sorteados foi determinado através de cálculo de tamanho amostral considerando a proporção de uso de plantas medicinais de 0,85 [18] e erro máximo de estimativa de 10%. Após contato telefônico e/ou através da entrega de carta-convite pelas agentes comunitárias de saúde, 22 usuários aceitaram participar, tendo sido entrevistados pela pesquisadora em suas residências, em aposento que preservasse o sigilo da interação. Cada usuário foi entrevistado em uma única ocasião e as entrevistas ocorreram entre junho e outubro de 2017. As pessoas não entrevistadas enquadram-se nas seguintes categorias: 10 pessoas não foram encontradas após três tentativas de contato, sete recusaram-se a participar, cinco mudaram-se do território e cinco exerciam atividade laboral em turno integral, impedindo sua participação nos horários disponíveis para a interação. Além destes, três usuários não puderam participar após constatar-se que não possuíam HAS e/ou DM (erro de registro), um usuário fora incluído no Programa de Atenção Domiciliar (critério de exclusão) e outro havia falecido na época do contato telefônico. A interação com os usuários ocorreu através de entrevista semiestruturada e as informações obtidas foram registradas por escrito. Os

participantes estão identificados pela letra “P” seguida de um número de ordem aleatória para preservar o sigilo das informações prestadas.

O estudo foi realizado respeitando-se a Resolução 466/2012, [19] e aprovado em 17 de fevereiro de 2017 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP-GHC, protocolo nº 17007). Através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi formalizada a participação voluntária dos usuários.

Os nomes científicos foram atribuídos às plantas a partir de pesquisa em repositórios de informações botânicas [20,21] e literatura [22] por meio dos nomes populares relatados e pela descrição dada pelos usuários e/ou registro fotográfico das hortas caseiras, quando existentes. Não foram realizadas coletas e identificação botânica das espécies vegetais.

As fontes de informação utilizadas para identificação das interações planta-medicamento foram: monografias de fitoterápicos e plantas medicinais da Organização Mundial da Saúde [23,24], *European Scientific Cooperative on Phytotherapy* [25] e Comissão E [26]; Memento fitoterápico da Farmacopeia Brasileira [27]; bases de dados [28,29] a partir da pesquisa a periódicos empregando-se combinações dos termos “interações”, “interações planta-medicamento”, “herb-drug interactions”, com os nomes científicos das espécies vegetais em questão.

## Resultados e Discussão

### Perfil sócio demográfico

Foram entrevistados 22 usuários com idade entre 60 e 81 anos, sendo a maioria mulheres (14). A maior parte dos participantes sabia ler e escrever (21), embora muitos não tenham estudado além do quinto ano do Ensino Fundamental (14). Nenhum dos participantes atuava formalmente no mercado de trabalho; 16 recebiam aposentadoria e 6 sempre exerceram, exclusivamente, atividades relacionadas ao cuidado do próprio lar, sem ter contribuído com a Previdência Social. Os entrevistados residiam com, pelo menos, uma pessoa em casa, e sua renda *per capita* era de aproximadamente um salário mínimo, o que representa cerca da metade daquela observada em Porto Alegre, porém semelhante à renda *per capita* do Rio Grande do Sul [30].

### Perfil de utilização de plantas medicinais

Vinte dos 22 usuários entrevistados relataram usar plantas medicinais no cuidado de sua saúde. Este resultado, embora não se tratando de estudo de prevalência, vem ao encontro dos dados da OMS sobre a abrangência do uso de plantas medicinais entre a população em geral nos países em desenvolvimento, cuja prevalência é de aproximadamente 80% [18], e de outros estudos conduzidos no âmbito da APS brasileira com percentuais semelhantes [8,11,31].

As plantas medicinais utilizadas pelos entrevistados estão listadas na **TABELA 1**, bem como a indicação referida, forma de preparo e frequência de uso das 10 espécies mais frequentemente mencionadas.



**TABELA 1:** Principais plantas medicinais utilizadas, indicações mencionadas, forma de preparo e frequência de uso. Porto Alegre/RS, 2017.

Planta medicinal (n=)	Usos referidos	Forma de preparo* (n=)	Frequência de utilização (n=)
Marcela (11) <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) DC.	"Dor de estômago", "Fígado", "Enjoo", "Colesterol alto", "Refeição pesada", "Dor de cabeça"	Infusão (8) Decocção (3)	Diariamente (1) Esporadicamente, em caso de sintomas (10)
Camomila (7) <i>Matricaria chamomilla</i> L.	"Calmante", "Para dormir", "Dor de cabeça, de estômago", "Digestivo", "Alergia, picada de bicho"	Infusão com água (6) Infusão com leite (3) Compressas (1)	Diariamente (3) Esporadicamente, em caso de sintomas (4)
Boldo (7) <i>Plectranthus barbatus</i> Andrews	"Dor de estômago", "Após refeições pesadas", "Digestivo", "Fígado", "Amargor da boca", "Ressaca", "Enjoo"	Infusão (3) Decocção (1) Maceração em água fria (3)	Diariamente (1) Esporadicamente, em caso de sintomas (6)
Guaco (6) <i>Mikania glomerata</i> Spreng.	"Gripe, tosse", "Bronquite"	Decocção (1) Adição da infusão sobre açúcar caramelizado (6)	Diariamente (0) Três vezes ao dia, em caso de sintomas (4) Duas vezes ao dia, em caso de sintomas (2)
Jambolão (5) <i>Syzygium jambolanum</i> (Lam.) DC.	"Diabetes"	Infusão (5)	Diariamente (3) Diariamente, cerca de 1-2 litros (2)
Babosa (4) <i>Aloe vera</i> (L.) Burm.	"Cicatrizante", "Mal-estar do estômago", "Preventivo do câncer"	Aplicação da mucilagem obtida das folhas diretamente sobre a pele (3) Maceração em água fria (2)	Esporadicamente, em caso de sintomas (4)
Capim cidró (4) <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	"Gripe", "Resfriado"	Infusão (2) Decocção (2)	Esporadicamente, em caso de sintomas (4)
Gengibre (3) <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	"Dor de estômago", "Dor de garganta", "Inflamações na garganta", "Resfriado", "Tudo, até câncer".	Infusão (1) Decocção (1) Maceração em água fria (1)	Diariamente (1) Esporadicamente, em caso de sintomas (2)
Poejo (3) <i>Mentha pulegium</i> L.	"Gripe"	Decocção (1) Adição da infusão sobre açúcar caramelizado (2)	Esporadicamente, em caso de sintomas (3)
Alecrim (3) <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	"Gripe", "Bronquite", "Digestivo", "Para palpitações".	Infusão (2) Adição da infusão sobre açúcar caramelizado (1)	Esporadicamente, em caso de sintomas (3)

Outras plantas citadas:

Quiabo, abacate, arnica, carqueja, alcachofra, agrião, guiné, erva-doce, laranjeira, bergamoteira, limoeiro, manjerição, alface, malva, tansagem, canela do brejo, mirarruira, pata de vaca, insulina, losna, canela, beringela, hortelã, salsa, gervão, erva de nossa senhora, alho, ipê roxo, quebra-pedra, cidreira, espinheira santa, canela de velho, picão, graviola, sene, mil-homens, catinga-de-mulata.

(n=) Número de usuários que mencionaram o uso. \* Algumas pessoas mencionaram mais de uma forma de preparo.

O repertório de plantas mais utilizadas assemelha-se com o encontrado por outros estudos conduzidos na região sul do Brasil nos quais a camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e a marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam) DC) figuram no topo da lista<sup>[9,11,31]</sup>. Enquanto a camomila é uma espécie exótica de origem europeia, cultivada em muitos países por suas propriedades terapêuticas bem estabelecidas<sup>[32]</sup>, a marcela é uma planta nativa bastante reconhecida na medicina popular regional possivelmente como herança das tradições indígenas sul americanas (marcela = *eloyatei-caá* em Tupi-guarani)<sup>[33]</sup>. No Rio Grande do Sul este reconhecimento é bastante expressivo, tendo sido instituída como planta medicinal símbolo do estado<sup>[34]</sup>.

Muitas das espécies apresentadas na **TABELA 1** também têm sua importância medicinal reconhecida em outras regiões do Brasil, pois compõem a seleção de espécies vegetais das hortas medicinais do Projeto

Farmácias Vivas [14]. Além disso, as plantas mais citadas aqui fazem parte da Relação Estadual de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde no Rio Grande do Sul [35], e sete aparecem na Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS) [36]. Estas listas apresentam as espécies medicinais com potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) e propõem-se a servir de base para agendas nacionais e estaduais de prioridades de pesquisa em saúde, no que se refere a plantas medicinais tanto para sua utilização como chá medicinal como para projetos de inovação farmacêutica [15]. Percebe-se assim coerência entre o repertório de plantas utilizadas pelos entrevistados e àqueles visados pelas políticas públicas com o objetivo de ampliar o conhecimento e fomentar o uso seguro e racional.

Quanto às indicações terapêuticas das plantas, constatou-se que a maioria dos usos referidos pelos idosos (**TABELA 1**) encontra embasamento na literatura científica [23,24,27].

Em relação ao preparo das plantas medicinais, a forma predominante é o chá (20 menções), denominação geral dada para preparações envolvendo as técnicas de infusão e decocção [37]. A maioria dos entrevistados relatou que utiliza os chás esporadicamente, e para o tratamento de enfermidades percebidas como de curta duração (autolimitadas), como por exemplo, gripes e resfriados, distúrbios gastrointestinais (dispepsia, náusea) e cefaleia (**TABELA 1**). Entretanto, foram feitas menções sobre o uso diário, intensivo e prolongado (1 e 2 litros de chá/dia ao longo de várias semanas) de algumas plantas medicinais para o manejo do diabetes, como o jambolão e a pata de vaca, sobre as quais não existem recomendações conclusivas para embasar esta indicação terapêutica e posologia. Nenhum dos participantes relatou interromper o uso dos medicamentos prescritos em favor dos chás, porém entre os que faziam seu uso intensivo para o diabetes era comum mencionarem que tomavam o chá em lugar da água. Esta é uma questão relevante porque nestes casos relatou-se consumir grandes quantidades das preparações, contendo princípios ativos vegetais, cujos efeitos sobre a saúde são ainda indeterminados. Também existe a possibilidade de interação dos chás com os medicamentos, como será abordado adiante.

Em se tratando de pacientes diabéticos, outra preocupação emergente é a adição de açúcares às preparações medicinais, algo que não foi relatado como uma prática comum entre os entrevistados. Entretanto, uma das preparações utilizada para o manejo de resfriados, tosse e dor de garganta - o xarope ou lambadura - envolve a adição de açúcar, como descrito:

“Primeiro derreto o açúcar na panela, largo a água fervente, e depois coloco as plantas todas – agrião, guiné, guaco, alecrim – e deixo abafado, para depois tomar” (P22).

Um terço dos entrevistados relatou utilizar o xarope frequentemente nos casos de sintomas respiratórios. Esta prática não foi reconhecida como prejudicial pelos participantes, mesmo depois de rememorada sua condição diabética. Sendo esta uma preparação comum envolvendo os chás para o manejo de gripes e resfriados [6,9], e sendo bem conhecido o fato de que infecções agudas ocasionam uma desregulação no controle glicêmico durante seu curso [38], é importante abordar a questão com os usuários e fazer proposições de modo a adequar a prática à condição diabética.

O conhecimento sobre o uso medicinal das plantas foi frequentemente citado como proveniente da família:

“A mãe usava muito chá, e plantava, me criei assim” (P20) e “O pai ia para o mato buscar as plantas e vinha com o cesto... é de onde aprendi. Eu só não ia para o mato porque tinha medo de cobra” (P2).

Outra usuária lembrou como o pai costumava tratar episódios de coqueluche:

“O pai me levava para o mato nas primeiras horas da manhã para pegar sereno. [Ele] colhia a flor... não lembro o nome. Era uma flor amarela parecida com um girassol, que tinha uma batatinha branca dentro. Depois raspava essa batata com mel e açúcar, e dava para a gente para curar a tosse comprida.” (P11).

Muitos também mencionaram que o conhecimento veio de tempos remotos, nem sempre bem determinados, através do emprego das expressões “vem da tradição”, “veio dos ancestrais”, “criei-me com isso” e de relatos de que aprenderam a usar as plantas com a família, desde a infância.

O consumo de plantas medicinais embasado em conhecimentos repassados pela família reforça a cultura do cultivo, pois demonstra a preocupação com a disponibilidade imediata do recurso terapêutico [6]. Apesar disto, a principal forma de aquisição das plantas para uso medicinal (37 menções) foi através da compra em supermercados ou pequenos mercados locais, e observou-se que menos da metade das residências visitadas possuía qualquer tipo de horta caseira. O cultivo próprio (26 menções) parece ser limitado pelas pequenas áreas físicas residenciais disponíveis para esta finalidade, e possivelmente é o motivo pelo qual também se adquirem as ervas através da colheita em vizinhos, praças e terrenos baldios nos arredores (19 menções). Ainda, mencionou-se a aquisição das ervas no Mercado Público Municipal de Porto Alegre/RS (15 menções) e de erveiros – pessoas com vasto conhecimento popular sobre as plantas, e que as comercializam geralmente de casa em casa (seis menções). Esta é uma preocupação porque é sabido que o cultivo em hortas caseiras proporciona um maior contato com as plantas e também conhecimento sobre sua identidade e vitalidade, algo que não é possível garantir quando são adquiridas no comércio, onde geralmente são vendidas na forma seca e rasuradas. Brandão, Freire e Vianna-Soares [39] avaliaram diversas amostras de camomila provenientes de farmácias, ervanárias e mercados em Minas Gerais e constataram que, apesar de constituírem-se majoritariamente da espécie em questão, a maioria estava com os capítulos florais destruídos, havendo sofrido redução significativa nos princípios ativos, além de apresentarem contaminação por insetos. Estes dados não são incomuns, como mostram trabalhos conduzidos em outros estados brasileiros para avaliar a qualidade das plantas medicinais comercializadas [40,41].

É interessante ressaltar que a pergunta inicial da entrevista - “O Senhor (a) usa algum remédio de planta medicinal - por exemplo, chás, compressas, garrafadas?” - foi inicialmente respondida negativamente por sete dos vinte usuários que usavam plantas medicinais. Uma das usuárias foi taxativa:

“Não... eu não tomo nada. Só o que o médico me dá. Morro de medo de usar ervas. A única coisa que eu tomo é suco de ameixa com couve e aveia” (P19).

A confirmação do uso, neste e nos outros casos, deu-se com a continuidade da interação, geralmente após pergunta sobre como manejavam problemas corriqueiros de saúde (gripe, dor de garganta, dor de estômago etc.). No caso de P19, a contradição apareceu após relatar que sofria de insônia:

“Para dormir melhor eu uso a camomila. Misturo [a camomila] com água quente e às vezes com leite, tomo todos os dias, senão fico desesperada”.

Os entrevistados não perceberam espontaneamente a aparente contradição e, quando questionados sobre a negativa inicial da pergunta sobre o uso de plantas medicinais, não souberam explicar o motivo, embora achessem graça disto.

Neste sentido, pondera-se que é possível que o termo usado na pergunta – *remédio* de planta medicinal – não tenha sido compreendido por alguns como pretendido pelas pesquisadoras. Daquilo que foi registrado é plausível pensar que o autocuidado realizado através do uso de chás nem sempre é associado a um remédio, mas sim a hábitos culturais das famílias e das relações sociais:

“Lá onde me criei, no terminal do mundo, só comíamos o que plantávamos. Não consigo imaginar minha vida sem [os chás]” (P13) e “[...] Quando vem visita precisa do chimarrão, facilita a conversa [...] Sempre que vem visita lá de fora [menciona a cidade distante], preparo o chimarrão e ponho cidreira, hortelã” (P6).

A noção de inocuidade dos chás e demais preparações de plantas também esteve presente entre a maioria (12 dos 22 entrevistados):

“Prefiro a erva ao remédio – esse tem química. O chá medicinal é muito difícil fazer mal” (P4) e “As plantas não fazem mal, senão eu já teria morrido!” (P10).

Contudo, houve relatos de determinadas situações desagradáveis nas quais os idosos ponderaram que o uso de plantas também pode envolver efeitos adversos:

“Uma vez comecei a usar o jambolão. Durou um dia. Tomei duas vezes e comecei a sentir uma palpitação, nunca mais usei” (P16) e “Minha irmã usava jambolão que nem água. Daí começou a ter problemas, ficar magra, magra. Eu acho que foi desse chá para o diabetes. Porque assim, isso é diferente de um chá que se usa poucos dias” (P14). “Eu nunca usei chá para o diabetes, nunca. Minha irmã usava jambolão, e a mãe, insulina [planta]. Ficaram cegas! E a mãe perdeu pé” (P18).

Para o grupo de entrevistados, contudo, quando houve a menção e busca sobre orientações sobre o uso medicinal das plantas durante a consulta médica, em qualquer momento da vida, os relatos foram de que isto não trouxe esclarecimentos sobre a segurança ou riscos potenciais desta prática, tendo prevalecido a percepção de que os profissionais ficavam indiferentes a ela. Nota-se aí uma clara necessidade de diálogo, na tentativa de convergir os saberes, e assegurar a qualidade deste recurso terapêutico milenar, além de promover a educação continuada dos profissionais de saúde sobre a prática da fitoterapia e a valorização dos conhecimentos populares e autonomia dos indivíduos em seu cuidado de saúde. Sobre este aspecto uma das antigas pautas da OMS <sup>[42]</sup> já sustentava que, para integração das medicinas tradicionais e suas práticas à atenção primária, havia a necessidade do ensino de princípios destas aos profissionais e estudantes de saúde, a fim de promover o diálogo, a comunicação, o bom entendimento e, finalmente, a integração.

### Potenciais interações planta-medicamento

As entrevistas confirmaram a ocorrência de polimedicação entre os idosos, algo que havia sido inferido previamente pelos registros mais recentes em prontuário. Cada usuário utilizava em média 7,1 (DP ± 2,3) medicamentos diferentes diariamente, demonstrando que a polimedicação entre idosos é um fenômeno comum e crescente, o qual está relacionado, entre outras coisas, ao aumento da longevidade e de doenças crônicas associadas <sup>[5]</sup>. De fato além de diabetes e hipertensão a maioria dos idosos entrevistados (20) relatava possuir enfermidade crônica adicional, sendo as mais comuns: dislipidemia, depressão e artrose. A própria polimedicação é um fator de adoecimento, visto que contribui para a menor aderência farmacoterapêutica e maior risco de interações e efeitos adversos, lesões e hospitalizações <sup>[9]</sup>, tendo já sido demonstrada forte associação entre polimedicação e impacto clínico negativo na vida das pessoas <sup>[43]</sup>.

Observou-se que em média 6,0 (DP ± 2,0) dos medicamentos utilizados foram prescritos, o que demonstra a ocorrência de automedicação. Cerca da metade (13) dos entrevistados relatou utilizar ao menos

semanalmente medicamentos analgésicos e/ou anti-inflamatórios não prescritos (paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno). Entre aqueles que relataram o uso diário de analgésicos (4), era comum também o uso de produtos contendo associações de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e relaxantes musculares – sendo alguns destes últimos considerados medicamentos inapropriados para os idosos <sup>[44]</sup>.

Os medicamentos mais utilizados, conforme princípio ativo e número de menções: metformina (15), sinvastatina (13), hidroclorotiazida (12), losartana (10), ácido acetilsalicílico 100 mg (9), omeprazol (8), paracetamol (8), catopril (7), anlodipino (4), glibenclamida (4), insulina NPH (4). A maioria das classes farmacológicas dos medicamentos utilizados corresponde à terapêutica para doenças apresentadas pelos participantes: HAS, DM, dislipidemia. Evidencia-se a utilização rotineira do paracetamol por automedicação, sugerindo que existem condições dolorosas persistentes que não estão sendo reconhecidas pelo serviço de saúde. Cabe destacar também a presença do omeprazol entre os principais medicamentos usados diariamente e por tempo prolongado, apesar de não haver registros entre os usuários de condições clínicas para as quais o fármaco é formalmente indicado.

Em relação às possíveis interações entre os medicamentos e as plantas mais utilizadas, entende-se aqui a “interação planta-medicamento” como os possíveis efeitos fisiológicos e/ou tóxicos resultantes do consumo, ao mesmo tempo ou dentro de pouco tempo, de plantas medicinais e medicamentos, sendo que esses efeitos diferem daqueles de quando cada um dos itens é consumido isoladamente <sup>[17]</sup>. As potenciais interações, considerando-se as 10 plantas mais utilizadas, bem como os efeitos adversos e contraindicações ao uso identificados em literatura estão descritos na **TABELA 2**.

**TABELA 2:** Interações medicamento-planta, efeitos adversos e contraindicações ao uso das 10 plantas mais utilizadas. Porto Alegre/RS, 2017.

Planta	Potenciais Interações Medicamento-planta	Efeitos adversos e Contraindicação
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) DC.	Uso oral e tópico: não existem interações descritas na literatura pesquisada.	Indivíduos com conhecida sensibilidade ou alergia às plantas da família Asteraceae (ex. camomila) podem ter reações de hipersensibilidade também à marcela <sup>[24,27]</sup> .
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Uso oral: compostos cumarínicos presentes na camomila podem interferir com anticoagulantes, como a varfarina <sup>[27,45]</sup> . O efeito ocorre apenas em caso de uso prolongado e altas doses <sup>[33]</sup> .	Risco de sangramentos <sup>[33]</sup> .
	Uso tópico: não existem interações descritas na literatura pesquisada.	A presença de lactonas sesquiterpênicas nas flores de camomila poderá desencadear reações alérgicas em indivíduos sensíveis, e tem sido descrita dermatite de contato para algumas preparações <sup>[27]</sup> . Deve-se ter cuidado particularmente com as compressas oculares, seu uso não deve ultrapassar poucos dias <sup>[46]</sup> . A camomila é contraindicada a indivíduos com conhecida sensibilidade ou alergia às plantas da família Asteraceae (ex. marcela) <sup>[24,27]</sup> .
<i>Plectranthus barbatus</i> Andrews	Uso oral e tópico: não existem interações descritas na literatura pesquisada.	
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Uso oral: - Pode potencializar o efeito de medicamentos anticoagulantes <sup>[33]</sup> . - Preparações que possibilitem a fermentação podem favorecer a	- Risco de sangramentos <sup>[33]</sup> .

	transformação das cumarinas em dicumarol, substância anticoagulante [47].	
<i>Syzygium jambolanum</i> (Lam.) DC.	Estudo <i>in vitro</i> demonstrou aumento no tempo de coagulação sanguínea após incubação com extrato de jambolão [48].	Embora não existam recomendações específicas, sugere-se que pessoas com riscos de sangramentos e em uso de anticoagulantes orais tenham cautela na ingestão de preparações contendo o jambolão.
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.	Uso oral: a ingestão de preparações contendo o exudato amarelo presente próximo à casca da babosa resulta em modificações no peristaltismo, podendo levar a menor absorção de medicamentos administrados por via oral [24].	- Redução no efeito terapêutico dos fármacos ingeridos concomitantemente. - Uso oral de babosa é contraindicado nos casos de obstrução intestinal, constipação crônica, desidratação com depleção de eletrólitos; também não deve ser utilizada por indivíduos com doenças intestinais inflamatórias, hemorroidas, e problemas abdominais não diagnosticados cujos sintomas envolvem dor, náusea e vômitos [24,26].
	- Diuréticos tiazídicos, como a hidroclorotiazida, atuam sinergicamente na redução do potássio [24].	- Hipocalemia e em casos mais severos, rabdomiólise, anormalidades renais e arritmias cardíacas [24].
	- Redução na concentração e/ou efeitos dos hormônios tireoidianos T3 e T4 [33].	
	Uso tópico: não existem interações descritas na literatura pesquisada para a via tópica.	- O gel de babosa é contraindicado a indivíduos com conhecida alergia às plantas da família Liliaceae (ex. tulipas, lírios) [24].
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Uso oral e tópico: não existem interações descritas na literatura pesquisada.	
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Uso oral: O gengibre pode afetar o tempo de sangramento e parâmetros imunológicos, de modo que pode potencializar os efeitos de medicamentos anticoagulantes e antiagregantes plaquetários (ex. varfarina, AAS) [24,33].	- Risco de sangramentos. Os pacientes que tomam medicamentos anticoagulantes ou que apresentam distúrbios da coagulação sanguínea devem consultar seu médico antes de se automedicar com gengibre [24]. - Contraindicado para pessoas com cálculos biliares, irritação gástrica e hipertensão arterial [27].
<i>Mentha pulegium</i> L.	Uso oral: pode interferir na absorção de medicamentos contendo ferro [33].	- Possível redução no efeito terapêutico do medicamento. - Um dos componentes da planta, a pulegona, pode causar hepatotoxicidade quando ingerido excessivamente [33,49]. Recomenda-se uso esporádico e em quantidade máxima de duas xícaras/dia preparadas com 1-2 gramas (planta seca) ou até 4 gramas (planta fresca) [14].
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Uso oral: - O cineol, principal componente do óleo essencial e de preparações aquosas do alecrim, possui efeito indutor sobre sistemas enzimáticos responsáveis pelo metabolismo de fármacos: citocromo P450 1A1, 2B1/2, 2E1, glutatona transferase e quinona redutase [23].	- Fármacos metabolizados por estas enzimas serão afetados [23], com possível redução do efeito terapêutico. - Não são conhecidas interações com medicamentos [29].
	Uso tópico: - Não existem interações descritas na literatura pesquisada para a via tópica.	- Existem descrições da ocorrência de dermatite de contato e fotossensibilidade [23]. - Deve-se evitar a aplicação de banhos quentes contendo alecrim em pessoas com grandes áreas de feridas na pele, em situações febris e de inflamações agudas, na hipertensão e em casos de distúrbios circulatórios severos [29].

Dentre as potenciais interações planta-medicamento identificadas, poucas descreviam interações específicas com os medicamentos em uso pelos participantes da pesquisa. A descrição mais frequente trata-se da interação entre medicamentos que interferem na coagulação sanguínea - varfarina e ácido

acetilsalicílico (AAS) - e plantas como a camomila, o guaco, o gengibre e o jambolão, podendo favorecer a ocorrência de sangramentos [27,33,45]. Isto pode ter maior importância nos casos onde se faz uso diário dos chás, como foi mencionado para o manejo de condições como insônia (camomila), diabetes (jambolão) e gripes e resfriados (guaco) (TABELA 1). Entretanto, a severidade e significância clínica destas interações não foram estabelecidas.

O uso interno de *Aloe vera* (L.) Burm. (babosa), através de sucos e macerados contendo as folhas, é outro item a ser destacado. As folhas contêm em seu interior mucilagem transparente e rica em polissacarídeos, indicada para aplicação tópica por suas propriedades cicatrizantes [27], diferentes do encontrado na região próxima à casca, onde se concentram antraquinonas, com propriedades laxativas [24]. Desta forma, a ingestão da babosa assim como relatada por alguns dos usuários para problemas do trato gastrointestinal (TABELA 1) pode desencadear efeito laxativo e purgativo, podendo levar a menor absorção de medicamentos administrados por esta mesma via [24], o que pode comprometer seu efeito terapêutico. A utilização conjunta com medicamentos como a hidroclorotiazida pode resultar em hipocalcemia e, em casos mais severos, rabdomiólise, anormalidades renais e arritmias cardíacas [24,26]. Esta é uma questão relevante quando se considera que a hidroclorotiazida é um dos fármacos de primeira linha no tratamento da hipertensão [2] e utilizada por mais da metade dos entrevistados.

O poejo (*Mentha pulegium* L.) tem o potencial de interferir na absorção de medicamentos contendo ferro [33], podendo ocasionar redução em sua biodisponibilidade. Quando o poejo é utilizado sob a forma de chás, xaropes ou quaisquer outras preparações de uso interno recomenda-se que seja utilizado esporadicamente e que a quantidade ingerida não seja superior a duas xícaras ao dia, nas quantidades de planta fresca ou seca descritas na TABELA 2 [14], pelo risco de hepatotoxicidade da pulegona, um terpeno presente na planta [33,49]. Ainda que os entrevistados tenham relatado usá-lo esporadicamente, esta é uma questão relevante, pois o risco de danos hepáticos decorrente do uso de ervas e medicamentos é maior em pessoas idosas e polimedicadas [50]. O aroma e sabor agradáveis do chá de poejo, intensificados pelo açúcar das preparações contendo açúcar (xaropes) podem ser um estímulo ao consumo mais vigoroso, o que incrementa a necessidade de orientações a respeito dos cuidados com a ingestão desta planta.

Ao gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), utilizado principalmente para o alívio de inflamações de garganta, resfriados e problemas gástricos (TABELA 1), atribui-se o potencial de interagir com fármacos anticoagulantes e antiagregantes plaquetários (ex. AAS) podendo ocasionar sangramentos [24,33]. Gengibre e AAS também podem favorecer o surgimento de irritações gástricas, algo relevante quando cerca da metade dos entrevistados utiliza AAS e omeprazol – um medicamento para o tratamento de gastrite – sem que se tenha descrito uma doença gastrointestinal bem definida. Apesar de apenas três entrevistados relatarem o uso de gengibre medicinalmente, não se pode descartar que ele esteja sendo consumido rotineiramente nos preparos culinários, algo que não foi investigado. O gengibre também é contraindicado para pessoas hipertensas, condição vivenciada pelos entrevistados [27].

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) possui efeito indutor sobre sistemas enzimáticos responsáveis pelo metabolismo de fármacos (TABELA 3) [23], podendo resultar na redução do efeito terapêutico dos medicamentos metabolizados por estes sistemas.

A marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam) DC.) - planta de maior menção entre os entrevistados, apesar de constar já na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, de 1929 [51], recebe sucintas informações sobre



interações nos compêndios oficiais. O Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira [52] descreve que a tintura pode potencializar o efeito de insulina, barbitúricos e outros sedativos, porém não fica claro se este efeito está relacionado à presença de álcool na preparação, ou à planta propriamente. Não foram encontradas outras descrições sobre possíveis interações planta-medicamento na bibliografia consultada. Isto demonstra a necessidade de esforços no sentido de ampliar o repertório de informações orientadoras, principalmente das espécies medicinais brasileiras, para orientar o profissional de saúde em sua prescrição ou indicação dessa terapia na APS.

## Conclusão

Neste trabalho estudou-se a forma de utilização de plantas medicinais entre idosos vinculados a um serviço de APS e que sofrem de agravos crônicos. Ficou evidenciado que além dos vários medicamentos que lhes são prescritos para HAS, DM e outras comorbidades, a maioria tem como prática de cuidado o uso de chás e outras preparações de plantas. Nem sempre houve o reconhecimento de que esse cuidado da saúde com as plantas tratava-se de remédio, ou que existiam riscos e efeitos adversos. O conhecimento sobre elas é habitualmente proveniente da própria família, passando de uma geração para outra. As plantas mais utilizadas por estes idosos são semelhantes ao que mostraram estudos etnobotânicos brasileiros, principalmente da região sul do país. Interações potenciais entre os medicamentos e as plantas utilizados foram identificadas, mas nem sempre a literatura sistematizada sobre o tema (monografias, memento) trouxe informações sobre as espécies de maior utilização. Concluiu-se a necessidade de avaliação e orientação sobre o uso de plantas medicinais pelos serviços de saúde na atenção aos idosos polimedicados, levando em consideração a maior vulnerabilidade desta população aos potenciais riscos aqui descritos.

## Referências

1. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. 383p. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 29 mai. 2019.
2. Malachias MVB, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**. 2016; 107(3): 1-83. ISSN 0066-782X. [\[Link\]](#).
3. Brasil. Ministério da Saúde. Grupo Hospitalar Conceição. Sistema de informações em saúde do Serviço de Saúde Comunitária (SIS-SSC/GHC), **Boletim mensal**. maio/2017.
4. Organização Mundial da Saúde (OMS). **Envelhecimento ativo: uma política de saúde**. Brasília; 2005. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 29 mai. 2019.
5. Gavilán-Moral E, Villafaina-Barroso A, Gracia LJ, Santana MCG. Ancianos frágiles polimedicados: es la deprescripción de medicamentos la salida? **Rev Esp Geriatr Gerontol**. 2012; 47(4): 162-167. [\[CrossRef\]](#).
6. Casagrande A. **Plantas medicinais e ritualísticas utilizadas pela comunidade do Morro da Cruz, Porto Alegre, RS. Porto Alegre**; 2009. 91p. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Ciências Biológicas] Universidade Federal do Rio Grande do Sul. [\[Link\]](#).
7. Pinto LN. **Plantas medicinais utilizadas no município de Igarapé Miri, Pará. Belém**; 2008. 112p. Tese de Doutorado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas] Universidade Federal do Pará. [\[Link\]](#).

8. Schwambach KH. **Utilização de plantas medicinais e medicamentos no autocuidado em Teutônia, RS**. Porto Alegre; 2007. 98 p. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas] Universidade Federal do Rio Grande do Sul. [\[Link\]](#).
9. Vendruscolo GS, Mentz LA. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais, por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Ser Bot**. 2006; 61(1-2): 83-103. ISSN: 2446-8231. [\[Link\]](#).
10. World Health Organization (WHO). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva; 2011. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
11. Silva BQ, Hahn SR. Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias. **R Bras Farm Hosp Serv Saúde** 2011; 2(3): 36-40. ISSN 2316-7750. [\[Link\]](#)
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS (Série B. Textos Básicos de Saúde)**. Brasília; 2006. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 3 mai. 2019.
13. Brasil. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Série B. Textos Básicos de Saúde)**. Brasília; 2006a. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
14. Matos FJA. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 2ª ed. Fortaleza: EUFC; 1994.
15. Brasil. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília; 2009. ISBN: 978-85-334-1597-3. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
16. Portugal. Universidade de Coimbra. **Observatório de Interações Planta-Medicamento: casos relatados**. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019
17. Gupta RC, Chang D, Nammi S, Bensoussan A, Bilinski K, Roufogalis BD. Interactions between antidiabetic drugs and herbs: an overview of mechanisms of action and clinical implications. **Diabetol Metab Syndr**. 2017; 9:59-70. ISSN 1758-5996. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
18. World Health Organization (WHO). **National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines: report of a WHO Global survey**. Geneva; 2005. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
19. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº. 466**, de 12 de dezembro de 2012. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 13 jun. 2013; Seção 1, n.112, p.59.
20. DATAPLAMT. **Banco de dados e amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas da UFMG**. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 19 dez. 2017.
21. Flora do Brasil 2020. *Mikania glomerata* Spreng.. Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 19 dez. 2017.
22. Lorenzi H, Matos FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum; 2002.
23. World Health Organization (WHO). **Monographs on selected medicinal plants**. Vol. 4. Genebra; 2009. 456p. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
24. World Health Organization (WHO). **Monographs on selected medicinal plants**. Vol. 1. Genebra; 1999. 294p. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
25. European Scientific Cooperative on Phytotherapy. **ESCOP Monographs: the scientific foundation for herbal medicinal products**. 2<sup>nd</sup> ed. United Kingdom: Thieme; 352p. 2003. ISBN: 1-901964-07-8.

26. Blumenthal M. **The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines**. Boston, MA, EUA: American Botanical Council; 1998. ISBN: 9780965555500.
27. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Memento fitoterápico da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA. 2016; 115p. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
28. Medline. **U.S. National Library of Medicine bibliographic data base**. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
29. SciELO. Scientific Electronic Library Online. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
30. Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil. Rio de Janeiro, PNUD, IPEA, Fundação João Pinheiro. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 21 dez. 2017.
31. Colet CF, Cavalheiro CAN, Molin GTD, Gavinatto AW, Schiavo M, Schwambach KH et al. Uso de plantas medicinais por usuários do serviço público de saúde do município de Ijuí/RS. **Rev Bras Med Fam Comunidade**. 2015; 36: 1-13. [\[CrossRef\]](#)
32. Miraj S, Alesaiiedi S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuitta chamomile* (chamomile). **Electron Physician**. 2016; 8(9): 3024-3031. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Alonso, J. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos**. Argentina, Rosario: Corpus Libros. 2004; ISBN: 987-20292-3-7.
34. Rio Grande do Sul. **Lei nº 11.858**, de 05 de dezembro de 2002. Institui a planta medicinal símbolo do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Diário Oficial [do Estado do Rio Grande do Sul]. Porto Alegre, RS, 6 dez. 2012; Seção 1, n.235.
35. Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde. **Portaria nº 588**, de 05 de dezembro de 2017. Institui a Relação Estadual de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde no Rio Grande do Sul e listas complementares. Diário Oficial [do Estado do Rio Grande do Sul]. Porto Alegre, RS, 22 dez. 2017.
36. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS**. Brasília; 2009. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai. 2019.
37. Simões CMO. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS; 1988. ISBN: 85-7025-127-0.
38. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H. Infection and diabetes: the case of glucose control. **Am J Med**. 1982; 72(3): 439-450. [\[CrossRef\]](#).
39. Brandão MGL, Freire N, Vianna-Soares CD. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Cad Saúde Públ**. 1998; 14(3): 613-616. ISSN 1678-4464. [\[CrossRef\]](#).
40. Melo JG, Nascimento VT, Amorim ELC, Andrade-Lima CS, Albuquerque UP. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). **Rev Bras Farmacogn**. 2004; 14(2): 111-120. ISSN 0102-695X [\[CrossRef\]](#).
41. Amaral FMM, Countinho DF, Ribeiro MNS, Oliveira MA. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Rev Bras Farmacogn**. 2003; 13(Supl.1): 27-30. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
42. Organización Mundial de La Salud (OMS). Promoción e desarrollo de La medicina tradicional: Informe de una reunión de La OMS. **Serie de Informes Técnicos**; 1978. ISBN: 13 9789243206226.

43. Maher RL, Hanlon J, Hajjar ER. Clinical consequences of polypharmacy in elderly. **Expert opin drug saf.** 2014; 13(1): 57-65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
44. Fick DM, Cooper JW, Wade WE, Walter JL, Maclean JR, Beers MH. Updating the Beers criteria for potentially inappropriate medication use in older adults. **Arch intern Med.** 2003; 163(22): 2716-2724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
45. Milic N, Milosevic N, Golocorbin Kon S, Bozic T, Abenavoli L, Borrelli F. Warfarin interactions with medicinal herbs. **Nat Prod Commun.** 2014; 9(8): 1211-1216. [[PubMed](#)].
46. Mckenna DJ, Jones K, Hughes K. **Botanical medicines: the desk reference for major herbal supplements.** 2<sup>a</sup> ed. Binghamton, NY: The Haworth Herbal Press; 2002. ISBN: 0-7890-1266-9.
47. Matos FJA. **Plantas medicinais usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 2<sup>a</sup> ed. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC; 2000. ISBN: 85-74850-08-X.
48. Adhyapak MS, Kachole MS. Investigation of adverse effects of interactions between herbal drugs and natural blood clotting mechanism. **J Thromb Thrombolysis.** 2016; 41(4): 644-647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
49. Gordon P, Khojasteh SC. A decades-long investigation of acute metabolism-based hepatotoxicity by herbal constituents: a case study of pennyroyal oil. **Drug Metab Rev.** 2014; 47(1): 12-20. ISSN 1097-9883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Korth, C. Drug-induced hepatotoxicity of selected herbal therapies. **J Pharm Pract.** 2014; 27(6): 567-572. ISSN 1531-1937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
51. Mentz LA, Lutzenberger LC, Schenkel EP. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Cad farm.** 1997; 13(1): 25-47. [[Link](#)].
52. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira.** Brasília, DF: ANVISA; 2018. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 30 mai. 2019.

---

**Histórico do artigo** | **Submissão:** 31/05/2019 | **Aceite:** 12/02/2020 | **Publicação:** 31/03/2020

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

**Como citar este artigo:** Scheid T, Fajardo AP. Uso de plantas medicinais por idosos adscritos à atenção primária em Porto Alegre/RS e potenciais interações planta-medicamento. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 103-117. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/801>>. 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.



# Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero *Mikania*

Chemical composition, biological activity and safety of use of plants from genus *Mikania*

DOI 10.32712/2446-4775.2020.822

Coutinho, Lucas Amorim<sup>1</sup>; Gonçalves, Carolina Passarelli<sup>2</sup>; Marcucci, Maria Cristina<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>Complexo Hospitalar São Mateus. Rua Aclimação, 335, Bosque da Saúde, CEP 78050-040, Cuiabá, MT, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Anhanguera de São Paulo (UNIAN), Programa de Pós-graduação em Farmácia e Biotecnologia, Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305, Centro, Pirituba, CEP 05145-200, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências e Tecnologia, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Avenida Engenheiro Francisco José Longo, 777/778, Jardim São Dimas, São José dos Campos, SP, CEP 12245-000, SP, Brasil.

\*Correspondência: [cris\\_marcucci@yahoo.com.br](mailto:cris_marcucci@yahoo.com.br).

## Resumo

*Mikania*, guaco é utilizado popularmente há muitos anos, devido às propriedades medicinais atribuídas às folhas, incluindo a ação tônica, depurativa, antipirética e broncodilatadora, além de estimulante do apetite e antigripal. Também é empregado no tratamento de doenças respiratórias como asma e bronquite, na forma de xaropes para tosse. Várias dessas ações benéficas à saúde foram comprovadas cientificamente. Estudos foram publicados sobre a ação direta do guaco causando broncodilatação e relaxamento da musculatura lisa respiratória, o que pode estar relacionado ao bloqueio dos canais de cálcio, acompanhado de ações anti-inflamatória e antialérgica, sendo estas benéficas ao tratamento da asma, problema caracterizado por obstrução e inflamação das vias aéreas. Conforme indicações da ANVISA recomenda-se o uso do guaco sob as formas de tintura e extrato, sendo a cumarina o marcador de escolha no controle de qualidade da matéria prima e de produtos fitoterápicos contendo essa droga vegetal. Nesse trabalho, apresenta-se uma revisão sobre plantas do gênero *Mikania*, incluindo a farmacobotânica, a composição química, atividades biológicas e farmacológicas, interações medicamentosas, toxicidade e controle de qualidade.

**Palavras-chave:** Gênero *Mikania*. Guaco. Composição química. Atividade. Controle de qualidade.

## Abstract

*Mikania*, guaco has been popularly used for many years because its medicinal properties, attributed to leaves, including tonic, depurative, antipyretic and bronchodilatory actions, as well as appetite stimulant and anti-influenza. It is also used in the treatment of respiratory diseases such as asthma and bronchitis, in the form of cough syrups. Several of these health benefits have been scientifically proven. Studies have been published about the action of guaco causing bronchodilation and relaxation of the respiratory smooth muscle,

which may be related to calcium channel blockade, accompanied by anti-inflammatory and anti-allergic actions, which are beneficial to the treatment of asthma, a problem characterized by obstruction and inflammation of the airways. According to ANVISA indications it is recommended to use as tincture and extract forms. Coumarin is the marker of choice in the quality control of the raw material and phytotherapeutic products containing this plant. In this work, a review is presented on plants of the genus *Mikania*, including pharmacobotanical, chemical composition, biological and pharmacological activities, drug interactions, toxicity and quality control.

**Keywords:** Genus *Mikania*. Guaco. Chemical composition. Activity. Quality control.

---

## Introdução

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas há muito tempo, na tentativa de se descobrir novos princípios ativos para o tratamento de doenças<sup>[1]</sup>. A fitoterapia foi um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos, além de ser por muito tempo a única terapia disponível ao homem. Em algumas ocasiões, as plantas curavam, em outras matavam ou produziam graves efeitos colaterais, sendo, portanto, essencial o uso responsável, racional, seguro e não abusivo das mesmas<sup>[1]</sup>.

A ANVISA<sup>[2]</sup> dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, definindo um fitoterápico como:

Produto obtido de matéria prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal.

Não podem ser registrados como fitoterápicos aqueles medicamentos que contenham substâncias ativas isoladas na sua composição, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais<sup>[3-6]</sup>. Os medicamentos fitoterápicos devem ser obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia estejam baseadas e evidenciadas em estudos clínicos e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade<sup>[2,7]</sup>.

O comércio de plantas medicinais opera com várias espécies nativas brasileiras como, por exemplo, a *Mikania glomerata* Sprengel<sup>[8]</sup>. Entre as diversas plantas na Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado, publicada pela ANVISA <sup>[4]</sup>, e entre as incluídas nas edições da Farmacopeia, está a *Mikania glomerata*, popularmente conhecida como guaco<sup>[3,9]</sup>. Essa espécie é tão importante que foi incluída já na primeira edição da Farmacopeia Brasileira, em 1929<sup>[10]</sup>. Além disso, na RDC 10, de 10 de março de 2010, a ANVISA publicou medidas, esclarecendo quando e como as plantas medicinais devem ser utilizadas, garantindo os efeitos benéficos e evitando que o uso incorreto possa causar efeitos indesejáveis e toxicidade<sup>[1,11]</sup>. O guaco está incluído nessas normas atualizadas<sup>[2]</sup>.

O guaco também conhecido como erva-de-serpentes, cipó-catinga ou erva-de-cobra, é uma trepadeira volúvel, glabra. Folhas simples, opostas, ovadas e oblongo-lanceoladas, de base obtusa e ápice agudo, de até 15 cm de comprimento e 7 cm de largura, com três nervuras bem evidentes, pecioladas, carnosos-coriáceas, verde-brilhantes na face superior, mais pálidas na inferior. Flores hemafroditas, reunidas em número de quatro capítulos, iguais entre si, de papus branco e corola tubulosa, de cor branco-creme;

capítulos agrupados em ramos espiciformes congestos, ou em glomérulos. Fruto tipo aquênio, glabro<sup>[12,13]</sup>. Sua composição química é constituída de sesquiterpenos e diterpenos, estigmasterol, flavonoides, cumarinas, resinas, taninos, saponinas, guacosídeos e ácido clorogênico<sup>[1,14-16]</sup>, sendo seu marcador químico a cumarina<sup>[16,17]</sup>. É uma planta medicinal utilizada contra gripe, rouquidão, infecção na garganta, tosse, bronquite. Pertence a família das Compositae e tem sua distribuição como espécie nativa do sudeste ao sul do Brasil, de São Paulo ao Rio Grande do Sul. O uso do guaco como planta medicinal é muito antigo. Em 1870, chegou a ser criado um produto preparado com hastes e folhas da planta - era o Opodeldo de Guaco - que durante décadas foi considerado um “santo remédio” contra bronquite, tosse e reumatismo. O guaco também sempre foi muito conhecido pelos índios brasileiros, que usavam a planta para combater o veneno das serpentes (daí vem alguns dos seus nomes populares). Ainda hoje, em algumas regiões do Brasil, o macerado das folhas é aplicado em forma de cataplasma sobre picadas de cobras e outros animais peçonhentos. Existe também a tradição de usar a planta fresca e nova (cujas folhas emanam um aroma intenso e agradável) para manter as cobras afastadas<sup>[1]</sup>.

Atividades farmacológicas como hipoglicemiante, antidiarréica, anti-*Trypanosoma cruzi*, antioxidante, alelopática, anticonvulsivante e antimalárica também são descritas na literatura para plantas do gênero *Mikania*<sup>[18-23]</sup>. Popularmente, o guaco continua sendo usado para tratar reumatismo, infecções intestinais e cicatrizar ferimentos<sup>[17,24]</sup>.

A proposta deste trabalho foi realizar uma revisão sobre plantas do gênero *Mikania*, especialmente o guaco, apresentando algumas das suas características, bem como o controle de qualidade da planta.

## Material e Método

Foi realizada uma revisão sistemática, consistindo em uma pesquisa por diversas bases de dados como Medline (PubMed), ScienceDirect, Scopus, Lilacs, Scielo, Google Scholar e Periódicos Capes sem seleção prévia de datas para busca de todos os artigos disponíveis até julho de 2019. A pesquisa foi realizada usando as seguintes palavras-chave: "*Mikania*", "*Mikania glomerata*", "*Mikania laevigata*", "Guaco", "Composição química", "Controle de qualidade", "Farmacologia" e "Farmacobotânica". Também se utilizou a estratégia de combiná-las: "*Mikania*" e "Farmacologia" ou "*Mikania*" e "toxicologia", ou "*Mikania*" e "Farmacobotânica" ou "*Mikania*" e "Composição química", ou "*Mikania*" e "Controle de qualidade", "Guaco" e "Farmacologia" ou "Guaco" e "Toxicologia", ou "Guaco" e "Farmacobotânica" ou "Guaco" e "Composição química", ou "Guaco" e "Controle de qualidade". Somente artigos científicos publicados em periódicos, resumos de conferências, dissertações e teses foram selecionados. Este trabalho está organizado em cinco seções, que abordam as características farmacobotânicas, a composição química, atividade biológica, atividade toxicológica e o controle de qualidade da planta, através de resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* e estudos clínicos<sup>[25,26]</sup>.

## O gênero *Mikania*

O grupo mais numeroso dentro das Angiospermas é a família Asteraceae, que compreende cerca de 1100 gêneros e 25000 espécies. É constituída por plantas com características variadas, incluindo geralmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores<sup>[27]</sup>. Aproximadamente 98% dos gêneros são compostos por plantas de pequeno porte que são encontradas em todos os tipos de habitats, principalmente nas regiões

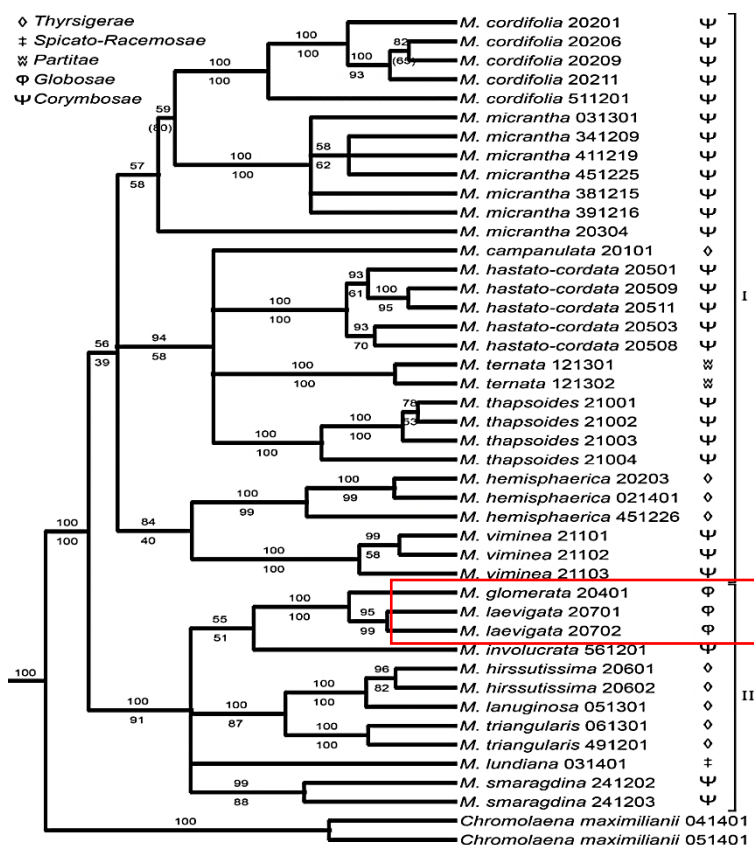


tropicais montanhosas da América do Sul<sup>[28]</sup>. Na constituição desta família, a composição química torna-se mais importante do que a morfologia, devido à presença de várias classes de metabólitos secundários<sup>[1,29]</sup>.

O gênero *Mikania*, pertencente à família Asteraceae e à tribo Eupatorieae, tem cerca de 430 espécies distribuídas principalmente na América do Sul. No Brasil, o gênero está representado por aproximadamente 171 espécies. A *Mikania* é um dos gêneros mais estáveis dessa tribo, embora as espécies sejam de difícil delimitação, devido a grande variabilidade morfológica que estas plantas apresentam<sup>[1]</sup>. Várias espécies do gênero *Mikania* de hábito trepador recebem a denominação vulgar de “guaco”. *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, conhecida como “guaco”, “guaco-de-casa” e “guaco-do-mato”, é uma espécie nativa do Brasil<sup>[30]</sup>.

Rodrigues et al<sup>[30]</sup> coletaram 16 espécies de *Mikania* representando as cinco seções propostas por Barroso<sup>[31]</sup>, totalizando 42 amostras, e dois indivíduos de *Chromolaena maximiliani* (Schrad.) R. M. King & Rob. como grupo externo. As árvores geradas pelos dois métodos foram combinadas pelo software TreeGraph 2 (FIGURA 1).

FIGURA 1: Árvore filogenética combinada de *Mikania*, construída pelo método *Neighbor-Joining* e Inferência Bayesiana, por meio de marcadores moleculares AFLP.



Fonte: Rodrigues et al.<sup>[30]</sup>

Neste estudo filogenético, Rodrigues et al.<sup>[30]</sup> observou que as espécies *M. micrantha* Kunth e *M. cordifolia* (L.f.) Willd. formam um grupo parafilético, uma vez que, *M. micrantha* Kunth não engloba todos os descendentes do ancestral comum. Entretanto, as espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* assim como, *M. hirsutissima* DC e *M. lanuginosa* D.C são espécies irmãs com 100% de probabilidade posterior e 100% de bootstrap<sup>[32]</sup>.

Dentre as espécies de *Mikania Willdenow*, pertencentes à secção *Globosae* Robinson destacam-se algumas de utilização medicinal, a saber, *M. cordifolia* (L.f.) Willd., *Mikania scandens* (L.) Willd., *Mikania officinalis* Mart., *Mikania opifera* D.C., *M. glomerata* Sprengel e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker<sup>[33,34]</sup>. As espécies mais utilizadas são a *M. glomerata* e a *M. laevigata*, conhecidas popularmente como guaco<sup>[8]</sup>.

As espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*, amplamente empregadas pela população, apresentam semelhanças morfoanatômicas, sendo comercializadas indistintamente<sup>[8,34]</sup>.

A espécie *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) foi oficializada como fitofármaco na primeira edição da Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil<sup>[10]</sup> e reconhecidamente, apresenta propriedades biológicas e farmacológicas. A cumarina é uma das substâncias associadas a essas propriedades<sup>[34-37]</sup>.

### Farmacobotânica do guaco

A *Mikania glomerata* é um subarbusto silvestre, escandente, de folhagem densa e perene, com caule cilíndrico, ramificado e glabro. Quando seco, o caule apresenta fratura fibrosa e aspecto estriado no sentido longitudinal, enquanto que, estando jovem, apresenta coloração verde-claro passando a arroxeada e a cinzento-escuro nas partes suberificadas. As folhas são pecioladas, cordiforme-deltoides, oval lanceoladas, tri ou pentanervadas e agudas no ápice. A **FIGURA 2** mostra alguns aspectos da *M. glomerata*<sup>[30,37]</sup>. As flores são esbranquiçadas e carnosas, dispostas em inflorescência panícula tirsoide, com até 30 cm de comprimento, onde os capítulos se encontram reunidos em glomérulos (**FIGURA 2**). As bractéolas são lineares e apresentam medidas próximas a 2 mm de comprimento. O aquênio é pentangular, com aproximadamente 3 mm<sup>[38]</sup>. O guaco tem seu habitat nas margens dos rios, crescendo espontaneamente em matas primárias, capoeiras, capoeirões, orla de matas, terrenos de aluvião, várzeas sujeitas a inundações e possui boa adaptação ao cultivo doméstico. A planta é bastante procurada por abelhas melíferas durante a época da floração. Reproduz-se por sementes ou plantio de estacas do caule, preferencialmente em terrenos arenosos e úmidos<sup>[1,39,40]</sup>.

**FIGURA 2:** Guaco (*M. glomerata*). Detalhe da folha (A), Inflorescência (B), detalhes do fruto: Pa = papus; Es = Estigma; Fr = fruto; Pe = pétala; Barra 0,25 cm.



Fonte: Costa et al.<sup>[41]</sup>.

A identificação das espécies de *Mikania* permanece um dilema, tendo em vista a grande diversidade fenotípica encontrada entre algumas espécies, principalmente em *Mikania glomerata*. Isso pode resultar em uso incorreto de espécies diversas de guaco como sendo aquela indicada na Farmacopeia Brasileira e aprovada atualmente pelos órgãos oficiais de saúde no Brasil<sup>[42,43]</sup>.

As populações existentes de guaco na Mata Atlântica e nos cultivos domésticos apresentam ampla variabilidade fenotípica, principalmente nos aspectos morfológicos foliares (**FIGURA 3**) e também no rendimento de biomassa e conteúdo de cumarina [43-45].

**FIGURA 3:** Plasticidade fenotípica foliar de *Mikania glomerata* (A), inflorescência e detalhe de capítulos (B).



Fonte: Silva Junior et al. [43].

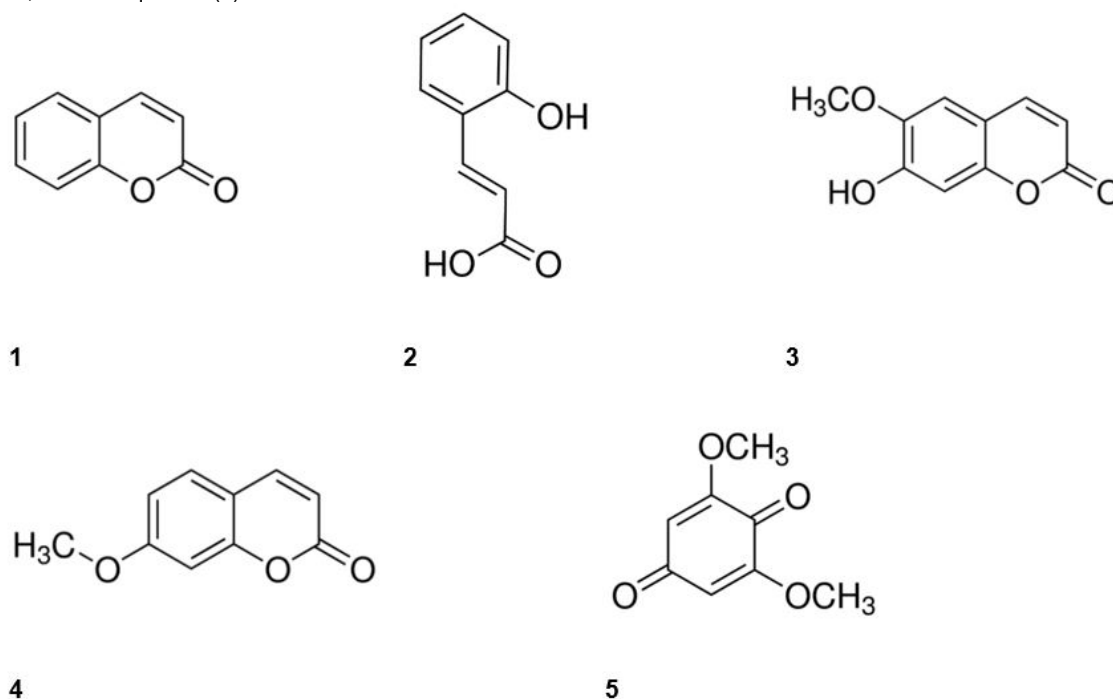
Quanto aos teores de cumarina, o quimiótipo Q-MLF apresentou baixo teor deste ativo marcador da espécie, ao passo que amostras de *M. glomerata* Q-P obtidas no Banco de Germoplasma de Bioativas da Epagri - Estação Experimental de Itajaí revelaram a presença de altos níveis de cumarina nas folhas. É importante lembrar que a cumarina ocorre apenas em 20% das espécies de *Mikania* [46], e sua principal ocorrência acontece nas espécies *M. micranta* Kunth; *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker e *M. glomerata* Spreng.

#### Fitoquímica do o gênero *Mikania*

Diferentes classes de compostos foram isoladas a partir de várias partes de *Mikania*, podendo ser associados a atividades farmacológicas desta planta. Os principais grupos são: cumarinas e derivados, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, fitoesteróis, terpenóides e flavonoides. Derivados de ácidos cafeioquinóicos, além de outros compostos, são encontrados em menor quantidade. Diterpenos como caurenóico e ácido benzoilgrandiflorico (da classe dos cauranos), também têm atraído o interesse por sua ação farmacológica. Além disso, outras substâncias foram encontradas em espécies de *Mikania*, como álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos e ésteres orgânicos [1,14,47].

A classe mais característica dos compostos no gênero *Mikania* é a das cumarinas e seus derivados [48-50]. Existem quatro subtipos cumarínicos principais: os cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas substituídas por pirona. A cumarina (1,2-benzopirano) e o ácido *o*-cumárico foram identificados em extratos de *M. glomerata* [51] e *M. laevigata* [35]. Herz e Kulanthaivei [52] descobriram nas partes aéreas de *M. congesta* DC, proveniente do estado do Pará, alguns compostos semelhantes, tais como escopoletina e *o*-geranilescopoletina. Em *M. shushunensis* W.C.Holmes & McDaniel, coletada no Peru, foram encontradas a herniarina (7-metoxicumarina) e a 2,6-dimetoxiquinona (**FIGURA 4**).

**FIGURA 4:** Estruturas químicas da cumarina (1) e derivados: ácido o-cumárico (2), escopoletina (3), 7-metoxicumarina e 2,6-dimetoxiquinona (5) encontrados em *Mikania*.



Fonte: www.sial.com

Já foram identificadas cerca de 1.300 cumarinas em fontes naturais, como vegetais, fungos e bactérias, sendo encontradas principalmente nas famílias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Oleaceae*, *Moraceae*, *Thymeleaceae*, *Apiaceae* e *Rutaceae*. No guaco, a cumarina é utilizada no controle de qualidade na produção dos extratos, devido ao aroma característico que concede às folhas<sup>[1,50]</sup>.

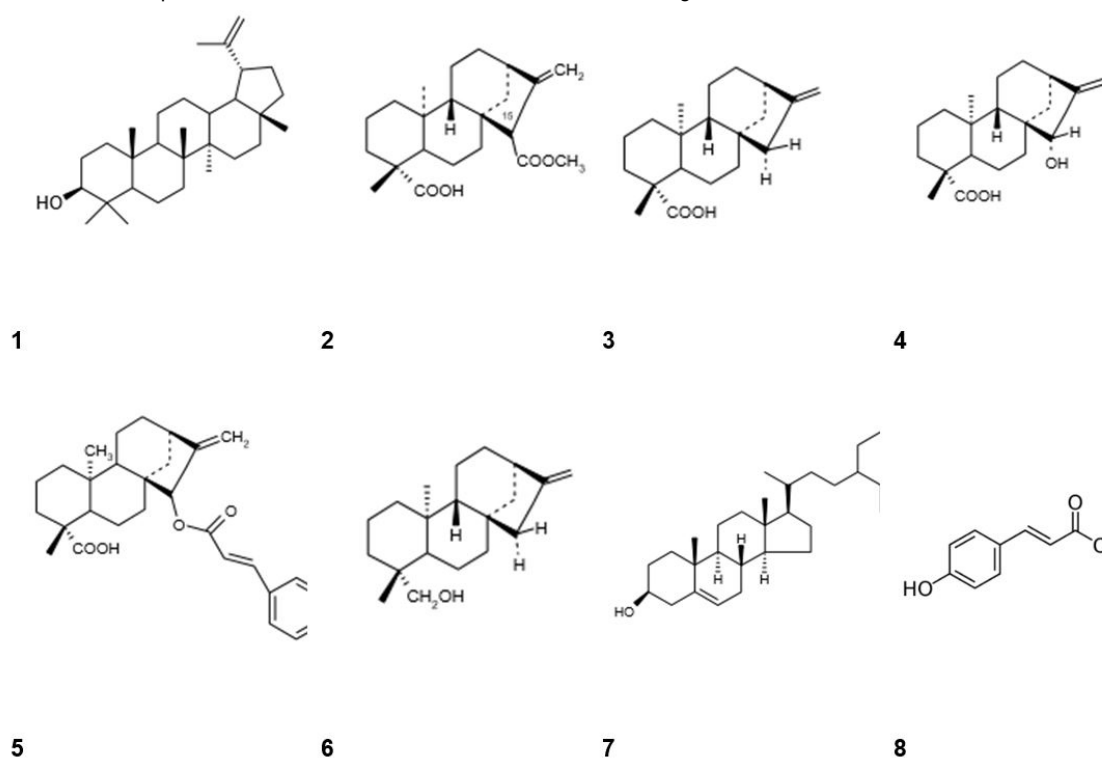
A cumarina é frequentemente associada a atividade farmacológica. Uma grande variedade de atividades biológicas é atribuída a estes compostos, tais como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitumoral, anticoagulante, broncodilatadora e antioxidante<sup>[48,49]</sup>.

Os sesquiterpenos também são abundantes no gênero *Mikania*, sendo os mais frequentes o germacreno D, isocomeno e  $\gamma$ -humuleno. Estes compostos foram relatados em cerca de 20% das espécies de *Mikania* as quais possuem a sua composição química determinada, entre elas *M. arrojadoi* Mattf.<sup>[53]</sup>, *M. officinalis* Mart, *M. sessilifolia* D.C, *M. luetzelburgii* Mattf e *M. belemii* R.M.King & H.Rob.<sup>[54]</sup>. Da mesma forma, terpenos, diterpenos e lactonas sesquiterpênicas são frequentemente encontradas, principalmente as dilactonas derivadas dos tipos mikanolida e miscandenina, que têm atividade analgésica<sup>[55]</sup>, antibacteriana<sup>[56]</sup> e antitumoral<sup>[57]</sup>. Alguns diterpenos são comuns no gênero *Mikania*, como o ácido caurenóico, o principal componente de extrato etanólico de *M. obtusata* D.C<sup>[58]</sup> e *M. glomerata*<sup>[59]</sup>, que é caracterizado pela sua atividade tripanocida. Também o ácido caurenóico tem outras atividades importantes, como antimicrobiana, antinociceptiva, anti-inflamatória e relaxante do músculo liso <sup>[14,47,60-62]</sup>.

Em *M. laevigata* os principais representantes são o ácido cinamoilgrandiflórico, isopropiloxigrandiflórico, ácido isobutiloxigrandiflórico e kaurenol<sup>[35,63-66]</sup>. Além disso, em partes aéreas de *M. oblongifolia* D.C foram encontrados terpenos do tipo cinamoilgrandiflórico além de outros<sup>[67]</sup>. Cruz e Roque<sup>[68]</sup> isolaram a partir de caules de *M. triangularis*, encontrados no Estado de São Paulo, um novo ácido diterpênico, metil-*ent*-7- $\alpha$ -hidroxipimara-8,15-dien-19-oato de etila e outros ácidos diterpênicos, metil-*ent*-pimara-9, 15-dien-19-oato

de metila, metil-*ent*-pimara-8,15-dien-19-oato de metila, metil-8,9 $\alpha$ -epoxi-*ent*-pimara-15-en-19-oato de metila, metil-7 $\beta$ -hidroxi-*ent*-pimara-8,15-dien-19-oato de etila e metil-7 $\alpha$ -hidroxi-*ent* pimara-8,15-dien-19-oato de metila. Além disso, a fração ácida do extrato hexânico é composta por vários ácidos pimariânicos, que mostraram atividade antibacteriana<sup>[69]</sup>. Em um estudo realizado por Nunez et al.<sup>[70]</sup>, nas folhas de *Mikania sp. (nov.)* encontradas no Estado da Bahia, foram encontrados vários diterpenos: metil éster do ácido  $\lambda$ -8(17),12,14-trien-19-oico, metilester do ácido pimara-9(11),15-dien-19-oico, metil éster do ácido  $\lambda$ -8(17),13(16),14-trien-19-oico, metil éster do ácido  $\lambda$ -12 $\alpha$ -epoxy-(17),14-dien-19-oico, metil éster do ácido  $\lambda$ -12 $\beta$ -epoxy-8(17),14-dien-19-oico, ácido eritroxila-3,15-dien-19-oico, ácido  $\lambda$ -12,15-epoxy-8(17),13-dien-19-oico e metil éster do ácido  $\lambda$ -12,13-di-idroxi-8(17),14-dien-19-oico. A **FIGURA 5** mostra alguns metabólitos secundários encontrados em *M. glomerata*<sup>[71]</sup>.

**FIGURA 5:** Principais metabólitos secundários encontrados em *Mikania glomerata*.



Onde: lupeol (1), ácido  $\alpha$ -isobutiriloxi-caur-16-en-19-oico (2), ácidos diterpênicos: caurenóico (3), grandifloróico (4), cinamoilgrandifloróico (5); caurenol (6),  $\beta$ -sitosterol (7) e ácido *o*-cumárico (8). Fonte: Santos (2005).

Os fitoesteróis mais comuns estão presentes em aproximadamente 10% das espécies de *Mikania*, que possuem a sua composição química determinada, entre eles estigmasterol, lupeol e sitosterol. Estes compostos foram identificados nas partes aéreas e são encontrados nas espécies *M. micrantha* Kunth<sup>[72,73]</sup>, *M. glomerata* Spreng.<sup>[74]</sup>, *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob<sup>[75,76]</sup>, *M. cordifolia* (L.f.) Willd.<sup>[77]</sup>, *M. minima* (Baker ex Baker) B.L.Rob.<sup>[78]</sup>, *M. hoehnei* B.L.Rob.<sup>[79]</sup>, *M. alvimii* R.M.King & H.Rob., *Mikania grazielae* R.M.King & H.Rob.<sup>[80]</sup>, *M. pseudohoffmanniana* G.M.Barroso ex W.Holmes<sup>[81]</sup>, *M. stipulacea* (Vahl) Willd.<sup>[82,83]</sup> e *M. pohlii* (Baker) R.M.King & H.Rob.<sup>[53]</sup>.

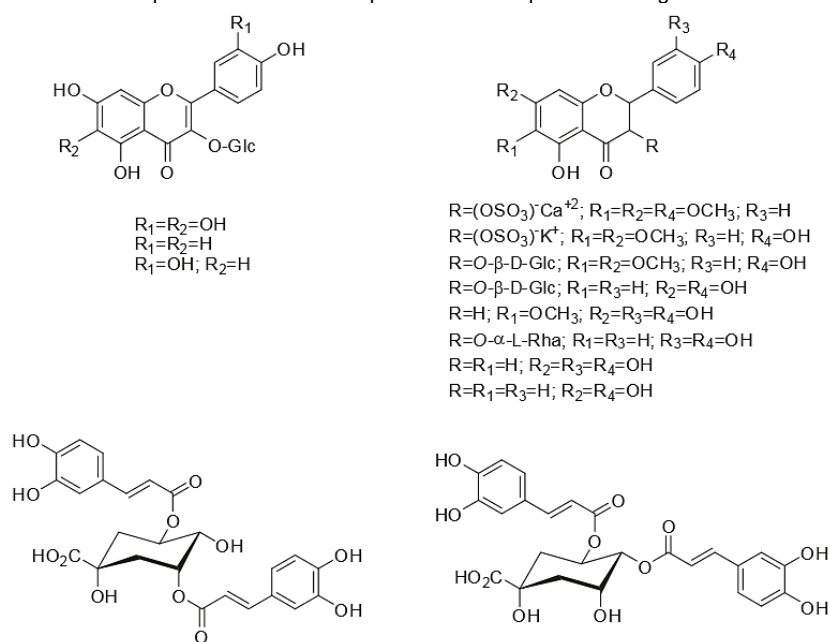
A presença de outros fitoesteróis comuns como campesterol e taraxasterol foi relatada em espécies como *M. cordifolia* (L.f.) Willd.<sup>[83]</sup>, *M. laevigata*<sup>[53]</sup>, *M. hoehnei* B.L.Rob.<sup>[82]</sup> e *M. parodii* Cabrera<sup>[76]</sup>.

Os terpenóides amirina e friedelina, abundantes no gênero *Mikania*, foram relatados em *M. micrantha* Kunth, *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob, *M. cordifolia* (L.f.) Willd<sup>[83]</sup>, *M. minima* (Baker ex Baker) B.L.Rob. e *M. lasiandrae* DC<sup>[84,85]</sup>, entre outras espécies. Outros terpenóides menos comuns, mas igualmente importantes com respeito à atividade antioxidante, tais como o esqualeno, foram encontrados em várias espécies como *Mikania grazielae* R.M.King & H.Rob.<sup>[80]</sup>, *M. sessilifolli* DC, *M. luetzelburgii* Mattf e *M. officinalis* Mart<sup>[54]</sup>.

Entre os representantes exóticos de terpenóides presentes no gênero *Mikania*, foram relatados  $\tau$ -muurolool em *M. hookeriana* DC<sup>[86]</sup>, estigmasta-4, 22-dien-3-ona em *M. microptera* DC, olean-9 (11), 13-dien-3-ona em *M. rimachii* W.C.Holmes & McDaniel<sup>[87]</sup> e 19,20-dihidroxi-16-oxo-geranil em *M. luetzelburgii* Mattf<sup>[47,54]</sup>.

Os flavonoides são conhecidos principalmente quanto à sua atividade antioxidante e estão amplamente presentes no gênero *Mikania*. Em *M. laevigata* foram identificados flavonoides heterosídeos como patuletina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, canferol 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e 3,3',5-tri-hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, entre outros<sup>[76]</sup>. Em *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob, os flavonoides descritos foram patuletina-3-O- $\beta$ -D-6"-(p-cumaroil), glicosídeo (6-metoxiquercetina-3-O- $\beta$ -D-6"- (p-cumaroil) glicosídeo), mikanin-3-O-sulfato (sal de Ca<sup>2+</sup>), eupalitin-3-O-sulfato (como sal de K<sup>+</sup>), eupalitin-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo, 6- metoxicanferol-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo, nepetina e canferol-3-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo<sup>[77]</sup>. Na mesma espécie foi relatado o isolamento de uma flavona, a mikanina (3,5-di-hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona) e epifriedelinol a partir de raízes e do ácido fumárico a partir de folhas e caules<sup>[75]</sup>. Em *M. cordifolia* (L.f.) Willd um derivado de quercetina foi identificado como quercetina-3-O-glicosídeo. Em *M. micrantha* Kunth foram isolados e identificados eupalitina, eupafolina, luteolina<sup>[88]</sup>, mikanina, alpinetina, mikanina-3-O-sulfato<sup>[72,73,89-91]</sup>. Na mesma espécie foi identificada a 3,4',5,7-tetrahidroxi-6-metoxiflavona-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo<sup>[92]</sup>. Os flavonoides canferol-3-O-glicosídeo e quercetina-3-O-glicosídeo foram identificados em e *M. parodii* Cabrera<sup>[84]</sup>. A naringenina foi identificada em *Mikania grazielae* R.M.King & H.Rob.<sup>[80]</sup> e um derivado de flavona, a batatifolina foi encontrada em *M. batatifolia* DC<sup>[93]</sup>. Uma revisão sobre a presença de flavonoides em *Mikania* foi relatada por Rufatto et al.<sup>[47]</sup>. A FIGURA 6 mostra os principais flavonoides identificados em *Mikania*.

FIGURA 6: Principais flavonoides e compostos fenólicos presentes no gênero *Mikania*.



Fonte: Rufatto et al.<sup>[47]</sup>.



O ácido 5-cafeoilquínico é um éster de ácido cafeico, também conhecido como ácido clorogênico, normalmente encontrado num grande número de plantas, por exemplo, no café e na própolis. É produzido em plantas através de uma ligação éster entre o grupo carboxila do ácido cafeico e o grupo 5-hidroxila do ácido quínico<sup>[94]</sup>. O ácido clorogênico e o ácido cafeico foram relatados como atenuantes do risco de doenças crônicas, como a inflamação, doenças cardiovasculares e câncer<sup>[95,96]</sup>. Em *M. micrantha* Kunth foi relatada a presença do éster de ácido n-butil-3,5-di-O-cafeoilquínico e do éster do ácido n-butil-3,4-di-O-cafeoilquínico<sup>[88]</sup>. Para o mesmo ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico foi relatada a presença em *M. cordifolia* (L.f.) Willd, além de outros derivados, como 5-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico e do ácido 3-O-feruloil-5-O-cafeoilquínico<sup>[84]</sup>. Em *M. lasiandrae* DC também foi relatada a presença de ácido cafeoilquínico<sup>[85]</sup>. Em *M. hirsutissima* DC foi descrita a presença de ácido 1,5-dicafeoilquínico<sup>[47,97,98]</sup>.

Apesar da ampla quantidade de estudos sobre *Mikania*, nota-se a carência de trabalhos que englobem os principais pontos referentes ao uso de uma espécie de planta medicinal, a rota biossintética dos metabólitos secundários, propriedades biológicas (farmacológicas e tóxicas) dos mesmos, morfoanatomia da espécie vegetal, assim como fatores intrínsecos e do meio (por exemplo, luz, vento, calor, chuva) que alteram o potencial de biossíntese<sup>[1,52,99-101]</sup>.

### Atividades biológicas e farmacológicas no gênero *Mikania*

As espécies de *Mikania* têm múltiplas ações farmacológicas. Em geral, a atividade se dá no trato respiratório, além de anti-inflamatória, antialérgica, analgésica, antioxidante, atuando também no sistema nervoso central<sup>[47,102]</sup>.

Usualmente administrada na forma de xarope, tintura, extrato fluido, decocto ou infuso, preparações empregando-se extratos de droga vegetal *Mikania* têm suas atividades farmacológicas frequentemente, relacionadas com a presença de cumarina (1,2-benzopirona)<sup>[103]</sup>. A seguir, são relatadas algumas atividades biológicas e farmacológicas do gênero *Mikania*.

Baratto et al.<sup>[21]</sup> investigaram a atividade antimicrobiana de extratos de *Mikania*. Concluíram que não houve formação de halo de inibição na presença de nenhum dos extratos de *M. laevigata*, sendo que nas concentrações testadas não houve atividade antibacteriana significativa para as linhagens de *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*, ATCC 25923), *Escherichia coli* (*E.coli*, ATCC 25992), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*, ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*, ATCC 29212) e *Enterococcus faecium* (*E.faecium*, ATCC 10541). Estes resultados foram, segundo os autores, inesperados, considerando o uso popular da espécie como antisséptico.

A cumarina é considerada uma das substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana do guaco<sup>[104]</sup> e sua presença já foi comprovada em *M. laevigata*. Em um estudo com essa espécie, comprovou-se a atividade inibitória do extrato etanólico sobre o crescimento e a adesão celular de *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), micro-organismos associados às cáries dentais. Acredita-se que os ácidos cupressênico, diterpênico e caurenóico possam ser responsáveis por esta atividade<sup>[65,105]</sup>.

O óleo essencial de outra espécie de guaco, *M. glomerata*, exibiu uma forte atividade contra *Candida albicans* (*C.albicans*). Dentre os componentes do óleo essencial, alguns apresentaram atividade antimicrobiana, incluindo 1,8-cineol, limoneno, linalol, geranial, germacreno-D e mentol<sup>[106,107]</sup>. As frações



obtidas em diclorometano, acetato de etila e n-butanol a partir de *M. lanuginosa* DC e o ácido caurenóico apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), mas foram inativos contra bactérias Gram-negativas (*P.aeruginosa*, *E.coli* e *Bacillus cereus*)<sup>[106,108]</sup>. O extrato etanólico das folhas de *M. hirsutissima* DC não exibiu atividade antibacteriana contra *E. coli*, no entanto mostrou-se ativo contra *S. aureus*<sup>[106,109]</sup>.

Da Penha et al.<sup>[110]</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana da própolis e do guaco utilizados na manipulação de medicamentos frente a cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853 IAL1026), *E. coli* (ATCC 10536), *S. aureus* (ATCC 25923 IAL1606), *Salmonella sp* (ATCC 19196), *Candida albicans* (*C. albicans*) (ATCC 64550), as quais são comumente causadoras de infecções em humanos. Os autores concluíram que os produtos naturais comumente utilizados na medicina popular brasileira apresentaram atividade antimicrobiana. A tintura de *M. glomerata* apresentou forte atividade, com inibição de quatro em cinco cepas utilizadas no estudo. O extrato puro de *M. glomerata* foi capaz de inibir as cepas de *S. aureus* e *C. albicans*. Os resultados apresentam uma expressiva contribuição para a caracterização da atividade antimicrobiana de produtos naturais largamente utilizados na medicina popular.

Estudos avaliaram a composição química de extratos do guaco e sua atividade antimicrobiana sobre *S.mutans*. Observou-se um efeito inibitório efetivo sobre as cepas bacterianas e inibição da aderência dos micro-organismos à superfície do vidro. A ação antimicrobiana de *M. glomerata* classifica-a como fonte promissora de novos agentes terapêuticos<sup>[65]</sup>, o que pode ser observado pela ação dos óleos essenciais de *M. glomerata* na atividade contra candidíase<sup>[107]</sup>. As cumarinas apresentam atividade citotóxica, anti-HIV1 pela inibição da transcriptase reversa, antifúngica, inseticida, vasodilatadora coronariana através da inibição da cAMPfosfodiesterase e anticoagulante, inibindo a formação de tromboxana nas plaquetas<sup>[1,111]</sup>.

O tratamento com *M. glomerata* também está indicado em casos de pneumoconiose, que é caracterizada por inflamação pulmonar causada pela exposição ao pó de carvão. A utilização reduz a infiltração pulmonar inflamatória induzida pelo pó de carvão, o que aponta o fitoterápico como preventivo de lesão pulmonar oxidativa<sup>[1,112]</sup>.

Moreira et al.<sup>[113]</sup> investigaram a atividade antimicrobiana de extratos de *M. glomerata*, sendo atribuída ao maior teor de um diterpeno do tipo kaurano (KA) (o ácido *ent*-kaurenóico) presente planta. Os autores desenvolveram um extrato de *M. glometara* rico em KA (KAMg) e avaliaram-no como uma nova proposta de ingrediente à base de plantas para ser usado em produtos para cuidados orais. Assim, descreveram a preparação de tal extrato, bem como o desenvolvimento de um método validado por HPLC-DAD para determinar o conteúdo de KA. Avaliaram então esse extrato contra várias bactérias cariogênicas em comparação com KA. Concluíram que o extrato de KAMg inibiu o desenvolvimento de alguns micro-organismos responsáveis pela cárie dentária, sendo mais efetivo na inibição de *S.mutans*, inclusive impedindo a formação do biofilme.

Algumas plantas atuam no trato respiratório como as do gênero *Mikania* cuja eficácia já foi confirmada. O guaco (*M. glomerata* e/ou *M. laevigata*) é usado na cultura popular há séculos devido às propriedades das folhas, que incluem ação tônica, depurativa, antipirética e broncodilatadora, além de estimulante do apetite e antigripal<sup>[114]</sup>. É ainda empregado no tratamento da asma, bronquite e adjuvante no combate à tosse<sup>[1,115]</sup>.

Estudos relataram que o guaco age diretamente causando broncodilatação e relaxamento da musculatura lisa respiratória, o que pode estar relacionado ao bloqueio dos canais de cálcio, acompanhado de ações anti-inflamatória e antialérgica<sup>[100,116]</sup>, que são extremamente benéficas ao tratamento da asma, a qual caracteriza-se por obstrução e inflamação das vias aéreas e, resposta broncodilatadora exagerada<sup>[1,72]</sup>.

Apesar de possuir várias indicações terapêuticas populares, somente a ação broncodilatadora, antitussígena, expectorante e edematogênica sobre as vias respiratórias foram comprovadas<sup>[1,76]</sup>.

Por exemplo, a *M. glomerata*, uma das espécies mais importantes e comumente utilizadas no gênero *Mikania*, tem sido popularmente usada no tratamento de asma, bronquite e tosse<sup>[47,50,115,117]</sup>. Outras espécies, conhecidas como "guaco" são também utilizadas para tratar problemas respiratórios como *M. cordifolia* (L.f.) Willd<sup>[78,118]</sup>, *M. laevigata*<sup>[16,26]</sup> e *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob<sup>[119]</sup>. Outros estudos mostraram a utilização de *M. glomerata* e *M. laevigata* como expectorante, no tratamento de doenças da gripe e respiratórias <sup>[114,120]</sup>. A atividade broncodilatadora foi parcialmente atribuída a cumarina, através do relaxamento da musculatura lisa. Além disso, Moura et al.<sup>[117]</sup> verificaram que os extratos aquosos e hidroalcoólicos (HAE) obtidos de *M. glomerata* induziram uma inibição significativa sobre as contrações de histamina na traqueia isolada de cobaia. O HAE induziu uma concentração-dependente no relaxamento na traqueia de cobaia tratada com histamina (IC<sub>50</sub> 0,34 mg/mL), a acetilcolina (IC<sub>50</sub> 0,72 mg/mL) ou K<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub> de 1,41 mg/mL) e no brônquio humano isolado pré-contraído com K<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub> de 0,34 (0,26 - 0,42) mg/mL). Em estudos, avaliando-se o HAE de *M. laevigata* no tratamento de doenças respiratórias, verificou-se que o extrato produziu uma dose dependente no relaxamento no de dois tipos diferentes de epitélio de traqueia de ratos pré-contraídos com acetilcolina com uma concentração eficaz (EC<sub>50</sub>) de 1406,7 ng/mL e 1378,3 µg/mL, respectivamente, e um efeito máximo (Emax) de 94,7 e 95,7%, respectivamente<sup>[14,121]</sup>. Estes dados apoiam a indicação de que a *M. glomerata* e a *M. laevigata* podem ser usadas para o tratamento de doenças respiratórias broncoconstritoras<sup>[47]</sup>.

Nessa mesma espécie (*M. glomerata*), em ensaios com extratos: aquoso e hidroalcoólico, utilizando modelos de traqueia de cobaia e brônquio humano isolados verificou-se que o efeito relaxante sobre a musculatura lisa do trato respiratório pode estar relacionado ao bloqueio dos canais de cálcio, sendo que a presença de cumarina nos extratos não interferiu nos resultados. Em ensaios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* realizados com o extrato hidroalcoólico e uma solução padrão de cumarina, ambos demonstraram efeitos espasmolítico, antiedematogênico e broncodilatador. Além disso, diferentes intensidades nos efeitos farmacológicos foram observadas no extrato indicando que, além da cumarina, outros compostos biologicamente ativos estão presentes<sup>[120,122]</sup>.

A atividade da *Mikania* no sistema digestivo foi relatada em uma revisão publicada por Rufatto et al.<sup>[47]</sup>. Muitas plantas e seus extratos são comumente utilizados agindo contra várias desordens do sistema digestivo. Entre eles estão algumas espécies do gênero *Mikania* como a *M. glomerata*, *M. laevigata* e *M. cordata*. Em um estudo realizado por Salgado et al.<sup>[123]</sup> com *M. glomerata*, o extrato aquoso de folhas (1,000 mg/mL) mostrou uma diminuição nos movimentos propulsivos do conteúdo intestinal em ratos. A administração oral produziu uma inibição do trânsito gastrointestinal eficaz como a produzida pela Loperamida, uma droga referência, utilizada como antidiarreico. Estes achados sugerem que o extrato aquoso das folhas de *M. glomerata* pode produzir um efeito antidiarreico por inibição da motilidade intestinal. Além disso, o decocto das folhas de *M. cordata* também mostrou efeitos no sistema digestivo, sendo utilizado em dispepsia, úlcera gástrica e disenteria<sup>[124]</sup>.

A fração metanólica do extrato da raiz mostrou efeitos antiúlcera em ratos machos Sprague-Dawley, de forma dose-dependente na inibição de úlceras gástricas induzidas por imersão em água induzida pelo estresse, etanol, ácido acetilsalicílico e fenilbutazona. Os valores de ED<sub>50</sub> do extrato nos quatro modelos de úlceras foram verificados: 95,1; 109,7; 125,5 e 136,2 mg/kg, respectivamente<sup>[126]</sup>. No estudo realizado por Paul et al.<sup>[126]</sup>, a fração obtida a partir de um extrato etanólico de folhas de *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob, rico em alcaloides (dose de 50 mg/kg), houve uma inibição da atividade antiúlcera (*in vivo*) em lesões gástricas induzidas por Diclofenaco de sódio em ratos Long Evans. Mosaddik e Alam<sup>[127]</sup> realizaram um estudo semelhante ao avaliar o papel da fração de alcaloides em lesões gástricas induzida por Diclofenaco de sódio em ratos Long Evans e descobriram que no grupo avaliado com o extrato rico em alcaloides (50 mg/kg) o índice de úlceras do estômago ( $0,268 \pm 0,0346$ ) e do duodeno ( $0,050 \pm 0,0129$ ) foi significativamente mais baixo do que a do grupo ao qual foi administrado o Diclofenaco ( $0,691 \pm 0,0184$  e  $0,093 \pm 0,0346$ , respectivamente). Assim, os princípios bioativos de *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob provaram ter efeitos antiulcerogênicos. O extrato bruto hidroalcoólico a 70% de *M. laevigata* apresentou atividade antiulcerogênica quando aplicado em ratos Wistar machos, diminuindo o índice ulcerativo produzido pela indometacina, o etanol, estresse e reserpina em 85, 93, 82 e 50%, respectivamente<sup>[64]</sup>. Desta forma, diferentes espécies de guaco mostram atividade no sistema digestivo<sup>[47]</sup>.

O efeito de extratos de *Mikania* foi descrito por possuir propriedades neurofarmacológicas confirmadas. Os estudos da fração metanólica do extrato da raiz de *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob em animais mostrou alterações no padrão de comportamento de forma geral (por exemplo, redução espontânea da motilidade, analgesia e supressão do comportamento agressivo), entre outros efeitos. As observações sugerem que a raiz de *M. cordata* (Burm. f.) B.L.Rob possui uma potente ação sobre o sistema nervoso central<sup>[128]</sup>. O extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *M. scandens* (L.) Willd. apresentaram propriedades neurofarmacológicas em ratos albinos suíços. Os resultados do estudo revelaram uma ação sobre o sistema nervoso central<sup>[129]</sup>.

Estudos com extratos, óleos e compostos de várias espécies demonstraram atividade anti-inflamatória<sup>[47]</sup>. Oliveira et al.<sup>[130]</sup> descobriram a ação anti-inflamatória do extrato fluido de *M. glomerata* no teste de atividade antiedema de pata induzido por carragenina e quantificado por pletismografia. Essas inibições foram ligeiramente menores do que as produzidas pelo controle com fenilbutazona. Além disso, Leite et al.<sup>[122]</sup> compararam o efeito do extrato de *M. glomerata* e solução de cumarina (1,2-benzopirano), em testes *in vivo* (edema de pata). Os resultados mostraram o efeito anti-inflamatório do extrato e, também, da solução de cumarina. Ruppelt et al.<sup>[34]</sup> estudaram o chá de guaco (*M. glomerata*) como agentes analgésico e anti-inflamatório. O grupo de animais que ingeriu o chá mostrou inibição de 63,1% em contorções e uma redução de 48,92% em difusão do corante (azul de Evans), em comparação com o controle. Deste modo, a infusão da planta demonstrou atividade analgésica e anti-inflamatória em menor grau em comparação com o controle analgésico.

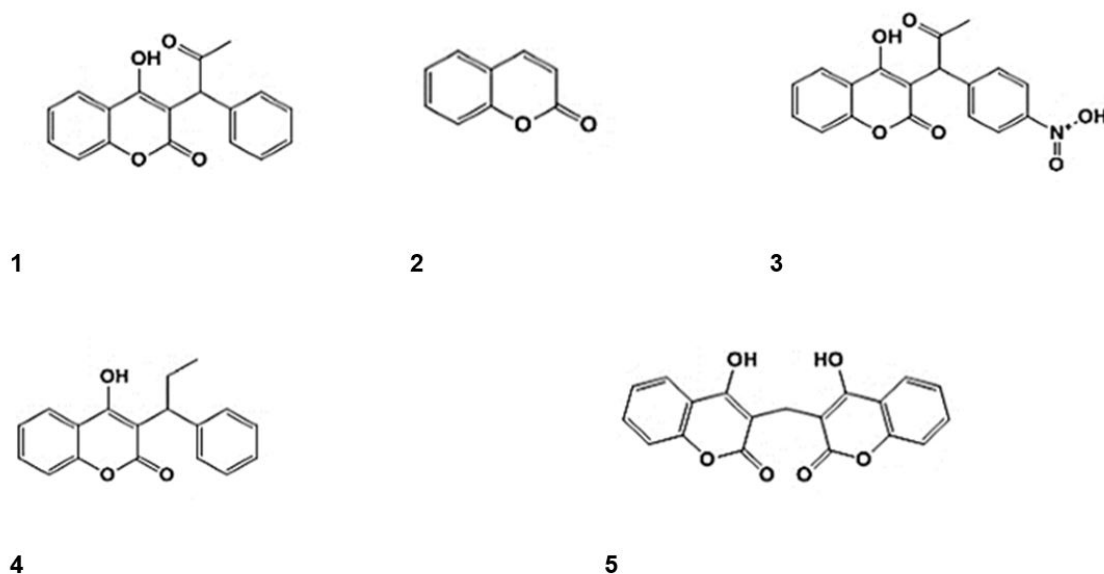
A atividade anti-inflamatória de *M. cordifolia* (L.f.) Willd foi atribuída à presença de ácidos dicafeoilquínicos. Foi avaliada a atividade sobre a migração de monócitos e a produção de ânion superóxido<sup>[131]</sup>. Outras espécies, *M. laevigata* e *M. involucrata* Hook. & Arn. demonstraram uma potencial atividade anti-inflamatória em inibir edema e pleurisia. No teste de edema de pata induzido, os animais tratados com decocções de folha de *M. laevigata* (200 mg/kg) e *M. involucrata* Hook. & Arn. (50 mg/kg) apresentaram uma inibição do edema de 81,56 e 81,67%, respectivamente, 3 horas após a administração do agente flogístico. No ensaio de pleurisia, decocções das folhas de *M. laevigata* (400 mg/kg) e de *M. involucrata* Hook. & Arn. (200 mg/kg)

inibiram a migração de leucócitos para o exsudato pleural em 28,26 e 54,35%, respectivamente<sup>[112,132]</sup>. Em conclusão, muitas espécies de *Mikania* estão envolvidas em respostas anti-inflamatória, analgésica e antialérgica<sup>[47]</sup>. Outras atividades descritas foram antiviral e parasitária<sup>[47,53,133-135]</sup>, antifúngica<sup>[47,136,137]</sup>, fitotóxica<sup>[47,73,93,138]</sup> e alelopática<sup>[47,93,139,140]</sup>.

### Interações medicamentosas e toxicidade

A varfarina, cuja estrutura química resulta de uma modificação da cumarina, é um anticoagulante oral que atua como inibidor da vitamina K, um cofator essencial para a síntese de fatores de coagulação II, VII, IX e X<sup>[141]</sup>. Outras moléculas com o esqueleto químico das cumarinas, como o acenocumarol, femprocumona e dicumarol (**FIGURA 7**), também apresentam atividades anticoagulantes<sup>[141]</sup>. Como o guaco é rico em cumarina, é desaconselhável o uso para crianças com idade inferior a um ano e mulheres no período gestacional. Além disso, o uso prolongado pode provocar acidentes hemorrágicos, pelo antagonismo à vitamina K<sup>[142]</sup>. Além da interação com anticoagulantes, um estudo demonstrou que extratos secos de guaco podem interagir, sinergicamente *in vitro*, com alguns antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, vancomicina e penicilina, no entanto, o mecanismo de ação ainda é desconhecido<sup>[1,143]</sup>.

**FIGURA 7:** Estruturas químicas da varfarina (1), cumarina (2), acenocumarol (3), femprocumona (4) e dicumarol (5).



Fonte: Czelusniak et al.<sup>[4]</sup>

### Controle de qualidade de *Mikania*

A seguir, são relatados alguns trabalhos sobre o controle de qualidade de *Mikania*. Celeghini et al.<sup>[46]</sup> avaliaram vários métodos de extração para os extratos hidroalcoólicos das folhas de “guaco” (*Mikania glomerata* Spreng.), a saber: maceração, maceração com ultrassom, infusão e extração por fluido supercrítico. Dentre os métodos estudados, a maceração com ultrassom proporcionou os melhores resultados, especialmente considerando-se a relação rendimento da extração/tempo de extração. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para determinar a concentração de cumarina nos extratos hidroalcoólicos das folhas de guaco. A metodologia de análise desenvolvida utilizando HPLC mostrou ser sensível e reprodutível. O método de maceração com sonicação se mostrou melhor na escolha, considerando os resultados apresentados na **TABELA 1**.

**TABELA 1:** Conteúdo de cumarina em três extrações sucessivas da mesma amostra de *M. glomerata* Spreng.

Amostra	Concentração (mg/mL) ± dp*	Rendimento relativo da extração (%)
Folhas secas	0,648 ± 0,015	78,7
Folhas depois da primeira maceração	0,140 ± 0,002	17,1
Folhas depois da segunda extração	0,035 ± 0,004	4,2

\*Triplicata. Fonte: Celeghini et al. [46].

Osorio e Martins<sup>[24]</sup> desenvolveram um método de doseamento de cumarina (1,2-benzopirano) em extrato fluido e tintura de guaco (*M. glomerata* Sprengel). O método desenvolvido foi por espectrofotometria derivada de primeira ordem, que se mostrou preciso, exato, reprodutível e de fácil execução. A espectrofotometria por derivada de primeira ordem, pelo coeficiente de linearidade alto (0,9987), quando de sua aplicação em extrato fluido de guaco, mostrou-se útil para a aplicação na quantificação da cumarina nos extratos de *M. glomerata*.

Apesar da grande utilização de extratos de guaco, Bueno e Bastos<sup>[144]</sup> verificaram que existia uma falta relativa à disponibilidade de métodos validados de análise quantitativa de cumarina em fitomedicamentos contendo extratos de guaco, especialmente xaropes. Além disso, não havia à época da publicação do artigo, nenhum procedimento descrito para controle do processo de fabricação na sua totalidade, incluindo a aquisição da matéria prima até a produção e padronização de extratos. No entanto, o controle de qualidade é baseado na quantificação da cumarina na planta bruta e nos seus extratos, através da aplicação de técnicas cromatográficas, como sugerido por Vilegas et al.<sup>[145]</sup> e outros autores<sup>[66,146,147]</sup> e espectrofotométricas<sup>[17]</sup>. Os dados apresentados por outros autores<sup>[144]</sup> mostraram que o método desenvolvido por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) foi adequado para a análise quantitativa de rotina da cumarina em xarope de guaco, assim como na droga vegetal e em extratos.

Foi aplicado um método para realizar a análise do teor de cumarina presente em xaropes de guaco (*M. glomerata*) armazenado em diferentes temperaturas, por espectrometria no UV em comprimento de onda de 275,4 nm. Utilizou-se como veículo para efetuar as diluições da amostra uma mistura de metanol/água destilada, na proporção de 80% v/v. A curva de calibração foi obtida diluindo-se 100 mg de cumarina padrão em 100 mL da solução descrita anteriormente, obtendo-se sete concentrações distintas com variação de 2 µg a 20 µg. Os resultados obtidos demonstraram que a temperatura de armazenamento de 45 °C foi considerada ótima para desenvolver a conversão do isômero *trans* em *cis* com subsequente conversão deste a cumarina. Os valores de cumarina, encontrados na forma farmacêutica em estudo, foram de 1,19 a 1,37 mg/mL, sendo que o valor mais alto refere-se às amostras armazenadas a 45 °C durante seis meses <sup>[148]</sup>.

Em outro trabalho, foram avaliadas drogas vegetais constituídas de folhas e tinturas de guaco (*M. glomerata*), adquiridas no Mercado Central e em farmácias de manipulação de Belo Horizonte, respectivamente. Realizaram-se testes físico químicos de caracterização organoléptica, determinação de matéria estranha, teores de água e cinzas totais para as amostras de drogas vegetais e caracterização organoléptica, medidas de pH e de densidade para as amostras de tinturas. Foram obtidos os perfis cromatográficos por cromatografia em camada delgada (CCD) e HPLC-FR e fez-se a quantificação da cumarina, por HPLC-FR (fase reversa). As amostras analisadas apresentaram um ou mais dos parâmetros avaliados fora dos valores preconizados pela Farmacopeia Brasileira, evidenciando-se a necessidade da realização do controle de qualidade de matérias-primas vegetais, para obtenção de medicamentos fitoterápicos de qualidade, eficientes e seguros <sup>[149]</sup>.

Bolina et al. [17] realizaram um estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. Pelos perfis cromatográficos obtidos por CCD, constataram que as duas espécies apresentaram constituição química semelhante, sendo detectada a presença da cumarina (1,2-benzopirona), triterpenos/esteróides e heterosídeos flavônicos. Características semelhantes foram também observadas nos perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de *M. glomerata* e *M. laevigata* obtidos por HPLC-FR. e os teores de cumarina mostraram-se bastante próximos. Assim, os resultados encontrados sugeriram que as espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* podiam ser utilizadas de forma indistinta.

O extrato seco de guaco (*M. glomerata*) obtido pelo processo de liofilização foi considerado adequado como matéria-prima para a produção de cápsulas de forma farmacêutica sólida. O método espectrofotométrico por UV não foi apenas apto para quantificar a substância de referência, mas todas as cumarinas presentes no guaco, enquanto que a técnica de HPLC foi específica para quantificar a 2H-1-benzopiran-2-ona (**FIGURA 7**) como marcador químico da espécie. No entanto, o método por espectrofotometria-UV teve algumas vantagens em comparação com o HPLC-UV, tais como o custo operacional reduzido e o tempo de análise, sendo uma técnica simples, com menos impacto ambiental, uma vez que o reagente utilizado no método de HPLC-UV, acetonitrila, é teratogênico, com um perfil tóxico por várias vias de absorção [150,151].

Passari et al. [152] desenvolveram um planejamento experimental para caracterizar variações sazonais e efeitos de solvente utilizados na extração sobre as quantidades de cumarina e metabólitos de *M. laevigata*. Para a quantificação da cumarina, os autores utilizaram RP-HPLC-DAD e UPLC-ESI-MS. Os resultados mostraram que existem efeitos sazonais que refletiram no teor de cumarina, ácido *o*-cumárico e ácido melilótico. A análise cromatográfica aliada ao desenho experimental foram ferramentas importantes para prover informações a respeito das concentrações dos metabólitos secundários na planta durante as quatro estações do ano [153].

De Melo e Sawaya [16], empregando a técnica de UHPLC-MS, não só identificaram e quantificaram o ácido clorogênico e a cumarina, como outros compostos, os quais fazem parte do perfil químico complexo de amostras de *M. glomerata*. O método cromatográfico empregado permitiu distinguir amostras de folhas de duas morfologias similares e pode ser empregado, segundo os autores, no controle de qualidade de folhas secas e extratos dessa espécie [153].

Dentro do âmbito de se propor métodos analíticos mais rápidos que podem ser alternativas aos métodos convencionais para a análise de fitomedicamentos, Cappelaro et al. [151] compararam a análise por HS-SPME-HRGC-MS de compostos voláteis e semi-voláteis de folhas secas de *M. glomerata*, utilizando-se três fibras comerciais diferentes, sugerindo a HS-SPME como uma abordagem analítica alternativa que pode ser utilizada como complemento no controle de qualidade de fitoterápicos a base de *M. glomerata*, particularmente na análise de matéria-prima a base de guaco. Os resultados apresentados por esses autores sugeriram que a HS-SPME-HRGC-MS pode ser uma ferramenta analítica potencial para a análise de compostos voláteis e semi-voláteis de *M. glomerata*.

Foi utilizada a técnica de HPLC-RP com detector UV (254 nm) para avaliar folhas da *M. glomerata* Spreng., coletadas no banco ativo de germoplasma (BAG) da Estação Experimental da Epagri de Itajaí, SC. Os autores validaram o método analítico [154]. Puderam concluir que o mesmo é confiável para os parâmetros avaliados. As principais vantagens do método estariam relacionadas principalmente a redução do tempo de análise e da



geração de resíduos, indo desta forma ao encontro dos princípios da química verde. A proposta de um método rápido tornou-se interessante para a rotina do controle de qualidade industrial, visando à obtenção de medicamentos fitoterápicos padronizados. Desta forma, o método desenvolvido e validado para análise de cumarina em extrato de guaco utilizando coluna de fase reversa C<sub>18</sub> de 30 mm atendeu às necessidades específicas do estudo, mostrando-se uma alternativa analítica rápida e eficiente [155].

Considerando-se a falta de estudos sobre as condições de cultivo da *M. laevigata* e da *M. glomerata* e a importância destes estudos para a sua utilização segura, foram avaliados três metabólitos secundários por UHPLC-MS e MS/MS, os quais são influenciados pela sazonalidade e as seguintes variações nas condições de cultivo: temperatura, luminosidade e disponibilidade de água. Extratos hidroetanólicos das folhas foram avaliados por UHPLC-MS e MS/MS, seguindo as diferenças na concentração do seu marcador químico, cumarina, e outros componentes bioativos: ácido clorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico) e ácido dicafeoilquínico. Este é o primeiro relatório sobre a presença de ácido dicafeoilquínico nestas espécies. Os resultados mostram influência significativa da sazonalidade e dos tratamentos sobre o conteúdo destes compostos [52, 156].

Segundo o relatado no presente trabalho e, observado por Costa et al. [41], devido ao padrão de metabólitos secundários encontrados em *M. glomerata* e *M. laevigata*, o perfil químico das folhas, avaliado por UHPLC-MS, foi a característica que melhor diferenciou as duas espécies. A cumarina esteve presente em todas as amostras das folhas de *M. laevigata*, mas ausente ou em baixa concentração em folhas de *M. glomerata*. As hastes apresentaram cumarina em ambas as espécies, embora em diferentes concentrações. A quantificação dos ácidos clorogênico e dicafeoilquínico foi determinante para a separação das duas espécies, uma vez que maiores concentrações são encontradas em *M. glomerata* [41,156,157].

## Conclusão

O uso de plantas medicinais não pode mais ser considerado apenas como cultura de povos ou tradição, mas como ciência que vem sendo estudada, aperfeiçoada e utilizada por grande parte da população mundial, como terapia alternativa, a qual pode trazer inúmeros benefícios aos usuários. Isto é comprovado em relação ao guaco, através de estudos sobre sua farmacobotânica, composição química e ações biológicas. Para a fitoterapia é fundamental também o conhecimento sobre os metabólitos secundários da planta, os efeitos e a biossíntese, além dos fatores que podem influenciar no acúmulo ou redução destes componentes na planta além de um rígido controle de qualidade dos seus marcadores.

## Referências

1. Czelusniak KE, Brocco A, Pereira DF, Freitas GBL. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Rev Bras Plant Med.** 2012; 14(2):400-409. ISSN 1516-0572. [Link].
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada **RDC nº 26**: Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos naturais fitoterápicos. D.O.U. (Diário Oficial da União), 13/05/2014. [Link].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada **RDC Nº 48**: Dispõe sobre o registro de Fitoterápicos. D.O.U (Diário Oficial da União), 16/03/2004. [Link].



4. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Determina a publicação da **Lista de Registro Simplificado de fitoterápicos**, 11/12/2008. [\[Link\]](#).
5. Nicoletti MA, Junior MAO, Bertasso CC, Caporossi PY, Tavares APL. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**. 2007; 19(1/2):32-40. ISSN 0104-021. [\[Link\]](#).
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa IN N° 4**: Determina a publicação do guia de orientação para registro de medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. D.O.U (Diário Oficial da União), 18/06/2014. [\[Link\]](#).
7. Storion AC. **Uso de técnicas analíticas hifenadas na identificação de marcadores fitoquímicos e adulterações em drogas vegetais e fitoterápicos**. São Paulo, 2016. Dissertação de Mestrado. [Programa de Mestrado Profissional em Farmácia], UNIAN-SP.
8. Alvarenga FCR, Garcia EF, Bastos EMAF, Grandi TSM, Duarte MGR. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Rev Bras Farmacogn**. 2009; 19(2A):442-448. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa (IN) nº 5**, de 11 de dezembro de 2008. Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 dezembro. 2008. [\[Link\]](#).
10. Silva RAD. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926. 1147p.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada **RDC N° 14**: Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos. D.O.U (Diário Oficial da União), 31/03/2010. [\[Link\]](#).
12. Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn**. 2006; 16(3):408-420. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
13. Brandão MGL, Zanetti NNS, Oliveira GRR, Goulart LO, Monte Mor RLM. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn**. 2008; 18(1):127-134. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
14. Gasparetto JC, De Francisco TMG, Pontarolo R. Chemical constituents of *Mikania glomerata* Spreng and *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker. **J Med Plant Res**. 2013; 7(13):753-765. ISSN 1996-0875. [\[CrossRef\]](#).
15. Passari LMZ, Scriminio IS, Bruns RE. Experimental designs characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. **Anal Chim Acta**. 2014; 821:89-96. ISSN 0003-2670. [\[CrossRef\]](#).
16. De Melo LV, Sawaya ACHF. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). **Rev Bras Farmacogn**. 2015; 25(2):105-110. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
17. Bolina RC, Garcia EF, Duarte MGR. Comparative study of the chemical composition of the species *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Rev Bras Farmacogn**. 2009; 19(1B):294-298. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
18. Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev Bras Farmacogn**. 2005; 15(4):392-413. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).

19. Saúde-Guimarães DA, Faria AR. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Farmacogn**. 2007; 17(3):455-465. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
20. Vicentino ARR, Menezes FS. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev Bras Farmacogn**. 2007; 17(3):384-387. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
21. Baratto L, Lang KL, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB, Falkenberg M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Rev Bras Farmacogn**. 2008; 18(4):577-582. ISSN 0102-695X. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
22. Quintans-Júnior LJ, Almeida JRGS, Lima JT, Nunes XP, Siqueira JS, Oliveira LEG et al. Plants with anticonvulsant properties - a review. **Rev Bras Farmacogn**. 2008; 18(Supl.):798-819. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
23. Mariath IR, Falcão HS, Barbosa-Filho JM, Sousa LCF, Tomaz ACA, Batista LM et al. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Rev Bras Farmacogn**. 2009; 19(1a):158-162. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
24. Osório AC, Martins JLS. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Rev Bras Cienc Farm**. 2004; 40(4):481-486. ISSN 1516-9332. [[CrossRef](#)].
25. Ueno VY, Sawaya ACHF. Influence of environmental factors on the volatile composition of two Brazilian medicinal plants: *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Metabolomics**. 2019; 15:91-95. ISSN 1573-3882. [[CrossRef](#)].
26. Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. **Quím Nova**. 2005; 28(1):85-94. ISSN 0100-4042. [[CrossRef](#)].
27. Joly AB. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. 7ª ed. São Paulo: Cia. Editora Nacional. 1967.159p. ISBN 8504002314.
28. Emerenciano VP, Kaplan MAC, Gottlieb OR, Bonfanti MRM, Ferreira ZS, Comegno LMA. Evolution of sesquiterpene lactones in Asteraceae. **Biochem System Ecol**. 1986; 14(6):585-589. ISSN 0305-1978. [[CrossRef](#)].
29. Budel JM, Duarte MR, Kosciuv I, De Moraes TB, Ferrari LP. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. **Rev Bras Farmacogn**. 2009; 19(2B):545-552. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
30. Rodrigues KM, De Godoy SM, Ruas CF. Filogenia molecular do gênero *Mikania* (Asteraceae, Eupatorieae) por meio de marcadores AFLP. **Anais do Encontro Anual de Iniciação Científica da UEL**. 2015; ISSN 2447-4118. [[Link](#)].
31. Barroso GM. *Mikania* do Brasil, Jardim Botânico, Ed. Rio de Janeiro, 1958.
32. Neves JL, Sá MFA. Contribuição ao estudo de plantas medicinais *Mikania glomerata* Sprengel. **Rev Bras Farmacogn**. 1991; 72:42-47. ISSN 0102-695X. [[Link](#)].
33. Oliveira F, Oga S, Akisue G, Akisue MK. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker). **An Farm Quim**. São Paulo. 1985; 25:50-54. ISSN 0102-695X. [[Link](#)].
34. Ruppelt BM, Pereira EF, Gonçalves LC, Pereira NA. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1991; 86:203-205. ISSN 1678-8060. [[PubMed](#)].

35. Oliveira F, Alvarenga MA, Akisue G, Akisue MK. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Rev Farm Bioquim.** 1984; 2:169-183. ISSN 0301-7052. [\[Link\]](#).
36. De Castro EM, Pinto JEBP, Melo HC, Soares AM, Alvarenga AA, Lima Júnior EC. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a diferentes fotoperíodos. **Hort Bras.** 2005; 23 (3):846-850. ISSN 0102-0536. [\[CrossRef\]](#).
37. Bastos CL, Da Mata CZ, Maia VH, Borges RAX, Franco LO, Ferreira PCG et al. Anatomical and molecular identification of “guaco” *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata* (Asteraceae), two important medicinal species from Brazil. **J Med Plant Res.** 2011; 5(18): 4579-4583. ISSN 1996-0875. [\[Link\]](#).
38. Freitas TP. **Avaliação dos efeitos de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) no processo inflamatório induzido pela exposição aguda ao carvão mineral.** 2006. 48p. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais], Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. [\[Link\]](#).
39. Cabrera AL, Klein M. Compostas (Eupatoriae). In: Reitz R. **Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1989. p.649-750. [\[Link\]](#).
40. Ritter MR, Miotto STS. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea.** 2005; 32(3):309-359. ISSN 2236-8906. [\[Link\]](#).
41. Costa VCO, Borghi AA, Mayer JLS, Sawaya ACHF. Comparison of the Morphology, Anatomy, and Chemical Profile of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*. **Plan. Med.** 2017; 84(3):191-200. ISSN 0032-0943. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
42. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira:** Brasília. 126p, 2011. [\[Link\]](#).
43. Silva Júnior AA, Ritter MR, Zambonim FM, Deschamps FC, Tcacenco FA, Bertoldi FC. Um novo ecótipo de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) rico em óleo essencial no Sul do Brasil. **Rev Fitos** 2015, 9(1):19-28. ISSN 2446-4775. [\[CrossRef\]](#).
44. Silva Júnior AA. Fitoprospecção e avaliação de acessos de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) no Litoral de Santa Catarina. In: **Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais**, 6, Florianópolis, SC. Resumos. Florianópolis, SC: UFSC, 2010. p.58-61. [\[Link\]](#).
45. Silva Junior AA, Deschamps FC, Osaida CC. Fitoprospecção de plantas aromáticas nativas de Santa Catarina. In: **Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais**, 6, Florianópolis. Anais. Florianópolis: UFSC, 2010a. p.55-57. [\[Link\]](#).
46. Celeghini RMS, Vilegas JHY, Lanças FM. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng (“guaco”) leaves. **J Braz Chem Soc.** 2001; 12(6):706-709. ISSN 0103-5053 [\[CrossRef\]](#).
47. Rufatto LC, Gower A, Schwambach J, Moura S. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. **Rev Bras Farmacogn.** 2012; 22(6):1384-1403. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
48. Pereira BMR, Gonçalves LC, Pereira NA. **Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III. Atividade antidermatogênica.** Congresso Brasileiro de Plantas Mediciniais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p. 1, 1992.
49. Hoult JRS, Payá M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen Pharmacol.** 1996; 27:713-722. ISSN 0306-3623. [\[CrossRef\]](#).

50. Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FCF. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev Bras Farmacogn.** 2006; 16:455-462. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
51. De Castro EM, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Malta MR, Cardoso MG, Silva FAM. Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (guaco) under different radiation levels and photoperiod. **Acta Farm Bonaerense.** 2006; 25 (3):387-392. ISSN 0326-2383. [[Link](#)].
52. Herz W, Kulanthaivel P. Diterpenes and sesquiterpene lactones from *Mikania congesta*. **Phytochemistry.** 1985; 24(8):1761-1768. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
53. Bohlmann F, Adler A, Jakupovic J, King RM, Robinson H. A dimeric germacranolide and other sesquiterpene lactones from *Mikania* species. **Phytochemistry.** 1982; 21(6):1349-1355. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
54. Bohlmann F, Adler A, Schuster A, Gupta RK, King RM, Robinson H. Diterpenes from *Mikania* species. **Phytochemistry.** 1981; 20:1899-1902. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
55. Ahmed M, Rahman MT, Alimuzzaman M, Shilpi JA. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. **Fitoterapia.** 2001; 72:919-921. ISSN 0367-326X. [[CrossRef](#)].
56. Facey PC, Peart PC, Porter RBR. The antibacterial activities of mikanolide and its derivatives. **West Indian Med J.** 2010; 59:249-252. ISSN 0043-3144. [[Link](#)].
57. Prevost G, Coulomb H, Lavergne O, Lanco C, Teng B-P. **Preparation of pharmaceutical compositions containing mikanolide, dihydromikanolide or an analog thereof combined with another anticancer agent for therapeutic use in cancer treatment** PCT Int. Appl. WO 2002096348 A2 20021205, 2002. [[Link](#)].
58. Alves TMA, Chaves PPG, Santos LMST, Nagem TJ, Murta SMF, Ceravolo IP et al. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med.** 1995; 61:85-87. ISSN 0032-0943. [[CrossRef](#)].
59. Barbosa AD, Ferreira RCV, Valente PHM. Atividade antimicrobiana de extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras. **Lecta.** 1994; 12:153-163. ISSN 0104-0987. [[Link](#)].
60. Costa-Lotufo LV, Cunha GMA, Farias PAM, Viana GSB, Cunha KMA, Pessoa C et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon.** 2002; 40:1231-1234. ISSN 0041-0101. [[CrossRef](#)].
61. Wilkens M, Alarcon C, Urzua A, Mendoza L. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta Med.** 2002; 68:452-454. ISSN 0032-0943. [[CrossRef](#)].
62. Cunha KMA, Paiva LAF, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VSN. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vivo*. **Phytother Res.** 2003; 17:320-324. ISSN 1099-1573. [[CrossRef](#)].
63. Bighetti AE, Antônio MA, Kohn LK, Rehder VLG, Foglio MA, Possenti A. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomed.** 2005; 12:72-77. ISSN 0944-7113. [[CrossRef](#)].
64. Yatsuda R, Rosalen PL, Cury JA, Murata RM, Rehder VLG, Melo VL. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. **J Ethnopharmacol.** 2005; 97:83-89. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
65. Santos SC, Krueger CL, Steil AA, Krueger MR, Biavati MW, Wisniewski-Junior A. LC characterization of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Med.** 2006; 72:679-684. ISSN 1439-0221. [[CrossRef](#)].

66. Vichnewski W, Filho HFL, Murari R, Herz W. Cinnamoylgrandifloric acid from *Mikania oblongifolia*. **Phytochemistry** 1977; 16:2028-2029. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
67. Cruz FG, Roque NF. Diterpene acids from *Mikania triangularis*. **Phytochemistry** 1992; 31:2793-2796. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
68. Cruz FG, Roque NF, Giesbrecht AM, Davino SC. Antibiotic activity of diterpenes from *Mikania triangularis*. **Fitoterapia**. 1996; 67:189-190. ISSN 0367-326X. [[Link](#)].
69. Santos SC. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Schulz Bip. ex Baker e *M. glomerata* Sprengel e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar**. 2005. 93p. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. [[Link](#)].
70. Nunez CV, Amendula MC, Lago JHG, Roque NF. Diterpene acids from *Mikania* sp. **Biochem Syst Ecol**. 2004; 32:233-237. ISSN 0305-1978. [[CrossRef](#)].
71. Herz W, Srinivasan A, Kalyanaraman PS. Mikanokryptin, a new guianolide from *Mikania*. **Phytochemistry**. 1975; 14:233-237. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
72. Nicollier G, Thompson AC. Essential oil and terpenoids of *Mikania micrantha*. **Phytochemistry**. 1981; 20:2587-2588. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
73. Gasparetto JC, Campos FR, Budel JM, Pontarolo R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Rev Bras Farmacogn**. 2010; 20(4):627-640. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
74. Kiang AK, Sim KY, Yoong SW. Constituents of *Mikania cordata* (Burm. F.) B. L. Robinson (Compositae)-II. **Phytochemistry**. 1968; 7:1035-1037. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
75. Aguinaldo AM, Abe F, Yamauchi T, Padolina WG. Germacranolides of *Mikania cordata*. **Phytochemistry**. 1995; 38:1441-1443. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
76. Oliveira PA, Turatti ICC, Oliveira DCO. Comparative analysis of triterpenoids from *Mikania cordifolia* collected from four different locations. **Rev Bras Ciênc Farm**. 2006; 42(4):547-552. ISSN 1516-9332. [[CrossRef](#)].
77. Cuenca MDR, Catalán CAN. 14,15-dihydroxygermacranolides and other constituents of *Mikania minima*. **J Nat Prod**. 1990; 53:686-691. ISSN 0163-3864. [[PubMed](#)].
78. Chaves JS, Oliveira DCR. Sesquiterpene lactones and other chemical constituents of *Mikania hoehnei* R. **J Braz Chem Soc**. 2003; 14:734-737. ISSN 0103-5053. [[CrossRef](#)].
79. Bohlmann F, Adler A, King RM, Robinson H. Ent-labdanes from *Mikania alvimii*. **Phytochemistry**. 1982; 21(1):173-176. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
80. Bohlmann F, Adler A, King RM, Robinson H. Germacranolides from *Mikania grazielae*. **Phytochemistry**. 1982a; 21(5):1169-1170. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
81. De Souza JM, Taleb-Contini SH, De Oliveira DCR. Phytochemical study of *Mikania pseudohoffmanianna* G. M. Barroso ex W. C. Holmes. **Rev Bras Cien Farm**. 2006; 42(2):265-268. ISSN 1516-9332. [[CrossRef](#)].
82. Nascimento AM, Oliveira DCR. Kaurene diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. **J Braz Chem Soc**. 2001; 12:552-555. ISSN 0103-5053. [[CrossRef](#)].

83. Nascimento AM, Chaves JS, Albuquerque S, Oliveira DCR. Trypanocidal properties of *Mikania stipulacea* and *Mikania hoehnei* isolated terpenoids. **Fitoterapia**. 2004; 75:381-384. ISSN 0367-326X. [[CrossRef](#)].
84. Ferreira FP, Oliveira DCR. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip.ex Baker. **Tetrahed Lett**. 2010; 51:6856-6859. ISSN 0040-4039. [[CrossRef](#)].
85. Gregorio LE, Moraes SL, Pott A, Oliveira DCR. Chemical constituents of the ethanolic extract of *Mikania parodii*. **Chem Nat Compounds**. 2008; 44:512-51. ISSN 0009-3130. [[Link](#)].
86. Soares AP, Nascimento AM, Taleb-Contini SH, Oliveira DCR. Constituents of *Mikania lasiandrae*. **Chem Nat Compounds**. 2007; 43:708-709. ISSN 0009-3130. [[Link](#)].
87. Reis AA, Mendes CC, Ferraz TPL, Roque NF. Terpenes from *Mikania hookeriana*. **Biochem Syst Ecol**. 2003; 31:1061-1062. ISSN 0305-1978. [[Link](#)].
88. Díaz JG, Goedken VL, Herz W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Mikania rimachii* and *Mikania microptera*. **Phytochemistry** 1992; 31:597-602. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
89. Wei X, Huang H, Wu P, Cao H, Ye W. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. **Biochem Syst Ecol**. 2004; 32:1091-1096. ISSN 0305-1978. [[CrossRef](#)].
90. Boeker R, Jakupovic J, Bohlmann F, Schmeda-Hirschmann G. Germacra-1,10Z,4E-dien-12, 8- $\alpha$ -olides from *Mikania micrantha*. **Plant Med**. 1987; 53:105-106. ISSN 1516-0572. [[CrossRef](#)].
91. Cuenca MDR, Bardon A, Catalan CAN. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha*. **J Nat Prod**. 1988; 51:625-626. ISSN 0163-3864. [[PubMed](#)].
92. Jiang RW, He ZD, But PPH, Chan YM, Ma SC, Mak TCW. A novel 1:1 complex of potassium mikanin-3O-sulfate with methanol. **Chem Pharm Bull**. 2001; 49:1166-1169. ISSN 1347-5223. [[CrossRef](#)].
93. Huang H, Ye W, Wei X, Zhang C. Allelopathic potential of sesquiterpene lactones and phenolic constituents from *Mikania micrantha* H.B.K. **Biochem Syst Ecol**. 2009; 36:867-871. ISSN 0305-1978. [[CrossRef](#)].
94. Herz W, Santhanam PS. Isolation, structure and synthesis of 4',5,6,7-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone (batatifolin), a new flavone from *Mikania batatifolia* DC. **Tetrahed Lett**. 1969; 39: 3419-3421. ISSN 0040-4039. [[CrossRef](#)].
95. Clifford MN, Marks S, Knight S, Kuhnert N. Characterization by LC-MS<sup>(N)</sup> of four new classes of p-coumaric acid-containing diacylchlorogenic acids in green coffee beans. **J Agric Food Chem**. 2006; 54:4095-4101. ISSN 0021-8561. [[CrossRef](#)].
96. Boyer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. **Nutr J**. 2004; 3:1-15. ISSN 0899-9007. [[CrossRef](#)].
97. Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: *in vitro*, cellular, animal, and human studies. **Pharmacol Res**. 2007; 55:187-198. ISSN 1043-6618. [[CrossRef](#)].
98. Oliveira FD. Contribuição para o estudo botânico de *Mikania hirsutissima* DC. var. *hirsutissima*. II. Morfologia externa e anatomia da folha, flor, fruto e semente. **Rev Farm Bioquim**. 1972; 10:15-36. ISSN 0301-7052. [[Link](#)].
99. Ohkoshi E, Kamo S, Makino M, Fujimoto Y. Entkaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (Compositae). **Phytochemistry**. 2004; 65:885-890. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].



100. Dos Santos RR. **Comparação de sistemas de cultivo convencional e orgânico na produção de cumarina em *Mikania Glomerata* Spreng. (Ssteraceae) e avaliação de genotoxicidade.** Criciúma, 2018. Tese de doutorado. Universidade do Extremo Sul Catarinense.
101. Passari LMZG, Scarminio IS, Bruns RE. Experimental designs characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. **Anal Chim Acta.** 2014; 821:89-96. ISSN 0003-2670. [[CrossRef](#)].
102. Almeida CL, Xavier RM, Borghi AA, Santos VF, Sawaya ACHF. Effect of seasonality and growth conditions on the content of coumarin, chlorogenic acid and dicaffeoylquinic acids in *Mikania laevigata* Schultz and *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) by UHPLC–MS/MS. **Internat J Mass Spectr.** 2017; 418:162–172. ISSN 1387-3806. [[CrossRef](#)].
103. Della Pasqua CSP, Iwamoto RD, Antunes E., Borghi AA, Sawaya ACHF, Landucci ECT. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **J. Ethnopharmacol.** 2019; 231:50-56. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
104. Aboy AL, Ortega GG, Petrovick PR, Langeloh A, Bassani VL. Atividade antiespasmódica de soluções extrativas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). **Acta Farm Bonaerense** 2002; 21(3):185-191. ISSN 0326-2383. [[Link](#)].
105. Gonçalves CP, Yasuda FS, Dos Santos MA, Reis RD, Savino MI, Ribeiro W et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for the determination of coumarin in syrups with guaco and critical analysis of drug labels. **Am J Phytomed Clin Ther.** 2017; 5(3):1-8. ISSN 2321-2748. [[CrossRef](#)].
106. Dos Santos TC, Tomassini TCB, Sanchez E, Cabral LM. Estudo da atividade antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. **XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.** Florianópolis, Brasil, 1996.
107. Baratto L, Lang KL, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB, Falkenberg M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Rev Bras Farmacogn.** 2008; 18(4):577-582. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
108. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** 2005; 97:305-31. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
109. Rios EM, Silva RZ, Silva MZ, Leal LF, Miguel OG, Cechinel Filho V. Atividade antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC (Asteraceae). **XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.** Recife, Brasil, 2000.
110. Da Penha DAC, Hashimoto ET, Silva WRB, Nabas JMABB, Motizuki RS. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Mikania glomerata* e da própolis utilizados no laboratório de fitoterápicos da FAI. **Revista OMNIA Saúde,** 2008. Acesso em: 22 abr. 29. [[Link](#)].
111. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev Bras Ciênc Farm.** 2006; 42:195-202. ISSN 1516-9332. [[CrossRef](#)].
112. Scio E. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* Família Clusiaceae. **Rev Bras Farmacogn.** 2004; 85(1):27-31. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
113. Moreira MR, Souza AB, Soares S, Bianchi TC, Eugênio DS, Lemes DC et al. Ent-Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: *In vitro* activity against bacteria responsible for dental caries. **Fitoterapia.** 2016; 112:211–216. ISSN 0367-326X. [[CrossRef](#)].
114. Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Rezin GT, Rocha J, Citadini-Zanette V et al. Effects of *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. **J Med Food.** 2008; 11(4):761-766. ISSN 1096-620X. [[CrossRef](#)].



115. Lorenzi H, Matos FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008; 544p. ISBN 9788586714283.
116. Teske M, Trentini AMM. Herbarium compêndio de fitoterapia. 3ª ed. Curitiba: Herbarium. 1997. 317p. ISBN 91-944
117. Moura SR, Costa SS, Jansen JM, Silva CA, Lopes CS, Bernardo-Filho M et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **J Pharm Pharmacol**. 2002; 54:249-256. ISSN 0022-3573. [[PubMed](#)].
118. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn**. 2008; 18:472-508. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
119. Caribe J, Campos JM. **Plantas que ajudam o homem**. Ed. Cultrix, São Paulo. 319p, 1991.
120. Ali S, Islam S, Rahman M, Islam R, Sayeed MA. Antibacterial and cytotoxic activity of ethanol extract of *Mikania cordata* (Burm.F.) B.L. Robinson leaves. **J Basic Clin Pharmacol**. 2011; 2:103-107. ISSN 2191-0286. [[PubMed](#)].
121. Graça C, Baggio CH, Freitas CS, Rattmann YD, Souza LM, Cipriani TR et al. *In vivo* assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **J Ethnopharmacol**. 2007; 112:430-439. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
122. Leite MGR, Souza CL, Silva MAM, Moreira LKA, Matos FJA, Viana GSB. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Spreng (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* Fr.All (cumarú). **Rev Bras Farmacogn**. 1993; 1:12-15. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
123. Salgado HRN, Roncari AFF, Moreira RRD. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. **Rev Bras Farmacogn**. 2005; 15:205-208. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
124. Ghani A. **Medicinal plants of Bangladesh**. Asiatic Society of Bangladesh, 233, 1998. [[Link](#)].
125. Bishayee A, Chatterjee M. Protective effects of *Mikania cordata* root extract against physical and chemical factors-induced gastric erosions in experimental animals. **Planta Med**. 1994; 60:110-113. ISSN 1439-0221. [[CrossRef](#)].
126. Paul RK, Jabbar A, Rashid MA. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. **Fitoterapia**. 2000; 71:701-703. ISSN 0367-326X. [[CrossRef](#)].
127. Mosaddik MA, Alam KMF. The anti-ulcerogenic effect of an alkaloidal fraction from *Mikania cordata* on Diclofenac sodium-induced gastrointestinal lesions in rats. **J Pharm Pharmacol**. 2000; 52:1157-1162. ISSN 0022-3573. [[PubMed](#)].
128. Bhattacharya S, Pal S, Chaudhuri AKN. Neuropharmacological studies on *Mikania cordata* root extract. **Planta Med**. 1988; 54:483-487. ISSN 1439-0221. [[PubMed](#)].
129. Dey P, Chandra S, Chatterjee P, Bhattacharya S. Neuropharmacological properties of *Mikania scandes* (L.) Willd. (Asteraceae). **J Adv Pharmacol Technol Res**. 2011; 2:255-259. ISSN 0976-2094. [[CrossRef](#)].
130. Oliveira F, Oga S, Akisue G, Akisue MK. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker). **An Farm Quím**. 1985; 25:50-54. ISSN 0003-2441. [[Link](#)].
131. Peluso G, De Feo V, De Simone F, Bresciano E, Vuotto ML. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. **J Nat Prod**. 1995; 58:639-649. ISSN 0163-3864. [[PubMed](#)].

132. Suyenaga ES, Reche E, Farias FM, Schapoval EES, Chaves CGM, Henriques AT. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytother Res**. 2002; 16:519-523. ISSN 1099-1573. [[PubMed](#)]
133. Arias AR, Ferro E, Inchausti A, Ascurra M, Acosta N, Rodriguez E, Fournet A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. **J Ethnopharmacol**. 1995; 45:35-41. ISSN 0378-8741. [[PubMed](#)].
134. Serrano SM, Nogal JJ, Diaz MRA, Escario JÁ, Fernández AR, Barrio AG. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J Ethnopharmacol**. 2000; 71:101-107. ISSN 0378-8741. [[PubMed](#)].
135. But PP-H, He Z-D, Ma S-C, Chan Y-M, Shaw P-C, Ye W-C et al. Antiviral constituents against respiratory viruses from *Mikania micrantha*. **J Nat Prod**. 2009; 72:925-928. ISSN 0163-3864. [[PubMed](#)].
136. Pereira BMR, Gonçalves LC, Pereira NA. **Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III. Atividade antidermatogênica**. Congresso Brasileiro de Plantas Mediciniais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p. 1, 1992. [[Link](#)].
137. Maiorano VA, Marcucci S, Daher MAF, Oliveira CZ, Couto LB, Gomes AO et al. Antiophidian properties of the aqueous of *Mikania glomerata*. **J Ethnopharmacol**. 2005; 102:364-370. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
138. Huang H, Ye W, Wu P, Lin L, Wei X. New sesquiterpene dilactones from *Mikania micrantha*. **J Nat Prod**. 2004; 67:734-736. ISSN 0163-3864. [[PubMed](#)].
139. Nicollier G, Thompson AC. Essential oil and terpenoids of *Mikania micrantha*. **Phytochemistry**. 1981; 20:2587-2588. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
140. Ismail BS, Chong TV. Effects of aqueous extracts and decomposition of *Mikania micrantha* H.B.K. debris on selected agronomic crops. **Weed Biol Man**. 2002; 2:31-38. ISSN 1444-6162. [[CrossRef](#)].
141. Chaves DSA, Costa SS, De Almeida AP, Frattani F, Assafim M, Zingali RB. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Quím Nova**. 2010; 33(1):172-180. ISSN 0100-4042. [[CrossRef](#)].
142. Freitas TP, Silveira PC, Rocha LG, Rezin GT, Rocha J, Citadini-Zanette V et al. Effects of *Mikania glomerata* Sprengel. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) extracts on pulmonary inflammation and oxidative stress caused by acute coal dust exposure. **J Med Food**. 2008; 11(4):761-766. ISSN 1096-620X. [[CrossRef](#)].
143. Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Junior A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2006; 101(4):387-390. ISSN 1678-8060. [[PubMed](#)].
144. Bueno PCP, Bastos JK. A validated capillary gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. **Rev Bras Farmacogn**. 2009; 19(1B):218-223. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
145. Vilegas JHY, Marchi E, Lanças FM. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* ("guaco") leaves by high resolution gas chromatography. **Phytochem Anal**. 1997; 8:74-77. ISSN 0958-0344. [[CrossRef](#)].
146. Taleb-Contini SH, Santos PA, Veneziani RCS, Pereira AMS, França SC, Lopes NP et al. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Rev Bras Farmacogn**. 2006; 16(Supl.):596-598. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].

147. Do Amaral MPH, Vieira FP, Leite MN, Do Amaral LH, Pinheiro LC, Fonseca BG et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Rev Bras Farmacogn.** 2009; 19(2B): 607-611. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
148. Alvarenga FCR, Garcia EF, Bastos EMAF, Grandi TSM, Duarte MGR. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Rev Bras Farmacogn.** 2009; 19(2A):442-448. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
149. Rufatto LC, Gower A, Schwambach J, Moura S. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. **Rev Bras de Farmacog.** 2012; 22(6):1384-1403. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
150. Silva LS, Da Silva LS, Brumano L, Stringheta PC, Pinto MAO, Dias LOM et al. Preparation of dry extract of *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) and determination of its coumarin levels by spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules.** 2012; 17:10344-10354. ISSN 1420-3049. [[PubMed](#)].
151. Cappelaro EA, Yariwake JH. HS-SPME-GC-MS Analysis of volatile and semi-volatile compounds from dried leaves of *Mikania glomerata* Sprengel. **Quím Nova.** 2015; 38(3): 427-430. ISSN 0100-4042. [[CrossRef](#)].
152. Passari MZGL, Scarminio IS, Marchefaveb GG, Bruns RE. Seasonal changes and solvent effects on fractionated functional food component yields from *Mikania laevigata* leaves. **Food Chem.** 2019; 273:151-158. ISSN 0308-8146. [[CrossRef](#)].
153. Bertoldi FC, Deschamps FC, Silva Junior AA, Correa AF, Franco MF, Eberlin MN. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Rev Bras Plantas Med.** 2016; 18(Supl.1):316-325. ISSN 1516-0572. [[Link](#)].
154. Honório AC, Quaresma AS, Oliveira CT. Flora do Ceará, Brasil: *Mikania* (Asteraceae: Eupatorieae). **Rodriguésia.** 2019; 70:.. ISSN 2175-7860. [[CrossRef](#)].
155. Gasparetto JC, De Francisco TMG, Campos FR, Pontarolo R. Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations. **J Sep Sci.** 2011; 34(7):740-748. ISSN 1615-9306. [[CrossRef](#)].
156. Moreti DLC, Leandro LF, Moraes TS, Moreira MR, Veneziani RCS, Ambrosio SR et al. *Mikania glomerata* Sprengel extract and its major compound *ent*-kaurenoic acid display activity against bacteria present in endodontic infections. **Anaerobe.** 2017; 47:201-208. ISSN 1075-9964 [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
157. Silva MG, Celeghini RMS, Silva MA. Effect of ethanol on the drying characteristics and on the coumarin yield of dried guaco leaves (*Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker). **Braz J of Chem Eng.** July/sept. 2018; 35(3):1095-1104. ISSN 0104-6632. [[CrossRef](#)][[Link](#)].

---

Histórico do artigo | Submissão: 29/07/2019 | Aceite: 18/11/2019 | Publicação: 31/03/2020

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

Como citar este artigo: Coutinho LA, Gonçalves CP, Marcucci MC. Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero *Mikania*. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(1): 118-144. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/822>>. 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: 31/03/2020

## Sumário

1. **Normas para submissão e apresentação do manuscrito**
2. **Processo de Avaliação/Revisão por pares (“peer review”)**
3. **Tipos de artigos publicados**
  - [Artigos de pesquisa](#)
  - [Revisão](#)
  - [Relatos de Experiência](#)
  - [Comunicação Breve](#)
  - [Monografia de Plantas Medicinais](#)
  - [Perspectiva](#)
  - [Resenhas](#)
  - [Carta ao Editor](#)
4. **Informações Gerais do Manuscrito**
  - [Termo de Cessão de Direitos Autorais](#)
  - [Conflito de interesses](#)
  - [Fontes de financiamento](#)
  - [Comitê de Ética](#)
  - [Autorizações ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional](#)
5. **Formatação do Manuscrito**
  - [Aspectos gerais](#)
  - [Título](#)
  - [Resumo e Abstract](#)
  - [Nomenclatura Botânica](#)
  - [Palavras-chave e Keywords](#)
6. **Seções em Artigos de Pesquisa, Revisão, Relato de Experiência e Comunicação Breve**
  - [Introdução](#)
  - [Metodologia / Material e Métodos](#)
  - [Resultados](#)
  - [Discussão](#)
  - [Conclusão](#)

- [Agradecimentos](#)
- [Abreviaturas](#)
- [Unidades de Medida e Números](#)
- [Comunicações Verbais](#)
- [Citações no texto](#)
- [Referências](#)

## 7. Exemplos de referências

- [Artigo de Periódico](#)
- [Artigo de periódico eletrônico](#)
- [Artigo de jornal](#)
- [Livro completo](#)
- [Livro em formato eletrônico](#)
- [Capítulo de livro](#)
- [Capítulo de livro cujo autor é o mesmo da obra](#)
- [Capítulo de livro - autor/colaborador](#)
- [Tese / Dissertação / Monografia](#)
- [Trabalho publicado em anais de eventos científicos](#)
- [Trabalhos aceitos para publicação \(Ahead of Print\)](#)
- [Trabalhos inéditos \(submetidos à aceitação de uma editora, sem ter atingido a fase de publicação\)](#)
- [Patente](#)
- [Legislativa](#)
- [Base de Dados](#)
- [Documentos de Associações/Organizações](#)

---

## 1. Normas para submissão e apresentação do manuscrito

A Revista Fitos (Farmanguinhos/Fiocruz) é um periódico interdisciplinar de publicação trimestral que tem por objetivo divulgar e promover a produção científica e o intercâmbio de informações entre a comunidade nacional e internacional, através da publicação de artigos científicos originais sobre Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) em Biodiversidade e Saúde, aceitando submissão de trabalhos de diferentes áreas do conhecimento, tais como: 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.

O conteúdo integral da Revista Fitos de livre acesso, está disponibilizado no site <http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/>, com licença de publicação CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

A Revista Fitos publica 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. Os manuscritos de pesquisas envolvendo animais e/ou seres humanos deverão ser acompanhados do Certificado de Aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa institucional.

Todos os artigos são publicados em formato PDF, em português, inglês (grafia do inglês americano ou britânico) e espanhol e devem ser submetidos neste idioma. O Título e o Resumo dos manuscritos em português são obrigatórios mesmo para os manuscritos redigidos em inglês ou espanhol.

## 2. Processo de Avaliação/Revisão por pares (“peer review”)

O conteúdo integral publicado na Revista Fitos (Farmanguinhos/Fiocruz) passa pelo processo de revisão por (Peer review) especialistas. Os manuscritos submetidos são direcionados aos editores científicos, para avaliação inicial quanto ao atendimento às normas requeridas para envio dos originais e o mérito do trabalho, decidindo assim, sobre a aprovação de sua submissão, com ou sem alterações. Na sequência, o artigo é enviado para um processo de avaliação por pares, duplo-cega, selecionados de um cadastro de revisores de instituições nacionais e internacionais. Após receber os pareceres, os Editores Científicos/Associados decidirão pela aceitação do manuscrito sem modificações, pela devolução aos autores com sugestões de modificações ou pela rejeição. Os Editores Científicos/Associados têm a responsabilidade de reencaminhar o artigo aos autores para esclarecimentos, tantas vezes quanto necessário, e, a qualquer momento, por decisão dos Editores o documento pode ter sua recusa determinada. Cada nova versão é analisada pelo Editor Científico, que detém o poder da decisão final.

## 3. Tipos de artigos publicados

**Artigos de pesquisa:** Incluem estudos descritivos e experimentais, incluindo os de pesquisa básica com animais de laboratório, estudos controlados e randomizados, estudos observacionais de coorte, caso-controle e transversais, outros. O texto deve ter no máximo 6.000 palavras, excluindo tabelas/ figuras e referências; o número de referências não deve ultrapassar 30. Artigos que relatam ensaios clínicos (clinical trials) deverão informar adesão ao CONSORT (<http://www.consort-statement.org/>) e ter cadastro em um dos Registros de Ensaios Clínicos listados pela Organização Mundial da Saúde ou no National Institute of Health (NIH) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Em casos de submissão de estudos observacionais, solicita-se adesão aos guias do STROBE (<https://www.strobe-statement.org/index.php?id=strobe-home>) para a preparação do manuscrito.

**Revisão:** Avaliações críticas e ordenadas da literatura sobre temas pertinentes ao escopo da Revista Fitos, incluindo as Revisões Sistemáticas e meta-análises. Os autores destes últimos, devem incluir no corpo do manuscrito o número do Registro do protocolo da Revisão no PROSPERO (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>). Para a elaboração do manuscrito os autores devem seguir as normas propostas pelo PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>). Autores podem também submeter à Equipe Editorial Científica uma proposta de artigo de revisão, com um roteiro. Se aprovado, o autor pode desenvolver o roteiro e submetê-lo para publicação. Artigos de revisão devem limitar-se a 8.000 palavras, excluindo referências e tabelas/figuras. As referências bibliográficas devem ser atuais e em número máximo de 40.

**Relatos de Experiência:** Descrição de experiência que contribua de forma relevante para a área de atuação, contextualizado, com objetividade e aporte teórico, incluindo resumo, introdução com marco

teórico e objetivo(s), metodologia, descrição da experiência, discussão, agradecimento (quando houver). O texto deve ter até 6.000 palavras e 20 referências. Serão permitidas, no máximo 04 figuras. As figuras podem ser organizadas sob a forma de prancha. Cada prancha será considerada como uma figura.

**Comunicação Breve:** Relato de resultados preliminares de pesquisa, ou ainda, 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.

**Perspectiva:** Análises de temas conjunturais, de interesse imediato e sobre a importância do tema, em geral a convite dos Editores, 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.

**Carta ao Editor:** Comentários com conteúdo crítico construtivo acerca de material previamente publicado na Revista Fitos. E, ser diretamente submetidas aos Editores Associados. Com, no máximo, 700 palavras, incluindo no máximo seis (6) referências bibliográficas. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada junto com a carta. Editoriais e comentários são encomendados a autoridades em áreas específicas. O Conselho Editorial também analisa propostas de comentários submetidas espontaneamente.

#### 4. Informações Gerais do Manuscrito

A Revista Fitos publica artigos científicos inéditos e originais, que não estejam em avaliação simultânea em nenhum outro periódico, cuja identificação fará com que o manuscrito seja desconsiderado para publicação.

- 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.
- Os conceitos e opiniões expressos nos manuscritos, a exatidão e a procedência das citações, são de exclusiva responsabilidade dos autores.
- Caso haja conflito de interesse, que envolva o manuscrito, este deverá ser informado no formulário de submissão.
- Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado de auxílio à pesquisa.
- 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).
- As autorizações para acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado devem ser apresentadas.



## 5. Formatação do Manuscrito

- O manuscrito deve ser redigido com fonte Arial tamanho 12, em folha configurada em tamanho A4, com espaço 1,5 e margem de 3 cm de cada um dos lados, incluindo as referências bibliográficas e títulos/legendas de tabelas e ilustrações.
- O arquivo deverá apresentar-se em formato digital, extensão “doc” ou “docx”. Arquivos em Adobe® PDF format (.pdf files) não serão aceitos.
- As seções do manuscrito devem seguir a ordem: título, resumo em português, resumo em inglês, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas (cada tabela completa, com título e legendas, inseridas no corpo do texto), figuras (cada figura completa, com título e legendas, inseridas no corpo do texto).
- O Título e os Subtítulos, em negrito, deverá ter a primeira palavra escrita com a primeira letra maiúscula.
- Não serão aceitas notas de rodapé.
- Siglas devem ser escritas por extenso, quando aparecem a primeira vez no texto, incluindo Resumo e Abstract.

### Título

O título do manuscrito deve ser conciso e informativo, evitando termos supérfluos e abreviaturas, em negrito, no idioma do manuscrito (português, inglês ou espanhol) e em inglês, com o máximo de 120 caracteres, incluindo espaços. O Título e o Resumo dos manuscritos em português são exigidos quando da submissão e envio da versão final para aqueles em inglês e espanhol.

### Resumo e Abstract

- Só não se aplica a perspectiva, resenha e carta.
- O resumo e o abstract devem conter, no máximo, 200 palavras ou 1.200 caracteres, evitando o uso de abreviaturas, contendo apresentação concisa dos pontos relevantes do trabalho em um único parágrafo, expondo objetivo, metodologia, resultados e conclusão.
- No abstract, evitar traduções literais.

Importante: 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.

### Nomenclatura Botânica

Os nomes científicos das plantas devem ser escritos de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, sem abreviaturas no resumo/abstract e no corpo do texto, para cada espécie citada pela primeira vez, mas quando várias espécies pertencerem ao mesmo gênero basta citar apenas para a primeira (por exemplo, *Mentha piperita* e *M. acuta*). A autoria da espécie (por exemplo, L., Opiz) é necessária apenas na seção de Metodologia, de acordo com o The International Plant Names Index

([www.ipni.org](http://www.ipni.org)) e com a Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>) . Cultivares ou variedades devem ser correlacionados ao nome científico (por exemplo, *Ximena americana* var. *inermis*). Os autores devem informar na Metodologia/Material e Métodos o espécime e número do voucher de referência das plantas utilizadas ou outro material examinado.

### Palavras-chave e Keywords

- Após o resumo dos artigos originais, relatos de caso ou revisões, indicar de três (3) a seis (6) palavras-chave e **Keywords**, usadas para indexação, que representem o conteúdo do manuscrito, facilitando a recuperação da informação.
- Utilize termos do Medical Subject Headings (MeSH), disponíveis em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>. Quando não estiverem disponíveis descritores adequados é possível utilizar termos livres.
- 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. As keywords deverão ser em inglês.

## 6. Seções em Artigos de Pesquisa, Revisão, Relato de Experiência e Comunicação Breve

### Introdução

Clara, objetiva, sucinta, citando apenas referências estritamente relacionadas ao tema que justifique a realização do trabalho, informando as hipóteses iniciais (quando houver) e o referencial teórico atualizado. Ao final da introdução, os objetivos do estudo devem ser claramente descritos.

### Metodologia / Material e Métodos

A Metodologia ou Material e Métodos deverá descrever os instrumentos de coleta de dados, os materiais usados e os mecanismos de análise dos dados, incluindo o desenho de estudo, definição de variáveis, análise estatística. Os procedimentos, produtos e equipamentos utilizados devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo.

Os estudos em seres humanos e/ou em animais, é obrigatória a inclusão de declaração de que todos os procedimentos tenham sido aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da instituição a que se vinculam os autores ou, na falta deste, por outro comitê de ética em pesquisa indicado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde.

As Revisões deverão informar as fontes dos dados, descrever as fontes da pesquisa, definindo as bases de dados e os anos pesquisados, apresentar a estratégia de busca, os critérios de elegibilidade dos estudos, a análise do risco de viés dos estudos incluídos, a extração de dados e a estratégia de avaliação das informações (em caso de Revisões Sistemáticas). Nos casos de revisões sistemáticas, com ou sem meta- análises, os autores devem seguir o PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>).

## **Resultados**

Devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto.

Os Resultados deverão ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica, informando os principais dados, quantitativos ou qualitativos, intervalos de confiança e significância, a estatística dos achados. Sempre que necessário, deverão estar acompanhados de tabelas e figuras adequadas.

## **Discussão**

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 descritos na literatura, publicados e referenciados. Discutir as implicações dos achados e suas limitações, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. Os autores devem dar igual ênfase aos achados favoráveis e desfavoráveis que tenham méritos científicos similares. Incluir recomendações, quando pertinentes.

As seções de Resultados e Discussão poderão ser apresentados num único tópico.

## **Conclusão**

Apresentar apenas aquelas apoiadas pelos dados do estudo e que contemplem os objetivos, bem como sua aplicação prática, dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares. As conclusões devem ser apresentadas no final da discussão e responder os objetivos do estudo, evitando informações se inferências não sustentadas pelos achados.

## **Agradecimentos**

Devem ser breves e objetivos. Somente devem ser mencionadas as pessoas ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas que não tenham preenchido os critérios de autoria.

## **Abreviaturas**

Devem ser evitadas, pois prejudicam a leitura confortável do texto. Quando usadas, devem ser definidas ao serem mencionadas pela primeira vez. Jamais devem aparecer no título e nos resumos.

## **Unidades de Medida e Números**

A Revista Fitos adota o Systéme International d'Unités (SI). Para volume, usar metro cúbico (e.g.  $1 \times 10^{-5}$  m<sup>3</sup>) ou litro (e.g. 5 µL, 5 mL, 5 L). Para concentrações, usar µM, µmol L<sup>-1</sup> or mg L<sup>-1</sup>. Para tamanho e distância usar (cm, mm, µm, etc) e seja consistente no manuscrito.

Números abaixo de nove devem ser escritos, com exceção das medidas, os acima de dez, devem ser indicados em numerais, desde que não estejam em início de sentença.

## 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.

Observações não publicadas e comunicações pessoais não podem ser citadas como referências; se for imprescindível a inclusão de informações dessa natureza no artigo, elas devem ser seguidas pela observação “dado não publicado” ou “comunicação pessoal” entre parênteses no corpo do artigo.

## Citações no texto

Todas as citações deverão estar informadas no texto, numeradas, entre chaves e na sequência da sua apresentação no texto, separadas entre vírgulas no caso de mais de duas citações sequenciais ou citações múltiplas.

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.

## Referências

As referências devem ser formatadas no estilo Vancouver, também conhecido como o estilo Uniform Requirements.

As referências devem ser numeradas e ordenadas na sequência das citações no texto. As citações no texto devem ser identificadas por algarismos arábicos, entre chaves e sobrescritos. Seguir a sequência da numeração das citações, também, nas tabelas, caso haja.

Artigos aceitos para publicação, mas ainda não publicados podem ser citados desde que seja feita a indicação da revista e que o respectivo artigo está na pré-publicação em “Ahead of Print”.

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme recomenda o Index Medicus; uma lista com suas respectivas abreviaturas pode ser obtidas através da publicação da NLM “List of Serials Indexed for Online Users”, disponível no endereço [www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html).

A seguir, apresentamos alguns exemplos do modelo adotado pela Revista Fitos.

## 7. 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?. **J of Technol Educ** [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* diarreiogênia empregando culturas fecais primárias**. Rio de Janeiro; 2000. Dissertação de 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 de Doutorado [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 (Ahead of Print)

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

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

Silvestre P. Golpe de arfete: 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.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

