

Volume 14 - Número 4
Outubro - Dezembro 2020

REVISTA

FITOS[®]

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

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Medicamentos da Biodiversidade

Foto de capa: *Cryptomeria japonica* (L. F.) D. (Cupressaceae)

 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

 **farmanguinhos**
Instituto de Tecnologia em Fármacos



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

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

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

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

Editores

Editor de Pesquisa Maria Helena Durães Alves Monteiro, FIOCRUZ

Editor de Desenvolvimento e Inovação Glauco de Kruse Villas-Bôas, FIOCRUZ

Editores Associados

Emiliano de Oliveira Barreto, UFAL

Érica Speaglich, USP

Israel Felzenszwalb, UERJ

Ivanildes 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

Tel: +55 21 3348.5370 / +55 21 3348.5598

E-mail: revistafitos@far.fiocruz.br

Acesso online / Online access

Artigos disponíveis em formatos PDF e HTML no endereço eletrônico:

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 4

Outubro - Dezembro 2020

APRESENTAÇÃO

Yolanda Arruda 431-433

EDITORIAL**Um ciclo de 15 anos** 434-435

Glauco Villas Bôas

ARTIGO DE PESQUISA**Atividade do extrato de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) sobre os parâmetros bioquímicos e histológicos de ratos diabéticos** 436-449Activity of litchia extract (*Litchi chinensis* Sonn.) on the biochemicals and histological parameters of diabetic rats

Brasil, Flávia de Fátima; Santos, Everton Charles Ferreira dos; Costa, Fábio Martins da; Correa, Gustavo Henrique Bortolozzo; Xavier, Gustavo de Almeida; Melo, Ródney André de; Pieroni, Marcela Rezende; Lopes, Ana Claudia Frota Machado de Melo; Salles, Bruno Cesar Correa; Santos, Gérsika Bitencourt.

Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans* 450-461Characterization of phenolic compounds, toxicity assessment, and quality analysis of tea samples from *Miconia albicans*

Hamann, Bruna; Winter, Elisa Mara dos Santos; Silbert, Diogo Alexandre; Micke, Gustavo Amadeu; Vitali, Luciano; Tenfen, Adrielli; Zimmermann, Lara Almida.

***Cryptomeria japonica* (L. F.) D. Don as source of shikimic acid** 462-468

Cerdeira, Antonio Luiz; Queiroz, Sonia Claudia Nascimento; Matallo, Marcus Barifouse.

Effect of spray drying process parameters on *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. dried extracts 469-475

Rodrigues, Lucas Oliveira; Faria, Rachel Andrade de; Gouvêa, Marcos Martins; Peregrino, Carlos Augusto de Freitas; Macedo, Elizabeth Valverde; Mourão, Samanta Cardozo.

Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata* 476-491Chemical study and antimalarial activity evaluation of branches of *Piranhea trifoliata*

Pedroza, Laila da Silva; Salazar, Marcos Gabriel Maciel; Osorio, Maria Izabel Correia; Fachin-Espinar, Maria Tereza; Paula, Renata Cristina de; Nascimento, Maria Fernanda Alves de; Oliveira, Alaíde Braga de; Nunez, Cecilia Veronica.

Etnobotânica aplicada à seleção de espécies nativas amazônicas como subsídio à regionalização da fitoterapia no SUS: município de Oriximiná – PA, Brasil 492-512

Ethnobotany applied to the selection of native Amazonian species as support to the regionalization of phytotherapy in the SUS: municipality of Oriximiná – PA, Brazil

Pires, Jéssica Oliveira; Léda, Paulo Henrique de Oliveira; Oliveira, Danilo Ribeiro de; Coelho-Ferreira, Márlia Regina; Scher, Itana Suzart; Talgatti, Dávia Marciana.

Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade 513-527

Nanoemulsions formulated for topical use: a study of synthesis and toxicity

Porto, Alice Sperandio; Almeida, Igor Vivian de; Vicentini, Verônica Elisa Pimenta.

***In vitro* antileishmanial activity and phytochemical analysis of *Casearia javitensis* Kunth (Salicaceae)** 528-537

Silva, Carolina Moraes da; Eiró, Luciana Guimarães; Silva-Silva, João Vítor; Correa-Barbosa, Juliana; Coelho-Ferreira, Márlia; Silveira, Fernando Tobias; Marinho, Andrey Moacir do Rosário; Almeida, Maria das Graças Carvalho; Brígido, Heliton Patrick Cordovil; Dolabela, Maria Fâni.

RELATO DE EXPERIÊNCIA

Desenvolvimento de fitoterápicos a partir das folhas da noqueira-da-índia (*Aleurites moluccanus*): relato de experiência de parceria entre uma Universidade Comunitária e indústrias farmacêuticas nacionais 538-546

Development of herbal medicines from the leaves of the walnut tree (*Aleurites moluccanus*): report experience of Community University and national pharmaceutical company

Bresolin, Tania Mari Bellé; Silva, Ruth Meri Lucinda da; Meyre-Silva, Christiane; Quintão, Nara Lins Meira; Cechinel Filho, Valdir.

REVISÃO

Contributions of bioinformatics to study natural antifungals: review in a pharmacological context 547-562

Miozza, Valeria; Barceló, Sebastián; Passero, Pablo; Farah, Ezequiel; Pérez, Cristina.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Normas para submissão e apresentação do manuscrito 563-574

Neste número 4 estamos finalizando o volume 14 da Revista Fitos, atendendo assim a meta da pontualidade das publicações estabelecida para o ano de 2020. Apresentamos a seguir os resumos de 10 artigos publicados, sendo: 8 pesquisas, 1 revisão e 1 relato de experiência:

Atividade antileishmanial *in vitro* e análise fitoquímica de *Casearia javitensis* Kunth (Salicaceae). O objetivo deste estudo foi realizar análises fitoquímicas do extrato de casca de *Casearia javitensis* e avaliar a sua atividade antipromastigante contra *Leishmania amazonensis*. O ensaio de antipromastigotas de *Leishmania amazonensis* e o teste de citotoxicidade contra a linha celular de leucemia monocítica aguda (THP-1) foram realizados pelo ensaio colorimétrico MTT. O perfil fitoquímico em cromatografia em camada fina (TLC) detectou terpenos em todas as amostras. Conclui-se que a fração em diclorometano (FrDcm) de *C. javitensis* tem potencial como leishmanicida, e esta atividade pode estar relacionada com a presença de composto fenólico.

Atividade do extrato de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) sobre os parâmetros bioquímicos e histológicos de ratos diabéticos. Neste estudo avaliou-se o efeito anti-hiperglicêmico do extrato hidroetanólico da casca e polpa dos frutos de *Litchi chinensis* (lichia) em ratos diabéticos. Foram avaliados a glicemia e os biomarcadores, como as triglicérides, colesterol, função renal e hepática. Tecidos como fígado, rins, coração e pâncreas foram retirados para análise histológica. Os ratos tratados tanto com a casca quanto com a polpa, obtiveram redução dos níveis de lipídeos, das taxas de triglicérides e colesterol. *Litchi chinensis* mostrou seu benefício nos efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, tendo potencial terapêutico na prevenção e no tratamento das complicações da diabetes *mellitus*.

Caracterização dos compostos fenólicos e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*. Neste estudo foram avaliados os constituintes fenólicos e a qualidade de cinco amostras de chás de *M. albicans* (canela de velho), adquiridos em ambientes comerciais da cidade de Jaraguá do Sul-SC. A toxicidade foi avaliada com larvas de *Artemia salina*. Os resultados de controle de qualidade da matéria-prima vegetal demonstraram estar em conformidade com as especificações descritas na Farmacopeia Brasileira. As amostras são potencialmente citotóxicas, tendo uma DL₅₀ menor que 1000 µg/mL. Sugere-se que sejam realizados estudos adicionais dos benefícios farmacológicos e efeitos toxicológicos da espécie visando maior segurança aos usuários.

***Cryptomeria japonica* (L. F.) D. Don como fonte de ácido chiquímico.** Neste estudo, encontrou-se um conteúdo de 56,36 mg.kg⁻¹ de SA na biomassa seca de *C. japonica*, enquanto que para a *Illicium verum*, a fonte tradicional, era de 96,57 mg.kg⁻¹. O fosfato de oseltamivir (OSP), comercializado sob a marca Tamiflu®, é um potente inibidor da neuraminidase viral, uma enzima glicosídica hidrolase essencial para a replicação viral. A OSP é também importante no controle do vírus da gripe (H1N1) e é produzida principalmente a partir do ácido chiquímico (SA) extraído das plantas. A principal fonte de OSP é a partir de sementes de *I. verum*. A *Cryptomeria japonica* é uma das alternativas para satisfazer a demanda mundial, uma vez que *C. japonica* sendo uma árvore, explorada para produção comercial, pode ser uma fonte renovável e fiável SA para a produção de OSP.

Efeito dos parâmetros do processo de secagem por pulverização em *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. extratos secos. Este estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros do processo de secagem por pulverização sobre as propriedades de diferentes extratos obtidos a partir de *U. tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. (garra de gato), uma planta da família das Rubiaceae, da região amazônica, utilizada na medicina tradicional como matéria-prima para fitoterápicos indicados para a artrite e osteoartrite. A melhor configuração de secagem por pulverização para as características desejadas (menor higroscopicidade e umidade) utilizou o bocal de pulverização maior com um diâmetro de 1,2 mm e a temperatura mais elevada de 150°C, com ambos os portadores.

Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. Este trabalho teve como objetivos o estudo químico dos galhos de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae) e a avaliação do seu potencial antimalárico, com duas coletas no estado do PA, Brasil. Quanto à atividade antimalárica, os extratos e as fases dos extratos MeOH foram avaliados *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum*, e os extratos MeOH da 1ª e 2ª coletas foram considerados ativos ($CI_{50} = 13,7 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50} = 5,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Este trabalho contribuiu para o conhecimento biológico e químico da espécie *Piranhea trifoliata* e da família Picrodendraceae, sendo o primeiro relato de atividades biológicas para a espécie em estudo.

Etnobotânica aplicada à seleção de espécies nativas amazônicas como subsídio à regionalização da fitoterapia no SUS: Oriximiná – Pará. Neste estudo, conduziu-se levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais, por moradores de Oriximiná-PA, e analisou-se presença das nativas da Amazônia em documentos do Sistema Único de Saúde (SUS). Por entrevistas obteve-se a coleta e identificação de 112 espécies pertencentes a 50 famílias, sendo a maior parte referente à família Fabaceae e nativas da Amazônia (56%). Foram comparadas nativas da Amazônia com aquelas presentes em 14 documentos do SUS. O estudo etnobotânico conduzido em Oriximiná demonstra a importância das nativas para a população, em contrapartida à sua pouca representatividade no SUS. Pesquisa desta natureza, objetiva alinhar políticas de saúde ao território.

Contribuições da bioinformática no estudo dos antifúngicos naturais: revisão num contexto farmacológico. A proposta dessa revisão foi atualizar os conhecimentos relativos à aplicação de métodos computacionais, ferramentas valiosas para a investigação de compostos antifúngicos naturais, de sistemas biológicos, aplicadas à bioquímica, imunologia, farmacologia, etc. Para este trabalho, buscaram-se, em bases de dados eletrônicas, artigos científicos pertinentes e relevantes sobre estudos *in silico* de novos e conhecidos agentes antifúngicos naturais. No contexto farmacológico, considerou-se: alvos moleculares, mecanismos de efeitos terapêuticos e tóxicos, bem como mecanismos de resistência e sua reversão, com especial enfoque nas micoses humanas. Nesta revisão resumem-se importantes contribuições de estudos de bioinformática para o desenho e descoberta de novos agentes potenciais.

Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. Este estudo de revisão descreve metodologias de síntese de nanoemulsões utilizando para composição da fórmula, extratos e óleos vegetais, medicamentos alopáticos convencionais e nanopartículas metálicas. A Nanotecnologia tem se destacado significativamente em diversas áreas da ciência, em especial, na área farmacêutica. Os nanocarreadores de fármacos apresentam uma alternativa segura e eficaz, apresentando propriedades importantes do ponto de vista farmacoterápico. Trata-se de sistemas constituídos por glóbulos bastante

reduzidos, em escala manométrica, que podem veicular princípio ativo sendo ainda adequados à distribuição de substâncias ativas na pele, permitindo maior absorção.

Desenvolvimento de Fitoterápicos a partir das Folhas da Nogueira-da-Índia (*Aleurites moluccanus*): relato de experiência de parceria entre universidade comunitária e indústria farmacêutica nacional.

Este trabalho relata o desenvolvimento de novos e efetivos fitoterápicos obtidos a partir das folhas de *Aleurites moluccanus* (Euphorbiaceae), uma espécie exótica, proveniente da Ásia. Nos estudos não clínicos e na etapa clínica-fase I foram desenvolvidos, em escala piloto, comprimidos a base do extrato seco padronizado de *A. moluccanus*, e estabelecidas formulações como creme tópico e suspensão oral. A padronização do extrato, em escala industrial, depende do cenário e consequente direcionamento do mercado. Este relato proporcionou uma visão sobre as superações vivenciadas por pesquisadores de uma Universidade Comunitária brasileira, na P&D de novo, efetivo e seguro fitoterápico analgésico e anti-inflamatório.

Boa leitura!

Yolanda Arruda

Um ciclo de 15 anos

Chegamos ao final de 2020, um ano marcado pela emergência da Pandemia COVID-19 e por seus impactos sócio econômicos, ambientais, culturais e políticos. Diria que este ano nos fez refletir sobre as interrelações de distintas dimensões como a emergência climática e a crise crônica e aguda do modelo de desenvolvimento hegemônico, a biodiversidade e a emergência de novas doenças, o domínio do mercado sobre as tecnologias e as políticas nacionais de desenvolvimento tecnológico e inovação em saúde, entre outras.

Neste panorama de mudanças aceleradas rumo a um “novo normal” imprevisível, a Revista Fitos completa um ciclo de 15 anos de existência, com a publicação do presente número. Desde sua criação a Fitos atravessou diversos desafios, dentre os quais destaco a sua institucionalização na Fiocruz, a atualização de sua plataforma operacional para OJS/PKP, a adoção de novo enfoque disciplinar e a ampliação do seu escopo.

Neste caminho, a Revista Fitos evoluiu de forma singular, assumindo em sua linha editorial a perspectiva da diversidade genética, ecossistêmica e de espécies, que definem Biodiversidade, para abrigar a produção acadêmica. Sua política editorial descreve como missão a publicação de trabalhos científicos que contribuam para o pensamento crítico em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biodiversidade e Saúde, a promoção da inter e transdisciplinaridade entre diversas áreas do conhecimento tais como Saúde, Humanas e Tecnológicas, aumentando a compreensão das complexas relações, que envolvem: a biodiversidade; a saúde; o desenvolvimento sustentável; a conservação dos recursos naturais; e a redução das desigualdades sociais.

Ao longo destes anos a Fitos visou o aumentar o alcance de seus artigos, priorizando o processo de indexação, atendendo tanto aos requisitos básicos como o ISSN, DOI, cronograma de publicação, política de direitos autorais e metadados básicos em seus artigos, quanto àqueles descritos como elevados padrões técnicos. Hoje, a Fitos encontra-se preparada para alcançar seu potencial máximo de indexação, contando com arquivos em HTML e PDF, um site capaz de ser rastreado por robôs, assim como de exportar dados em XML.

A partir da emergência da pandemia Covid-19, a Revista Fitos alinhou-se aos demais periódicos da Fiocruz adotando um conjunto de procedimentos, visando agilizar o processo de avaliação editorial, revisão por pares e publicação denominada *fast track* para artigos relacionados à Covid-19.

Este ano a Fitos publicou 6 números, quatro regulares, sendo um deles temático (Práticas Integrativas e Complementares para a Saúde, PIC's), um número especial (Desenvolvimento tecnológico e inovação em fitomedicamentos) e um suplemento (II Seminário Internacional de Pós-Graduação em Desenvolvimento Rural Sustentável – UNIOESTE /PR).

Além disso, instituímos o FAST TRACK para artigos sobre a COVID-19, alinhadas com a política editorial da FIOCRUZ, comprometida com a excelência em pesquisa e também na divulgação científica para a sociedade. A Revista Fitos está presente nas redes sociais (Facebook, Instagram, LinkedIn, Twitter).

O presente número 4 do volume 14 contém 10 artigos, sendo oito de pesquisa um de revisão e um relato de experiência.

Ao encerrar este ciclo de 15 anos parabeno toda a equipe de trabalho, pelo esforço dedicação e competência. Agradeço aos autores, pelas submissões dos seus trabalhos e por acreditarem na qualidade da revista e, também, a todos os pesquisadores que estiveram nas diversas editorias, cada qual no seu tempo, dando sua valiosa contribuição para a trajetória da Revista Fitos.

Glauco Villas Bôas
Editor

Atividade do extrato de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) sobre os parâmetros bioquímicos e histológicos de ratos diabéticos

Activity of lichia extract (*Litchi chinensis* Sonn.) on the biochemicals and histological parameters of diabetic rats

DOI 10.32712/2446-4775.2020.826

Brasil, Flávia de Fátima¹; Santos, Everton Charles Ferreira dos¹; Costa, Fábio Martins da¹; Correa, Gustavo Henrique Bortolozzo¹; Xavier, Gustavo de Almeida¹; Melo, Ródney André de¹; Pieroni, Marcela Rezende¹; Lopes, Ana Claudia Frota Machado de Melo²; Salles, Bruno Cesar Correa¹; Santos, Gérsika Bitencourt¹.

¹Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), Campus Alfenas, Rodovia MG-179 Km 0, s/n, Bairro Trevo, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

²Universidade de São Paulo (USP), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255, Cerqueira César, CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brasil.

*Correspondência: flaah_brasil@hotmail.com.

Resumo

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica não transmissível caracterizada como o aumento da glicose, devido às disfunções do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Aliado com o avanço da ciência os frutos e seus subprodutos tem sido considerados promotores da saúde. Neste estudo foi avaliado o efeito anti-hiperglicêmico do extrato hidroetanólico da casca e polpa dos frutos de *Litchi chinensis* (lichia) em ratos diabéticos. Foram utilizados ratos wistar (250 a 300 g) com DM induzido por aloxana 130 mg/kg. Os animais foram tratados com 300 mg/kg de extratos de *Litchi chinensis*, durante 75 dias, por gavagem. Foram avaliados a glicemia e os biomarcadores, como os triglicérides, colesterol, função renal e hepática. Tecidos como fígado, rins, coração e pâncreas foram retirados para análise histológica. Os ratos diabéticos tratados com a casca de *Litchi chinensis* apresentaram uma redução significativa na glicemia em jejum, quando comparados aos ratos não tratados. Além dessa ação benéfica, os ratos tratados tanto com a casca quanto com a polpa, obtiveram redução dos níveis de lipídeos, reduzindo as taxas de triglicerídeos e colesterol. Portanto, *Litchi chinensis* mostrou seu benefício nos efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, tendo potencial terapêutico na prevenção e no tratamento das complicações do diabetes *mellitus*.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Fitoterapia. Tratamento nutricional.

Abstract

Diabetes *mellitus* (DM) is a chronic non-communicable disease characterized as increased glucose, due to metabolic dysfunctions of carbohydrates, lipids and proteins. Along with the advancement of science the

fruits and their by-products have been considered health promoters. In the present study the antihyperglycemic effect of the hydroethanolic extract of the peel and pulp of the fruits of *Litchi chinensis* (lichia) in diabetic rats was evaluated. Wistar rats (250 to 300 g) with alloxan-induced DM 130 mg / kg were used. The animals were treated with extracts of *Litchi chinensis* 300 mg / kg for 75 days, by gavage. Blood glucose and biomarkers, such as triglycerides, cholesterol, renal and hepatic function were evaluated. Tissues such as liver, kidneys, heart and pancreas were removed for histological analysis. Diabetic rats treated with the peel of *Litchi chinensis* showed a significant reduction in fasting glycemia when compared to untreated rats. In addition to this beneficial action, rats treated both with the peel and the pulp, obtained reduction of the lipid levels, reducing the rates of triglycerides and cholesterol. Therefore, *Litchi chinensis* showed its benefit in the hypoglycemic and lipid-lowering effects, having therapeutic potential in the prevention and treatment of the complications of diabetes *mellitus*.

Keywords: Diabetes *mellitus*. Phytotherapy. Nutritional treatment.

Introdução

O diabetes é uma doença crônica caracterizada pelo aumento da glicose sanguínea (hiperglicemia), devido a distúrbios do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Manifesta-se pela ausência de produção de insulina pelo pâncreas, aumento de resistência periférica à insulina ou por ambos os casos^[1,2].

Estudos recentes visam comprovar a atuação de certos alimentos na redução do risco de doenças. Eles mostram que os fitoquímicos dos frutos são os principais compostos bioativos que trazem benefícios à saúde humana e mostram que o seu consumo auxilia na redução do risco de doença acidente vascular encefálico hemorrágico, assim como na diminuição da incidência de certos tipos de câncer e do estresse oxidativo^[3].

Dentro desse contexto, se chama a atenção para a espécie *Litchi chinensis* pertencente a família Sapindaceae. Todas as partes da planta são ricas fontes de fitoquímicos, diglicosídeo de malvidina, leucocianidina, glicosídeo de cianidina, saponinas, hidroxitolueno, butilado, isolariciresinol, kaempferol, rutina e estigmasterol^[4].

Aliados aos avanços da ciência e pelo destaque nas diversas publicações sobre as propriedades nutricionais dos alimentos e seus potenciais benefícios à saúde humana, os frutos e seus subprodutos são considerados promotores da saúde e peças-chave na promoção da qualidade de vida^[5].

Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade dos extratos da casca e polpa de lichia (*Litchi chinensis*) em reduzir parâmetros bioquímicos (glicemia e triglicérides) e histológicos aumentados em animais diabéticos.

Material e Métodos

Aspectos éticos

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Institucional sobre o uso de animais da Universidade José do Rosário Vellano (Parecer nº 42A/2017). Todos os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory*

Animals^[6]. Além disso, a pesquisa não envolve qualquer espécie ameaçada de extinção e/ou protegida e nenhuma permissão específica foi requerida quanto ao uso do material vegetal.

Coleta e identificação do material vegetal

Os frutos foram coletados na fazenda Borda do Campo, em Ouro fino/MG, Brasil que se encontra geograficamente localizada em Latitude: 22°16'59"S. Longitude: 46°22'08"W. Altitude: 908 m. A identificação taxonômica do material vegetal foi realizada no herbário UALF da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), onde uma amostra foi depositada.

Preparo do extrato hidroetanólico de *Litchi chinensis*

Foram preparados extratos da casca e da polpa de *Litchi chinensis*. Os extratos hidroetanólicos tiveram início com o umedecimento antecipado de 200 gramas de casca e polpa de *Litchi chinensis* durante duas horas. Em seguida, o Erlenmeyer foi preenchido com a droga vegetal umedecida e adicionou-se o álcool 70% (v/v), deixando-o em maceração por sete dias. Os extratos hidroetanólicos obtidos passaram por filtração e foram colocados em refratário sob chapas em temperatura controlada (aproximadamente 45°C) para concentração do extrato líquido. O extrato obtido foi apropriadamente armazenado e, quando do uso, solubilizado em água destilada para administração por gavagem aos animais.

Parte experimental

Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos (6–9 semanas), com peso corporal inicial variando entre 250-300 g, fornecidas pelo Biotério da Unifenas/Alfenas. Os animais foram submetidos a um período de aclimação por 10 dias, alojados em gaiolas coletivas (três animais por gaiola), em temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e em um ambiente com ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo alimentação específica para espécie (ração comercial) e água potável *ad libitum*.

Indução de DM tipo 1

Para indução do DM tipo 1, os animais foram previamente mantidos em jejum por 12 horas, com água fornecida *ad libitum*. A seguir, os animais receberam uma dose única (130 mg/kg de peso) de uma solução de aloxana monoidratada (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, USA), via intraperitoneal. Uma hora e meia após a injeção, a alimentação foi reintroduzida aos animais. Após sete dias, foi realizada a pesagem e determinação da glicemia capilar de cada animal. Aqueles animais que obtiveram e sustentaram uma glicemia superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos^[7].

Desenho experimental

Ratos sem DM (saudáveis) não tratados foram usados como controle, conforme demonstrado no grupo 1 da TABELA 1. Após indução do DM tipo 1, como acima descrito, os ratos diabéticos foram mantidos com dieta padrão e água *ad libitum*, e divididos em mais dois grupos experimentais (TABELA 1): um tratado com extrato da casca e outro tratado com extrato etanólico da polpa de *Litchi chinensis*, administrado pelo processo de gavagem, durante 75 dias. Os consumos de água e ração, bem como o acompanhamento do peso dos ratos, foram avaliados neste intervalo.

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

Grupo experimental	Nº inicial de animais/ Nº final de animais	Injeção administrada/ Indução do DM (Sim/Não)	Dieta	Tempo de Tratamento/ Tipo de Tratamento
Sem diabetes	5/5	Salina/Não	Padrão	75 dias/Placebo
Com diabetes	8/4	Aloxana (130 mg/kg) /Sim	Padrão	75 dias/Placebo
Tratados com extrato da casca de <i>Litchi chinensis</i>	8/4	Aloxana (130 mg/kg) /Sim	Padrão	75 dias/Extrato (300 mg/kg/dia)
Tratados com extrato da polpa de <i>Litchi chinensis</i>	9/4	Aloxana (130 mg/kg) /Sim	Padrão	75 dias/Extrato (300 mg/kg/dia)

Obtenção das amostras biológicas

Após 75 dias de tratamento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e, em seguida anestesiados usando Isoflurano a 5% e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Para obtenção do soro, as amostras de sangue coletadas em tubos siliconizados (sem aditivo) foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos, em temperatura ambiente, e o soro foi separado, sendo imediatamente utilizado para a determinação da glicemia de jejum, da função renal, da função hepática e do perfil lipídico. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia e foram retirados, coração, fígado, pâncreas e rins. Para o preparo do homogeneizado dos órgãos, foram homogeneizados, a 4°C em tampão, fosfato (PBS, pH 7,2) 0,1 M, na proporção 5 mL/g de órgão^[8].

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

As concentrações de glicose, colesterol total e de triglicerídeos foram determinadas no soro por método enzimático colorimétrico de ponto final. Os níveis séricos de creatinina foram determinados pelo método de Jaffé modificado, utilizando um kit adquirido comercialmente, cujo procedimento de medição foi calibrado com o material de referência SRM 914 do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), tornando os resultados rastreáveis ao método definitivo (espectrometria de massas com diluição isotópica). As concentrações das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas no soro, por método cinético UV.

Análise dos resultados

Os dados foram expressos como média (+/-) e erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey que serviu para comparar as médias entre os quatro diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi $\leq 0,05$.

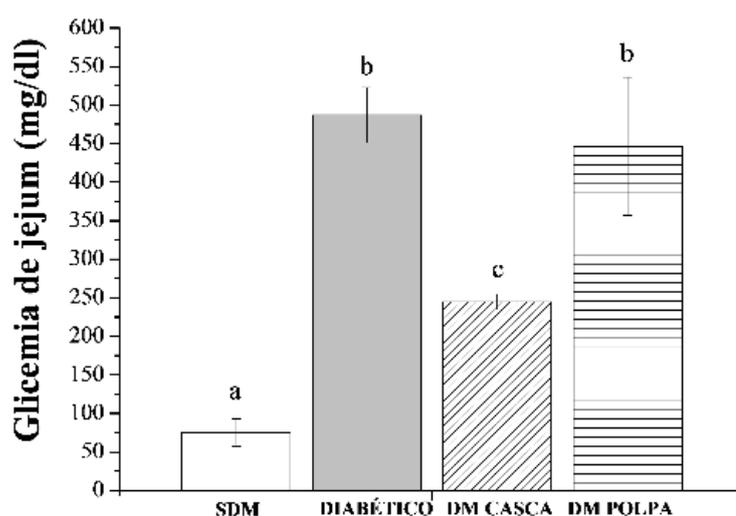
Resultados e Discussão

Análises Bioquímicas

No presente estudo verificou-se o efeito anti-hiperglicêmico do extrato etanólico da casca e da polpa de *Litchi chinensis* em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1 (FIGURA 1). Após 75 dias de tratamento, tempo necessário para o marcante aparecimento das complicações do DM não controlado (hiperglicemia não controlada), houve uma significativa ($p < 0,05$) diminuição na glicemia de jejum em animais que receberam uma dose diária de 300 mg/kg do extrato da casca de lichia, durante este intervalo de tempo, porém não houve redução significativa da glicemia dos ratos tratados com extrato da polpa de *Litchi chinensis*.

O fruto, em especial a casca, apresenta um perfil que contém quantidades significativas de compostos fenólicos, antocianinas que são os principais polifenóis, indicando-a como um potente eliminador de radicais livres e possuindo uma notável atividade antioxidante utilizada na prevenção de diversas doenças, como do diabetes *mellitus*^[9].

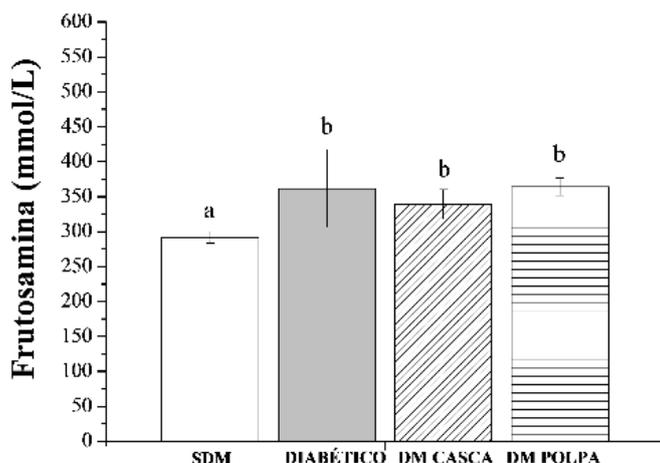
FIGURA 1. Efeito anti-hiperglicêmico do extrato etanólico da casca e polpa de *Litchi chinensis* (300 mg/kg/dia) em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1.



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

Nesse estudo verificou-se que não houve influência do tratamento com os extratos da casca e da polpa de *L. chinensis*, na dose usada, sobre os níveis de frutossamina nos ratos com diabetes *mellitus* (FIGURA 2). A frutossamina é formada através do mecanismo não enzimático que envolve a ligação da glicose sérica às proteínas séricas, em especial a albumina, para formar cetaminas. Portanto, ela é o produto da glicação de proteínas séricas e possui um tempo de vida médio entre 14 e 21 dias, ou seja, duas a três semanas, indicando o nível médio de glicemia deste período^[10]. Ela, ainda, eleva-se na presença de níveis aumentados de glicose no sangue, e com isso mostra que o controle glicêmico foi inadequado no período supracitado.

FIGURA 2: Efeito do extrato etanólico da casca e polpa de *Litchi chinensis* sobre os níveis séricos de frutossamina em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1.



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

Em relação ao peso dos animais (**TABELA 2**), os ratos saudáveis (SDM) apresentaram, em média, maior peso, não havendo diferenças significativas entre os grupos de ratos diabéticos e aqueles diabéticos tratados com a casca de *Litchi chinensis*. Entretanto, há uma diferença considerável na perda de peso dos ratos tratados com a polpa da fruta^[11]. O consumo de água e ração (**TABELAS 3 e 4**), também foi influenciado pelo tratamento com os extratos de *Litchi chinensis*, sendo que houve um significativo maior no consumo de água no grupo de ratos diabéticos tratados com a polpa de *Litchi chinensis*. E o consumo de ração foi significativamente diferente entre os três grupos avaliados. Algumas literaturas mostram que tais variáveis podem ser influenciadas pelas alterações induzidas pelo diabetes mellitus^[12].

TABELA 2. Médias¹ (erro padrão) do controle de peso dos 4 grupos.

Grupos	Médias ¹
SDM	347,8000 ^b
CDM	249,2000 ^a
Casca	254,8000 ^a
Polpa	231,4000 ^a

¹Médias seguidas das mesmas letras são consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Tukey, ao nível nominal de 5% de significância.

TABELA 3. Médias¹ (erro padrão) do consumo de água dos 4 grupos.

Grupos	Médias ¹
SDM	182,1250 ^a
CDM	608,6250 ^b
Casca	589,1250 ^b
Polpa	674,0000 ^c

¹Médias seguidas das mesmas letras são consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Tukey, ao nível nominal de 5% de significância.

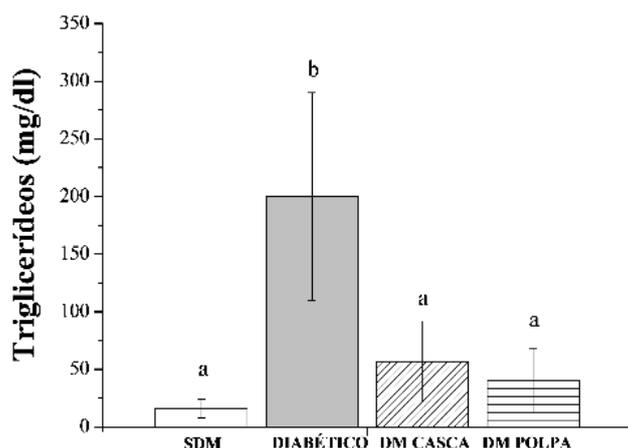
TABELA 4. Médias¹ (erro padrão) do consumo de ração dos 4 grupos.

Grupos	Médias ¹
SDM	111,1250 ^b
CDM	102,7500 ^a
Casca	115,0000 ^b
Polpa	127,0000 ^c

¹Médias seguidas das mesmas letras são consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Tukey, ao nível nominal de 5% de significância.

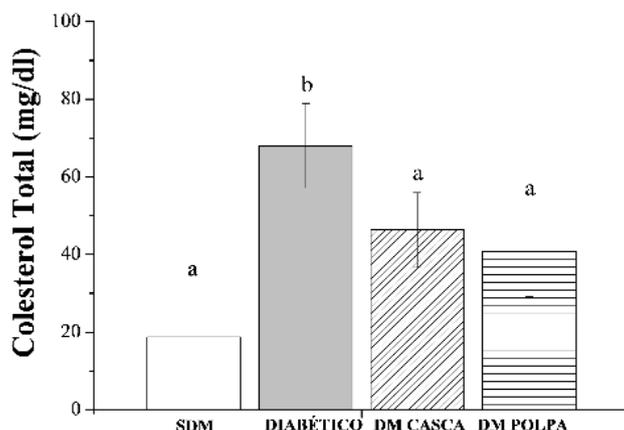
Observou-se uma diminuição dos níveis de colesterol e triglicérides dos ratos que foram tratados com os extratos da casca e polpa de lichia (**FIGURAS 3 e 4**). Já os ratos com diabetes sem tratamento, a administração dos extratos da casca e polpa de *Litchi chinensis* promoveu um significativo efeito preventivo sobre tal aumento. O que se manteve durante os 75 dias de tratamento. As dislipidemias são alterações no metabolismo de lipídios, decorrente de distúrbio das gorduras presentes no sangue, podendo ser o colesterol, triglicérides ou ambos^[13].

FIGURA 3: Efeito do extrato etanólico da casca e polpa de *Litchi chinensis* sobre os níveis séricos de triglicérides em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1.



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

FIGURA 4: Efeito do extrato etanólico da casca e polpa de *Litchi chinensis* sobre os níveis séricos do colesterol em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1.

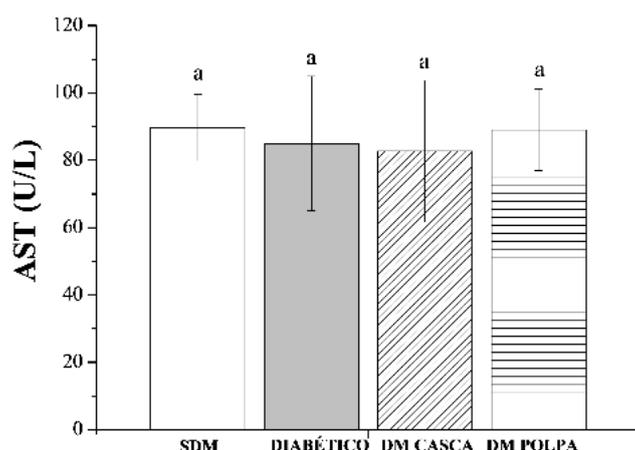


Legenda: As letras diferentes acima da coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

A casca de lichia apresenta elevado valor energético total e teores de carboidratos. A casca possui os maiores teores de fibra (bruta e alimentar), lipídeos, cinzas e proteínas, e a polpa apresenta maior acidez, menor pH e maiores teores de sólidos solúveis^[14]. Atualmente, a fibra alimentar é considerada um componente funcional, pois tem diversas funções importantes no organismo. Relaciona-se dietas ricas em fibras com a menor incidência de diabetes, pressão arterial e menor nível de colesterol, além de desempenharem um papel nas atividades hipoglicemiante e hipocolesterolêmica^[15].

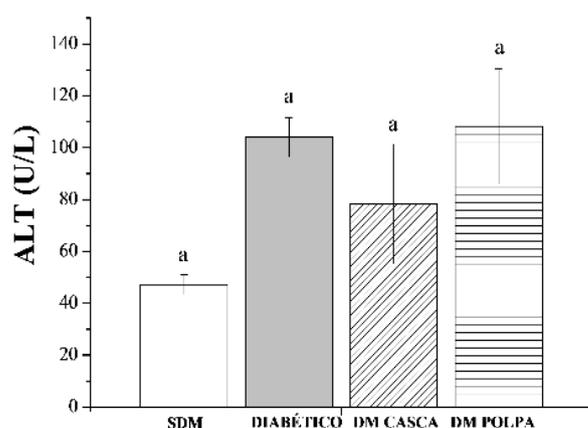
Disfunções e danos hepáticos podem acontecer em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 não controlado, o mecanismo de resistência à insulina no DM leva ao aumento da peroxidação lipídica, diminuição da oxidação de carboidratos e acúmulo de gordura nos hepatócitos. Com isso, pode haver o surgimento de hepatopatia e consequente elevação de enzimas hepáticas como ALT, AST^[16]. Danos renais (mostrados nos níveis de creatinina), também são complicações comuns, advindas das oscilações do diabetes *mellitus*. Aqui são demonstradas tais alterações (**FIGURAS 5, 6 e 7**), o tratamento com *Litchi chinensis* não promoveu uma melhora significativa em estabilizar os níveis normais destes biomarcadores, mas também não apresentaram níveis hepatotóxicos e nem danos renais aos ratos com DM.

FIGURA 5: Efeito do extrato etanólico da casca e polpa de *Litchi chinensis* sobre os níveis séricos de AST em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1.



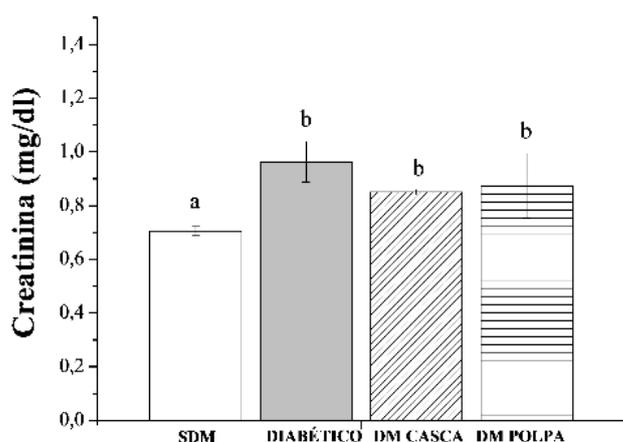
Legenda: As letras diferentes acima da coluna indicam que as médias foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância ($\alpha=0,05$).

FIGURA 6: Efeito do extrato etanólico da casca e polpa de *Litchi chinensis* sobre os níveis séricos de ALT em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1.



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

FIGURA 7: Efeito do extrato etanólico da casca e polpa de *Litchi chinensis* sobre os níveis séricos de creatinina em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1.



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

Análises Histológicas

Pâncreas

A histologia do pâncreas dos animais apresentou-se organizada em ilhotas e ácinos, com suas células centroacinosas e grânulos de zimogênio. Os ratos não diabéticos apresentaram parênquima dentro dos limites da normalidade (**FIGURA 8A**). Os animais diabéticos sem tratamento apresentaram edema, de leve a moderado, no parênquima pancreático (**FIGURA 9A**), alteração que se manteve nos animais que fizeram tratamento com casca (**FIGURA 10A**). Dos ratos que tratados com polpa, um deles apresentou redução do edema e epitélio praticamente normal (**FIGURA 11A**), enquanto os outros ($n=2$) mantiveram o mesmo edema apresentado pelos demais ratos diabéticos.

Fígado

Os hepatócitos estão organizados em placas interconectadas, radialmente dispostos no lóbulo hepático. O espaço entre essas placas contém capilares, chamadas de sinusóides hepáticos, que são vasos irregularmente dilatados compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas. Os macrófagos, denominados células de Kupffer, também estão presentes nos sinusóides.

A análise das amostras hepáticas dos animais sem diabetes apresentaram a histologia do fígado íntegra (**FIGURA 8B**) sendo que, dos animais avaliados, apenas um deles apresentava um leve edema, dentro dos limites da normalidade. Ao se avaliar os animais com diabetes sem tratamento, foi observado edema considerável, de moderado a intenso, em todos os casos estudados, sem outras alterações morfológicas (**FIGURA 9B**). Os ratos diabéticos tratados com casca também apresentaram alguma melhora do padrão morfológico hepático, sendo que dois deles também evidenciaram apenas um edema leve (**FIGURA 10B**). Dos ratos tratados com polpa, apenas um deles mostrou melhora na morfologia hepática, e apresentou apenas edema leve (**FIGURA 11B**). Os demais ($n=2$) apresentaram edema mais intenso.

Coração

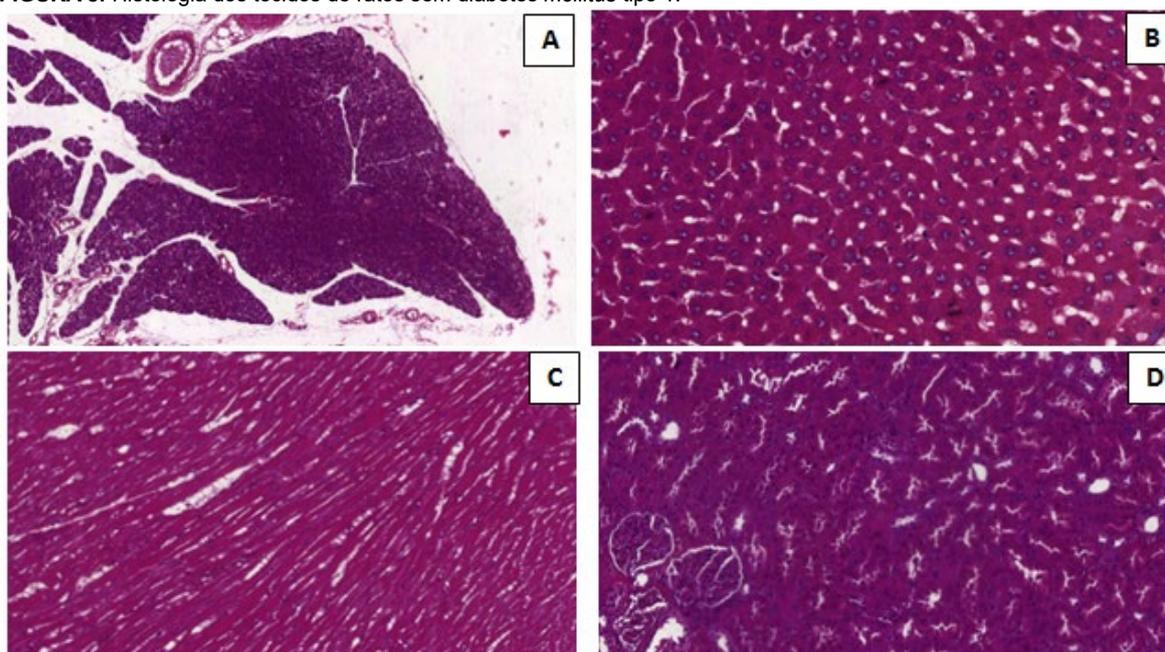
Constituído pelas 3 túnicas, endocárdio, miocárdio e pericárdio, com presença de endotélio no endocárdio e arranjo variado em miocárdio. O mesotélio presente reveste o coração externamente e todas essas estruturas são permeadas por vasos coronarianos que fazem a nutrição do músculo. Todas as amostras de coração sejam de animais não diabéticos ou diabéticos, tratados ou não, não apresentaram alterações morfológicas na histologia (**FIGURA 8C, 9C, 10C e 11C**).

Rins

Os rins estavam divididos em zona medular e zona cortical com os túbulos uriníferos constituídos por néfrons e túbulos coletores, que se reúnem para formar a pelve renal, de onde a urina é drenada para os ureteres.

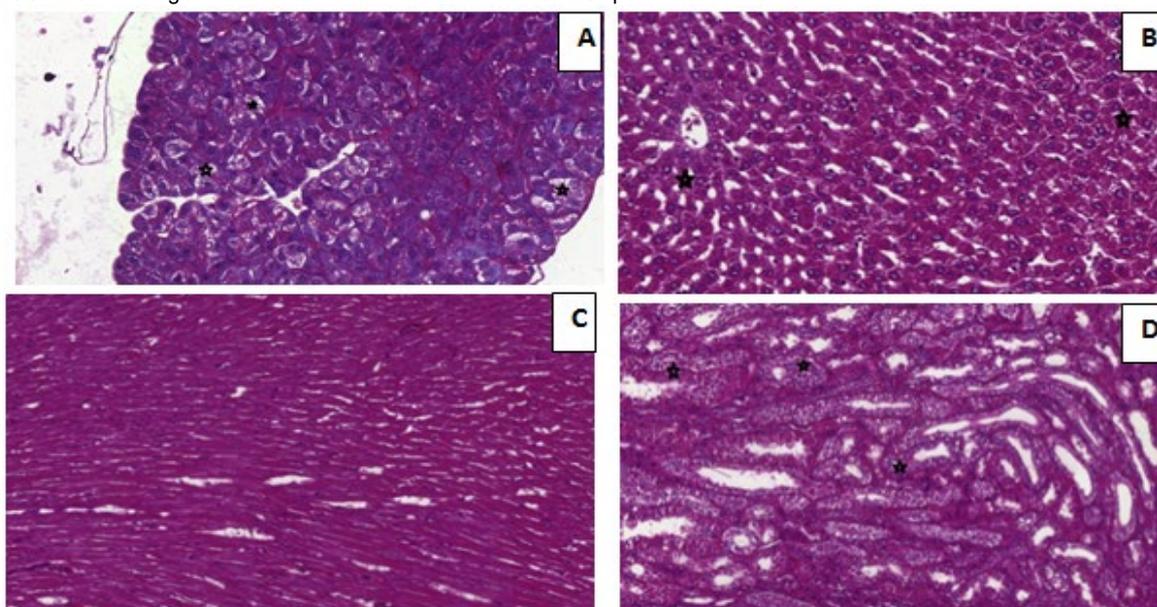
Os ratos sem diabetes apresentaram rim com morfologia dentro dos limites da normalidade (**FIGURA 8D**). Já as amostras de ratos acometidos por diabetes apresentavam necrose tubular aguda de moderada a leve em todos os espécimes (**FIGURA 9D**); e esse padrão não apresentou melhora com nenhum dos tratamentos realizados (**FIGURA 10D, FIGURA 11D**).

FIGURA 8: Histologia dos tecidos de ratos sem diabetes *mellitus* tipo 1.



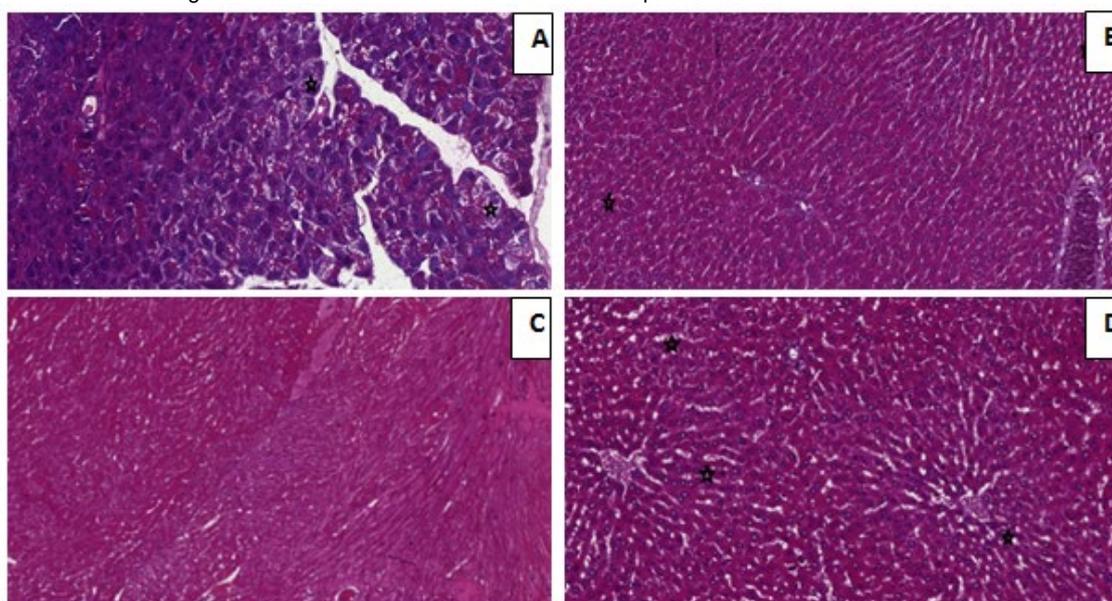
Legenda: **(A)** Pâncreas: Parênquima pancreático dentro dos limites da normalidade. **(B)** Fígado: dentro dos limites da normalidade. **(C)** Coração: Dentro dos limites da normalidade. **(D)** Rim: Túbulos e glomerulos dentro dos limites da normalidade.

FIGURA 9: Histologia de tecidos de ratos com diabetes *mellitus* tipo 1 sem tratamento.



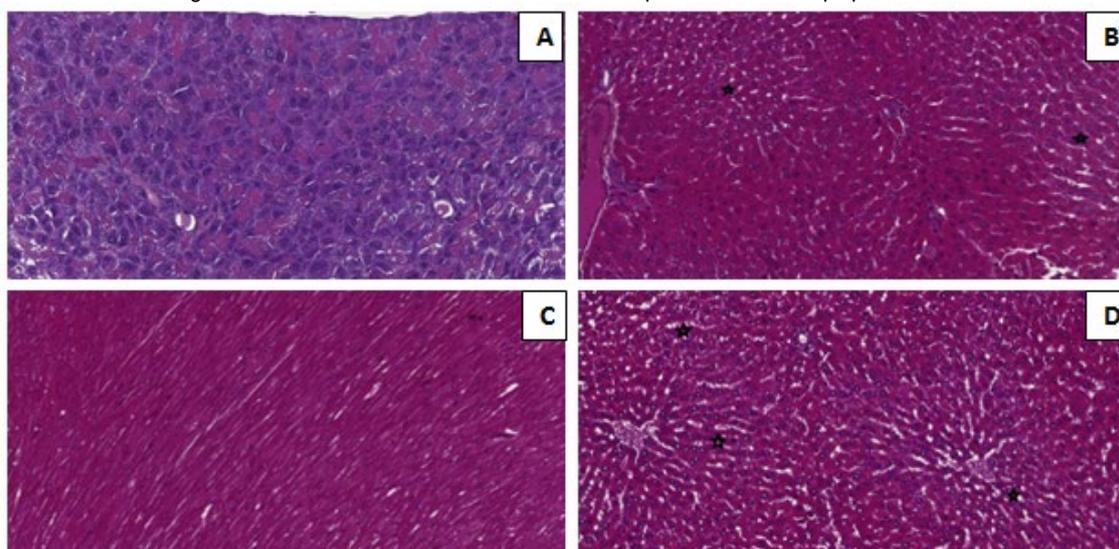
Legenda: **(A)** Pâncreas: Área com parênquima pancreático apresentando edema celular leve a moderado em ácinos (assinalado com estrela). **(B)** Fígado: Áreas com parênquima hepático, apresentando edema de moderado a grave em pacientes diabéticos não tratados (assinalado com estrela). **(C)** Coração: dentro dos limites da normalidade. **(D)** Rim: Túbulos apresentando necrose tubular aguda leve (vide marcação com estrela).

FIGURA 10: Histologia dos tecidos de ratos com diabetes *mellitus* tipo 1 tratados com casca de Lichia.



Legenda: **(A)** Pâncreas: área com parênquima pancreático apresentando edema celular leve a moderado em ácinos (assinalado com estrela). **(B)** Fígado: áreas com parênquima hepático apresentado edema celular leve em hepatócitos (assinalado com estrela) evidenciando melhora do padrão do edema. **(C)** Coração: dentro dos limites da normalidade. **(D)** Rim: túbulos apresentando necrose tubular aguda leve (vide marcação com estrela).

FIGURA 11: Histologia dos tecidos de ratos com diabetes *mellitus* tipo 1 tratados com polpa de Lichia.



Legenda: **(A)** Pâncreas: parênquima pancreático dentro dos limites de normalidade. **(B)** Fígado: áreas com parênquima hepático apresentado edema celular leve em hepatócitos (assinalado com estrela) evidenciando melhora do padrão do edema. **(C)** Coração: dentro dos limites da normalidade. **(D)** Rim: túbulos apresentando necrose tubular aguda leve (vide marcação com estrela).

Foi feita a análise histopatológica e imunohistoquímica do fígado de ratos Wistar [17], não sendo encontradas referências que pudessem embasar uma discussão plausível, o que abre a oportunidade para novas pesquisas seguindo a mesma linha. Segundo Boopat et al. [17], efeitos hepatoprotetores poderiam ser explicados pelas propriedades antioxidantes de lichia.

São notórios os efeitos benéficos do extrato etanólico da casca e polpa da *Litchi chinensis*, amenizando os efeitos hiperglicemiantes do diabetes *mellitus* tipo 1 e suas complicações, em ratos Wistar, cuja dose administrada oralmente, para a promoção de tais efeitos foi de 300 mg/kg/dia. As qualidades múltiplas encontradas nesse fruto, tais como, possuir baixa caloria, reduzir o LDL, sua ação anti-inflamatória e suas propriedades antioxidantes, fazem da *Litchi chinensis* um excelente alvo de novos modelos terapêuticos. É indispensável que haja outros estudos, e que esses possam investigar os potenciais terapêuticos e fitoterápicos do fruto em questão, bem como o isolamento de compostos que apresentem efeitos sobre o diabetes *mellitus*, havendo uma maior atenção sobre a segurança quanto ao uso em humanos.

Conclusão

A patogenicidade multifatorial do diabetes *mellitus* requer uma abordagem terapêutica baseada em diferentes agentes para atuar nas diversas características da doença e nos seus diferentes estágios de evolução. No presente estudo, usando um modelo experimental de ratos com diabetes mellitus tipo 1, demonstrou-se um efeito benéfico e hipoglicemiante advindos do extrato da casca da *Litchi chinensis*, assim como foram expressivas as ações da casca e polpa em prevenir típicas alterações nos níveis de lipídeos, graças a redução das taxas de triglicerídeos e colesterol. É crucial que seja estudado mais detalhadamente em outros modelos experimentais, visando elucidar os efeitos adicionais que possam vir a colaborar com nossos achados. Portanto, pode-se concluir que substâncias naturais com atividades hiperglicemiantes e hipolipemiantes, presentes na *Litchi chinensis*, têm potencial terapêutico na prevenção e no tratamento das complicações do diabetes *mellitus*.

Agradecimentos

Ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC/FAPEMIG/UNIFENAS.

Referências

1. Rosa RL, Barcelos ALV, Bampi G. Research on medicinal plants in treating individuals with diabetes *mellitus* in the city of Herval D'Oeste, Santa Catarina State, Brazil. **Rev Bras PI Med**. 2012; 14(2): 306-310. ISSN 1516-0572. [\[CrossRef\]](#).
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diab Care**. 2011; (Supl. 1): S62-9. ISSN 1935-5548. [\[CrossRef\]](#)
3. Costa NMB, Rosa COB. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Editora Rubio. 2016. 504p. ISBN-13: 978-8584110544. [\[Link\]](#).
4. Da Motta EL. **Avaliação da composição nutricional e atividade antioxidante de *Litchi chinensis* Sonn. (“Lichia”) cultivada no Brasil**. Rio de Janeiro. 2009. 100 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Rio de Janeiro. 2009. [\[Link\]](#).
5. Oliveira MS et al. Consumo de frutas e hortaliças e as condições de saúde de homens e mulheres atendidos na atenção primária à saúde. **Ciêns Saúde Colet**. 2015; 20(8): 2313-2322. ISSN 1678-4561. [\[CrossRef\]](#).
6. National Institutes of Health [NIH], Washington DC: The National Academy Press, 2011.
7. Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Experimental alloxan diabetes-induced: a model for clinical and laboratory Studies in rats. **Acta Cir Bras**. 2003; 18(2): 132-42. ISSN 1678-2674. [\[CrossRef\]](#).
8. Jones B, Roberts PJ, Faubion WA, Kominami E, Gores GJ. Cystatin A expression reduces bile salt-induced apoptosis in a rat hepatoma cell line. **Am J Physiol**. 1998; 275(4):G723-G730.[\[CrossRef\]](#)[\[PubMed\]](#).
9. Queiroz ER, Abreu CMP, Oliveira KS. Constituintes químicos das frações de lichia in natura e submetidas à secagem: potencial nutricional dos subprodutos. **Rev Bras Frutic**. 2012; 34(4): 1174-1179. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).
10. Mazzaferro GS, Lunardelli A. Frutosamina como principal parâmetro glicêmico do paciente diabético em hemodiálise. **Ciêns Saúde**. 2016; 9(2): 119-126. [\[CrossRef\]](#).
11. Garcia CCA, Santos VS, Almeida MEF. Aceitação da farinha de Lichia e seu efeito no emagrecimento de crianças com excesso de peso. **RBONE-Rev Bras Obes Nutr Emagr**. 2015; 9(52): 158-166. ISSN- e 1981-9919. [\[Link\]](#).
12. Harkness SE, Wagner JE. **Biologia e clínica de coelhos roedores**. São Paulo: Livraria Roca, 1993. 238p.
13. Silva BQ, Hahn SR. Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus* ou dislipidemias. **Rev Bras Farm Hosp Serv Saúde**. 2011; 2(3): 36-40. [\[Link\]](#).
14. Coelho PM. **Influência do consumo de farinha de casca e semente de Lichia (*Litchi chinensis* Sonn) sobre o estresse oxidativo e perfil cardiometabólico de ratos obesos induzidos ao diabetes**. Vitória. 2018. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde]. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2018. [\[Link\]](#).

15. Macedo TMB, Schmourlo G, Viana KDAL. **Fibra alimentar como mecanismo preventivo de doenças crônicas e distúrbios metabólicos.** Rev UNI. Imperatriz (MA). 2012; ano 2. 2: 67-77. [\[Link\]](#).

16. Caxambú ALRL, Carrocini MMS, Thomazelli FCS. Prevalência das alterações de enzimas hepáticas relacionadas à doença hepática gordurosa não-alcóolica em pacientes com diabetes *mellitus*. **Arq Catar Med.** 2016; 44(1): 3-13. [\[Link\]](#).

17. Bhoopat L, Srichairatanakool S, Kanjanapothi D et al. Efeitos hepatoprotetores da lichia (*Litchi chinensis* Sonn.): Uma combinação de atividades antioxidantes e anti-apoptóticas. **J Ethnopharmacol.** 2011; 136(1): 55-66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).

Histórico do artigo | Submissão: 10/08/2019 | **Aceite:** 09/09/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Brasil FF, Santos ECF, Costa FM, Correa GHB, et al. Atividade do extrato de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) sobre os parâmetros bioquímicos e histológicos de ratos diabéticos. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 436-449. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/826>>. 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.



Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*

Characterization of phenolic compounds, toxicity assessment, and quality analysis of tea samples from *Miconia albicans*

DOI 10.32712/2446-4775.2020.1055

Hamann, Bruna¹; Winter, Elisa Mara dos Santos¹; Silbert, Diogo Alexandre²; Micke, Gustavo Amadeu²; Vitali, Luciano²; Tenfen, Adrielli¹; Zimmermann, Lara Almida¹.

¹Universidade Sociedade Educacional de Santa Catarina – UniSociesc, Faculdade de Farmácia, Campus Jaraguá Park Shopping, Av. Getúlio Vargas, 268, Centro, CEP 89251-970, Jaraguá do Sul, SC, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Departamento de Química – CFM. Campus Universitário Trindade. Rua Engenheiro Agrônomo Andrei Cristian Ferreira, s/n, Trindade. CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

*Correspondência: lalinhazi@gmail.com.

Resumo

O uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica é crescente na medicina popular. A espécie *Miconia albicans*, popularmente conhecida como canela de velho, está sendo consumida em várias regiões do país, por apresentar ação anti-inflamatória. Este trabalho avaliou os constituintes fenólicos e a qualidade de cinco amostras de chás de *M. albicans*, adquiridos em ambientes comerciais da cidade de Jaraguá do Sul. Comparou-se informações de seus rótulos e determinou-se a presença de matérias estranhas, de microrganismos, o teor de umidade e de cinzas totais. A caracterização de compostos fenólicos das amostras foi realizada através HPLC-LC-ESI-MS/MS. A toxicidade foi avaliada com larvas de *Artemia salina*. Algumas amostras apresentaram irregularidades no que tange as especificações de rótulos das embalagens. Os resultados de controle de qualidade da matéria-prima vegetal demonstraram estar em conformidade com as especificações descritas na Farmacopeia Brasileira. Foi observado o mesmo padrão de compostos fenólicos nas cinco amostras, assim como o perfil fitoquímico condizente com a espécie em estudo, *Miconia albicans*. As amostras são potencialmente citotóxicas, tendo uma DL₅₀ menor que 1000 µg/mL. Portanto, sugere-se que sejam realizados estudos adicionais dos benefícios farmacológicos e efeitos toxicológicos da espécie visando maior segurança aos usuários.

Palavras-chave: Análise fitoquímica. Chá. *Artemia salina*. Cromatografia.

Abstract

The use of medicinal plants as a therapeutic alternative is growing in society. The species *Miconia albicans*, popularly known as old cinnamon, is being consumed in several regions of the country, as it has anti-inflammatory action. This work evaluated the volatile constituents and the quality of five samples of *M. albicans* teas, acquired in commercial environments in the city of Jaraguá do Sul. The information on their labels were compared and the presence of foreign matter, microorganisms, moisture content, and total ash were determined. The characterization of phenolic compounds in the samples was performed using HPLC-LC-ESI-MS / MS. Toxicity was assessed with *Artemia salina* larvae. Some samples showed irregularities regarding the specifications of packaging labels. The results of quality control of the vegetable raw material have shown to be in accordance with the specifications described in the Brazilian Pharmacopeia. The phenolic compounds analysis of five samples, as well as the phytochemical profile consistent with the species under study. The analyzed samples are potentially cytotoxic, which makes the species promising for future studies in the cancer's treatment.

Keywords: Phytochemical analysis. Tea. *Artemia salina*. Chromatography.

Introdução

Usado a aproximadamente 3000 a.C., o chá é uma bebida antiga, popular, consumida por mais de dois terços da população mundial, com imensa importância cultural, medicinal e econômica^[1]. A ingestão e a produção tendem a crescer, podendo atingir, em 2027, uma taxa de produção de aproximadamente 3,6 milhões de toneladas de chá verde^[2].

Apesar do uso de plantas com fins terapêuticos ser considerado rotineiro em muitas regiões do Brasil, várias espécies vegetais além de apresentarem efeitos benéficos à saúde do consumidor, podem apresentar efeitos adversos ao organismo, como carcinogênese e hepatotoxicidade, dependendo das substâncias e/ou elementos presentes na matéria prima vegetal^[3-5].

Miconia albicans é uma espécie arbórea, pertence à família Melastomataceae e está distribuída em regiões tropicais, muito abundante na flora brasileira principalmente no cerrado^[6,7]. Nativa do Brasil, conhecida popularmente como Canela-de-velho, as folhas são usualmente utilizadas em forma de chá, através da infusão, para alívio de sintomas de artrite, dores reumáticas e articulares^[8]. Algumas atividades biológicas para a espécie já foram reportadas como analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, antidiabético e antimicrobiana e efeito protetor mutagênico^[9-14]. Estudos também caracterizaram a presença de metabólitos secundários, tais como polifenóis, triterpenos e esteróis^[9,11,12].

Embora os estudos apresentados tenham grande relevância, não garantem a qualidade da matéria prima vegetal comercializada, que pode variar por fatores como clima, cultivo, colheita, processamento, tempo e condições de armazenamento. É de grande importância controlar a qualidade dos chás comercializados e consequentemente garantir um produto padronizado e de uso seguro à saúde do consumidor^[15].

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os compostos fenólicos de cinco amostras de chá, comercializado na cidade de Jaraguá do Sul - SC, e comparar esses compostos com um extrato de uma amostra *in natura*. Adicionalmente, realizou-se a caracterização físico-química das amostras e avaliação de toxicidade.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal

Foram adquiridas comercialmente 10 embalagens de chá de *M. albicans*, de cinco marcas diferentes, correspondendo a aproximadamente 90 g de cada marca. As amostras foram compradas em diferentes estabelecimentos comerciais na cidade de Jaraguá do Sul, Santa Catarina, no mês de julho de 2018. Três marcas foram adquiridas em farmácias, uma marca em loja de produtos naturais e uma marca no mercado. As amostras foram examinadas visualmente quanto à integridade das embalagens e a natureza da amostra nelas contidas^[16].

Cerca de 500 g de *M. albicans in natura* foi coletada na cidade de Taió, Santa Catarina, em outubro de 2018, que serviu como comparativo entre as amostras de chá. A planta foi devidamente identificada pelo botânico Jean Mary Facchini professor de botânica no município de Jaraguá do Sul.

Análise de rótulos

As conformidades dos rótulos das cinco marcas de chás foram realizadas de forma visual e os dados obtidos foram comparados com a legislação em vigor (RDC Nº 360, de 23 de dezembro de 2003, Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998, RDC Nº 259, de 20 de setembro de 2002 e RDC Nº 277, de 22 de setembro de 2005), correlacionadas com a comercialização desta classe de produto^[17-20]. A análise consistiu de 12 critérios: nome comum; nome científico; parte da planta utilizada; lista de ingredientes; denominação de venda do alimento; identificação de origem; razão social; endereço do fabricante; lote; prazo de validade; instruções de preparo; conteúdos líquidos.

Características organolépticas

As amostras foram avaliadas quanto a características organolépticas de coloração e aroma. Com relação a coloração, as amostras foram examinadas à luz do dia e a olho nu. Para a avaliação do aroma, uma porção da amostra foi analisada em placa de Petri, onde foi inalada lenta e repetidamente. Os resultados obtidos pelos autores foram expressos com a intensidade e sensação aromática^[16].

Análise de material estranho

O material em estudo foi analisado seguindo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira para análise de drogas vegetais. As amostras de chá foram homogeneizadas, separadas por quarteamento manualmente a olho nu e pesadas 5g de cada amostra na balança semi-analítica da marca Exacta®. Em seguida, com o auxílio de uma lupa estereoscópica e uma pinça, cada amostra de forma individual, foi avaliada quanto à presença de constituintes estranhos (adulterantes ou contaminantes) ou outras partes da planta, como raízes. O material separado foi identificado, pesado e tiveram sua porcentagem calculada com base no peso da amostra submetida ao ensaio, para comparação com os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira^[16].

Determinação do teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade foi utilizado o método gravimétrico (dessecação). Foram pesados 2 g de cada amostra em pesa-filtro, previamente dessecado na estufa a 105°C durante 30 minutos e tarado.

Deixou-se a amostra a 105°C na estufa (DeLeo®) durante 4 horas. Esfriou-se a amostra em dessecador até temperatura ambiente. Pesou-se a amostra e repetiu-se a operação até peso constante. A porcentagem de perda por dessecação foi calculada usando a fórmula descrita na Farmacopeia Brasileira. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados comparados com os limites de teor de umidade vigentes^[16].

Determinação do teor de cinzas

Pesou-se 3 g de cada amostra e transferiu-se para o cadinho previamente pesado. As amostras foram distribuídas uniformemente no cadinho e incineradas, aumentando a temperatura gradativamente até que todo o carvão fosse eliminado da mufla (LGI Scientific®). Após, o resfriamento dos cadinhos em dessecador por 40 minutos, os mesmos foram pesados até a obtenção de pesos constantes. A análise foi executada em triplicata e a porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação à massa da amostra vegetal^[16].

Metodologia de extração

O método selecionado para extração foi infusão. Em um béquer de 250 mL, previamente pesado (Exacta®), transferiu-se 4 g das amostras e da planta *in natura*. Foram adicionados 100 mL de água fervente sobre o material vegetal e, em seguida, tampou-se o recipiente por 15 minutos. Os extratos foram filtrados e secados com o auxílio de uma chapa de aquecimento à 60°C. O conteúdo obtido foi pesado e calculou-se a porcentagem de materiais extraídos em mg/g de material seco. O material obtido foi acondicionado à 5°C armazenado em recipiente de vidro âmbar.

Análise do pH

Para análise do pH foi utilizado o pHmetro de bancada modelo pHB-500, previamente calibrado.

Análise perfil cromatográfico

O perfil fitoquímico dos extratos fluidos das amostras de chás e da planta *in natura*, obtidos pelo método de infusão, foram analisados de forma qualitativa, através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromato placas de sílica gel da marca ALUGRAM® XTRA SIL G e acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26) como fase móvel^[21]. As placas foram analisadas em luz UV da marca Vhtex® com comprimento de onda de $\lambda = 254$ e 365 nm. Em seguida, as cromatografias foram reveladas com dois sistemas reveladores: reagente NP/PEG (difenilborioxetilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol) e anisaldeído sulfúrico^[21]. Um padrão de quercetina (Merck) foi aplicado juntamente na cromatografia.

Identificação de compostos fenólicos por HPLC-LC-ESI- MS/MS.

A análise HPLC-ESI-MS/MS foi realizada com a utilização dos parâmetros de pré-tratamento da amostra, cromatografia e espectrômetro de massa previamente descritos por Siebert et al.^[22]. O eluente foi formado por mistura de solventes A (MeOH/H₂O em relação de 95:5, v v⁻¹) e B (H₂O / ácido fórmico 0,1%) da seguinte forma: 1ª fase - 10% de solvente A e 90% de B (modo isocrático) durante 5 min; 2º estágio - gradiente linear de solventes A e B (de 10 a 90% de A) durante 2 min; 3º estágio - 90% de solvente A e 10% de B (modo isocrático) durante 3 min; 4º estágio - gradiente linear de solventes A e B (de 90 a 10% de A) por 7 min com um caudal de 250 $\mu\text{L min}^{-1}$ de fase móvel. Em todas as análises, o volume injetado foi de 5 μL .

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido Agilent® 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), com fonte de ionização TurbolonSpray® acoplada a um espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo/ion-trap linear Qtrap® 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, EUA) utilizando fonte de ionização por eletronebulização, em modo negativo de ionização, com as seguintes parâmetros: interface íon-spray a 400°C; tensão íon-spray de 4500 V; *curtain gas*, 10 psi; gás de nebulização, 45 psi; gás auxiliar, 45 psi; e gás de colisão, médio. Os pares de íons foram monitorados no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). No equipamento utilizou-se coluna Phenomenex® Synergi 4 µ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm, tamanho de partícula de 4 µm) mantida a 30°C. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para o registro e tratamento de dados.

Para a identificação e quantificação dos compostos, 46 compostos fenólicos padrão (ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroximetilbenzóico, apigenina, aromadendrina, ácido cafeico, carnosol, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido cinâmico, coniferaldeído, ácido ellágico, epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, eriodictiol, ácido ferúlico, fustin, galangina, ácido gálico, hispudulina, isoquercetina, kaempferol, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, miricitrina, naringerina, naringina, ácido p-anísico, ácido p-coumarico, pinocembrina, ácido protocatequico, A quercetina, o resveratrol, o ácido rosmarínico, a rutina, o ácido salicílico, a scopoletina, o sinapaldeído, o ácido sinápico, o siringaldeído, o ácido siringico, a taxifolina, a umbeliferona, o ácido vanílico e a vanilina) dissolvidos em metanol (0,06 a 6 mg/L) foram analisados nas mesmas condições descritas acima.

As amostras das frações foram preparadas por dissolução de 50 mg do material em 5 mL de solução de ácido clorídrico a pH 2. Estes 5 mL foram extraídos três vezes com 2 mL de éter etílico cada um, que foram combinados. Depois de secar o extrato combinado, foi armazenado selado a -20°C. Para realizar a análise, o material seco foi dissolvido em 1 mL de MeOH e centrifugado a 12.000 rpm durante 120 segundos.

Avaliação da toxicidade usando larvas de *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade dos extratos obtidos das amostras de chás de *M. albicans* e do extrato da planta *in natura* foi através de bioensaios de letalidade da *Artemia salina*. A metodologia utilizada foi a descrita por Meyer et al. [23], com algumas modificações. Os extratos seco (20,0 mg) foram diluídos em 2,0 mL de água destilada. As larvas de *A. salina* foram cultivadas, tendo como meio de cultivo água salgada artificial (38,0 g de sal marinho/L de água). Nos ensaios utilizou-se larvas 24h após a eclosão, em fase náuplio. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, a cada poço foi adicionado ente 8 a 10 larvas de *A. salina* contendo 400 µL de mar artificial e a solução da substância a ser testada em quatro diferentes concentrações (ppm), sendo o primeiro poço de 2000ppm, o segundo 400ppm, a terceira 80ppm e a última concentração 16ppm. Cada concentração foi avaliada em triplicata.

Como controle negativo utilizou-se uma solução salina e dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,01% e como controle positivo solução de 10 µg/mL de K₂Cr₂O₇ (dicromato de potássio) (DL₅₀ = 20 – 40 ppm). Após 24 horas contou-se a quantidade de larvas vivas e mortas para determinação da DL₅₀ de acordo com o método estatístico de Probitos utilizando o programa Excel 2007²¹.

Resultados e Discussão

Cinco amostras de chás de *M. albicans* foram adquiridas em ambientes comerciais de Jaraguá do Sul-SC e designadas como: amostra 1 (A1), amostra 2 (A2), amostra 3 (A3), amostra 4 (A4) e amostra 5 (A5). Os rótulos foram avaliados quanto o disposto nas legislações nacionais (RDC Nº 360, de 23 de dezembro de 2003, Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998, RDC Nº 259, de 20 de setembro de 2002 e RDC Nº 277, de 22 de setembro de 2005) e os itens avaliados sumarizados na **TABELA 1**^[17-20]. Os rótulos devem constar designados "Chá", seguido do nome comum da espécie vegetal utilizada, partes utilizadas, apresentar ou não denominações consagradas pelo uso, podendo ser acrescido do processo de obtenção e/ou característica específica, denominação de venda do alimento, lista de ingredientes, conteúdos líquidos, identificação da origem, nome ou razão social e endereço, identificação do lote, prazo de validade, instruções sobre o preparo e uso do alimento^[17-20].

TABELA 1: Resultados obtidos com a análise dos rótulos das amostras (A1-A5) de chá de *M. albicans*^[17-20].

Amostras	A1	A	A3	A4	A5
Nome comum	+	+	+	+	+
Parte da planta utilizada	+	+	-	+	-
Lista de ingredientes	+	+	+	+	+
Denominação de venda do alimento	+	+	+	+	+
Identificação de origem	+	+	+	+	+
Razão social	+	+	+	+	+
Endereço do fabricante	+	+	+	+	+
Lote	+	+	+	+	+
Prazo de validade	+	+	+	+	+
Instruções de preparo	+	+	+	-	-
Conteúdos líquidos	+	+	+	+	+

Legenda: + (positivo): informação presente; - (negativo): informação ausente.

Através dos resultados obtidos com a análise visual dos rótulos das amostras com base no disposto na RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002 (**TABELA 1**), observou-se que as amostras 3, 4 e 5 estavam em desacordo com a legislação vigente. As amostras 3 e 5 não possuem informações sobre qual parte da planta foi utilizada. A amostra 5 não apresentou o modo de preparo do chá e a amostra 4 não continha descrito de forma clara as informações sobre o modo de preparo do chá. Estas informações são obrigatórias conforme determina a RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002, a qual orienta o usuário a quantidade correta a ser usada, evitando erro de dosagens ou possível intoxicação^[19]. Foi verificado que para amostra 1, as informações sobre o modo de preparo e qual parte da planta foi utilizada no preparo do produto comercializado o chá, foram adicionadas por meio de um adesivo em cima do rótulo original. Fato esse que não garante uma informação confiável, por não fazer parte da embalagem original e por não conter identificação de quem o adicionou^[18].

A análise sensorial foi realizada nas cinco amostras de chá de *M. albicans*. Apesar da Farmacopeia Brasileira não descrever as características organolépticas para a espécie em estudo, as amostras foram comparadas com o extrato da planta *in natura* e apresentaram odor e intensidade semelhante.

A porcentagem permitida de material estranho é de até 2% em drogas vegetais^[16]. De acordo com a análise macroscópica realizada nas cinco amostras de chá de *M. albicans*, estas estão isentas de fungos, insetos e outras contaminações, estando os valores (A1: 0,5%; A2:0,3%; A3:0,7%; A4:0,2%; A5 0,3%) para esse ensaio em conformidade com os limites preconizados pela farmacopeia.

O teor de umidade é um fator muito importante para avaliar a qualidade do processo de fabricação do chá. Valores acima do permitido favorecem a proliferação de microrganismos, possibilita a ação de enzimas e decorrente degradação dos metabólitos secundários^[24]. Conforme a **TABELA 2**, os resultados encontrados estão entre 4,44% a 6,65%, valores adequados com o estipulado para algumas espécies na Farmacopeia Brasileira, valores inferiores à 14%^[25,16].

TABELA 2: Resultados para o teste do teor de cinzas e teor de umidade em amostras de chá de *M. albicans*.

Amostras	Teor de Cinzas (%)	Teor de Umidade (%)
1	4,77 ± 0,477	5,29 ± 0,226
2	6,77 ± 0,233	5,39 ± 0,575
3	3,76 ± 0,720	4,60 ± 0,134
4	6,90 ± 2,690	6,65 ± 0,555
5	3,42 ± 0,409	4,44 ± 0,620

A determinação do teor de cinzas é uma análise que permite verificar a presença de impurezas inorgânicas não voláteis, como metais pesados e alguns minerais como, por exemplo, o cálcio e o potássio, que podem estar presentes como contaminantes em materiais vegetais^[16]. A análise foi realizada com as cinco amostras de chá e os valores encontrados estão entre 3,42% a 6,90% (**TABELA 2**). Embora haja divergência nos valores encontrados entre as amostras, ainda não existem especificações para o chá de *M. albicans*, o que sugere mais estudos para padronização deste procedimento analítico para essa espécie.

Dentre as diferentes metodologias para preparações de extratos de material vegetal, destaca-se o método de infusão para a obtenção de chás, utilizando o material vegetal dessecado^[23]. A eficiência de extração, através do método de infusão, para as amostras de *M. abicans comerciais* (amostra 1-5) e amostra 6 (planta *in natura*) e respectivo pH dos extratos foram determinados e podem ser observados na **TABELA 3**.

TABELA 3: Eficiência de extração e pH das amostras de *M. albicans*.

Extrato Fluido	Substâncias Extraídas (%)	pH
Amostra 1	5,8%	4,70
Amostra 2	8,1%	4,09
Amostra 3	5,9%	4,86
Amostra 4	3,55%	4,25
Amostra 5	5,7%	4,63
Amostra 6 ¹	5,15%	4,98

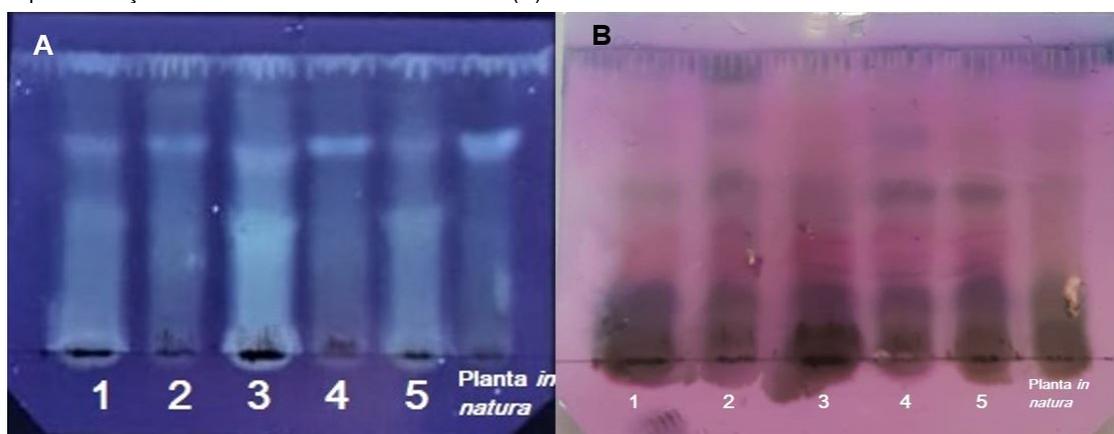
1: Amostra 6: extrato planta *in natura* planta.

Os resultados obtidos indicaram uma maior eficiência na quantidade de substâncias extraídas para a amostra 2. As amostras 1, 3 e a planta *in natura* obtiveram rendimentos semelhantes para a quantidade de substâncias extraídas, já a amostra 4 teve o menor rendimento dentre as amostras analisadas. A variação de resultados obtidos pode estar relacionada com a sazonalidade da colheita do material vegetal, pela

hegemonia do material vegetal utilizado na hora da infusão, visto a utilização de partes aéreas (folhas e galhos) e pelo modo de preparo da amostra^[26,27]. O valor de pH é convencionalmente usado para determinar a concentração de íon hidrogênio da solução^[16]. Os resultados obtidos para a análise do pH na **TABELA 3** mostram que os extratos de *M. albicans* analisados estão entre 4,09 e 4,9. Os valores encontrados são considerados ácidos, possivelmente associados com a presença de ácidos fenólicos da espécie^[9,11].

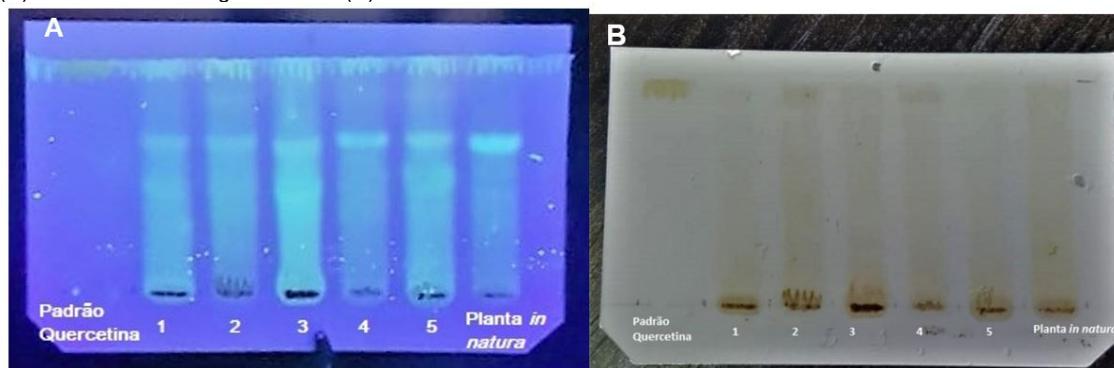
O perfil fitoquímico qualitativo dos extratos fluidos de *M. albicans* analisado por CCD, mostrou sob a luz UV a $\lambda = 365$ nm a presença de compostos com extinção de fluorescência (**FIGURA 1A**). Adicionalmente, percebeu-se que os perfis cromatográficos dos extratos de chás comercialmente adquiridos são semelhantes ao encontrado para o extrato da planta *in natura* utilizado como padrão, indicando possivelmente se tratar da mesma espécie.

FIGURA 1: Resultados obtidos com análise cromatográfica das amostras 1-6 observadas sob a luz UV $\lambda = 365$ nm (A) e após revelação com anisaldeído sulfúrico no visível (B).



Com o intuito de verificar nas amostras em estudo a presença de classes metabólicas secundárias como triterpenos e flavonoides, as placas foram reveladas com reagentes químicos anisaldeído sulfúrico (**FIGURA 1B**) e reagente NP/PEG (**FIGURA 2B**), respectivamente. A CCD revelada com anisaldeído sulfúrico quando analisada no visível, apresentou manchas de coloração violeta indicando possivelmente a presença de terpenos nas amostras, como descrito na literatura de Lima et al. ^[12,28].

FIGURA 2: Análise cromatográfica dos extratos de *M. albicans* e padrão quercetina observadas sob a luz UV $\lambda = 365$ nm (A) e revelado com reagente natura (B).



Não foi possível detectar de forma visual na análise através de CCD, revelada com reagente NP/PEG e observada no visível a presença de flavonoides, como quercetina, em nenhum dos extratos analisados^[21].

Porém, nas amostras 1, 4 e 6 quando analisadas por HPLC-LC-ESI-MS/MS foi identificada a presença de quercetina, mesmo que em baixas concentrações (TABELA 4).

TABELA 4: Compostos fenólicos identificados nas amostras de chás comerciais (A1-A5) e extrato da planta *in natura* (A6).

n.	Composto	tR (min)	Massa calculada	Massa experimental [M – H] ⁺	MS/MS (m/z)	A1 (µg/g)	A2 (µg/g)	A3 (µg/g)	A4 (µg/g)	A5 (µg/g)	A6 ¹ (µg/g)
1	Ácido salicílico	10,89	138,12	136,94	93,00	0,0014	0,0012	0,0001	0,0043	0,0053	-
2	Ácido p-anísico	11,34	152,15	136,9	91,1	-	T	-	T	-	-
3	Ácido 4-hidroximetilbenzoico	8,84	153,12	150,899	104,20		T	-	T	-	
4	Protocatecuico	8,01	151,75	152,92	109,00	0,1893	0,3270	0,2818	1,4400	0,8947	0,1357
5	Galangina	13,44	270,24	268,811	59,900	-	T	-	-	-	-
6	Ácido elágico	11,84	302,19	300,95	145,00	0,7462	0,3087	0,5521	0,3168	0,7262	0,4901
7	Quercetina	11,81	302,23	300,96	151,00	T	-	-	T	-	0,0060
8	Ácido Gálico	3,75	170,12	168,90	125,00	0,2323	0,3319	0,3644	1,1037	0,9845	1,9617
9	Ácido Siringico	10,01	198,02	196,862	119,60	T	T	T-	0,1874	T	-

1: A6: extrato planta *in natura* planta (A6). T: Traços

Dos 45 compostos fenólicos utilizados como padrão na análise, nove compostos foram identificados nos extratos (ácido salicílico, ácido p-anísico, ácido 4-hidroximetilbenzoico, ácido protocatecuico, galangina, ácido elágico, quercetina, ácido gálico, ácido siringico). Os compostos identificados em todas as amostras foram protocatecuico, ácido elágico e ácido gálico. Embora todas as amostras de chás comerciais tenham apresentado ácido salicílico, no extrato da amostra 6 (A6) o mesmo não foi observado. As plantas cultivadas em câmaras de crescimento como possivelmente acontece com as amostras comerciais, são cultivadas em condições normais de proteção o que pode favorecer a expressão dos genes envolvidos na biossíntese do composto fenólico, assim como, a variação controlada da irrigação pode induzir a adaptação da planta, o que favorece a produção de metabolitos secundários como o caso do ácido salicílico^[29]. Ademais, fatores abióticos (influência ambiental) e bióticos (predadores herbais) podem causar variações no acúmulo ou biogênese de metabolitos secundários^[30].

Outro resultado importante de ser ressaltado é que o ácido gálico e o ácido protocatecuico estão sendo aqui reportados pela primeira vez para essa espécie. A baixa concentração de compostos fenólicos extraídos e identificados nas amostras pode ser explicada possivelmente por influência de fatores ambientais e idade da planta^[15,26,31], mas o perfil semelhante dos compostos caracterizados corrobora com os resultados encontrados na análise qualitativa através de CCD, em que possivelmente as amostras sejam da mesma espécie.

O teste de letalidade de *A. salina*, micro crustáceo encontrado em águas salgadas e pertence a ordem Anostraca, é um método rápido, simples, prático e de baixo custo (não requer técnicas assépticas) e permite que um grande número de amostras seja testado, sendo uma ferramenta útil para prever a toxicidade aguda oral em extratos de plantas^[23,32]. Através da análise dos resultados, os compostos podem ser considerados quando associados a letalidade com a atividade citotóxica frente algumas linhagens tumorais: não tóxicos (DL₅₀ >1.000 µg/mL), muito ativos (DL₅₀ < 100 µg/mL) e com atividade moderada (DL₅₀ entre 100 e 900

µg/mL)^[33]. As amostras de *M. albicans* apresentam uma possível ação citotóxica, pois os ensaios indicam uma DL₅₀ abaixo de 1000 µg/mL (**TABELA 5**). A amostra 6 e a amostra 5 apresentaram atividade moderada DL₅₀ 113,8 µg/mL e DL₅₀ = 126,9 µg/mL, respectivamente..

TABELA 5: Resultados de DL₅₀ dos extratos das amostras (1-6) de *M. albicans* em ensaio com larvas de *A. salina*.

Amostras	DL ₅₀ ¹ µg/mL
A1	122,5 ± 0,521
A2	125,1 ± 0,520
A3	119,7 ± 0,589
A4	123,4 ± 0,784
A5	126,9 ± 0,342
A6 ²	113,8 ± 0,352
K ₂ Cr ₂ O ₇ ³	21,98 ± 0,156

1. DL₅₀ dose letal mediana. 2. A6: extrato planta *in natura*. 3. Controle positivo.

Conclusão

Os resultados obtidos indicam que, embora as amostras analisadas estejam de acordo com a Farmacopeia Brasileira, no que tange a análise físico-química, encontra-se uma falta de padronização dos rótulos das amostras analisadas, o que sugere uma melhor fiscalização na elaboração dos mesmos, visando maior segurança dos usuários deste chá comercial. Também foi verificado o mesmo padrão de compostos fenólicos nas cinco amostras (A1-A5) analisadas, assim como o perfil fitoquímico condizente com a espécie em estudo, *Miconia albicans*. O bioensaio com microcrustáceo, *A. salina*, indicou um potencial citotóxico moderado para as amostras avaliadas (A1-A6), o que torna a espécie promissora futuros estudos para o tratamento do câncer.

Referências

- Xia E-H, Zhang H-B, Sheng J et al. The Tea Tree Genome Provides Insights into Tea Flavor and Independent Evolution of Caffeine Biosynthesis. **Mol Plant**. 2017; 10(6): 866–877. [[CrossRef](#)].
- Gilbert N. The science of tea's mood-altering magic. **Nature** 2019; 566: S8–S9. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
- Salvador MJ, Lopes GN, Nascimento Filho VF et al. Quality control of commercial tea by x-ray fluorescence. **X-Ray Spectrom**. 2002; 31(2): 141-144. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
- Madeira F, Park YM, Lee J et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Res**. 2019; 47(W1): W636–W641. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
- Sortibrán AC, Téllez MGO, Ocotero VM et al. Chronic Toxicity, Genotoxic Assay, and Phytochemical Analysis of Four Traditional Medicinal Plants. **J Med Food**. 2011; 14(9): 1018-1022. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
- Martins AB, Semir J, Goldenberg R et al. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no Estado de São Paulo. **Acta Bot Bras**. 1996; 10: 267–316. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
- Camargo MGG, Schaefer HM, Habermann G et al. Bicolored display of *Miconia albicans* fruits: Evaluating visual and physiological functions of fruit colors. **Am J Bot**. 2015; 102(9): 1453-1461. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].

8. Alves TMA, Silva AF, Brandão M et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2000; 95(3): 367-373. ISSN 1678-8060. [[CrossRef](#)].
9. Pieroni LG, Rezende FM, Ximenes VF et al. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. **Molecules**. 2011; 16(11): 9439-9450. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
10. Celotto AC, Nazario DZ, Spessoto MA et al. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Braz J Microbiol**. 2003; 34(4): 339–340. ISSN 1678-4405. [[CrossRef](#)].
11. Vasconcelos MAL, Royo VA, Ferreira DS et al. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Z Naturforsch C J Biosci**. 2006; 61(7-8): 477-482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
12. Lima RCL, Kongstad TK, Kato L et al. High-Resolution PTP1B Inhibition Profiling Combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for Identification of PTP1B Inhibitors from *Miconia albicans*. **Molecules**. 2018; 23(7): 1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
13. Serpeloni JM, Bisarro dos Reis M, Rodrigues J et al. *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**. 2008; 23(6): 501–507. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
14. Mara Serpeloni J, Mazzaron Barcelos GR, Prates Mori M et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An *in vitro* analysis. **Exp Toxicol Pathol**. 2011; 63(5): 499–504. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
15. Zhu M-Z, Wen B, Wu H et al. The Quality Control of Tea by Near-Infrared Reflectance (NIR) Spectroscopy and Chemometrics. **J Spectrosc**. 2019; 2019: 1-11. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
16. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª edição. Brasília, 2010. Disponível em: [[Link](#)].
17. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **RDC Nº 360**, de 23 de dezembro de 2003. Brasília, 2003. Disponível em: [[Link](#)].
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 519**, de 26 de junho de 1998. Brasília, 1998. Disponível em: [[Link](#)].
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **RDC Nº 259**, de 20 de setembro de 2002. Brasília, 2002. Disponível em: [[Link](#)].
20. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **RDC Nº 277**, de 22 de setembro de 2005. Brasília, 2005. Disponível em: [[Link](#)].
21. Wagner H, Bladt S. **Plant Drug Analysis**. Second Edi. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. ISBN: 978-3-642-00574-9. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
22. Siebert DA, Mello F, Alberton MD et al. Determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretically-mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L. **Nat Prod Res**. 2019; 34(18):2683-2688. [[CrossRef](#)].
23. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **PI Med**. 1982; 45(5): 31-34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
24. World Health Organization - WHO. **Quality control methods for herbal materials**. Press. Geneva, 2011.

25. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopeia Brasileira. In: Atheneu (Hrsg.). **Farmacopeia Brasileira**. São Paulo, 1988. ISBN 13: 9788574540573. [\[Link\]](#).
26. Bernardes LSC, Lang KL, Petrovick PR et al. Produtos Naturais e o desenvolvimento de Fármacos. In: Simoes Cmo, Schenkel Ep, Mentz LA (Hrsg.). **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre-RS: Artmed/Grupo A, 2017: 502.
27. Nnane IP, Hutt AJ, Damani LA. Appendix 1. Essential Guides for Isolation/Purification of Drug Metabolites*. In: **Encyclopedia of Separation Science**. Elsevier, 2000: 4539–4547. [\[Link\]](#).
28. Macari PAT, Emerenciano VP, Ferreira ZMGS. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análise por microcomputador. **Quim Nova**. 1990; 13(4): 260–262. [\[Link\]](#).
29. Oh M-M, Trick HN, Rajashekar CB. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **J Plant Physiol**. 2009; 166(2): 180-191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Link\]](#).
30. Sampaio BL, Edrada-Ebel R, Da Costa FB. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Sci Rep**. 2016; 6: 29265. [\[CrossRef\]](#).
31. Liu W, Yin D, Li N et al. Influence of environmental factors on the active substance production and antioxidant activity in *Potentilla fruticosa* L. and Its Quality Assessment. **Sci Rep**. 2016; 6: 28591. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Link\]](#).
32. Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI. Comparative study of the assay of and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. 2001; 8(5): 395-400. Disponível em: [\[Link\]](#).
33. Silva M, David JP, Silva LCRC et al. Bioactive Oleanane, Lupane and Ursane Triterpene acid derivatives. **Molecules**. 2012; 17: 12197-12205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Link\]](#).

Histórico do artigo | Submissão: 17/07/2020 | Aceite: 17/09/2020 | Publicação: 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Hamann B, Winter EMS, Silbert DA, Micke GA, et al. Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 450-461. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/1055>>. 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.



Cryptomeria japonica (L. F.) D. Don as source of shikimic acid

DOI 10.32712/2446-4775.2020.821

Cerdeira, Antonio Luiz^{1*}; Queiroz, Sonia Claudia Nascimento¹; Matallo, Marcus Barifouse¹.

¹Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340 - Km 127,5, Jaguariúna, CEP 13820-000, SP, Brasil.

*Correspondência: antonio.cerdeira@embrapa.br.

Abstract

Oseltamivir phosphate (OSP), marketed under the brand name of Tamiflu®, is a potent inhibitor of viral neuraminidase, a glycoside hydrolase enzyme essential for viral replication. OSP is also important to control influenza virus (H1N1) and is produced mainly from shikimic acid (SA) extracted from plants. The main source of SA is from seeds of *I. verum*. Alternatives to meet the worldwide demand are necessary. One of this is *Cryptomeria japonica*. In this study, we found a content of 56.36 mg.kg⁻¹ of SA in dried biomass for *C. japonica*, while for *I. verum*, the traditional source, was 96.57 mg.kg⁻¹. Due to the fact of *C. japonica* is a tree, exploited for commercial production, it can be a renewable and reliable source SA for OSP production.

Keywords: Influenza. Tamiflu. Oseltamivir phosphate. Neuraminidase.

Introduction

There are four main influenza virus species: A, B, C and D. Type A viruses are known to infect a wide variety of birds and mammals, while the other species have more restricted host ranges^[1]. Occasionally the world suffers influenza pandemics like Spanish flu in 1918, Asian flu in 1957 and Hong Kong flu in 1968^[2]. The first influenza pandemic A (H1N1) of the 21st century lasted 14 months from June 2009 to August 2010^[2]. Avian influenza H5N1, originated in poultry in Hong Kong in 1997, is also a major concern worldwide with a lethality rate over 50%^[3].

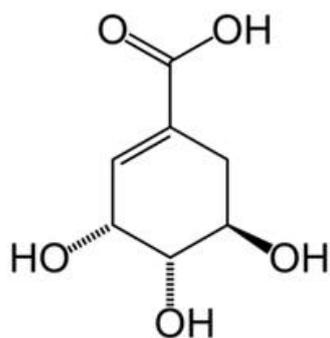
Shikimic acid (SA), [(3R,4S,5R)-3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid] is a major intermediate in the biosynthesis of essential amino acids important for plant survival^[4]. A large number of plant metabolites depend on SA via the shikimate pathway, found in many tissues of a variety of plants, depending on the age and growth stage of the plants. SA content is higher in stages where the metabolic process rates are high as in intensive growth according to the organ of plants^[4].

Neuramidases are glycoside hydrolase enzymes that cleave the glycosidic bonds of neuraminic acid essential for viral replication^[5]. Oseltamivir phosphate (OSP) is a potent inhibitor of viral neuraminidase developed in 1996 by a Californian-based pharmaceutical company^[6] and launched in 1999 by the pharmaceutical company Roche, marketed under the brand name Tamiflu®, used against various strains of influenza virus, including H1N1 and H5N1^[7].

Shikimic acid (**FIGURE 1**) precursor of OSP is the main chiral starting compound, in a complex synthesis process, involving 11 phases for its production^[4]. SA supply has been a problem for the increased demand of OSP^[4].

Although many scientists have been working to develop synthetic processes to produce SA^[8] such as genetically engineering microbes of *E. coli* strain^[9], the most important source of SA is from plants^[10].

FIGURE 1: Shikimic acid structure.



In terms of source supply, the majority of world's production of SA is from seeds of *Illicium verum*, a shrub native from China, popularly known as Chinese star anise, and *Illiciumm anizatum*, native from Japan^[11,12]. Cultivation of this specie is very difficult because it reaches seed bearing stage only after six years of sowing with seeds containing about 2-7% of SA^[11,12].

As result, alternatives source of SA is very desirable to meet the worldwide demand of Tamiflu[®]^[13]. In a conservative estimate, Bradley^[14] states that 520,000 kg of SA are needed for producing Tamiflu[®] in the event of a pandemic affecting 400 million people, compared to a current annual production of 100,000 kg of the acid.

Cryptomeria japonica, Cupressaceae, gymnosperm, is a native conifer from Japan and China, widely distributed in rainy regions, cold winters and moderately warm summers. According Kratz^[15] this conifer is a large tree species, light wood and reddish color. In Brazil, it has a rapid growth, good adaptation to the climate and soil of the southern region of the country and a good response to growing technologies. Besides its potential as a wood, it is a potential source of essential oils for use in the pharmaceutical industry^[16].

Because of those properties mentioned before, we selected *C. japonica* in this study to find an alternate renewable source of this acid comparing to the usual source of Star anise seeds (*I. verum*).

Material and methods

Plant material

A prior study was conducted to explore other alternative sources of SA from Cupressaceae family like *Thuja* spp. In this case SA content varied from 0.12 to 0.52% (w/w), what led us to choose *C. japonica* for further studies.

Since the purpose of this research was to explore the potential of steady supply of a source of SA, fully grown mature branches of adult plants of *C. japonica*, produced by vegetative propagation from cuttings

were collected in Colombo, PR, Brazil, at the Forestry Research Center of Embrapa Florestas (*Brazilian Agricultural Research Corporation*) (25° 19'18.20" S and 49° 9'34.47" W). No pesticides including glyphosate were applied during any time on the plants. The branches were harvested on December 2017. Since this was a study to evaluate the potential of the plant to produce SA we chose only one season to develop the protocol. Star anise seeds, *I. verum*, used as reference were purchased locally.

Extraction of SA

Branches with needles from *C. japonica* were harvested and processed at the Laboratory, located at Jaguariúna, SP, Brazil, and kept under refrigeration. Measurement of SA content was conducted by a modified method according to Matallo et al.^[17]. The whole branches were oven dried at 40°C for 72 hours, grounded with a knife mill (Tecnal, Brazil), sealed in a polystyrene bag and stored in a -18°C until analyses. Aliquots of 400 mg of dry matter with ten replications each one, were mixed with 10 mL of Milli-Q water acidified to pH 3 with formic acid, kept in microwave for 50 seconds at 100 W (Panasonic NN-S62B) reaching temperature of 50°C ($\pm 3.0^\circ\text{C}$), cooled for 5 minutes, filtered through Whatman N° 1 filter paper (0.22 μm) (Millex-GV, Millipore) for quantification by Liquid Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (LC-MS).

Chemicals and reagents

The solvents utilized as mobile phase was methanol Lichrosolv, HPLC grade (Merck) and ammonium acetate (Merck) and SA (99.6%) standard, purchased from Sigma-Aldrich.

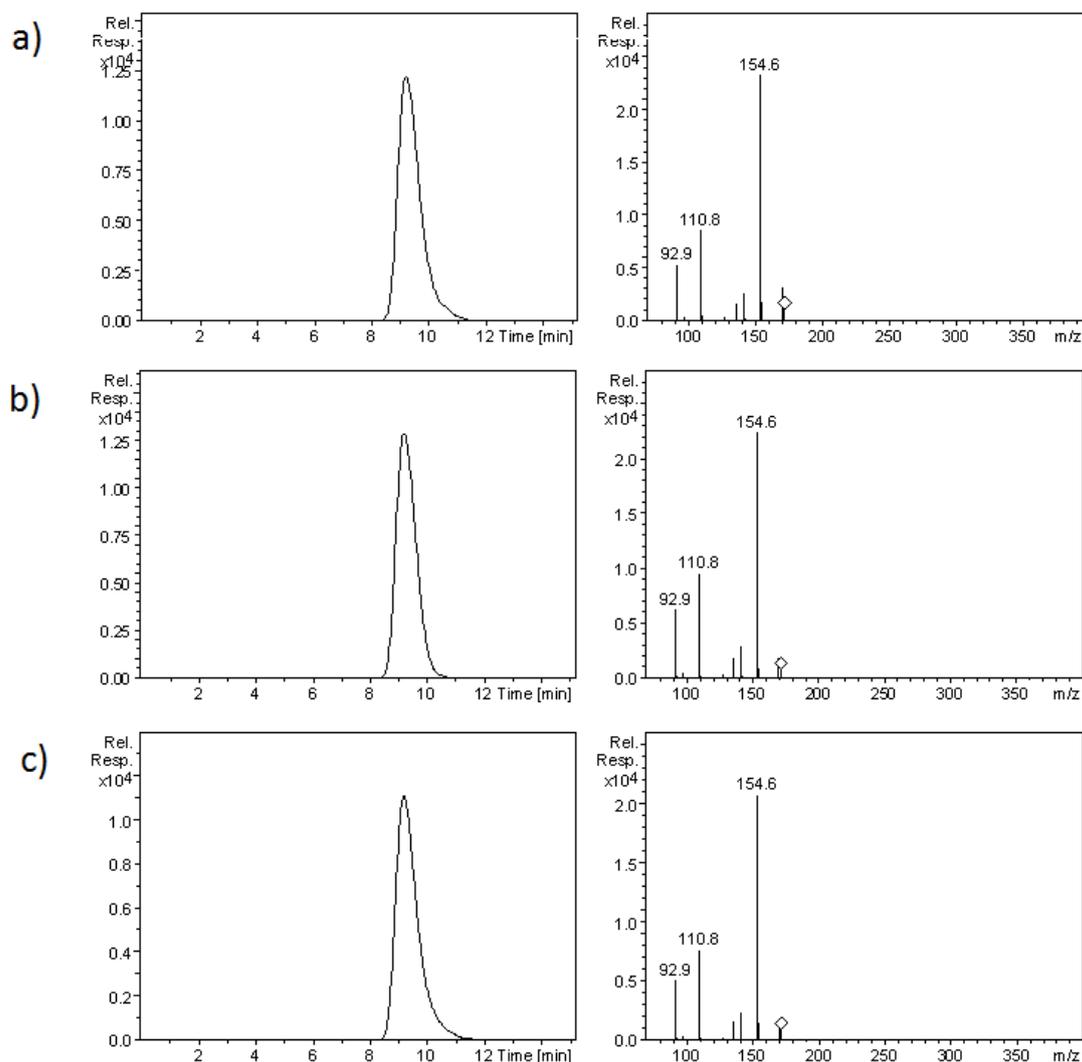
LC-MS analysis of SA

SA detection and confirmation were performed by Liquid Chromatography (UFLC – Shimadzu) coupled to an Ion Trap Mass Spectrometry (Bruker Daltonics - Model amaZon™ X), with Electrospray (ESI) as ionization source. Chromatographic conditions: UFLC: Auto sampler: SIL – 20 AC; Column oven: CTO-20; Communications Bus Module: CBM-20A; High pressure pumps: LC-20AT; Degasser: DGU-20As, Column: Lichrosorb - RP-18–100Å, 250 x 4,60mm – 5 μm – Phenomenex; Security Guard cartridges: – Fusion – RP – 4 x 3.0mm – Phenomenex; injection volume - 20 μL ; Flow rate: 0.800 mL.min⁻¹; Oven temperature: 40°C; mobile phase: Isocratic mode: 10% Methanol HPLC grade: 90% ammonium acetate; run time: 7 minutes, mass spectrometer in negative mode. Capillary voltage 4500 V. Nitrogen was used as nebulization gas at 320°C at flow rate of 10 L.min⁻¹ and pressure of 60 psi with Helium as collision gas. Retention time of SA was 3.2 minutes. A *t* test was performed to compare the amount of SA in both extracts (**P*<0.05). In order to evaluate the method precision, SA samples were analyzed in ten replicates.

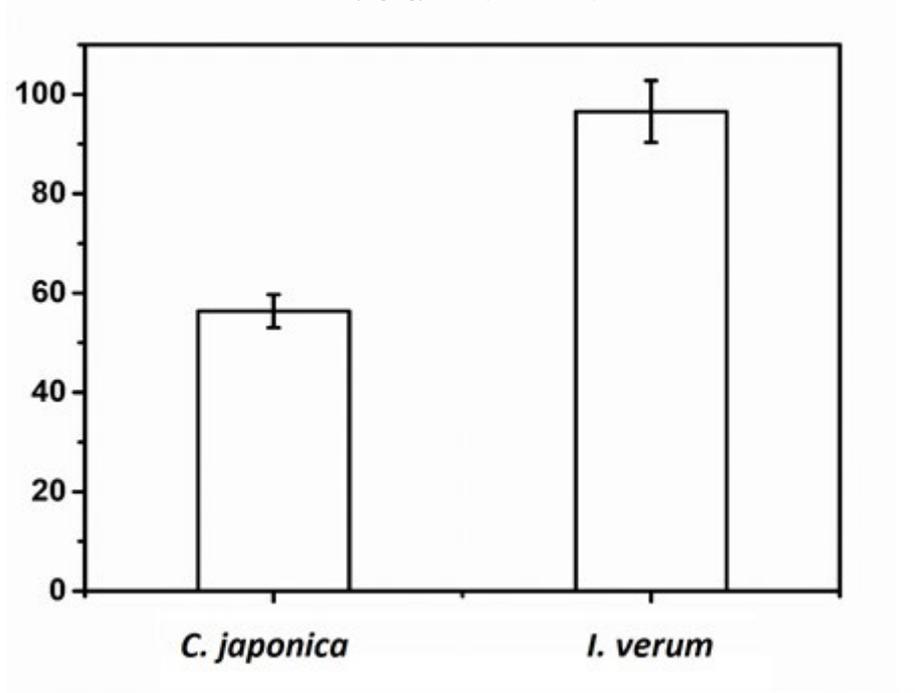
Results and Discussion

SA standard was used and its mass spectra had a [M-1]⁻ ion at *m/z* 172.6 according to C₇H₁₀O₅ and the ions *m/z* 154.6, the highest intensity, 143.7, 110.8 and 92.9. 154.6 ion was chosen for quantification and the others for confirmation. The identification of the peak corresponding to the SA in the samples was achieved comparing the mass spectra and the retention time of the sample and the SA standard (**FIGURE 2**).

FIGURE 2: Chromatogram of SA acid and the mass spectra. A) standard; B) *C. japonica* branches extract; C) *I. verum* seeds extract.



The amount of SA found in *C. japonica* and *I. verum* (branches and seeds respectively) were determined by Microwave Assisted Extraction (MWAE)^[17] using acidified water, as described in the experimental part. The quantifications resulted in 56.36 (\pm 3.31) mg.kg⁻¹ and the CV of 5.9% for the dried biomass for *C. japonica* and 96.57 (\pm 6.24) mg.kg⁻¹ e CV of 6.5% for *I. verum*, representing 5.64 (\pm 0.33) and 9.68 (\pm 0.62) percentage respectively (w/w). The *t*-test showed a significant difference between the levels of SA in both extracts ($p=1,15.10^{-8}$) (FIGURE 3).

FIGURE 3: Amount of Shikimic acid (mg/kg) in *Cryptomeria japonica* and *Illicium verum*.

Different species yielded SA at various levels ranged from 0.001% to 24.5%, the highest content reported for *I. religiosum* [18]. In our results, the SA content found of 5.64 % on dry basis in *C. japonica* is on the range compared to other species related by Bochkov et al. [18].

SA accumulates in gymnosperms and woody dicots. Sui [19], found concentrations of 0.82 to 1.6% in the wet and dried biomass of pine needles. Raghavendra et al. [13] screened 210 trees species and found detectable levels of shikimic acid, with six species accumulating greater than 1% by dry weight. Enrich et al. [20] found levels ranging from 2.4 to 3.7%, w/w from the seeds of *Liquidambar styraciflua*.

We believe that the fast growth of *C. japonica*, the amount that we found and the easy adaptability to the edapho-climatic conditions in the southern of Brazil associated with the good response to the forestry technologies can make this species as an alternate source of SA [15].

The results shows that branches of *C. japonica* have reasonably concentration of SA when compared with *I. verum* corresponding to 58.36% of that, representing a renewable source of SA. *C. japonica* typically yields 45 m³.ha⁻¹ from crop biomass on a per-hectare basis and their woody have a low density about 0.40 g.cm⁻³ [21], which could potentially produce 1,000 kg of SA/ha (gross weight).

Conclusion

Besides the use as wood, *C. japonica* can be exploited for commercial production of SA and can alleviate the problem of SA scarcity. Optimization of SA from *C. japonica* isolation at scale is still required to confirm the commercial viability of this plant as precursor of Oseltamivir phosphate in the pharmaceutical and cosmetic industry. Also more data on seasonal variation studies of SA content is necessary.

Acknowledgments

Marley Mendonça Tavares, Embrapa Meio Ambiente, by carrying out the chemical analyses. Rosana Higa, Embrapa Floresta for helping on plant material harvesting. Project funded by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

1. Lycett SJ, Duchatel F, Digard P. A brief history of bird flu. **Philos Trans Royal Soc B**. 2019; 374(1775). ISSN 0962-8436. [\[CrossRef\]](#).
2. Martirosyan L, Paget WJ, Jorgensen P, Brown CS, Meerhoff TJ, Pereyaslov D et al. The community impact of the 2009 influenza pandemic in the WHO European Region: a comparison with historical seasonal data from 28 countries. **BMC Infect Dis** [Internet]. 2012 Feb 12; 12: 36. Available from: [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
3. Farina V, Brown JD. Tamiflu: The supply problem. **Angew Chem**. 2006; 45(44): 7330-4. ISSN 1433-7851. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
4. Abrecht S, Federspiel MC, Estermann H, Fischer R, Karpf M, Mair HJ et al. The synthetic-technical development of oseltamivir phosphate tamiflu™: A race against time. **Chimia Inter J Chem**. 2007; 61(3): 93-9. ISSN 0009-4293. [\[CrossRef\]](#).
5. Forleo-Neto E, Halker E, Santos VJ, Paiva TM, Toniolo-Neto J. Influenza. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2003; 36(2): 267-74. ISSN 0037-8682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
6. Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu HT, Zhang LJ, Swaminathan S et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: Design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. **J Am Chem Soc**. 1997; 119(4): 681-90. ISSN 0002-7863. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
7. Kramer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Muller U, Orf S et al. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. **Metab Eng**. 2003; 5(4): 277-83. ISSN 1096-7176. [\[CrossRef\]](#).
8. Borah JC. Shikimic acid: a highly prospective molecule in pharmaceutical industry. **Curr Sci**. 2015; 109(9): 1672-9. ISSN 0011-3891. [\[CrossRef\]](#).
9. Díaz Quiroz DC, Carmona SB, Bolívar F, A E. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. **Res Rep Med Chem**. 2014; 4: 35-46. [\[CrossRef\]](#).
10. Cardoso SF, Lopes LMX, Nascimento IR. Eichhornia crassipes: an advantageous source of shikimic acid. **Rev Bras Farmacogn**. 2014; 24(4): 439-42. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
11. Payne R, Edmonds M. Isolation of shikimic acid from star aniseed. **J Chem Educ**. 2005; 82(4): 599-600. ISSN 0021-9584. [\[CrossRef\]](#).
12. Sadaka M, Garcia A. Extraction of shikimic and quinic acids. **Chem Eng Commun**. 1999; 173(1): 91-102. ISSN 0098-6445. [\[CrossRef\]](#).
13. Raghavendra TR, Vaidyanathan P, Swathi HK, Ramesha BT, Ravikanth G, Ganeshiah KN et al. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tamiflu, a bird-flu drug. **Curr Sci**. 2009; 96(6): 771-2. ISSN 0011-3891. [\[Link\]](#).
14. Bradley D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? **Nat Rev Drug Discov**. 2005; 4: 945. [\[CrossRef\]](#).

15. Kratz D, Wendling I, Brondani G.E. Concentrações de ácido indolbutírico no enraizamento de *Cryptomeria japonica*. **J Biotec Biodivers**. 2014; 2(3): 14-21. ISSN 2179-4804.
16. Santos CBd, Longhi SJ, Hoppe JM, Moscovich FA. Efeito do volume de tubetes e tipo de substratos na qualidade de mudas de *Cryptomeria japonica* (L.F.) D. Don. **Cien Flore**. 2000; 10(2): 1-15. [[CrossRef](#)].
17. Matallo MB, Almeida SDB, Cerdeira AL, Franco DA, Blanco FMG, Menezes PTC et al. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **PI Dan**. 2009; 27(spe): 987-94. ISSN 0100-8358. [[CrossRef](#)].
18. Bochkov DV, Sysolyatin SV, Kalashnikov AI, Surmacheva IA. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. **J Chem Biol**. 2012; 5: 5-17. [[CrossRef](#)].
19. Sui R. Separation of shikimic acid from pine needles. **Chem Eng Technol**. 2008; 31(3): 469-73. ISSN 0930-7516. [[CrossRef](#)].
20. Enrich LB, Scheuermann ML, Mohadjer A, Matthias KR, Eller CF, Newman MS et al. Liquidambar styraciflua: a renewable source of shikimic acid. **Tetrahedron Lett**. 2008; 49(16): 2503-5. ISSN 0040-4039. [[CrossRef](#)].
21. Shimizu JY, Maiochi RA. Criptoméria como espécie alternativa para produção de madeira no Paraná. **Pesqui Florest Bras**. 2007; 5(54): 63-70. ISSN 1983-2605. [[Link](#)].

Histórico do artigo | **Submissão:** 24/07/2019 | **Aceite:** 22/08/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Cerdeira AL, Queiroz SCN, Matallo MB. *Cryptomeria japonica* (L. F.) D. Don as source of shikimic acid. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 462-468. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revistafitos/article/view/821>>. 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.



Effect of spray drying process parameters on *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. dried extracts

DOI 10.32712/2446-4775.2020.969

Rodrigues, Lucas Oliveira¹; Faria, Rachel Andrade de¹; Gouvêa, Marcos Martins²; Peregrino, Carlos Augusto de Freitas³; Macedo, Elizabeth Valverde³; Mourão, Samanta Cardozo³.

¹Federal Fluminense University, Faculty of Pharmacy, Applied Sciences to Health Products Graduate Program, Rua Mário Viana nº 523, Postal code: 24241-000, Niterói, RJ, Brazil.

²Federal Fluminense University, Department of Analytical Chemistry, Outeiro de São João Batista s/n, *Campus* do Valonguinho, Postal code: 24020-141, Niterói, RJ, Brazil.

³Federal Fluminense University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Rua Mario Viana nº 523, Postal code: 24241-000, Niterói, RJ, Brazil.

*Correspondence: lucasor@id.uff.br.

Abstract

Uncaria tomentosa (Willd. ex Schult.) DC. (Cat's claw) is a plant member of the Rubiaceae family, from the Amazon region, and used in traditional medicine as raw material for phytomedicines indicated for arthritis and osteoarthritis. This study aimed to evaluate the spray drying process parameters on the properties of different extracts obtained from *Uncaria tomentosa*. A reduced 2^{4-1} multifactorial design was applied to evaluate the importance of the equipment variables (pump speed, spray nozzle diameter, air inlet temperature, and atomization airflow rate) in the process. Maltodextrin and acacia gum were used as carriers in a 1:1 (m/m) ratio, considering the solid residue content of the liquid plant extract. Process yield, moisture, and hygroscopicity were evaluated as dependent variables. Higher atomization airflow rate led to higher process yield for powdered dried extracts with maltodextrin. Higher temperature led to lower moisture contents regarding powdered dried extracts with acacia gum. No variable, for any carrier, was considered significant for hygroscopicity. The best spray drying configuration for the desired characteristics (*i.e.* lower hygroscopicity and moisture) used the larger spray nozzle with a diameter of 1.2 mm and the higher temperature of 150 °C, with both carriers.

Keywords: Traditional medicine. Design of experiments. Spray drying. Phytomedicine Development.

Introduction

Uncaria tomentosa (Willd. ex Schult.) DC. is popularly known as Cat's claw due to its curved spines. It is a member of the Rubiaceae family and a native medicinal plant of South America^[1]. It is commonly used in the form of liquid extracts and herbal teas, as a natural anti-inflammatory phytomedicine. In Brazil, the coated

tablets and the capsules containing powdered dried extract of *U. tomentosa* are provided by the Brazilian Unified National Health System (SUS), and they are indicated for the treatment of arthritis and osteoarthritis^[2].

Spray drying is a common technique used to obtain the plant's powdered dried extracts for production of its phytomedicines. Due to the hygroscopic characteristics of the plant's powdered dried extract as an active pharmaceutical ingredient (API), a coating procedure is required to increase the stability of the tablets. Certain compounds, called carriers or wall materials, can be added before the drying procedure to adjust the extract's properties such as its morphological and granulometric characteristics, chemical, physicochemical properties, and its stability. Also, they may be influenced by the equipment variables^[3].

Since it is not possible to infer to the operating conditions of the spray drying process, based on previous results from similar studies with other plant/carrier systems^[4], this study aims to evaluate the variables related to the drying apparatus to obtain a powdered dried extract of *U. tomentosa* with high yield, and low values of hygroscopicity, and moisture using separately maltodextrin and acacia gum as carriers. Hence, a dry extract with these characteristics could enable direct compression and possibly dismiss the coating procedure for tablets.

Material and methods

Barks of *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. of Rubiaceae family, received from the supplier (Florien Pharmaceutical Supplier, Brazil, batch 053626), were initially cut and partially crushed in a Fortinox Star ft 51/1 cyclone knife mill to obtain smaller particles. Liquid extracts were obtained by static maceration with 40% v/v (1:10 m/v) hydroalcoholic solution for four days with occasional agitation. After supernatant filtration, the vegetal material was subjected to remaceration (1:5 m/v), and the combined extracts were partially concentrated in a rotary evaporator. The solid residue was determined by solvent evaporation at 105°C, to constant weight (10 mL, n = 3)^[5].

Maltodextrin and acacia gum were separately used as carriers in a 1:1 m/m proportion regarding the solid residue of the plant extracts. The experimental conditions of the process were evaluated by a 2⁴⁻¹ multifactorial design applied to each carrier, considering pump speed, spray nozzle diameter, air inlet temperature, and atomization airflow rate as independent variables (**TABLE 1**), and process yield, moisture and hygroscopicity as dependent variables.

TABLE 1: Summary of the experiments.

Extract identification	Carrier	Pump speed (L/h)	Spray nozzle (mm)	Air inlet temperature (°C)	Atomization airflow rate (m ³ /min)
E1	Maltodextrin	0.3	1.2	150	0.64
E2	Maltodextrin	0.7	1.2	150	1.07
E3	Maltodextrin	0.3	0.7	150	1.07
E4	Maltodextrin	0.3	1.2	110	1.07
E5	Maltodextrin	0.7	1.2	110	0.64
E6	Maltodextrin	0.7	0.7	110	1.07
E7	Maltodextrin	0.3	0.7	110	0.64
E8	Maltodextrin	0.7	0.7	150	0.64
E9	Acacia gum	0.3	1.2	150	0.64
E10	Acacia gum	0.7	1.2	150	1.07
E11	Acacia gum	0.3	0.7	150	1.07
E12	Acacia gum	0.3	1.2	110	1.07

E13	Acacia gum	0.7	1.2	110	0.64
E14	Acacia gum	0.7	0.7	110	1.07
E15	Acacia gum	0.3	0.7	110	0.64
E16	Acacia gum	0.7	0.7	150	0.64

A co-current supply spray dryer (Labmaq do Brasil MSDi 1.0), was fed with the liquid extract mixed with the carrier under constant magnetic stirring after homogenization for 5 minutes at approximately 18.000 RPM (speed 3) in a DragonLab D-500 ultraturrax. The powdered dried extracts (0.1 g) obtained were heated at 105°C to constant weight (n = 3) to evaluate moisture^[5]. The hygroscopicity test was performed in a desiccator with controlled atmosphere (constant relative moisture (RH) = 75%) using a saturated sodium chloride solution. The mass gain from the powdered dried extracts was verified for 2 h (n = 3). The percentage of hygroscopicity (%H) was calculated according to Equation 1. The powders with less than 10% hygroscopicity were classified as non-hygroscopic; 10.1 – 15% as slightly hygroscopic; 15.1 – 20% as hygroscopic; 20.1 – 25% as very hygroscopic; > 25% as extremely hygroscopic^[6].

$$\%H = \frac{(WI + \%M) \times 100}{100 + WI}, \text{ and } WI = \frac{m_{\text{absorbed water}}}{(\text{initial mass})} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

Where WI = percentage of water intake; %M = moisture content of the sample after the test.

The statistical evaluation of the results was carried out by analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was established through p-value. P-values < 0.05 were considered statistically significant. The analysis was performed using the Statistica® software, version 12.5 from TIBCO Software Inc. (California, United States).

Results and Discussion

Two powdered dried extracts (E5 and E8) that used maltodextrin provided insignificant amounts of powder, which were visibly moist. These experiments were repeated, and the same results were observed, indicating that the process was not efficient under such conditions. Therefore, we used the most unwanted results to calculate a value that was used as input for the software. The percentage of hygroscopicity (%H) and the percentage of moisture (%M) were calculated according to the Equation 2, by summing the amplitude (w) of each category values for maltodextrin, with the highest value (z) obtained. A 5% rate was added to the final result.

$$\%H \vee \%M = (w + z) \times 1,05 \quad (\text{Equation 2})$$

Thus, the %H results for extracts E5 and E8 were 23.17%, and 16.40% for %M. To fill in the results (**TABLE 2**), the acronym VMM (visually moisture material) was adopted since these numbers do not reflect the actual results for these extracts.

TABLE 2: Summary of the results.

Extract identification	Yield (%)	Moisture (%)	Hygroscopicity (%)	Classification
E1	18.82	5.55	14.60	Slightly hygroscopic
E2	30.16	5.60	12.77	Slightly hygroscopic
E3	39.88	4.37	14.83	Slightly hygroscopic
E4	34.64	8.60	15.33	Hygroscopic
E5	9.88	VMM*	VMM	VMM
E6	40.87	9.99	14.23	Slightly hygroscopic
E7	24.88	8.25	17.42	Hygroscopic
E8	13.11	VMM	VMM	VMM
E9	39.01	5.83	22.76	Very Hygroscopic

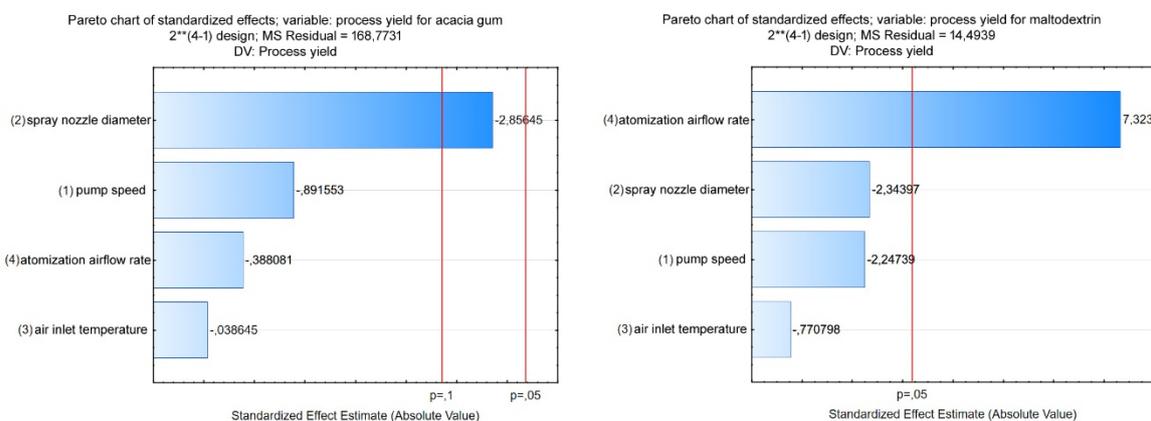
E10	25.59	5.35	16.68	Hygroscopic
E11	44.88	4.86	17.46	Hygroscopic
E12	40.08	5.53	13.14	Slightly hygroscopic
E13	14.37	10.88	22.67	Very hygroscopic
E14	53.85	11.63	23.55	Very hygroscopic
E15	63.94	12.23	28.80	Extremely hygroscopic
E16	61.34	7.43	18.56	Hygroscopic

* VMM = visually moisture material.

The extraction procedure was performed twice, providing two different liquid extracts, which presented 1.21 and 1.27% m/v of dry residue, 0.974 and 0.978 g/mL of density (measured with a pycnometer), and pH ≈ 5 measured with universal pH indicator paper. These extracts were used to manufacture the powdered dried extracts. Regarding the spray drying procedure, the highest yield was 63.94% (E15) – spite of its extreme hygroscopicity –, while the lowest yield was 9.88% (E5).

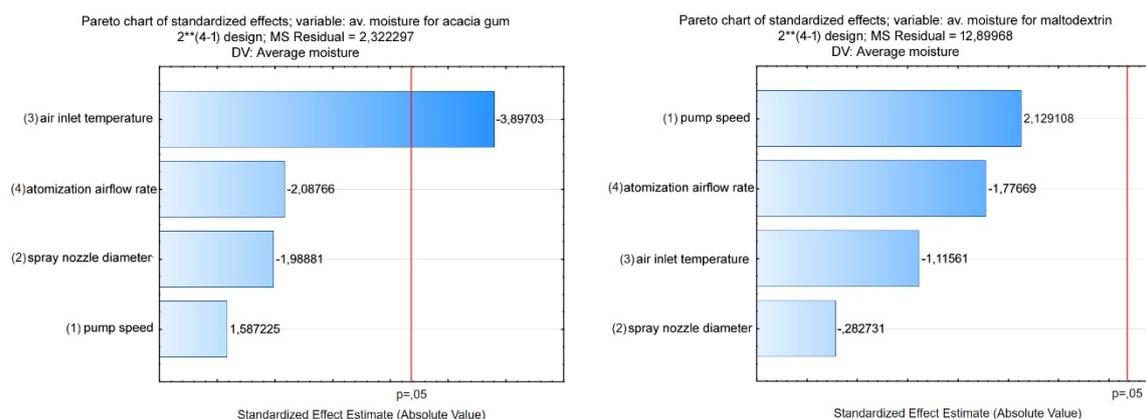
However, no variable was statistically significant for the yield results using acacia gum (E9 - E16). The parameter atomization airflow rate was significant ($p = 0.005259$), which influence the yield of the spray drying process with maltodextrin (**FIGURE 1**), where a higher airflow rate led to a higher yield. As higher airflow leads to greater availability of hot air and heat transfer, there is a possibility that a higher airflow could lower the initial diameter of the droplet and, therefore, significantly reduce the drying time^[7]. As a result, drying is more effective, and yield can increase.

FIGURE 1: Pareto charts of standardized effects for the yield of extracts with acacia gum (left) and maltodextrin (right).



Regarding moisture, the results obtained from extracts with acacia gum showed no significant influence. The lowest moisture value was 4.37% (E3), while the highest was 12.23% (E15). The results from extracts with maltodextrin, showed significant negative influence of air inlet temperature ($p = 0.029980$) (**FIGURE 2**), where a higher temperature led to lower moisture content.

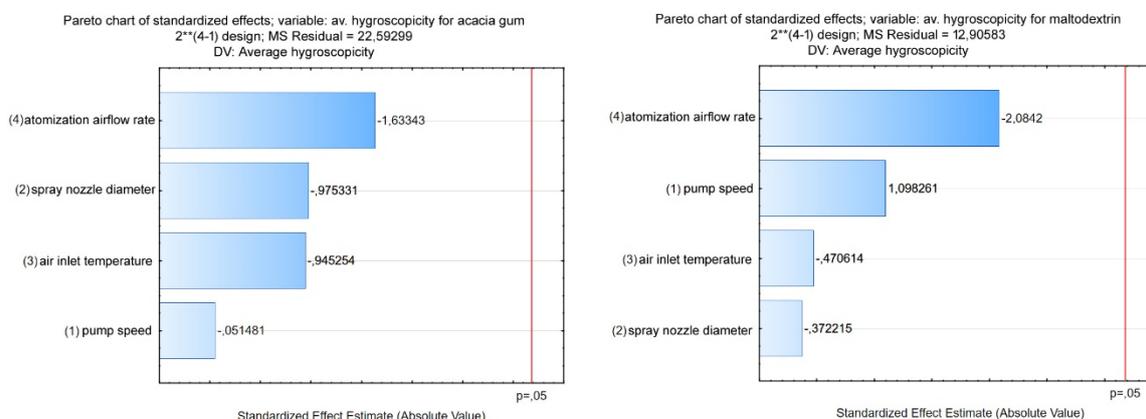
FIGURE 2: Pareto charts of standardized effects for the moisture of extracts with acacia gum (left) and maltodextrin (right).



Similar studies^[4,8-10] also found significance for air inlet temperature, since higher temperatures facilitate water evaporation, and consequently, the samples tend to present less moisture content. The best results for moisture (< 5%) were obtained from extracts E3 (maltodextrin) and E11 (acacia gum), which were produced with the same equipment variables (TABLES 1, 2).

For hygroscopicity, the lowest value found was 12.77% (E2) and the highest was 28.80% (E15). No significant influence was observed (FIGURE 3).

FIGURE 3: Pareto charts of standardized effects for the hygroscopicity of extracts with acacia gum (left) and maltodextrin (right).



However, it was possible to experimentally notice that a higher atomization airflow helped to obtain a less hygroscopic powder. This observation is also based on the classification of the extracts (TABLE 2), where 80% (4 out of 5) of them, classified as slightly hygroscopic, had the airflow at its highest level as the common variable.

Conclusion

Higher atomization airflow rate led to higher process yield for powdered dried extracts with maltodextrin. Higher temperature led to lower moisture contents regarding powdered dried extracts with acacia gum. No variable, for any carrier, was considered significant for hygroscopicity. The best dried extracts in terms of lower hygroscopicity and moisture were E1 and E2 (maltodextrin), and E10 and E12 (acacia gum). E1, E2, and E10 had in common the highest tested temperature (150°C). All of them presented the spray nozzle as

the common variable at its largest tested diameter (1.2 mm). Therefore, a larger spray nozzle and a higher temperature could help the development of a tablet that dismiss the currently necessary coating procedure.

Acknowledgments

This work was supported by Vital Brazil Institute (IVB) through their internship program, and by Fluminense Federal University (UFF) through their internship and scientific initiation (PIBIC) programs. We also want to acknowledge the financial support from CAPES Higher Education Improvement Coordination (financial code 001) and to thank the Fundamental and Applied Analytical Chemistry Laboratory (LaQAFA) for the collaboration.

References

1. Wurm M, Laco K, Gerhard L, Keplinger K, Dierich MP. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte proliferation-regulating factor. **PI Med.** 1998; 64(8): 701-704. ISSN 0032-0943. [[CrossRef](#)].
2. Brasil. Ministério da Saúde, **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2020**. 1ª ed. Brasília: 2019. ISBN-13: 9788533427488.
3. Yousefi S, Emam-Djomeh Z, Mousavi SM. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica granatum* L.). **J Food Sci Technol.** 2011; 48(6): 677-684. ISSN 0975-8402. [[CrossRef](#)].
4. Gallo L, Llabot JM, Allemandi D, Bucalá V, Piña J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technol.** 2011; 208(1): 205-214. ISSN 0032-5910. [[CrossRef](#)].
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª ed. Brasília; 2019. ISBN-13: 9788588233409.
6. GEA Niro Research Laboratory. Hygroscopicity, Method No. a 14a [Internet]. [updated 2005]. Available from: [[Link](#)]. Cited in: 2020 Feb 22.
7. Zhang T, Youan BBC. Analysis of process parameters affecting spray-dried oily core nanocapsules using factorial design. **Aaps Pharmscitech.** 2010; 11(3): 1422-1431. ISSN 1530-9932. [[CrossRef](#)].
8. Chegini GR, Ghobadian B. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. **Drying Technol.** 2005; 23(3): 657-668. ISSN 1532-2300. [[CrossRef](#)].
9. Fernandes RVDB, Borges SV, Botrel DA. Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. **Food Sci Technol.** 2013; 33: 171-178. ISSN 1678-457X. [[CrossRef](#)].
10. Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **J Food Eng.** 2008; 88(3): 411-418. ISSN 0260-8774. [[CrossRef](#)].

Histórico do artigo | Submissão: 14/03/2020 | **Aceite:** 05/10/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Rodrigues LO, Faria RA, Gouvêa MM, Peregrino CAF, et al. Effect of spray drying process parameters on *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. dried extracts. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 469-475. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/969>>. 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.



Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*

Chemical study and antimalarial activity evaluation of branches of *Piranhea trifoliata*

DOI 10.32712/2446-4775.2020.905

Pedroza, Laila da Silva^{1*}; Salazar, Marcos Gabriel Maciel¹; Osorio, Maria Izabel Correia¹; Fachin-Espinar, Maria Tereza¹; Paula, Renata Cristina de²; Nascimento, Maria Fernanda Alves de²; Oliveira, Alaide Braga de²; Nunez, Cecilia Veronica¹.

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Coordenação de Tecnologia e Inovação, Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia. Avenida André Araújo, 2936. Petrópolis, CEP 69067-375, Manaus, AM, Brasil.

²Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos. Av. Antônio Carlos, 6.627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

*Correspondência: lailapedroza2013@gmail.com.

Resumo

Este trabalho teve como objetivos realizar o estudo químico dos galhos de *Piranhea trifoliata* (Picodendraceae) e avaliar o seu potencial antimalárico. Foram realizadas duas coletas no Estado do Pará. O material foi seco, moído e extraído com diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e água (H₂O). Os extratos DCM e MeOH foram submetidos à análise em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), e apresentaram características principalmente de terpenos. Do estudo fitoquímico do extrato DCM da 2^a coleta, foi isolada: friedelan-3-ona e do extrato MeOH da 2^a coleta foi isolado: o triterpeno esqualeno, e mistura dos esteroides estigmasterol e β-sitosterol. Quanto à atividade antimalárica, os extratos e as fases dos extratos MeOH foram avaliados *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum*, e os extratos MeOH da 1^a e 2^a coletas foram considerados ativos (CI₅₀ = 13,7 µg/mL; CI₅₀ = 5,8 µg/mL, respectivamente). Este trabalho contribuiu para o conhecimento biológico e químico da espécie *Piranhea trifoliata* e da família Picodendraceae, sendo este o primeiro relato de atividades biológicas para a espécie em estudo.

Palavras-chave: Picodendraceae. Triterpenos. Esteroides. Terpenoides. *Piranhea*.

Abstract

The objective of this work was to carry out the chemical study of *Piranhea trifoliata* (Picodendraceae) branches and to evaluate their antimalarial potential. Two collections were performed in the State of Pará. The material was dried, ground and extracted with dichloromethane (DCM), methanol (MeOH) and water (H₂O). The DCM and MeOH extracts were subjected to comparative thin layer chromatography (TLC) analysis and showed characteristics mainly of terpenes. From the phytochemical study of the second collection DCM extract, it was

isolated: friedelan-3-one and the second collection MeOH extract was isolated: the squalene triterpene, and the mixture of the stigmasterol and β -sitosterol steroids. Regarding antimalarial activity, MeOH extracts and phases were evaluated *in vitro* against *Plasmodium falciparum*, and MeOH extracts from the 1st and 2nd collections were considered active ($IC_{50} = 13.7 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50} = 5.8 \mu\text{g/mL}$, respectively). This work contributed to the biological and chemical knowledge of the species *Piranhea trifoliata* and Picrodendraceae family, this being the first report of biological activities for the species under study.

Keywords: *Picrodendraceae*, *Triterpenes*, *Steroids*, *Terpenoids*, *Piranhea*.

Introdução

A malária é uma das doenças infecciosas mais devastadoras e comuns em todo mundo e uma das principais ameaças em matéria de saúde pública em mais de 90 países^[1-3]. Ela é uma doença altamente recorrente em países tropicais e subtropicais^[4]. É uma das doenças negligenciadas de países subdesenvolvidos.

Em 2015, foram relatados 212 milhões de casos clínicos e 429 mil mortes, ocorrendo em grávidas e, principalmente em crianças, sendo que, de acordo com a OMS^[5] 78% dos casos fatais ocorreram em crianças menores de 5 anos de idade, dados estes observados no continente africano. Os tratamentos utilizados após o diagnóstico da doença geralmente incluem dois medicamentos associados que causam alguns efeitos colaterais e têm pouca adesão do paciente^[6]. Este tratamento é bastante complexo, longo e muitas vezes ineficaz devido à reinfeção do paciente, muito comum nas áreas de incidência da doença^[7].

A ineficácia do tratamento antimalárico disponível é a principal razão por trás da sua ameaça. Esse grande problema está na resistência do *Plasmodium falciparum*, aos fármacos existentes e a toxicidade de drogas em seres humanos^[8-11]. As principais drogas antimaláricas atualmente utilizadas são divididas em quatro categorias: quinolinas (quinina, cloroquina, amodiaquina, mefloquina e primaquina), antifolatos (pirimetamina, proguanil e sulfadoxina), derivados da artemisinina (artemisinina, artesunato, arteéter e arteéter) e hidroxinaftoquinonas (atovaquina)^[12].

Porém, devido às dificuldades de acesso encontradas para o tratamento da doença, parte da população utiliza plantas medicinais no tratamento da malária. E algumas plantas já demonstraram o seu potencial para fornecer substâncias eficazes para o tratamento da doença, tais como a quinina e artemisinina, as quais foram isoladas de plantas. O que gera um interesse em procurar nas plantas novas alternativas terapêuticas com eficácia igual ou superior às já existentes^[1].

O surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes a quase todos os antimaláricos levaram químicos e biólogos a estudar a sua substituição efetiva com um mecanismo de ação alternativo e novas moléculas^[13]. Dentro destas perspectivas, pesquisas em busca de novas substâncias bioativas extraídas de plantas medicinais se tornaram um importante ponto a ser considerado.

Nesta busca de novos antimaláricos extraídos de plantas, podemos destacar o gênero *Piranhea*, do qual há estudos fitoquímicos relatados na literatura da espécie *P. mexicana* pela sinonímia *Celaenodendron mexicana*, da qual foram realizados estudos químicos e isolados terpenos. Também foi relatada que esta espécie é utilizada por índios mexicanos como antisséptico, possui atividade antimalárica, citotóxica e antiprotozoária^[14-16]. Assim, o gênero *Piranhea* é uma fonte promissora de terpenos, e possui um potencial

antimalárico, deste modo estudos de novas espécies de *Piranhea* fazem-se necessários para a quimiotaxinomia do gênero, do qual se tem poucos estudos.

A espécie *Piranhea trifoliata* é uma árvore bastante encontrada na América do Sul^(17,18) e popularmente conhecida como Piranheira, pois seus frutos e sementes servem de alimentos para cardumes de piranhas⁽¹⁹⁾. É uma árvore grande de até 25 metros de altura e vive mais de 400 anos^(19,20). É frequentemente encontrada nas regiões de várzeas e igapós, e sua casca é usada como curativo para inflamações no útero em banhos de assento e para chás no tratamento de malária⁽¹⁹⁾. Na literatura foi encontrado apenas um estudo fitoquímico, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, das folhas de *P. trifoliata* no qual foram isolados 6 triterpenos⁽²¹⁾, não havendo relato de estudos sobre suas atividades biológicas.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico dos extratos DCM e MeOH dos galhos de *P. trifoliata* e avaliar o seu potencial antimalárico.

Material e Métodos

Coleta e identificação do material vegetal

Os galhos foram coletados duas vezes. As duas coletas foram realizadas em Altamira, na Volta Grande do Xingu no estado do Pará, sendo a primeira coleta em novembro de 2008 e a segunda em agosto de 2009. As exsicatas foram catalogadas e registradas no herbário do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM, sob os números 10652 para a 1ª coleta e 10654 para a 2ª coleta. A coleta teve autorização do IBAMA número: 16970-1.

Obtenção dos extratos vegetais

Os galhos foram secos em estufa a 50 °C por aproximadamente dois dias, e posteriormente triturados em moinho de facas para o preparo dos extratos. O material seco foi extraído com solventes de polaridade crescente, diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e água (H₂O). Foram realizadas três extrações utilizando ultrassom por 20 minutos, a cada extração realizada. Após cada extração, o extrato obtido foi filtrado e seco, utilizando evaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperatura < 50 °C. Os extratos brutos DCM e MeOH das duas coletas foram comparados por CCDC e por serem distintos não foram reunidos. Os extratos aquosos não foram utilizados neste estudo e foram guardados em refrigeradores para futuros estudos.

Análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC)

Os extratos de *P. trifoliata* foram analisados por CCDC com o objetivo de averiguar a complexidade química dos extratos. Os extratos DCM e MeOH da 1ª e 2ª coleta foram submetidos a análise por CCDC e revelados com alguns reveladores químicos e físicos, para detecção das classes dos constituintes químicos presentes em cada extrato.

Após eluição as placas foram reveladas com luz UV (comprimento de onda de 254 e 365 nm) e, também, com alguns reagentes químicos, para detectar a presença de algumas classes químicas, tais como: Ce(SO₄)₂ para detecção de terpenos, anisaldeído para detecção de terpenos entre outras classes, FeCl₃ para detecção de substâncias aromáticas, AlCl₃ para confirmar a presença de flavonoides. Assim, conseqüentemente, foi possível estabelecer uma estratégia para a separação e purificação de suas substâncias.

Isolamento dos constituintes químicos dos galhos de *P. trifoliata*

O extrato DCM (5 g) da primeira coleta foi submetido a uma coluna filtrante (CCF) de sílica gel utilizando os solventes: DCM, acetato de etila (AcOEt) e MeOH. A fração 1-2 (3,5 g) foi refractionada em cromatografia em coluna aberta (CCA) de sílica gel utilizando como fase móvel misturas de solventes (HEX/DCM; DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH). Das frações resultantes a fração 21 (45,7 mg), foi submetida a um novo fracionamento em CCA usando sílica gel como adsorvente e eluída com misturas dos solventes (HEX/AcOEt e AcOEt/MeOH), resultando na fração 13 (6,3 mg) denominada de substância 1.

O extrato MeOH (130,0 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido, a qual permitiu a obtenção de três fases, desta a fase DCM (2,41 g) foi fracionada em CCA usando sílica gel como fase estacionária usando como fase móvel misturas dos solventes (HEX/DCM; DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH). De fracionamentos sucessivos da fase DCM obteve-se as frações 31-32 (2,2 mg) denominada de substância 2, a fração 3 (1,0 mg) denominada de substância 3 e na fração 42-46 (9,4 mg) denominada de substância 4 e 5.

Métodos espectroscópicos

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em equipamento Bruker BioSpin AG, modelo Fourier 300 Ultrashield, 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , as frações foram analisadas por RMN de ^1H e de ^{13}C mono e bidimensionais, utilizando na dissolução das amostras clorofórmio deuterado com TMS. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hz.

Avaliação da atividade antimalárica

Os testes *in vitro* dos extratos DCM e MeOH foram realizados com hemácias infectadas por *P. falciparum*, clone W2, resistente a cloroquina, através do método LDH (lactato desidrogenase)^[22]. As amostras foram solubilizadas com DMSO resultando uma solução estoque de cada amostra na concentração de 50 mg/mL. A cloroquina foi utilizada como antimalárico padrão e considerada muito ativa com valor de $\text{Cl}_{50} = 0,145 \mu\text{g/mL}$.

A incubação, parasito-droga, foi realizada com 20 μL de cada diluição dos compostos testados colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180 μL da suspensão de hemácias infectadas (1% hematócrito, 2% de parasitemia), provenientes de um cultivo. Foram usados controles sem drogas, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo).

Em seguida, as placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C por 48 h, com amostras e controles. Após esse período as microplacas foram congeladas (-20 °C no mínimo por 24 h), para promover a lise das hemácias.

O lisado celular foi transferido para placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 100 μL de reagente Malstat e 25 μL de reagente NBT/PES. Após 1 h de incubação, a absorbância de cada poço das placas foi registrada em espectrofotômetro (540 nm).

Os percentuais de redução do crescimento dos parasitos foram calculados a partir da absorbância.

As amostras foram avaliadas em dois experimentos independentes. As amostras foram testadas em duas concentrações, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, cada uma em triplicata, para a avaliação do percentual de redução da

parasitemia. Aquelas que apresentaram percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50%, foram selecionadas para determinação das CI_{50} , sendo realizados testes em 6 diferentes concentrações.

Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações inibitórias do crescimento de 50% dos parasitos (CI_{50}) em relação aos controles sem drogas.

Avaliação de citotoxicidade

Após a realização da avaliação da atividade antimalárica, amostras consideradas ativas no teste antimalárico, foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade *in vitro* na linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano.

Primeiramente as células derivadas da linhagem celular HepG2 foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4×10^5 células/100 μ L por poço) e incubadas em estufa de CO_2 à 37 °C por 24 h para a adesão das células à placa.

Em seguida, foram adicionados 100 μ L de meio completo contendo diferentes concentrações dos extratos testados em triplicata. As placas foram incubadas por mais 24 h.

Ao final deste período, foram adicionados 18 μ L/poço de uma solução brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), na concentração de 20 mg/mL. Após 1 h e 30 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

A dose letal mínima que inibe em 50% o crescimento das células na presença dos extratos testes e de antimaláricos controles foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos, considerada 100% de crescimento.

Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações citotóxicas que inibem em 50% o crescimento das células (CC_{50}) em relação aos controles sem drogas.

Para as amostras consideradas ativas foi calculado o índice de seletividade que é dado pela razão entre o valor obtido de CC_{50} para células HepG2 e o valor de CI_{50} para *P. falciparum*.

Resultados e Discussão

Coleta do Material Vegetal e Obtenção dos Extratos

Foram coletados galhos (**FIGURA 1**) de duas coletas diferentes (**TABELA 1**). Foram obtidos seis extratos e os extratos aquosos foram guardados em refrigerador para estudos futuros. Dos 4 extratos resultantes estudados, foi observado que os metanólicos para as duas coletas foram os que apresentaram uma maior porcentagem de rendimento (**TABELA 1**), destacando-se principalmente a 1ª e a 2ª coleta com rendimentos acima de 5%, já os extratos diclorometânicos obtiveram rendimentos inferiores a 1%.

FIGURA 1: Imagens da espécie *P. trifoliata*.

Fonte: autores. (A) aspecto das partes aéreas da árvore em seu habitat, (B) exsicata depositada no herbário.

TABELA 1: rendimentos dos extratos DCM e MeOH obtidos dos galhos de *P. trifoliata*.

Coleta	Solvente (L)	Material vegetal (Kg)	Massa extrato (g)	Rendimento (%)
1	DCM (6 L)	4,0	24,11	0,60
1	MeOH (6 L)	4,0	206,19	5,15
2	DCM (7,5 L)	5,0	10,09	0,20
2	MeOH (7,5 L)	5,0	264,82	5,29

Análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC)

A análise em camada delgada comparativa (CCDC) dos extratos DCM da primeira e da segunda coleta indicaram a presença de terpenos, observados quando as placas foram reveladas com sulfato cérico, pois apresentaram uma coloração vermelha intensa. Observou-se também a presença de substâncias fluorescentes sob a luz UV em 365 nm, um indicativo da presença de substâncias aromáticas. Quando revelados com DPPH mostraram a presença de possíveis antioxidantes pela coloração amarelada. Não foi identificada a presença de alcaloides quando as placas foram reveladas com o Reagente de Dragendorff, pois não se verificaram manchas de coloração alaranjada.

Os extratos MeOH dos galhos apresentaram a presença de terpenos nos extratos da primeira e segunda coleta, quando as placas cromatográficas foram reveladas com sulfato cérico, pois apresentaram uma coloração vermelha intensa. Quando as placas cromatográficas foram reveladas com DPPH mostraram a presença de possíveis antioxidantes pela coloração amarelada. Também não foi identificada a presença de alcaloides quando as placas cromatográficas foram reveladas com o Reagente de Dragendorff.

Ao comparar as duas coletas é possível observar que há muita diferença entre as coletas realizadas, o que pode ter sido influenciado pela diferença de localidades e sazonalidade das coletas. Esses extratos mostraram-se ricos quimicamente revelando uma grande quantidade de possíveis substâncias a serem isoladas.

Substâncias Isoladas dos galhos de *Piranhea trifoliata*

A substância 1 (S-1) obtida do extrato DCM dos galhos da 2ª coleta, apresentou-se na forma de cristais brancos, e quando revelada com $\text{Ce}(\text{SO}_2)_4$ verificou-se a coloração vermelha, com $R_f = 0,35$, quando eluída com HEX/AcOEt 95:05.

O espectro de RMN de ^1H da S-1, apresentou sinais na região de δ_{H} 0,73 a 1,26 ppm, sendo 7 simpletos em δ_{H} 0,73; 0,89; 0,96; 1,00; 1,01; 1,05; 1,18; e um duplete em δ_{H} 0,87 (6,58 Hz), sendo estes oito sinais referentes a 8 metilas, sugerindo que se tratava de um triterpeno. Não foi observada a presença de ligações duplas na região de δ_{H} 5,0 e 6,0, indicativo de um esqueleto friedelano e sinais entre δ_{H} 1,3 e 2,5 referentes aos hidrogênios metilênicos e metínicos.

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de 30 sinais, sendo um sinal em δ_{C} 213,0 indicando a presença de uma carbonila. Também foi possível confirmar a ausência de sinais de ligação dupla nas regiões de δ_{C} 100 a 150. E em δ_{C} 6,8 observou-se o sinal referente a metila na posição C-23, característico do esqueleto friedelano.

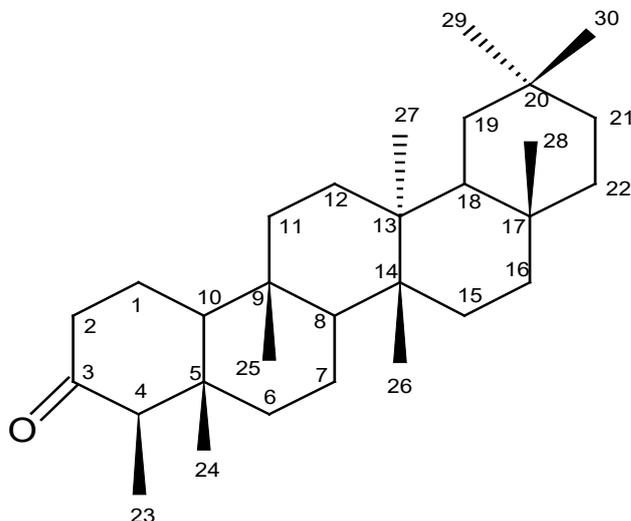
As análises dos dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram comparadas com dados da literatura^[23] (TABELA 2), sendo assim possível confirmar a S-1 como sendo o triterpeno friedelan-3-ona (FIGURA 2).

TABELA 2: Dados de RMN de ^{13}C da substância 1 e comparação com a literatura^[23].

Posição	δ_{C} Observado	δ_{C} Literatura	Tipos de Carbono
1	22,3	22,3	CH ₂
2	41,5	41,5	CH ₂
3	213,1	213,2	C
4	58,3	58,2	CH
5	42,1	42,1	CH
6	41,3	41,3	CH
7	18,3	18,2	CH ₂
8	53,1	53,1	CH ₂
9	37,5	37,4	C
10	59,3	59,4	CH
11	35,6	35,6	CH ₂
12	30,5	30,5	CH ₂
13	39,7	39,7	C
14	38,3	38,3	C
15	32,4	32,4	CH ₂
16	36,0	36,0	CH ₂
17	30,0	30,0	C
18	42,8	42,8	CH
19	35,3	35,3	CH ₂
20	28,2	28,1	C
21	32,8	32,7	CH ₂
22	39,3	39,2	CH ₂
23	6,8	6,8	CH ₃
24	14,7	14,6	CH ₃
25	17,9	17,9	CH ₃
26	20,3	20,2	CH ₃
27	18,6	18,6	CH ₃
28	32,1	32,1	CH ₃
29	35,0	35,0	CH ₃
30	31,8	31,8	CH ₃

A substância friedelan-3-ona está sendo relatada pela primeira vez nos galhos de *P. trifoliata*, porém esta substância já foi isolada das folhas de *P. trifoliata*^[21].

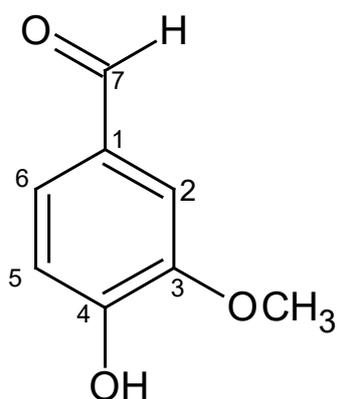
FIGURA 2: Estrutura química da substância friedelan-3-ona.



A substância 2 (S-2), obtida da fase DCM do extrato MeOH dos galhos da 2ª coleta, apresentou-se na forma de cristais brancos e $R_f = 0,4$, quando eluída com Hex/AcOEt 7:3. O seu espectro de RMN de ^1H mostrou alguns sinais na região dos aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,05$ (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), $\delta_{\text{H}} 7,44$ (1H, dd, $J = 8,5$ e 1,8 Hz, H-6), $\delta_{\text{H}} 7,42$ (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-2), mostrou singleto em $\delta_{\text{H}} 9,82$ confirmando a presença do grupo aldeído, e em $\delta_{\text{H}} 3,97$, relativo ao grupo metoxílico. Os dados foram comparados com a literatura^[24] (TABELA 3) e foi possível confirmar S-2 como sendo a substância fenólica 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído (FIGURA 3), sendo este o primeiro relato desta substância na família Picodendraceae.

TABELA 3: Dados de RMN de ^1H da substância 2 comparados com a literatura^[24].

Posição	Literatura		Observado	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	129,9	-	-
2	(d) 7,38	108,7	(s) 7,42	-
3	-	147,1	-	-
4	-	151,7	-	-
5	(d) 7,0	114,4	(d) 7,0	-
6	(dd) 7,39	127,5	(s) 7,44	-
7	(s) 9,81	190,9	(s) 9,82	-
OH	-	-	-	-
OMe	(s) 3,96	56,1	(s) 3,97	-

FIGURA 3: Estrutura química da substância 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído.

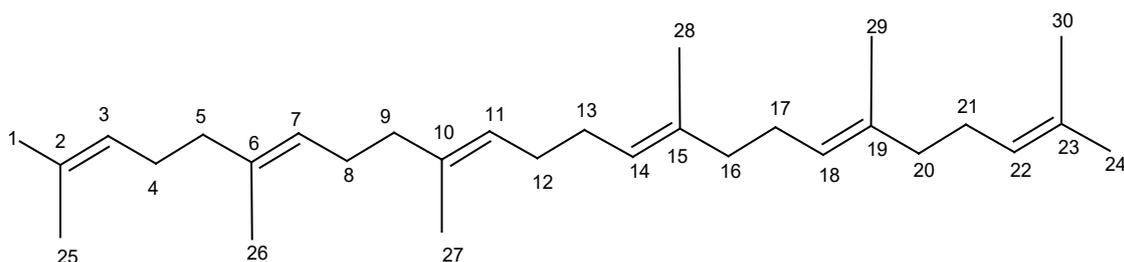
A substância 3 (S-3) obtida da fase DCM do extrato MeOH dos galhos da 2ª coleta, apresentou-se na forma de cristais brancos, e quando revelada com anisaldeído sulfúrico verificou-se a coloração lilás, com $R_f = 0,77$, quando eluída com Hex/DCM 9:1.

O espectro de RMN de ^1H da S-3 apresentou sinais em δ_H 1,68 (s, 6H) e 1,60 (s, 18H). Os hidrogênios em δ_H 1,68 atribuídos a grupos metílicos ligados a carbonos olefínicos nas posições C-1 e C-24 em δ_H 1,60 (s, 18H) atribuídos aos hidrogênios nas posições C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 e C-30. Mostrou também sinais em δ_H 2,06 (m, 20H) indicando a presença de hidrogênios metílicos vizinhos a ligações duplas, e um multiplete em δ_H 5,14 (m, 6H) sugerindo a presença de hidrogênios olefínicos. Não foi possível realizar análises dos espectros de carbono, devido a quantidade de massa obtida ter sido pouca. Os dados do espectro de RMN de ^1H foram comparadas com dados da literatura^[25] (TABELA 4) e foi possível confirmar S-2 como sendo o triterpeno esqualeno (FIGURA 4).

TABELA 4: Dados de RMN de ^1H da substância 3 comparados com a literatura^[25].

Hidrogênios	Literatura	Observados
	δ_H	δ_H
Hidrogênios metílicos ligados aos C-1 e C-24	1,80	1,68 (s)
Hidrogênios metílicos ligados aos C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 e C-30	1,7	1,60 (s)
Hidrogênios metilênicos ligados aos C-4, C-5, C-8, C-9, C-12, C-13, C-16, C-17, C-20, C-21	2,06	2,0 (m)
Hidrogênios olefínicos ligados aos (C-3, C-7, C-11, C-14, C-18, C-22)	5,0	5,14 (m)

A substância esqualeno está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Piranhea*. Esta substância é um triterpeno, classe química de metabólitos secundários, considerada marcadores químicos da família Picodendraceae.

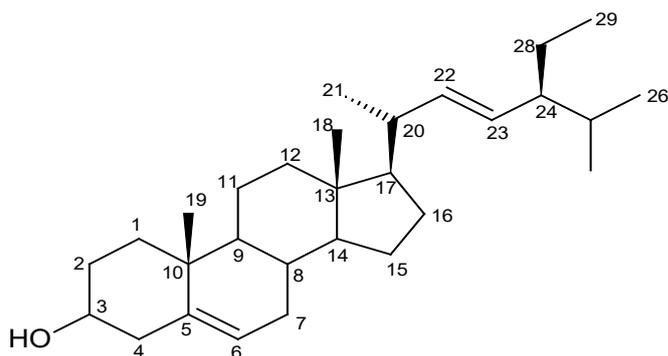
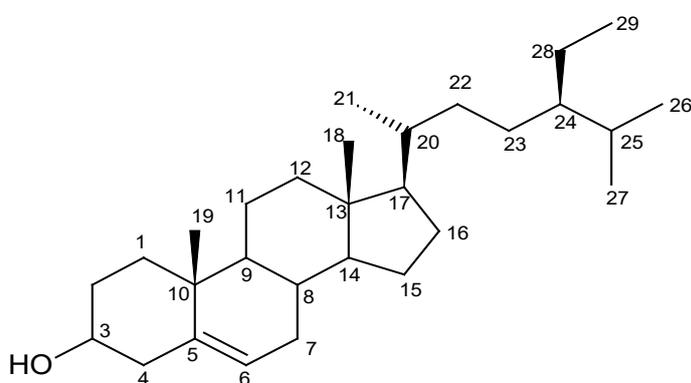
FIGURA 4: Estrutura química da substância esqualeno.

As substâncias 4 e 5 (S-4 e S-5) obtidas da fase DCM do extrato metanólico dos galhos da 2ª coleta, apresentaram-se na forma de cristais brancos e quando reveladas com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, verificou-se a coloração rosa com $R_f = 0,33$, quando eluída com DCM 100%.

O espectro de RMN de ^1H das substâncias 4 e 5 apresentou sinais nas regiões entre δ_{H} 0,69 a 2,33 ppm, referentes a hidrogênios de metílicos, metilênicos e metínicos, característicos de triterpenos e esteroides, com a presença do sinal em δ_{H} 0,69, um simpleto largo com integral para três hidrogênios, que é característico dos esteroides estigmasterol e β -sitosterol, foi possível inferir que as substâncias S-4 e S-5 eram esteroides. Apresentou também um multipeto em δ_{H} 3,52 atribuído a um hidrogênio ligado a carbono carbinólico, H-3 de ambos os esteroides. Em δ_{H} em 5,35 (2H, *dl*, $J = 5,12$ Hz), atribuído ao hidrogênio olefínico na posição H-6 de ambos os esteroides, e ainda dois duplos dupletos em δ_{H} 5,15 (1H, *dd*, $J = 15,18$ e 8,38 Hz) e em δ_{H} 5,01 (1H, *dd*, $J = 15,18$ e 8,57 Hz), referentes aos hidrogênios H-22 e H-23 do esteroide estigmasterol. A comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os descritos na literatura^[21] (TABELA 5) permitiu confirmar que tratava-se da mistura constituída pelos esteroides estigmasterol (FIGURA 5) e β -sitosterol (FIGURA 6), respectivamente substâncias 4 e 5 esteroides comumente encontrados em plantas. As percentagens aproximadas dos dois constituintes na mistura foram calculadas com base na integração dos sinais correspondentes a H-6 (intensidade relativa: 1,70, relativo aos dois esteroides 4 e 5) e H-22 e H-23 (intensidade relativa: 2,09) relativo a dois prótons do molécula do estigmasterol, a metade de 2,09 ($2,09/2=1,045$) representou um próton da molécula do estigmasterol, subtraindo este valor de 1,70 obteve-se a intensidade de 0,655 correspondente a um hidrogênio da molécula de β -sitosterol as intensidades relativas 1,045 e 0,655 permitiram deduzir que a mistura contém 61,48% de estigmasterol e 38,52% de β -sitosterol.

TABELA 5: Dados de RMN de ^1H das substâncias 4 e 5 comparados com a literatura^[21].

Hidrogênios	4 - δ_{H}	5 - δ_{H}	δ_{H}
	Observado	Observado	Literatura
Hidrogênios metílicos H-19	(s) 0,69	(s) 0,69	(s) 0,69
H-3	(m) 3,52	(m) 3,52	(m) 3,54
H-6	(dl) 5,35	(dl) 5,35	(d) 5,37
H-22	(dd) 5,15	-	(dd) 5,16
H-23	(dd) 5,01	-	(dd) 5,01

FIGURA 5: Estrutura química da substância estigmasterol.**FIGURA 6:** Estrutura química da substância β -sitosterol.

Avaliação da atividade antimalárica

As amostras foram testadas em duas concentrações, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Aquelas que apresentaram percentual de redução de parasitemia igual ou maior que 50% nas duas concentrações testadas foram selecionadas para determinação das Cl_{50} .

Os extratos diclorometânicos da 1ª e 2ª coleta apresentaram um percentual de redução de parasitemia inferior a 50%, não sendo um percentual significativo e não tiveram a Cl_{50} determinada, pois não obtiveram um resultado satisfatório. Já os extratos metanólicos da 1ª e 2ª coleta mostram resultados satisfatórios nos experimentos realizados. Os extratos das duas coletas apresentaram 100% de redução de parasitemia nas duas concentrações (100% em 25 $\mu\text{g/mL}$ e 100% em 50 $\mu\text{g/mL}$) (**TABELA 6**). Os extratos foram então submetidos para a determinação da CL_{50} .

TABELA 6: Percentual de redução (%Redução) do crescimento de *P. falciparum* na presença das duas concentrações.

Extratos	% Redução	
	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
1-G-DCM	12	36
1-G-MeOH	100	100
2-G-DCM	25	36
2-G-MeOH	100	100
Cloroquina	100	100

Os extratos metanólicos da 1ª e 2ª coletas foram considerados ativos ($CI_{50} = 13,7 \mu\text{g/mL}$ para a 1ª coleta e de $CI_{50} = 5,8 \mu\text{g/mL}$ para a 2ª coleta) (TABELA 7).

TABELA 7: Avaliação da concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) de *P. falciparum* pelos extratos metanólicos de *P. trifoliata*.

Extratos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Classificação
	Média	
1- G MeOH	13,66	Ativa
2 G MeOH	5,79	Ativa
Cloroquina	0,078	Muito ativa

Os estudos realizados com as fases dos extratos metanólicos da 1ª e 2ª coleta mostraram-se satisfatórios, com destaque para as fases DCM da 1ª e 2ª coleta com redução de parasitemia superior a 90% para as duas concentrações testadas para 1ª coleta (92% - 25 $\mu\text{g/mL}$ e 93% - 50 $\mu\text{g/mL}$) (TABELA 8) e redução superior a 70% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para a 2ª coleta. Estas fases foram testadas para determinação da CI_{50} . As demais fases testadas apresentaram um percentual de redução de parasitemia inferior a 50%, não sendo um percentual significativo e não tiveram a CI_{50} determinada, assim como os extratos.

TABELA 8: Avaliação do percentual de redução (%Redução) do crescimento de *P. falciparum* na presença das diferentes fases dos extratos metanólicos dos galhos de *P. trifoliata*.

Extratos	%Redução	
	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
1-G -MEOH-F-DCM	92	93
1-G-MEOH-F-ACOET	47	57
1-G-MEOH-F-H-MEOH	39	49
2-G-MEOH-F-DCM	36	71
2-G-MEOH-F-ACOET	19	31
2-G-MEOH-F-H-MEOH	10	47
Cloroquina	100	100

Das fases testadas destacaram-se principalmente as fases DCM da 1ª e 2ª coleta, onde foram obtidos valores de $CI_{50} = 7,05 \mu\text{g/mL}$ para 1ª coleta sendo considerada ativa e $CI_{50} =$ entre 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ para a segunda coleta sendo considerada pouco ativa. Já a fase AcOEt da 1ª coleta foi considerada pouco ativa ($CI_{50} =$ entre 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$). E as demais fases foram consideradas inativas (TABELA 9).

TABELA 9: Avaliação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) sobre o crescimento de *P. falciparum* pelas fases dos extratos metanólicos dos galhos de *P. trifoliata*.

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) sobre <i>P. falciparum</i> (cepa W2)	Classificação
1-G-MEOH-F-DCM	7,05 \pm 1,08	Ativa
1-G-MEOH-F-ACOET	Entre 25 e 50	Pouco ativa
1-G-MEOH-F-H-MEOH	>50	Inativa
2-G-MEOH-F-DCM	Entre 25 e 50	Pouco ativa
2-G-MEOH-F-ACOET	>50	Inativa
2-G-MEOH-F-H-MEOH	>50	Inativa
Cloroquina	0,145 \pm 0,02	Muito ativa

Avaliação de citotoxicidade

Após análise da Cl_{50} obtida para a fase DCM da 1ª coleta, a mesma foi submetida ao teste de citotoxicidade e a concentração observada foi superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (TABELA 10).

TABELA 10: Avaliação da atividade citotóxica da fase DCM da 1ª coleta dos galhos de *P. trifoliata* sobre células HepG2 na concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC_{50}).

Amostra	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1-G-MEOH/F-DCM	>1000
cloroquina	167,04 \pm 5,66

Após o teste de citotoxicidade foi realizado o cálculo do índice de seletividade dado pela razão entre o valor obtido de Cl_{50} para células HepG2 e o valor de Cl_{50} para *P. falciparum*.

A fase DCM da 1ª coleta apresentou índice maior que 10 (TABELA 11) e não foi considerada citotóxica, e assim foi possível inferir que esta fase é mais ativa nas células do parasita do que em células normais. Sendo este fator muito importante para estudos posteriores com *P. trifoliata*, pois quanto menor for a citotoxicidade da fase DCM para linhagem de células normais maior será a especificidade de atuação sobre o parasita a ser combatido. Este elevado índice de seletividade para o *P. falciparum* incentiva a realização de estudos posteriores para o isolamento das substâncias para verificar se há a presença de uma única substância ou várias que sejam responsáveis pela atividade antimalárica.

TABELA 11: Valores de CC_{50} , Cl_{50} e índice de seletividade calculado para a fase DCM da 1ª coleta dos galhos de *P. trifoliata*.

Amostra	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS*
1-G-MEOH/F-DCM	>1000,0	7,05	>141,84
Cloroquina	167,04	0,145	1152

*IS – Índice de seletividade.

Pela literatura consultada, pode-se relacionar parte da atividade antimalárica dos extratos desta espécie com a presença do triterpeno fridelina isolado dos galhos, pois há relato da atividade antimalárica desta substância frente ao *Plasmodium falciparum* na concentração de 7,70 μM ^[26]. No entanto, uma vez que o extrato DCM, que é rico em triterpenos desta classe, não apresentou atividade antimalárica, deve haver outras substâncias que sejam ativas sobre a cepa utilizada de *P. falciparum*. Indicando assim que *Piranhea trifoliata* é uma fonte de substâncias com atividade antimalárica ainda por conhecer.

Conclusão

O estudo fitoquímico dos galhos de *P. trifoliata*, permitiu o isolamento das substâncias: friedelina-3-ona, 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído, esqualeno e a mistura dos esteroides estigmasterol e β -sitosterol. O esqualeno e a substância fenólica estão sendo descritos pela primeira vez na família Picodendraceae.

As análises por cromatografia em camada delgada comparativa revelaram que os extratos DCM e MeOH de ambas as coletas são ricos em terpenoides.

Os extratos metanólicos dos galhos de *P. trifoliata* apresentaram um potencial antimalárico frente ao *P. falciparum*, sendo ainda necessários estudos químicos para o isolamento das substâncias ativas.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o conhecimento biológico e químico tanto da espécie *Piranhea trifoliata* como de sua família Picrodendraceae. Sendo duas das substâncias isoladas relatadas pela primeira vez na família assim como as atividades biológicas para a espécie em estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (projetos PPBio/CNPq, REPENSA/CNPq, CT-Agro/CNPq, CTAmazônia/CNPq e bolsas de produtividade de ABO e CVN) e CAPES (projeto Pro-Amazônia/CAPES) pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

Referências

1. Valdés AF, Martínez JM, Lizama RS, Gaitén YG, Rodríguez DA, Payrol JA. *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of some selected cuban medicinal plants. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 2010; 52(4): 197-201. ISSN 1678-9946. [[CrossRef](#)].
2. Lenta BN, Ngouela S, Boyom FF, Tantangmo F, Tchouya GRF, Tsamo E et al. Anti-plasmodial Activity of Some Constituents of the Root Bark of *Harungana madagascariensis* Lam. (Hypericaceae). **Chem Pharmacol Bull**. 2007; 55(3): 464-467. ISSN 1347-5223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
3. Hu YQ, Gao C, Zhang S, Xu L, Xu Z, Feng LS et al. Quinoline hybrids and their antiplasmodial and antimalarial activities. **Eur J Med Chem**. 2017; 20(139): 22-47. ISSN 0223-5234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
4. Aditya NP, Vathsala PG, Vieira V, Murthy RSR, Souto EB. Advances in nanomedicines for malaria treatment. **Adv Colloid Inter Sci**. 2013; 1(17): 201-202. ISSN 0001-8686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
5. World Health Organization - WHO, 2018. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery and Development of New Antibiotics**. [[Link](#)].
6. Santos-Magalhaes NS, Mosqueira VCF. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Adv Drug Deliv Rev**. 2010; 62(4-5): 560-575. ISSN 0169-409X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
7. Soares IS; Rodrigues MM. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Braz J Med Biol Res**. 1998; 31(3): 317-332. ISSN 0100-879X. [[CrossRef](#)].
8. Olliaro P. Mode of action and mechanisms resistance for antimalarial drug. **Pharmacol Therap**. 2001; 89(2): 207-219. ISSN 01637258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
9. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binka F et al. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infect Dis**. 2002; 2(9): 564-573. ISSN 1473 3099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
10. Rai M, Ingle AP, Paralikar P, Gupta I, Medici S, Santos CA. Recent advances in use of silver nanoparticles as antimalarial agents. **Inter J Pharmacol**. 2017; 526(1): 254-270. ISSN 0378-5173. [[CrossRef](#)].

11. Gomes AR, Ravenhall M, Benavente ED, Talman A, Sutherland C, Roper C et al. Genetic diversity of next generation antimalarial targets: A baseline for drug resistance surveillance programmes. **Inter J Paras Drugs Drug Resist.** 2017; 7(2):174-180. ISSN 2211-3207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
12. Saifi MA, Beg T, Harrath AM, Altayalan FSH, Al-Quraishy S. Antimalarial drugs: mode of action and status of resistance. **Afr J Pharm Pharmacol.** 2013; 7(5):148-156. ISSN 1996-0816. [[CrossRef](#)].
13. Hu YQ, Zhang S, Xu Z, Sheng Z, Liu ML, Feng LS. 4-Quinolone hybrids and their antibacterial activities. **Eur J Med Chem.** 2017; 141(1): 335-345. ISSN 0223-5234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
14. Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain T. Review antimalarials from nature. **Bioorg Med Chem.** 2009; 17(9): 3229-3256. ISSN 0968-0896. [[CrossRef](#)].
15. Castañeda PMR, Alma B, Garcia E, Chávez D, Mata R. Secondary metabolites from the stem bark *Celaenodendron mexicanum*. **J Nat Prod.** 1993; 56(9): 1575-1579. ISSN 0163-3864. [[CrossRef](#)].
16. Camacho MDR, Phillipson JD, Croft SL, Solis PN, Marshall SJ, Ghazanfar SA. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **J Ethnopharmacol.** 2003, 89(2-3): 185-191. ISSN:0378-8741 [[CrossRef](#)]
17. Secco R, Cordeiro I. Picrodendraceae: In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro-IPJBRJ. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 25 Mar. 2014.
18. Forzza RC. (Org). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil.** v.1, Rio de Janeiro – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro-IPJBRJ. 2010. ISBN: 978-85-88742-42-0.
19. Filho EMC. **Plante as árvores do Xingu e Araguaia.** São Paulo: Edição Revista e Ampliada, 2012. 260 p. ISBN: 978-85-8226-00 v5-0.
20. Worbes M, Klinger H, Revilla JD, Martins C. On dynamics, floristic subdivision and geographical distribution of varzea forest in Central Amazonia. **J Veget Sci.**1992; 3(4): 553-564. ISSN 1654-1103. [[CrossRef](#)].
21. Jeffreys MF, Nunez CV. Triterpenos das folhas de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). **Acta Amaz.** 2016; 46(2): 189-194. ISSN 1809-4392. [[CrossRef](#)].
22. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL et al. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **The Amer J Trop Med Hyg.** 1993; 48(6): 739-741. ISSN 0002-9637. [[CrossRef](#)].
23. Mahato SB, Kundu AP. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids Compilation and some Salient Features. **Phytochemistry.** 1994; 37(6): 1517-1575. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].
24. França VC, Vieira KVM, Lima EO, Barbosa-Filho JM, Cunha VL, Silva MS. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Rev Bras Farmacog.** 2005; 15(4): 326- 330. ISSN 0102-696X. [[CrossRef](#)].
25. Cursino LMC, Mesquita ASS, Mesquita DWO, Fernandes CC, Pereira Junior OL, Amaral IL et al. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amaz.** 2009; 39(1): 181-186. ISSN 1809-4392. [[CrossRef](#)].
26. Lenta BN, Ngouela S, Boyom FF, Tantangmo F, Tchouya GRF, Tsamo E et al. Anti-plasmodial Activity of Some Constituents of the Root Bark of *Harungana madagascariensis* Lam. (Hypericaceae). **Chem Pharm Bul.** 2007; 55(3): 464-467. ISSN 1347-5223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

Histórico do artigo | Submissão: 14/11/2019 | **Aceite:** 31/07/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Pedroza LS, Salazar MGM, Osorio MIC, Fachin-Espinar MT, et al. Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. *Rev Fitos*. Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 476-491. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/905>>. 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.



Etnobotânica aplicada à seleção de espécies nativas amazônicas como subsídio à regionalização da fitoterapia no SUS: município de Oriximiná – PA, Brasil

Ethnobotany applied to the selection of native Amazonian species as support to the regionalization of phytotherapy in the SUS: municipality of Oriximiná – PA, Brazil

DOI 10.17648/2446-4775.2020.947

Pires, Jéssica Oliveira¹; Léda, Paulo Henrique de Oliveira²; Oliveira, Danilo Ribeiro de³; Coelho-Ferreira, Márlia Regina⁴; Scher, Itana Suzart⁵; Talgatti, Dávia Marciana⁶.

¹Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Curso de Ciências Biológicas, *Campus* Oriximiná Avenida PA 254, 257, Santíssimo, CEP 68270-000, Oriximiná, PA, Brasil.

²Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, Avenida Comandante Guarany, 447, Jacarepaguá, CEP 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Centro de Ciências da Saúde. CCS, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Bl. A2, Sala 01, Cidade Universitária – Fundão, Ilha do Governador, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Perimetral, 1901, Terra Firme, CEP 66077-830, Belém, PA, Brasil.

⁵Universidade Federal da Bahia - UFBA, Faculdade Farmácia, Programa Farmácia da Terra, Rua Barão do Jeremoabo, nº 147, Ondina, CEP 40170-115, Salvador, Bahia, Brasil.

⁶Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, *campus* Oriximiná. Avenida PA 254, 257, Santíssimo, CEP 68270000, Oriximiná, PA, Brasil.

*Correspondência: jessicaoliveira.jo445@gmail.com.

Resumo

O Brasil apresenta rica diversidade vegetal, sobretudo na Amazônia, onde grupos étnicos utilizam diversas plantas no preparo de remédios caseiros. Estas práticas terapêuticas ocorrem sem interface com políticas de saúde. Neste contexto, conduziu-se levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais, por moradores de Oriximiná-PA, e analisou-se presença das nativas da Amazônia em documentos do Sistema Único de Saúde (SUS). Após a realização de entrevistas semiestruturadas, obteve-se a coleta e identificação de 112 espécies pertencentes a 50 famílias, sendo a maior parte referente à família Fabaceae e nativas da Amazônia (56%). Após identificação, comparou-se as nativas da Amazônia com aquelas presentes em 14 documentos do SUS, onde a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e o Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais (PPPM) demonstraram mais quantidade de nativas, enquanto houve exclusão nas atualizações da Farmacopeia Brasileira. Porém, observou-se tendência de aumento em documentos elaborados após reconhecimento da fitoterapia no SUS. Entretanto,

a maior parte das endêmicas da Amazônia não consta em nenhum dos documentos analisados. Logo, o estudo etnobotânico conduzido em Oriximiná demonstra a importância das nativas para a população, em contrapartida à sua pouca representatividade no SUS. Pesquisa desta natureza, objetiva alinhar políticas de saúde ao território.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Conhecimento Tradicional. Fitoterapia. Amazônia. Sistema Único de Saúde (SUS). Oriximiná - PA.

Abstract

Brazil has a rich vegetal biodiversity, especially in the Amazon biome where ethnic groups apply several plants for preparing homemade remedies. However, this biocultural heritage remains not well known. The authors sought to carry out a survey based on plants with medicinal properties used by residents of Oriximiná city, Pará State. Ethnobotanical data was obtained from semi-structured interviews. As a result, 112 species were collected, identified and classified into 50 families. Most part of these species are native (56%) from Amazon biome and predominance of the Fabaceae species was observed. After identification, Amazon natives were compared to those present in 14 documents from Unified Health System (UHS), where the "Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS" (RENISUS) and the "Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais" (PPPM) demonstrated more native species quantity, while there was exclusion in the Brazilian Pharmacopeia updates. However, with upward trend after recognition of phytotherapy in UHS. Most of the endemic species in the Amazon are not mentioned in any analyzed document. The ethnobotanical study conducted in Oriximiná demonstrates the native species importance to the population, in contrast to their poor UHS representation. Research of this nature, aims to align health policies to the territory.

Keywords: Medicinal Plants. Traditional Knowledge. Phytotherapy. Amazon. Unified Health System (UHS). Oriximiná - PA.

Introdução

No Brasil, as características culturais a respeito do uso de plantas em práticas curativas devem-se à influência dos ameríndios que, juntamente àquelas introduzidas por europeus, africanos e asiáticos, constituem o atual repertório fitoterapêutico da medicina popular brasileira^[1] que, aliado às práticas culturais e religiosas, busca suprir as necessidades de saúde de competência do Estado. Esta situação foi percebida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma oportunidade de fortalecer a Atenção Primária em Saúde (APS) por meio da introdução da fitoterapia nos sistemas de saúde, associando-a com ações de promoção da saúde vinculadas ao combate de fatores socioambientais que impactam na saúde humana^[2].

Nesta perspectiva, o Sistema Único de Saúde (SUS) seguiu as recomendações da OMS e adotou a APS como estratégia de reorganização dos serviços de saúde no Brasil, reconhecendo o território em suas diversas dimensões (ambiental, política, econômica, cultural e sanitária), em decorrência da importância dele para as condições de vida e de saúde da população. Logo, o estudo da dimensão territorial permite avaliar como os elementos bioculturais são válidos no cuidado à saúde^[3]. Para tanto, torna-se necessário conhecer como diferentes grupos étnicos interagem com a flora que os cerca, na perspectiva de adotar medidas que promovam o uso racional deste recurso terapêutico.

Fundamentação teórica

O SUS possibilita que as práticas de saúde da população, atendida na APS através da Estratégia Saúde da Família (ESF), sejam investigadas pela etnobotânica^[4], buscando identificar espécies, causas, origens e soluções para adoecimentos^[5]. Isso direciona a pesquisa para a geração de conhecimento que deve subsidiar ações de regionalização da saúde e, em particular, da fitoterapia^[6]. Para tanto, a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos – PNPMP^[7] previu a possibilidade da condução de pesquisas etnobotânicas por bioma, com vistas à definição de critérios de uso da fitoterapia. Essa diretriz corrobora o estudo das nativas, outra ação assegurada pela supracitada política, em decorrência da exclusão delas da maior parte das normativas do SUS^[8-10].

Tais medidas estimulam pesquisas com a população adscrita pela ESF no sentido de conhecer práticas terapêuticas e plantas medicinais utilizadas, a fim de incorporar a fitoterapia na APS. Neste contexto, ao conhecer as plantas medicinais utilizadas por meio da investigação etnobotânica, o resultado obtido servirá para promover ações de educação em saúde e criar vínculos de cuidado e de atenção entre usuários e equipes de saúde^[2,4]. Portanto, a etnobotânica fornece subsídios para avaliar em que medida o uso de espécies nativas correlaciona-se com as práticas tradicionais em saúde da população^[7]. Para alcançar este objetivo, o estudo etnobotânico deve ser conduzido em conexão com a realidade cotidiana vivenciada na ESF, em que cada núcleo de atenção e cuidado é a família, e os Agentes Comunitários de Saúde (ACSs) fazem o elo de conhecimento entre as práticas de saúde utilizadas pela população e os serviços de saúde^[11].

No que diz respeito ao setor saúde para a Amazônia, o Plano Regional de Desenvolvimento da Amazônia – PRDA^[12] destacou a saúde materno-infantil como um dos melhores indicadores para monitorar a qualidade de vida na região. A escolha desse indicador advém das suas relações com as condições de vida da população amazônica que, em última análise, refletem as condicionantes territoriais. Observa-se que esta população passa por transição epidemiológica ocasionada pela alta incidência de doenças infecciosas e parasitárias aliadas à presença de doenças crônicas não transmissíveis (diabetes, hipertensão), associada a uma acentuada erosão dos 'saberes' relacionados ao uso de plantas medicinais^[13]. Por isso, apenas a investigação etnobotânica associada à APS pode fornecer subsídios para a introdução da fitoterapia no SUS amazônico. Nota-se que a maior parte das pesquisas etnobotânicas conduzidas na região investiga o uso de plantas medicinais^[14]. Entretanto, é quase inexistente a interface entre pesquisadores e o SUS local que atuam nesse campo de estudo^[15]. Esses dados são corroborados por diagnóstico feito pelo Ministério da Saúde e outros autores a respeito da falta de iniciativas em fitoterapia na Região Norte^[16-18]. Assim, avalia-se aqui a importância das espécies nativas da Amazônia para a população de Oriximiná – Pará, a fim de criar subsídios para selecioná-las para uso no SUS local, contribuindo para ações voltadas para a regionalização da fitoterapia.

Materiais e Métodos

Área de estudo

O Município de Oriximiná está localizado na região do Baixo Amazonas (Latitude: 01°45'56"S; Longitude: 55°51'58"W), Estado do Pará, Brasil, com população estimada de 72.160 habitantes em 2018^[19], formada por ribeirinhos, quilombolas, indígenas e descendentes de europeus (**FIGURA 1**). No contexto amazônico e no caso investigado, a infraestrutura médico-hospitalar é precária e, em alguns casos, inexistente, especialmente

nas zonas rurais. Oriximiná conta com 123 ACSs, onde 63 encontram-se distribuídos em equipes nas 6 Unidades Básicas de Saúde (UBS) localizadas na zona urbana e 60 atendem as comunidades rurais. Essa quantidade de ACSs é insuficiente para fornecer 100% de cobertura à população^[20]. A carência de atendimento médico-hospitalar, por sua vez, proporciona mais interesse no estudo dos possíveis vínculos existentes entre práticas terapêuticas da população e o SUS local.

FIGURA 1: Localização do Município de Oriximiná-PA, com destaque para a zona urbana.



Elaboração: Maico Pimentel.

Seleção dos conhecedores de remédios caseiros

Participaram da pesquisa dois grupos sociais: ACSs e moradores atendidos por estes. No primeiro momento, foram realizados nove grupos focais^[21] entre agosto/2016 e setembro/2017, em que participaram 70% e 63% dos ACSs das zonas urbana e rural respectivamente, os quais deram ciência da pesquisa e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Nesta ocasião, estimulou-se a reflexão a respeito do uso de plantas medicinais e seus remédios; a declararem seus pontos de vista em relação à fitoterapia e; a indicarem os moradores para entrevistas através do formulário semiestruturado, às quais foram conduzidas entre março e junho/2018. O grupo focal possibilitou analisar aspectos qualitativos, publicados em capítulos de livros^[20,22] e em tese^[14]. No momento das entrevistas, realizou-se “turnês-guiadas” com os entrevistados aos quintais e/ou arredores das residências, os quais autorizaram participação através de registro em audiovisual, visando à coleta do material botânico com a associação dos nomes populares mencionados por eles^[23]. Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas na Plataforma Brasil - Parecer 1.882.261.

Identificação do material botânico e análise dos dados

As amostras botânicas coletadas foram fotografadas, herborizadas e identificadas através de chave taxonômica, por comparação com exsicatas depositadas nos herbários do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e em consulta em herbários virtuais. Atualizou-se a nomenclatura botânica conforme o sistema de classificação botânica para angiospermas (APG IV 2016)^[24] e os respectivos domínios fitogeográficos com auxílio da flora do Brasil^[25] e, quando necessário, nos sítios do Missouri Botanical Garden, International Plant Names Index e The Plant List. Depositou-se o material

testemunho no herbário HSTM da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Os dados foram tabulados e analisados com auxílio do Programa Microsoft Excel 2010, considerando os seguintes aspectos: família, nome científico, nome vulgar, origem, forma de uso, parte utilizada e categorias de uso, codificadas de acordo com a Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relativos a Saúde (CID-10)^[26]. Após essa sistematização selecionou-se as nativas da Amazônia a fim de compará-las com as nativas presentes em 14 documentos governamentais que embasam a inserção da fitoterapia no SUS: Farmacopeias Brasileira (FB) Edições de 1 a 6^[27-32]; Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 10/2010^[33], RDC N°26/2014 e seus Anexos^[34]; Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais (PPPM)^[35]; monografias da OMS^[36-39]; Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS)^[40]; Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira (FFFB) e seu suplemento^[41-42] e Memento Fitoterápico Farmacopeia Brasileira^[43], servindo como indicativo da importância dessas espécies nativas para o SUS^[14,34,44].

Resultados e discussão

Trinta e dois moradores foram indicados pelos ACSs como conhecedores de remédios caseiros, isto é, considerados especialistas no assunto por eles. Em decorrência da facilidade de comunicação com as equipes da zona urbana, a maior parte dos entrevistados reside nesta zona (75%), em bairros centrais e periféricos, e apenas 25% na zona rural. Entretanto, houve mais entrevistas no Bairro Santa Luzia e Perpétuo Socorro e na Comunidade Curupira pela maior disponibilidade dos ACSs em contribuir com a pesquisa nestas localidades (**TABELA 1**).

TABELA 1: Relação dos entrevistados, nas zonas urbana e rural e, quantitativo por bairro e comunidade rural de Oriximiná - PA.

Zona Urbana – Bairro	Zona Rural – Comunidade	Unidade Básica de Saúde	Nº de Entrevistados
Santa Luzia	–	Santa Luzia	5
São Pedro	–	N. Sra. das Graças	2
Nossa Sra. das Graças	–	Antônio Miléo	2
N. Sra. de Fátima	–	Antônio Miléo	1
Perpétuo Socorro	–	Antônio Miléo	1
Perpétuo Socorro	–	Lauro Corrêa	5
Santa Terezinha	–	Santa Terezinha	2
São José Operário	–	Corino Guerreiro	3
Bela Vista	–	Penta	3
–	Ajará	–	1
–	Ananizal	–	1
–	Curupira	–	4
–	Iripixi	–	1
–	Maceno	–	1
Total			32

Elaboração: autores.

A maior parte dos entrevistados pertence ao gênero feminino (81%) e são senhoras (faixa dos 45-60) e/ou idosas (>60), que desempenham várias atividades domésticas, entre as quais, cuidar da saúde da família e do cultivo de plantas em seus quintais^[20] Situação semelhante observada por outros pesquisadores, tanto no que se refere aos quintais^[45-48] quanto à predominância do gênero feminino^[46,49-56]. Contudo, observou-se durante o trabalho em campo na zona rural, que os homens têm mais domínio sobre as plantas localizadas na floresta, característica também relatada em Barcarena – PA^[57]. Quanto ao levantamento etnobotânico conduzido, houve o registro, identificação e coleta de 112 espécimes utilizados como medicinais, sendo identificados 109 indivíduos ao nível de espécie e três de gênero (**TABELA 2**).

TABELA 2: Plantas medicinais citadas pelos moradores das zonas urbana e rural do município de Oriximiná-Pará.

Família	Nome científico	Nome vulgar	Origem	Forma de uso	Parte utilizada	Categoria de uso	HSTM**
Acanthaceae	<i>Justicia calycina</i> (Nees) V.A.W. Graham	Sara-tudo	Nat	Chá	Folha	XI; XIV; II	13677
	<i>Justicia pectoralis</i> Jacq.	Cumaruzinho	Nat	Xarope	Folha	X	13678
	<i>Justicia</i> sp.	Mutuquinha	-	Chá	Folha	XIV; IX	13658
Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.	Sabugueiro	Ntz	Chá	Folha	I; XVIII	13679
Amaranthaceae	<i>Alternanthera bettzichiana</i> (Regel) G. Nicholson	Jacamin	Ntz	Emplastro	Folha	XIX	13680
	<i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze	Tetraciclina	Nat	Chá/emplastro	Folha	X; XII; XIV	13681
	<i>Alternanthera sessilis</i> (L.) R.Br.	Agrião	Nat	Comestível/xarope	Folha	X	13682
	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants	Mastruz	Ntz	Chá	Folha	III; X	13683
Anacardiaceae	<i>Anacardium giganteum</i> W. Hancock ex Engl.	Caju-açú	Nat	Chá	Casca	XVIII	13684
	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Caju	Nat	Chá	Casca	IX	13685
	<i>Mangifera indica</i> L.	Manga	Cul	Chá	Casca	IV	13686
Annonaceae	<i>Annona ambotay</i> Aubl.	Envirataia	Nat	Chá/defumação	Folha/casca	I; XVIII	13687
	<i>Annona muricata</i> L.	Graviola	Cul	Chá	Folha	XI; XIV	13688
	<i>Annona squamosa</i> L.	Ata	Cul	Chá	Folha	IV; XVIII	13689
Apiaceae	<i>Eryngium foetidum</i> L.	Chicória	Nat	Chá	Raiz	; XI	13690
Apocynaceae	<i>Himatanthus articulatus</i> (Vahl) Woodson	Sucuuba	Nat	Chá	Casca/látex	X; XI; XIV	13691
	<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K.Schum.	Castanhola	Nat	Chá	Fruto	IV	13692
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia trilobata</i> L.	Urubu-caá	Nat	Chá	Folha	XI	13693
Asteraceae	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K.Jansen	Jambu	Ntz	Chá	Folha	XI	13694
	<i>Ayapana triplinervis</i> (M. Vahl) R.M. King & H. Rob.	Japana-branca, Japana-roxa	Nat	Chá	Folha	III; X; XI	13695
	<i>Gymnanthemum amygdalinum</i> (Delile) Sch.Bip. ex Walp.	Figatil	Cul	Chá	Folha	XI	13696
	<i>Tagetes patula</i> L.	Cravo	Cul	Defumação	Flor	I, XVIII	13697

	<i>Unxia camphorata</i> L.f.	São-João-caá	Nat	Chá	Parte aérea	XI; XII	13698
Bignoniaceae	<i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L.G. Lohmann	Crajiru	Nat	Chá	Folha/raiz	IV; XI; XII; XIV	13699
	<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	Pau D'arco	Nat	Chá	Folha/casca	XI; XVIII	13700
	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry	Cipó-alho	Nat	Banho	Folha	X	13701
	<i>Bixa orellana</i> L.	Urucum	Nat	Chá	Raiz/semente	III; X; XIV	13659
Boraginaceae	<i>Heliotropium indicum</i> L.	Fedegoso	Nat	Chá	Folha	IX; XVIII	13702
Caricaceae	<i>Carica papaya</i> L.	Mamão-macho	Ntz	Chá	Flor	X; XI	13703
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i> L.	Marianinha	Ntz	Chá	Parte aérea	XIV; XVI	13704
Convolvulaceae	<i>Operculina hamiltonii</i> (G. Don) D.F. Austin & Staples	Batatão	Nat	Chá	Fruto	XI	13705
Costaceae	<i>Costus spicatus</i> (Jacq.) Sw.	Cana-mansa	Cul	Chá	Folha	XIV	13660
Crassulaceae	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Diabinho	Ntz	Chá/emplastro	Folha	IV; XVIII	13706
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea stegelmanniana</i> R. Knuth	Emenda-osso	Nat	Emplastro	Folha/rizoma	XIII	13707
Euphorbiaceae	<i>Croton cajucara</i> Benth.	Sacaca	Nat	Banho	Folha/casca	XI	13708
	<i>Croton sacaquinha</i> Croizat	Sacaquinha	Nat	Banho	Folha	XI; XVIII	13709
	<i>Jatropha curcas</i> L.	Pinhão branco	Ntz	Chá	Folha	X; XV; XVIII	13710
	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Pinhão-roxo	Nat	Chá/xarope	Folha	XI	13711
	<i>Jatropha multiflora</i> Pax & K. Hoffm.	Pião- pajé	Cul	Banho/emplastro	Folha	XI; XVIII	13661
	<i>Euphorbia Tithymaloides</i> (L.) Poit.	Coramina	Nat	Chá	Folha	IX	13712
Fabaceae	<i>Bauhinia acreana</i> Harms	Escada-de-Jabutí	Nat	Chá	Casca	IX; XIV	13713
	<i>Bauhinia forficata</i> Link	Pata-de-vaca	Nat	Chá	Folha/casca	IV; IX	13714
	<i>Campsiandra laurifolia</i> Benth.	Manaiara	Nat	Banho de assento/chá	Casca	I; XI; XII; XIV; XVI; XVIII	13715
	<i>Copaifera</i> sp.	Copaíba	Nat	Pomada/chá/xarope	Oleoresina/casca	XI	
	<i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd.	Cumarú	Nat	Xarope	Óleo/semente	X	13716
	<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Jatobá, Jutáí	Nat	Chá	Seiva/casca	XI; XIV	13717
	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz	Jucá	Nat	Emplastro	Semente	XII	13718

	<i>Machaerium ferox</i> (Mart. ex Benth.) Ducke	Sara-tudo	Nat	Chá	Folha	XI; XIV; XVIII	13719
	<i>Macrolobium multijugum</i> (DC.) Benth.	Acapurana	Nat	Banho de assento	Casca	XI	MG234224 #
	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	Barbatimão	Nat	Chá	Folha	XIV; XVI	13720
	<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarindo	Cul	Chá	Fruto	XI; XIV	13721
Humiriaceae	<i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	Uxi-liso	Nat	Garrafada	Casca	XI; XIV	13722
Iridaceae	<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	Marupazinho	Nat	Rizoma	Rizoma	I; XI	13723
Lamiaceae	<i>Pogostemon heyneanus</i> Benth.	Sândalo	Ntz	Chá	Folha	XVIII	13662
	<i>Aeollanthus suaveolens</i> Mart. ex Spreng.	Catinga-de-mulata	Cul	Chá	Folha	X; XI; XVIII	13663
	<i>Mentha arvensis</i> L.	Vick	Cul	Decocção	Folha	X	13664
	<i>Mentha x piperita</i> L.	Hortelãzinho	Cul	Chá	Folha	X; XI	13665
	<i>Ocimum americanum</i> L.	Esturaque	Ntz	Xarope/chá/maceração	Folha	X	13724
	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Alfavacão	Ntz	Chá	Folha	X; XVIII	13725
	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Hortelã-grande	Cul	Chá/xarope	Folha	X; XI	13666
	<i>Plectranthus barbatus</i> Andr.	Melhoral	Cul	Chá	Folha	X; XI	13667
	<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	Boldinho	Cul	Chá	Folha	XI	13668
	<i>Scutellaria purpurascens</i> Sw.	Trevo-roxo	Nat	Chá	Raiz/ folha	VIII; X	13726
Lauraceae	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	Canela	Cul	Chá/emplastro	Folha	X; XVIII	13669
	<i>Persea</i> sp.	Abacate	-	Chá	Folha/fruto	XI; XIV	13670
Lythraceae	<i>Punica granatum</i> L.	Romã	Cul	Chá/xarope	Casca/fruto	X; XIV	13671
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	Muruci	Nat	Emplastro	Casca	XII	13727
Malvaceae	<i>Gossypium barbadense</i> L.	Algodão	Ntz	Xarope	Folha	X	13728
Meliaceae	<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	Andiroba	Nat	Xarope/emplastro	Fruto	IV; X; XII; XV; XVIII	13729
Moraceae	<i>Morus nigra</i> L.	Amora	Cul	Chá	Folha	IV; IX; X; XIII	13672
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	Pitanga	Nat	Chá	Folha	XI	13730
	<i>Psidium guajava</i> L.	Goiaba	Ntz	Chá	Casca/folha	XI	13731
	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Azeitoneira	Ntz	Maceração	Folha/casca	XII	13732

Nyctaginaceae	<i>Boerhavia diffusa</i> L.	Pega-pinto	Ntz	Chá	Folha	XIV	13733
Oxalidaceae	<i>Averrhoa carambola</i> L.	Carambola	Cul	Chá	Folha/fruto	IV	13734
Passifloraceae	<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	Maracujá-do-mato	Nat	Chá	Folha/fruto	VI	13735
	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Maracujá-peroba	Nat	Chá	Folha/fruto	VI; IX	13736
Pedaliaceae	<i>Sesamum indicum</i> L.	Gergelim	Cul	Chá	Raiz	IX; X	13673
Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus orbiculatus</i> Rich.	Quebra-pedra	Nat	Chá	Folha	XIV	13737
Phytolaccaceae	<i>Petiveria alliacea</i> L.	Mucura-caá	Ntz	Banho/pomada	Folha	XVIII	13738
Piperaceae	<i>Piper aduncum</i> L.	Pau-de-Angola	Nat	Banho	Folha	XVIII	13739
	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	Elixir-Paregórico	Nat	Chá	Raiz/folha	XI	13740
	<i>Piper marginatum</i> Jacq.	Caapeba	Nat	Chá	Folha	IX; XIV; XVIII	13741
	<i>Piper nigrum</i> L.	Pimenta-do-reino	Cul	Chá	Fruto	XI; XIII	13742
Plantaginaceae	<i>Scoparia dulcis</i> L.	Vassourinha	Nat	Chá	Folha	IV; XIV	13743
Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Capim-santo	Ntz	Chá	Folha	IV; VI; XI	13744
Polypodiaceae	<i>Phlebodium decumanum</i> (Willd.) J.Sm.	Guaribinha	Nat	Chá	Raiz/folha	X	13745
Portulacaceae	<i>Portulaca pilosa</i> L.	Amor-crescido	Nat	Chá	Folha	I; XI; XII	13746
Rubiaceae	<i>Coffea canephora</i> L.	Café	Cul	Chá	Fruto/folha	XI; XVIII	13747
	<i>Genipa americana</i> L.	Jenipapo	Nat	Chá	Fruto	IV	13748
	<i>Morinda citrifolia</i> L.	Noni	Cul	Chá	Fruto	XVIII	13749
	<i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J.F. Gmel.	Unha-de-gato	Nat	Chá	Casca	XIV	13750
Rutaceae	<i>Citrus x aurantium</i> L.	Laranja-da-terra	Ntz	Chá	Fruto	IV; XI	13751
	<i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck	Limão	Ntz	Chá/xarope	Fruto/folha	X; IX; XII	13752
	<i>Ruta graveolens</i> L.	Arruda	Cul	Chá	Folha	VIII; IX; X; XI; XVIII	13674
Simaroubaceae	<i>Quassia amara</i> L.	Quina	Nat	Chá	Folha	I; IV; IX	13753
Solanaceae	<i>Capsicum frutescens</i> L.	Malagueta	Ntz	Emplastro	Fruto	XVIII	13754
	<i>Solanum stramonifolium</i> Jacq.	Jurubeba	Nat	Banho	Folha	XVIII	13755
Urticaceae	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Imbaúba	Nat	Emplastro	Folha	X; XVIII	13756
	<i>Laportea aestuans</i> (L.) chew	Urtiga	Nat	Emplastro	Folha	XIII	13757

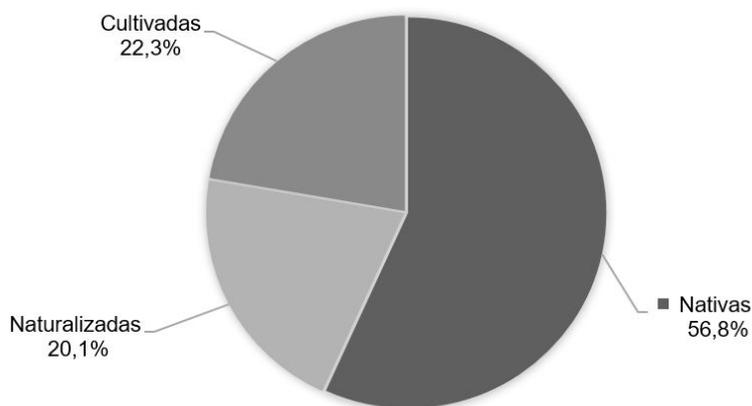
Verbenaceae	<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook.) Tronc.	Alfazema	Nat	Banho	Folha	XVIII	13758
	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson	Cidreira	Nat	Chá	Folha	VI; IX; XI	13759
	<i>Lippia sidoides</i> Cham	Carmelitana	Nat	Chá	Folha	XI	13760
	<i>Lippia organoides</i> Kunth	Salva-de-Marajó	Nat	Chá	Folha	X; XI; XVIII	13761
	<i>Lippia</i> sp.	Mangirona	-	Chá	Folha	X; XVIII	13675
	<i>Phyla betulifolia</i> (Kunth.) Greene	Capim-doce	Nat	Chá	Folha	XI	13762
	<i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl	Rinchão	Nat	Chá	Folha	XV	13763
	<i>Vitex agnus-castus</i> L.	Alecrim-do-norte	Ntz	Chá	Folha	XIV	13764
Vitaceae	<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E.Jarvis	Insulina	Nat	Chá/maceração	Folha	IV; IX	13765
Zingiberaceae	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm.	Vindicá	Cul	Chá/banho	Folha	IX; XVIII	13676
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Mangarataia	Cul	Chá/xarope	Raiz	X; XV	13766

Elaboração: autores.

Nat = Nativa; Ntz = Naturalizada; Cul = Cultivada; ** = Herbário HSTM da UFOPA; # = Herbário João Murça Pires do Museu Goeldi; I - Algumas doenças infecciosas e parasitárias; II - Neoplasias; III - Doenças do sangue e dos órgãos hematopoiéticos e alguns transtornos imunitários; IV - Doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas; V - Transtornos mentais e comportamentais; VI - Doenças do sistema nervoso; VII - Doenças do olho e anexos; VIII - Doença do ouvido e da apófise mastóide; IX - Doenças do aparelho circulatório; X - Doenças do aparelho respiratório; XI - Doenças do aparelho digestório; XII - Doenças da pele e do tecido subcutâneo; XIII - Doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo; XIV - Doenças do aparelho geniturinário; XV - Gravidez, parto e puerpério; XVI - Algumas afecções originadas no período perinatal; XVIII - Sintomas, sinais e achados anormais e/ou mal definidos; XIX - Lesões, envenenamento e algumas outras consequências de causas externas; XX - Causas externas de morbidade e de mortalidade.

As informações botânicas foram atualizadas^[25], categorizando-as em nativas (56,8%), naturalizadas (20,1%) e cultivadas (22,3%) (**FIGURA 2**), corroborando a importância das nativas no preparo dos remédios caseiros na Amazônia Central, resultado semelhante observado em outros estudos publicados entre 1983 e 2017^[46,49,57-65].

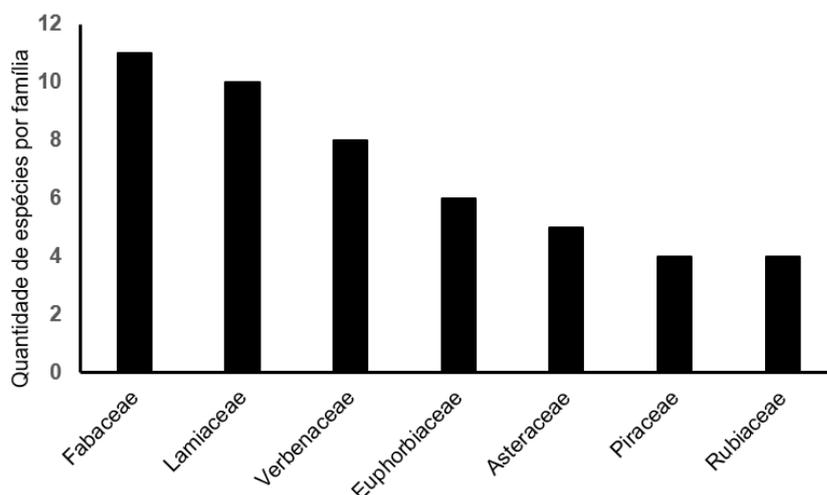
FIGURA 2: Categorização das espécies medicinais utilizadas no preparo de remédios caseiros em Oriximiná.



Elaboração: autores.

As famílias mais representativas foram: Fabaceae (12), Lamiaceae (10), Verbenaceae (8) Euphorbiaceae (6), Asteraceae (5), Piperaceae (4) e Rubiaceae (4) (**FIGURA 3**). Em geral, observa-se a predominância de espécies da família Fabaceae em estudos realizados na Amazônia^[46,58,59,62,63,66-68].

FIGURA 3: Quantidade de espécies medicinais de acordo com as famílias botânicas.



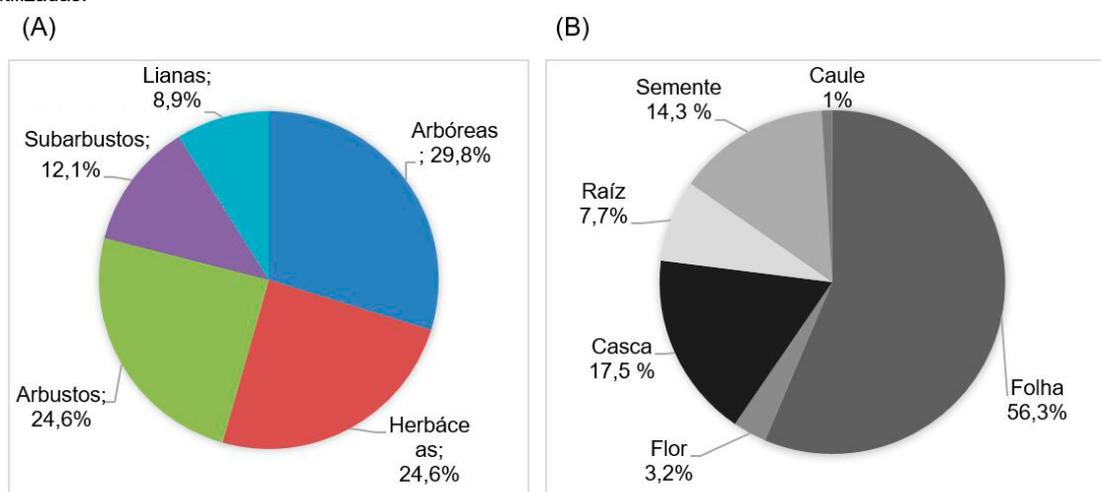
Elaboração: autores.

Embora não seja objeto de análise dessa pesquisa, observou-se alta representatividade de espécies introduzidas da África, Ásia e Europa, semelhante ao relatado por outros pesquisadores^[46,48,49,56,60,69-73]. Por exemplo, algumas das plantas mais citadas são originárias destes continentes: hortelã-grande (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – África e Ásia)^[74], diabinho (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. - África)^[75], hortelãzinho (*Mentha arvensis* L. - Europa)^[76], capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf - Ásia)^[77], arruda (*Ruta graveolens* L. - Europa)^[78], mastruz (*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants -

América Central)^[79], boldo (*Plectranthus barbatus* Andr. - África)^[80], boldinho (*Plectranthus neochilus* Schltr. - África)^[81], figatil (*Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch.Bip. ex Walp. - África)^[82].

Quanto à forma de vida, houve predomínio das arbóreas (29,8%), enquanto herbáceas e arbustos tiveram a mesma proporção (24,6%), seguidas de subarbustos (12,1%) e lianas (8,9%) (**FIGURA 4A**). No que diz respeito às partes do vegetal, as folhas são mais utilizadas (56,3%), presumivelmente, pelo fácil acesso a elas^[83,84]; seguidas de cascas (17,5%), sementes (14,2%), raiz (7,9%), flor (3,7%) e caule (1%) (**FIGURA 4B**). Embora as cascas apareçam em proporção bem menor que as folhas, o uso desta parte do vegetal é uma característica importante para a região amazônica^[73].

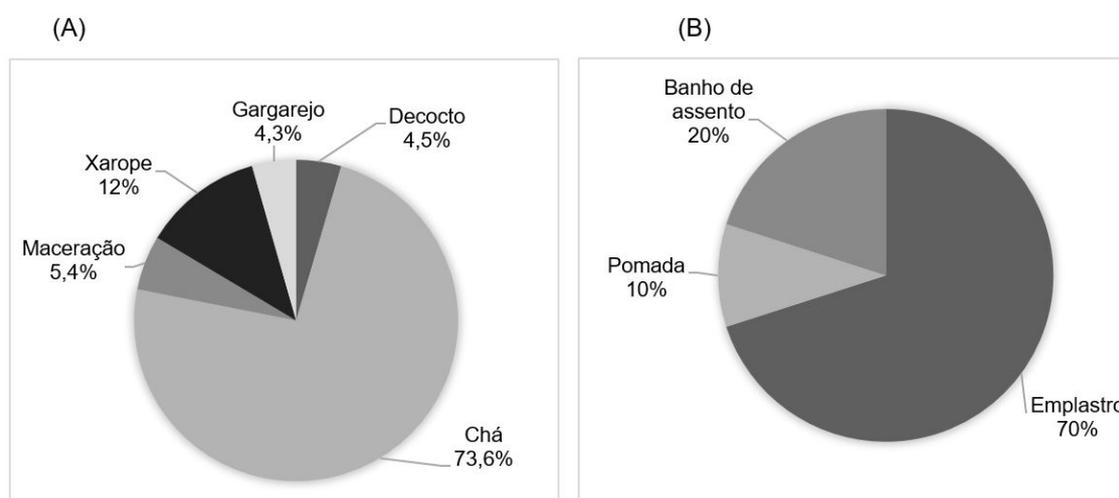
FIGURA 4: (A) Categorização das espécies de acordo com as formas de vida; (B) Frequência das partes das plantas utilizadas.



Elaboração: autores.

No que diz respeito às formas de uso dos remédios, a infusão (chá) (73%) é a mais utilizada, seguidas de xarope (12%), maceração (5%), gargarejo (4%) e decoção (4%). Quanto ao uso externo, o emplastro atingiu 70%, seguidos do banho de assento (20%) e da pomada (10%) (**FIGURA 5**). Hoje, esta última forma de preparo sofreu adaptações por meio da substituição das banhas de animais por gordura vegetal hidrogenada.

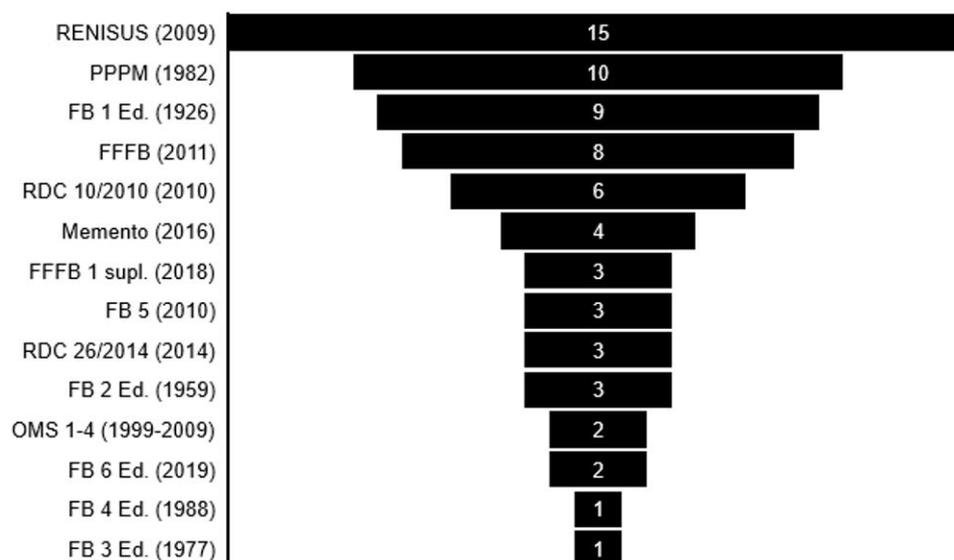
FIGURA 5: (A) Formas de uso interno das partes das plantas; (B) Formas de uso externo das partes das plantas”.



Elaboração: autores.

Quanto aos documentos governamentais analisados, das 34 espécies nativas da Amazônia, caracterizadas como de uso tradicional^[44], apenas sete não constam em nenhum dos 14 documentos, a saber: **1. *Operculina hamiltonii*** (G. Don) D. F. Austin & Staples (batatão); **2. *Endopleura uchi*** (Huber) Cuatrec. (uxi); **3. *Eleutherine bulbosa*** (Mill.) Urb. (marupazinho); **4. *Bertholletia excelsa*** Kunth (castanha); **5. *Ampelozizyphus amazonicus*** Ducke (saracuramirá); **6. *Genipa americana*** L. (jenipapo) e **7. *Quassia amara*** L. (quina). O documento com o maior número de nativas da Amazônia é a RENISUS^[35], por reunir informações acerca das espécies usadas nos serviços de fitoterapia do Brasil, seguido do PPPM^[40], que contém as plantas nativas mais utilizadas pela população brasileira. A 1ª Edição da FB^[27] e a 1ª Edição do FFFB^[41] apresentaram índices semelhantes, apesar das diferentes épocas em que foram elaborados (1926 e 2011), o que demonstra o interesse na reintrodução de espécies nativas no SUS, muitas delas excluídas após as revisões das FBs^[10,85]. Quanto à 1ª Edição da FB^[27], há cinco citadas em Oriximiná dentre as oito presentes neste documento: **1. *Anacardium occidentale*** L. (caju); **2. *Ayapana triplinervis*** (M.Vahl) R.M.King & H.Rob. (japana); **3. *Copaifera guyanensis*** Desf. (copaíba); **4. *Piper aduncum*** L. (pau-de-Angola); **5. *Stachytarpheta cayennensis*** (Rich.) Vahl. (rinchão). Em relação à 1ª Edição do FFFB^[41], apenas a *Paullinia cupana* Kunth não foi mencionada em campo, sendo as demais utilizadas: **1. *Justicia pectoralis*** Jacq. (cumaruzinho); **2. *Copaifera guyanensis*** Desf. (copaíba); **3. *Copaifera multijuga*** Hayne (copaíba); **4. *Copaifera paupera*** (Herzog) Dwyer (copaíba); **5. *Copaifera reticulata*** Ducke (copaíba); **6. *Passiflora edulis*** Sims (maracujá-peroba) e **7. *Lippia organoides*** Kunth (salva-de-Marajó). A RDC 10/2010^[33] também consta quatro espécies, a saber: **1. *Justicia pectoralis*** Jacq.; **2. *Anacardium occidentale*** L.; **3. *Passiflora edulis*** Sims; e **4. *Lippia organoides*** Kunth. No 1º Suplemento do FFFB^[42] contém apenas *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. A **FIGURA 6** mostra a distribuição das espécies de acordo com os 14 documentos analisados e o ano em que foram produzidos.

FIGURA 6: Distribuição das espécies nativas do Bioma Amazônia presentes nos documentos analisados.



Elaboração: autores.

RENISUS (2009) = Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS; PPPM (1982) = Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais; FB 1 Ed. (1926) = Farmacopeia Brasileira 1ª Edição; FFFB (2011) = Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira; RDC 10/2010 (2010) = Resolução da Diretoria Colegiada 10/2010; Memento (2016) = Memento Fitoterápico Farmacopeia Brasileira; FFFB 1 supl. (2018) = 1º Suplemento do Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira; FB 5 (2010) = Farmacopeia Brasileira 5ª Edição; RDC 26/2014 (2014) = Resolução da Diretoria Colegiada 26/2014; FB 2 Ed. (1959) = Farmacopeia Brasileira 2ª Edição; OMS 1-4 (1999-2009) = Monografias da OMS; FB 6 Ed. (2019) Farmacopeia Brasileira 6ª Edição; FB 4 Ed. (1988) = Farmacopeia Brasileira 4ª Edição; FB 3 Ed. (1977) = Farmacopeia Brasileira 3ª Edição.

Por sua vez, nove espécies utilizadas em Oriximiná não constam em nenhum documento: **1. *Mansoa alliacea*** (Lam.) A.H.Gentry (cipó-alho); **2. *Heliotropium indicum*** L. (fedegoso); **3. *Operculina hamiltonii*** (G. Don) D. F. Austin & Staples (batatão); **4. *Endopleura uchi*** (Huber) Cuatrec. (uxi); **5. *Eleutherine bulbosa*** (Mill.) Urb. (marupazinho); **6. *Genipa americana*** L. (jenipapo); **7. *Quassia amara*** L. (quina); **8. *Bertholletia excelsa*** Kunth (castanha); **9. *Ampelozizyphus amazonicus*** Ducke (saracuramirá). As duas últimas espécies não foram identificadas na presente pesquisa, mas mencionadas por Oliveira^[65] em comunidades quilombolas em Oriximiná. Investigação desta natureza demonstra a necessidade de mais estudos etnobotânicos a respeito da flora medicinal amazônica, visando ampliar a compreensão da realidade estudada. Ao mesmo tempo, analisa-se o afastamento entre as normativas do SUS e a realidade pesquisada^[18], tendo a perspectiva de promover a regionalização da fitoterapia. A título de exemplo, a *Uncaria tomentosa* não é a etnoespécie que mais apresenta registros históricos e/ou etnobotânicos no Brasil, mas sim a *Uncaria guianensis*^[62,72]. Alguns estudos mostram a presença de ambas ou apenas da *U. tomentosa*^[14]. E no caso particular de Oriximiná, a mais importante é a *U. guianensis*, identificada nessa pesquisa e por Oliveira^[65].

Outro dado que mostra a prevalência desta espécie é a maior quantidade de registros em bancos de dados botânicos *Species Link* e *Jabot*, onde o primeiro mostra 455 registros e o segundo 79. Enquanto a *U. tomentosa* apresenta apenas 39 e 9 registros em cada uma das bases citadas anteriormente. Outro exemplo é o da *Carapa guianensis*, com registros históricos feitos por naturalista^[86] e usada até hoje^[50,52,54,73], ou seja, com longa tradição de uso, muito semelhante à *Paullinia cupana* que teve sua importância medicinal reconhecida em todas as seis edições das FBs, além dos registros realizados por Spruce^[87] e von Martius^[66], cujo perfil atribui-se o conceito de "validação social"^[88]. Diante destes dados, observa-se que ambas apresentam um perfil semelhante, mas pode se dizer que a *Carapa guianensis* tem mais utilidade como recurso medicinal para a população amazônica. Fato corroborado pela quantidade de registros no *Species Link* (764) e *Jabot* (74) para a *Carapa guianensis*, enquanto a *Paullinia cupana* apresenta 34 em cada uma das bases supracitadas. Isso significa dizer que os documentos do SUS não refletem a realidade dos estudos etnobotânicos conduzidos na Amazônia, no sentido de valorizar espécies que apresentam maior importância à população. Portanto, os dados obtidos fornecem subsídios para selecionar espécies nativas da Amazônia já reconhecidas pelos moradores de Oriximiná que, ao mesmo tempo, apresentam requisitos de tradicionalidade de uso para emprego no SUS local, contribuindo para a regionalização da fitoterapia.

Conclusão

O estudo demonstra a existência de espécies nativas de uso tradicional da Amazônia presentes em documentos governamentais. Entretanto, a maior parte delas consta em documentos que não fazem parte do arcabouço regulatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tais como RENISUS e PPPM, o que ratifica a falta de pesquisas para inclusão de tais espécies no SUS, embora sejam as mais conhecidas e utilizadas pela população, o que mostra a necessidade de pesquisas etnobotânicas alinhadas ao SUS. A exclusão das nativas é fato notório e sempre discutido no âmbito da gestão da PNPMF, no sentido de encontrar meios para incluí-las no SUS. Fato corroborado pela redução da presença delas quando se compara à FB 1ª Edição (1926) às edições posteriores, mas nota-se um aumento gradual em documentos mais recentes (RDC 10/2010, 1ª edição do FFFB e de seu suplemento), caracterizando a recuperação de informações a respeito das nativas, proporcionado pelas ações conduzidas no âmbito da

gestão da PNPMP. Entretanto, ratificamos a falta de interface entre as políticas de saúde em fitoterapia do SUS e a realidade local. De tal maneira que nove espécies nativas da Amazônia empregadas pela população de Oriximiná não constam em nenhum dos documentos analisados, salientando a importância da etnobotânica como estratégia de introdução da fitoterapia alinhada ao SUS local. E no caso específico de Oriximiná, as nativas de uso tradicional devem servir de base para elaboração de protocolos de uso na APS, considerando as diferentes realidades apresentadas pelas zonas rural e urbana^[20].

Agradecimentos

Aos técnicos da UFAM - Veridiana Scudeller, Maria Rosalba Bilby, Deisy Saraiva e Ari Hidalgo - do MPEG – Maria de Fátima Almeida, Dyana Joy Fonseca - e da UFOPA – Thaís Elias Almeida - pelo auxílio na identificação e depósito do material testemunho. Aos ACSs e moradores de Oriximiná que contribuíram com a pesquisa. O artigo aqui publicado refere-se ao Trabalho de Conclusão de Curso, em Ciências Biológicas - Campus UFOPA Oriximiná, da acadêmica Jessica Oliveira Pires e parte do projeto de doutorado de Paulo Henrique de Oliveira Léda pela PPG-BIONORTE, o qual não teve apoio financeiro de editais ou órgãos de pesquisas.

Referências

1. Camargo MTLA. **As plantas medicinais e o sagrado: a etnofarmacobotânica em uma revisão historiográfica da medicina popular no Brasil**. São Paulo: Editora Ícone. 2014. ISBN: 978-85-274-1242-1.
2. Antonio GD, Tesser CD, Moretti-Pires RO. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Rev Saúde Públ**. 2014; 48(3):541-53. ISSN 0034-8910. [\[CrossRef\]](#).
3. Gondim GMM, Monken M. O Uso do Território na Atenção Primária à Saúde. In: Mendonça MHM, Matta G, Gondim R, Giovanella L (ed.). **Atenção Primária à Saúde no Brasil: conceitos, práticas e pesquisa**. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2018. ISBN: 978-85-7541-563-4.
4. Almeida MZ, Leda PHO, Silva MQO, Pinto A, Lisboa M, Guedes ML. Species with medicinal and mystical-religious uses in São Francisco do Conde, Bahia, Brazil: a contribution to the selection of species for introduction into the local Unified Health System. **Rev Bras Farmacogn**. 2014; 24(2):171-84. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
5. Luz M. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. *Physis*: **Rev Saúde Colet**. 1997; 7(1): 13-43. ISSN 1809-4481. [\[CrossRef\]](#).
6. Brasil. Conselho Nacional de Secretários de Saúde - CONASS. **Coleção Para Entender a Gestão do SUS**. Brasília: CONASS; 2011. ISBN: 978-85-89545-63-1.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p. ISBN 978-85-334-2399-2. [\[Link\]](#).
8. Brandão MG, Cosenza GP, Graef CF, Netto Junior NL, Monte-Mór RL. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn**. 2009; 19(2a):478-87. ISSN 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).

9. Brandão MGL, Cosenza GP, Stanislau AM, Fernandes GW. Influence of Brazilian herbal regulations on the use and conservation of native medicinal plants. **Environ Monit Assess**. 2009; 164:369-77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
10. Oliveira DR, Oliveira ACD, Marques LC. O estado regulatório dos fitoterápicos no Brasil: um paralelo entre a legislação e o mercado farmacêutico (1995–2015). **Rev Visa Deb** 2016; 4(4):139-48. ISSN 2317-269x. [[CrossRef](#)].
11. Morosini MV, Fonseca AF. Configurações do Trabalho dos Agentes Comunitários na Atenção Primária à Saúde: entre normas e práticas. In: Mendonça MHM, Matta G, Gondim R, Giovanella L (Ed.). **Atenção Primária à Saúde: conceitos, práticas e pesquisa**. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2018; ISBN: 978-85-7541-563-4.
12. Brasil. Ministério da Integração Nacional. Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia-SUDAM. Diretoria de Planejamento e Articulação de Políticas. Coordenação - Geral de Elaboração e Avaliação dos Planos de Desenvolvimento- CGEAP. **Plano Regional de Desenvolvimento da Amazônia (PRDA): 2016-2019**. Belém: SUDAM; 2016. 151p. [[Link](#)].
13. Shanley P, Rosa NA. Conhecimento em Erosão: Um Inventário Etnobotânico na Fronteira de Exploração da Amazônia Oriental. **Bol Mus Paraen Emílio Goeldi**. Série Ciências Naturais. 2005; 1(1): 147-71. [[Link](#)].
14. Léda PHO. Etnobotânica Aplicada às Plantas Medicinais como Subsídio para a Introdução de Espécies Nativas do Bioma Amazônia no Sistema Único de Saúde de Oriximiná – Pará, Brasil. Tese de Doutorado [Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – PGBIO]. Universidade Federal do Pará. Belém: **Mus Paraen Emílio Goeldi**. 2019. [[Link](#)].
15. Pinto LN, Flor ASSO, Barbosa WLR. Fitoterapia popular na Amazônia Paraense: uma abordagem no município de Igarapé-Miri, estado do Pará nos anos de 2000 e 2008. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. 2015; 35(2):305-11. ISSN 1808-4532. [[Link](#)].
16. Ferreira LLC, Matos JL, Oliveira DR, Behrens M. Incentivo governamental para Arranjos Produtivos Locais de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no âmbito do SUS. **Rev Fitos**, 2017; 11(Supl. 1): 54-61. [[CrossRef](#)].
17. Rodrigues AG, Pereira AM, Simoni CD, Trajano MA, Santos MG, Morais P. **Relatório de gestão 2006/2010 - Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. 2011; [[Link](#)].
18. Ribeiro LHL. Análise dos Programas de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a Perspectiva Territorial. **Ciênc Saúde Coletiva**. 2017; 24(5): 1733-1742. ISSN 1678-4561. [[CrossRef](#)].
19. Brasil. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. @cidades. [online] 2017. [[Link](#)].
20. Léda PHO, Souza MD, Nunes SRB, Scher IS, Pires JO, Araújo JS. Agentes Comunitários de Saúde e plantas medicinais: etnobotânica na análise de remédios caseiros para introdução na atenção básica em Oriximiná – Pará, Brasil. In: Ferla AA, Schweickardt KHSC, Schweickardt JC, Gai DN (Ed.). **Atenção básica e formação profissional em saúde: inovações na Amazônia**. Porto Alegre: Rede Unida; 2019. ISBN: 978-85-54329-17-4. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
21. Backes DS, Colomé JS, Erdmann RH, Lunardi VL. Grupo focal como técnica de coleta e análise de dados em pesquisas qualitativas. **Mundo Saúde**. 2011; 35(4): 438. [[Link](#)].
22. Léda PHO, Oliveira DR, Coelho-Ferreira MR. **Etnobotânica Aplicada ao Sistema Único de Saúde (SUS) como Método de Seleção de Espécies Nativas de Uso Tradicional do Bioma Amazônia: O Caso de Oriximiná-Pará, Brasil**. In: Neto C, Andrade E, Ruivo MdL, editors. **Avanços nos Estudos da**

Biodiversidade e Biotecnologia na Amazônia. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, Universidade Federal do Pará, Mus Paraen Emílio Goeldi. 2020. No prelo.

23. Albuquerque UP, Lucena RFP, Alencar NL. Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. In: Albuquerque UP, Lucena RFP (eds.). **Métodos e técnicas para coleta de dados etnobiológicos**. Recife: NUPEEA/Livro Rápido. 2010; p. 39-64. ISBN 978-85-63756-01-5

24. Chase MW, Christenhusz M, Fay M, Byng J, Judd WS, Soltis D. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Bot J Linn Soc**. 2016; 181(1):1-20. ISSN 1095-8339. [\[CrossRef\]](#).

25. Brasil. Flora do Brasil 2020 em construção. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro-IPJBRJ. Rio de Janeiro. 2017. [\[Link\]](#).

26. WHO. **Relatório da Conferência internacional sobre Cuidados Primários de Saúde**. Brasil: UNICEF. 1979; ISSN 1020-3311.

27. Brasil. Departamento Nacional de Saúde Pública. Farmacopeia Brasileira. **Decreto nº 17.509**, de 4 de novembro de 1926. Adota, como código pharmaceutico brasileiro, a Pharmacopeia Brasileira, elaborada pelo pharmaceutico Rodolpho Albino Dias da Silva. Rio de Janeiro: Brasil; 1926. [\[Link\]](#).

28. Brasil. ANVISA Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 2ª Edição. **Decreto 45.502** de 27 de fevereiro de 1959. Aprova a 2ª Edição da Farmacopeia Brasileira. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959. [\[Link\]](#).

29. Brasil. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 3ª Edição. Revista e complementada pela **Portaria Ministerial nº 383/1977**. São Paulo: Organização Andrei Editora S.A., 1977. [\[Link\]](#).

30. Brasil. ANVISA. Farmacopeia Brasileira 4ª Edição. **Portaria nº 175**, republicada em 19 de junho 1996. Parte II. São Paulo: Atheneu Editora, 1996. [\[Link\]](#).

31. Brasil. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5ª Edição, volume 2. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 49**, de 23 de novembro de 2010. Brasília: ANVISA; 2010. [\[Link\]](#).

32. Brasil. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6ª edição. Volume II – Monografias Plantas Medicinais. **RDC nº 298**, de 12 de agosto de 2019 - dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA; 2019. [\[Link\]](#).

33. Brasil. ANVISA. **RDC nº 10**, de 9 de março de 2010 - Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União nº 46, de 10 de março de 2010. [\[Link\]](#).

34. Brasil. ANVISA. **RDC Nº 26** de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília: Diário Oficial União, 14 maio 2014. [\[Link\]](#).

35. Brasil. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. [\[Link\]](#).

36. World Health Organization - WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants** - volume 1. Geneva: World Health Organization 1999. 297p. ISBN: 9241545178. [\[Link\]](#).

37. World Health Organization - WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants** - volume 2. Geneva: World Health Organization; 2002. 358p. ISBN: 9241545372. [\[Link\]](#).

38. World Health Organization - WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants** - volume 3. Geneva: World Health Organization 2007. 390p. ISBN: 9789241547024. [\[Link\]](#).

39. World Health Organization - WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants** - volume 4. Geneva: World Health Organization, 2009. 456p. ISBN: 9789241547055. [\[Link\]](#).
40. Santos MG, Carvalho ACB. Plantas medicinais: saberes tradicionais e o sistema de saúde. In: Santos MG, Quinteiro M, editors. **Saberes tradicionais e locais: reflexões etnobiológicas**. Rio de Janeiro: Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2018. ISBN: 978-85-7511-485-8.
41. Brasil. ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA; 2011. 126p. [\[Link\]](#).
42. Brasil. ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira** - Primeiro Suplemento. Brasília: 2018. 160p. [\[Link\]](#).
43. Brasil. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA; 2016. 115p. [\[Link\]](#).
44. Brasil. ANVISA. **Instrução Normativa nº 4**, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Brasília: ANVISA; 2014. 128p. [\[Link\]](#).
45. Rosa LS, Silveira EL, Santos MM, Modesto RS, Perote JRS, Vieira TA. Os Quintais agroflorestais em áreas de agricultores familiares no município de Bragança-PA: composição florística, uso de espécies e divisão de trabalho familiar. Resumos do V Congresso Brasileiro de Agroecologia Guarapari, ES. **Rev Bras Agro**. 2007; 2(2):337-341. ISSN 1980-9735. [\[Link\]](#).
46. Coelho-Ferreira M. Medicinal Knowledge and Plant Utilization in an Amazonian Coastal Community of Marudá, Pará State (Brazil). **J Ethnopharmacol**. 2009; 126(1):159-75. ISSN 0378-8741. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
47. Martins WMO, Martins LMO, Paiva FS, Martins WJO, Júnior SFL. Agrobiodiversidade nos Quintais e Roçados Ribeirinhos na Comunidade Boca do Mõa – Acre. **Biotemas**. UFSC. 2012; 25(3): 111-20. ISSN 2175-7925. [\[CrossRef\]](#).
48. Siviero A, Delunardo TA, Haverroth M, Oliveira LC, Mendonça AMS. Plantas Medicinais em Quintais Urbanos de Rio Branco, Acre. **Rev Bras Pl Med**. 2012; 14(4): 598-610. ISSN 1516-0572. [\[CrossRef\]](#).
49. Bieski IGC, Leonti M, Arnason JT, Ferrier J, Rapinski M, Violante IMP. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Jurueña Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **J Ethnopharmacol**. 2015; 173: 383-423. ISSN 0378-8741. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
50. Carneiro DB, Menezes MPM, Barboza MSL. Plantas nativas úteis na Vila dos Pescadores da Reserva Extrativista Marinha Caeté - Taperaçu, Pará, Brasil. **Acta Bot Bras**. 2010; 24(4): 1027-33. ISSN 0102-3306. [\[CrossRef\]](#).
51. Cavalheiro L, Guarim-Neto G. Ethnobotany and regional knowledge: combining popular knowledge with the biotechnological potential of plants in the Aldeia Velha community, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brazil. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat**. 2018; 17(2): 197-216. [\[Link\]](#).
52. Monteiro MVB, Bevilaqua CML, Palha MDC, Braga RR, Schwanke K, Rodrigues ST. Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. **Acta Amaz**. 2011; 41: 233-42. ISSN 0044-5967. [\[CrossRef\]](#).
53. Pereira ZV, Mussury RM, Almeida AB, Sangalli A. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul state. **Acta Sci Biol Sci**. 2009; 31(3): 293-9. ISSN 1807-863x. [\[CrossRef\]](#).
54. Ritter RA, Monteiro MVB, Monteiro FOB, Rodrigues ST, Soares ML, Silva JCR. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares island, Pará state, eastern Amazon, Brazil. **J Ethnopharmacol**. 2012; 144(2): 346-52. ISSN 0378-8741. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).

55. Santos MRA, Lima MR, Oliveira CLLG. Medicinal plants used in Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Rev Bras Plantas Med.** 2014; 16: 707-20. ISSN 1516-0572. [[CrossRef](#)].
56. Vásquez SPF, Mendonça M, Noda SN. Etnobotânica de Plantas Medicinais em Comunidades Ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.** 2014; 44(4):457-72. ISSN 0044-5967. [[CrossRef](#)].
57. Amorozo MCM, Gély A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas Barcarena, PA, Brasil. **Mus Paraen Emílio Goeldi.** 1988; 4(1):47-131. [[Link](#)].
58. Ribeiro RV, Bieski IGC, Balogun SO, Martins DTO. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **J Ethnopharmacol.** 2017; 205:69-102. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
59. Costa IBC, Bonfim FPG, Pasa MC, Montero DAV. Ethnobotanical survey of medicinal flora in the rural community Rio dos Couros, state of Mato Grosso, Brazil. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.** 2017; 16(1). ISSN 0717-7917. [[Link](#)].
60. Palheta IC, Tavares-Martins ACC, Lucas FCA, Jardim MAG. Ethnobotanical study of medicinal plants in urban home gardens in the city of Abaetetuba, Pará state, Brazil. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.** 2017; 16(3): 206-62. ISSN 0717-7917. [[Link](#)].
61. Pedrollo CT, Kinupp VF, Shepard G, Heinrich M. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **J Ethnopharmacol.** 2016; 186: 111-24. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
62. Vieira LS, Sousa RS, Lemos JR. Plantas medicinais conhecidas por especialistas locais de uma comunidade rural maranhense. **Rev Bras Plantas Med.** 2015; 17(4) Supl. 3: 1061-8. ISSN 1983-084X. [[CrossRef](#)].
63. Santos J, Pagani E, Ramos J, Rodrigues E. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **J Ethnopharmacol.** 2012; 142: 503–15. [[CrossRef](#)].
64. Branch LC, Silva MF. Folk medicine of Alter do Chão, Pará, Brasil. **Acta Amaz.** 1983; 13(5-6): 737-97. ISSN 1809-4392. [[CrossRef](#)].
65. Oliveira DR. **Bioprospecção de Espécies Vegetais do Conhecimento Tradicional Associado ao Patrimônio Genético em Comunidades Quilombolas de Oriximiná-PA.** 303p. 2009. Tese de Doutorado. Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.
66. Breitbach UB, Niehues M, Lopes NP, Faria JE, Brandão MG. Amazonian Brazilian medicinal plants described by CFP von Martius in the 19th century. **J Ethnopharmacol.** 2013; 147(1): 180-9. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
67. Amorozo MCM. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT. Brasil. **Acta Bot Bras.** 2002; 16: 189-203. ISSN 1677-941X. [[CrossRef](#)].
68. Stasi LCD, Hiruma-Lima CA, Guimarães E, Santos CM. Medicinal Plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia.** 1994; 65(6): 529-40. ISSN 0367326X.
69. Carniello MA, Silva RS, Cruz MAB, Guarim-Neto G. Quintais urbanos de Mirassol D'Oeste-MT, Brasil: uma abordagem etnobotânica. **Acta Amaz.** 2010; 40: 451-70. ISSN 0044-5967. [[CrossRef](#)].
70. Santos MRA, Lima MR, Ferreira MGR. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Hortic Bras.** 2008; 26: 244-50. ISSN 1806-9991. [[CrossRef](#)].

71. Leão RBA, Coelho-Ferreira MR, Jardim MAG. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Rev Bras Farm**. 2007; 88(1): 21-5. [\[Link\]](#).
72. Roman ALC, Santos JUM. A Importância das Plantas Medicinais para a Comunidade Pesqueira de Algodual. **Mus Paraen Emílio Goeldi**. 2006; 1(1): 69-80. ISSN 1981-8114. [\[Link\]](#).
73. Rodrigues E. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. **Phytother Res**. 2006; 20(5):378-91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
74. Arumugam G, Swamy M, Sinniah U. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. **Molecules**. 2016; 21(4): 369. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
75. Pattewar SV. *Kalanchoe pinnata*: phytochemical and pharmacological profile. **Int J Pharm Sci Res**. 2012; 3(4): 993. [\[CrossRef\]](#).
76. Alencar NL, Medeiros P, Medeiros MFT. Medicinal plants prescribed in the hospital of the São Bento Monastery between 1823 and 1824 in Olinda–Northeastern Brazil. **The Open Complem Med J**. 2010; 2: 74-9. ISSN 1876-391X. [\[CrossRef\]](#).
77. Negrelle R, Gomes E. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Rev Bras PI Med**. 2007; 9(1): 80-92. [\[Link\]](#).
78. Asgarpanah J, Khoshkam R. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. **J Med PI Res**. 2012; 6(23): 3942-9. [\[CrossRef\]](#).
79. Hurrell JA. *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Springer. 2018; 5: 197-209. ISSN 978-94-024-15506.
80. Dean W. A botânica e a política imperial: a introdução e a domesticação de plantas no Brasil. **Rev Est Hist**. 1991; 4(8): 216-28. [\[Link\]](#).
81. Rice LJ, Brits GJ, Potgieter CJ, Van Staden J. *Plectranthus*: A plant for the future? **S Afr J Bot**. 2011; 77(4):947-59. ISSN 0254-6299. [\[CrossRef\]](#).
82. Pandey A, Pradheep K, Sharma N. Potential introduced medicinal plant African bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Delile) in India: botany, propagation and uses. **Med Plants - Inter J Phytomed Rel Ind**. 2014; 6(4): 1-5. ISSN 0975-6892. [\[CrossRef\]](#).
83. Castellucci S, Lima MI, Nordi N, Marques JG. Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na Estação Ecológica de Jataí, município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica. **Rev Bras PI Med**. 2000; 3(1): 51-60. [\[Link\]](#).
84. Pinto EPP, Amorozo MCM, Furlan A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica-Itacaré, BA, Brasil. **Acta Bot Bras**. 2006; 20(4): 751-62. ISSN 1677-941X. [\[CrossRef\]](#).
85. Brandão MGL, Cosenza GP, Pereira FL, Vasconcelos AS, Fagg CW. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environ Monit Assess**. 2013; 185(8): 7013-23. [\[CrossRef\]](#).
86. Oliveira HV. **Systema de Materia Medica Vegetal Brasileira Contendo o Catalogo e Classificação de todas as plantas brasileira conhecidas**. Rio de Janeiro: Eduardo & Henrique Laemmert; 1854.
87. Santos-Fonseca DJ, Coelho-Ferreira M, Fonseca-Kruel VS. Useful plants referenced by the naturalist Richard Spruce in the 19th century in the state of Pará, Brazil. **Acta Bot Bras**. 2019; 33(2): 221-231. ISSN 1677-941X. [\[CrossRef\]](#).

88. Crellin JK. 'Traditional use' claims for herbs: the need for competent historical research. **Pharm Hist.** 2008; 38(3): 34-40. [[PubMed](#)].

Histórico do artigo | **Submissão:** 01/04/2020 | **Aceite:** 06/07/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Pires JO, Léda PHO, Oliveira DR, Coelho-Ferreira MR et al. Etnobotânica aplicada à seleção de espécies nativas amazônicas como subsídio à regionalização da fitoterapia no SUS, município de Oriximiná – PA, Brasil. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 492-512. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/947>>. 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.



Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade

Nanoemulsions formulated for topical use: a study of synthesis and toxicity

DOI 10.17648/2446-4775.2020.1060

Porto, Alice Sperandio^{1,4*}; Almeida, Igor Vivian de²; Vicentini, Verônica Elisa Pimenta³.

¹Universidade de Brasília (UNB), Instituto de Ciências Biológicas, *campus* Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, CEP 70910-900 Brasília, DF, Brasil.

²Universidade Federal Rural da Amazônia, Congregação, *campus* Capitão Poço. Estrada Pau Amarelo, s/n, Vila Nova, CEP 68650-000, Capitão Poço, PA, Brasil.

³Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, CCB-DBC-Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental-LMMA (H67-11). Avenida Colombo, 5790, CEP 87020-900, Jardim Universitário, Maringá, PR, Brasil.

⁴Instituto Federal de Rondônia (IFRO), Rua Rio Amazonas 151, Jardim dos Imigrantes, CEP 78960-000 Ji-Paraná, RO, Brasil.

*Correspondência: alicesporto@hotmail.com.

Resumo

A Nanotecnologia tem se destacado significativamente em diversas áreas da ciência, em especial, na área farmacêutica. Os nanocarreadores de fármacos apresentam uma alternativa segura e eficaz, apresentando propriedades importantes do ponto de vista farmacoterápico. Sob esse aspecto, destacam-se as nanoemulsões como veículo de fármacos já consagrados. Trata-se de sistemas constituídos por glóbulos bastante reduzidos, em escala manométrica, que podem veicular princípio ativo sendo ainda adequados à distribuição de substâncias ativas na pele, permitindo maior absorção. Dentro deste contexto, o presente estudo de revisão descreve metodologias de síntese de nanoemulsões utilizando para composição da fórmula, extratos e óleos vegetais, medicamentos alopáticos convencionais e nanopartículas metálicas.

Palavras-chave: Alopático. Nanobiotecnologia. Nanopartícula. Óleo vegetal.

Abstract

Nanotechnology has stood out significantly in several areas of science, especially in the pharmaceutical field. Drug nanocarriers are considered a safe and effective alternative because they possess essential properties from the pharmacotherapeutic perspective. In this regard, nanoemulsions stand out as a vehicle for already established drugs. These are systems made up of tiny globules on a nanometric scale, which can transport the active ingredient and are still suitable for the distribution on the skin, allowing more excellent absorption. In this sense, the present review describes methodologies for the synthesis of nanoemulsions using vegetable extracts and oils, conventional allopathic medicines, and metallic nanoparticles for the composition of the formula.

Keywords: Allopathic. Nanobiotechnology. Nanoparticle. Vegetable oil.

Introdução

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar que utiliza valores de nanoestruturas com dimensão entre 1 a 100 nanômetros (nm), focalizando em materiais de tamanho atômico, molecular e supramolecular, apontando o controle e manipulação desses novos materiais em escala celular ou menor, que não seria possível através da tecnologia convencional^[1,2]. Os nanoprodutos ou nanomateriais desenvolvidos apresentam vantagens quanto à possibilidade de obtenção da estabilidade cinética, características organolépticas favoráveis, maior poder de penetração e/ou absorção, maior biodisponibilidade, incremento da solubilidade em água para substâncias pouco solúveis e a liberação controlada de fármacos^[3,4].

Com a busca de sistemas terapêuticos mais eficazes, que garantam a baixa toxicidade, reduzam os efeitos adversos e diminuam as doses, a nanotecnologia é uma alternativa para a inovação dos medicamentos, principalmente, quando se refere a liberação controlada do fármaco. Entre as vantagens que os nanossistemas podem oferecer destaca-se a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, mantendo seus níveis plasmáticos em concentrações constantes^[5].

A síntese de nanofármacos envolve técnicas de fabricação e aplicação das nanoestruturas que possuem formas e tamanhos controlados^[6]. As nanoemulsões (NEs), por exemplo, são muito utilizadas como veículos nas indústrias cosmética, farmacêutica e de alimentos. Estas apresentam vantagens como a veiculação de ativos tanto hidrofílicos como lipofílicos na mesma formulação, além de possibilitarem o controle de aspectos sensoriais adaptados às necessidades da via de administração para as quais se destinam^[7].

As NEs são sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis, cujas gotículas encontram-se com tamanho médio inferior a 200 nm^[8,9], sendo necessário para a estabilização da fase aquosa (água) e fase oleosa (óleo essencial), o uso de tensoativo (ou surfactantes), para a obtenção de amostras homogêneas e estáveis. Esses sistemas em escala nanométrica podem ser considerados uma derivação das Emulsões, Microemulsões ou Macroemulsões, tradicionalmente desenvolvidas pela área farmacêutica (**FIGURA 1**). Quando se trata de NEs, os tamanhos das gotículas incorporadas ao sistema possuem dimensão em torno de 20 a 50 nm^[9,10]. As NEs são obtidas, aplicando-se altas intensidades de agitação para dispersar uma fase líquida ou aquosa, fundida em um dispersante quente a uma fase oleosa constituída, geralmente, por óleo essencial, adicionando tensoativo, e com resfriamento subsequente para obter o núcleo sólido^[11].

FIGURA 1: Comparação entre uma nanoemulsão (esquerda) e uma macroemulsão (direita) com diâmetros das gotículas de 35 nm e 1 µm, respectivamente^[12].



Os sistemas de NEs podem ter como componentes incorporados às formulações, além de tensoativos e a fase aquosa (geralmente água destilada, pura ou Milli-Q), os óleos essenciais (OEs), extratos alcoólicos de vegetais, óleos vegetais (copaíba, andiroba, por exemplo), nanopartículas metálicas, fármacos convencionais, entre outros. Os OEs são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 2 de 2007^[13], como produtos voláteis de origem vegetal obtido por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação à pressão reduzida ou outro método adequado), sendo flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para a produção de óleos essenciais^[7].

Sendo assim, o objetivo desta revisão é abordar os métodos de obtenção de nanoemulsões, evidenciando os reagentes utilizados nas formulações, além de abordar os aspectos toxicológicos dos materiais nanoestruturados para fins terapêuticos.

Material e Métodos

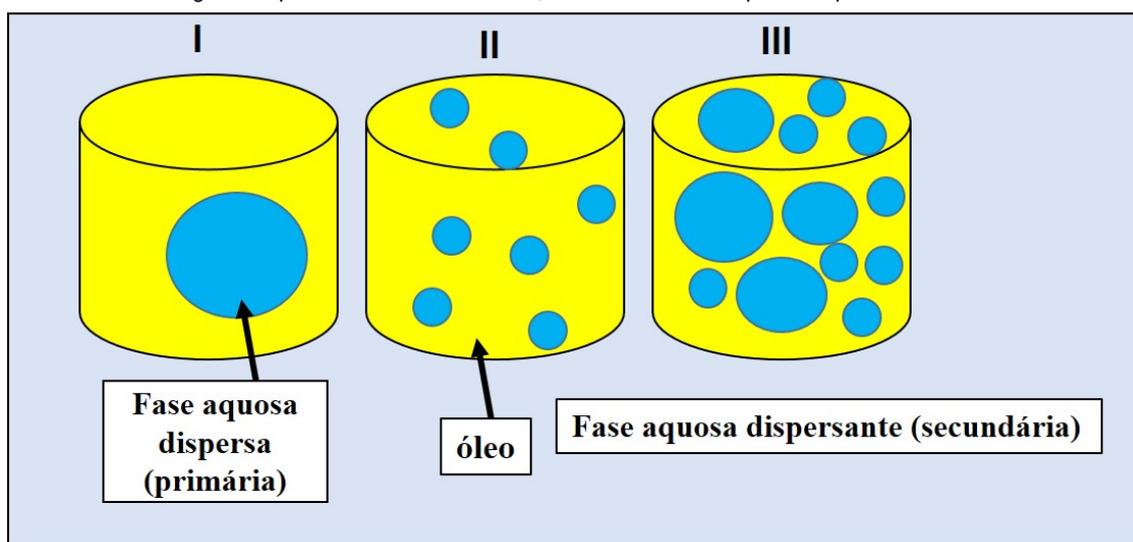
Existem na literatura, diversos estudos sobre a síntese de NEs e as mais variadas técnicas utilizadas para sua obtenção, principalmente associadas a óleos vegetais com atividades terapêuticas. O presente estudo é caracterizado como uma revisão de literatura descritiva e comparativa, analisando produções científicas indexadas nas seguintes bases eletrônicas de dados: LILACS, MEDLINE e SCIELO, que enfocam a síntese e caracterização de NEs associadas ou não a medicamentos alopáticos convencionais.

A revisão ressalta a preferência de metodologia utilizada pelos pesquisadores para desenvolverem a referida forma nanofarmacêutica e quais as principais técnicas de caracterização do nanoproduto. O recorte temporal abrangeu um período compreendido entre os anos de 2000 a 2019. Outras fontes que abordam o tema, como artigos e resumos, serviram de suporte para a compreensão de conceitos na área nanofarmacêutica.

Após o levantamento dos estudos disponíveis em meio eletrônico, foram analisados outros critérios importantes à serem destacados como: os principais tipos de tensoativos utilizados, qual a técnica de síntese mais adequada para diferentes vias de administração do nanofármaco (oral, endovenosa ou tópica) e tipo de fármaco empregado na fórmula (óleo vegetal, extrato de plantas ou fármaco convencional).

Resultados e Discussão

As emulsões podem ser classificadas em óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) e sistemas múltiplos (A/O/A ou O/A/O) (**FIGURA 2**). Quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas em fase contínua oleosa, denomina-se A/O, porém, quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas na fase aquosa, denomina-se O/A^[14]. As emulsões múltiplas são sistemas onde os dois tipos de emulsões existem simultaneamente, podendo assim ser do tipo A/O/A ou O/A/O, no qual a fase dispersa contém pequenas gotas de outra fase dispersa em seu interior, e esta segunda fase dispersa está fisicamente separada por uma fase dispersa de composição distinta^[15].

FIGURA 2: Morfologia dos tipos de nanoemulsões: A/O, O/A e sistemas múltiplos. Adaptado^[16,15,11].

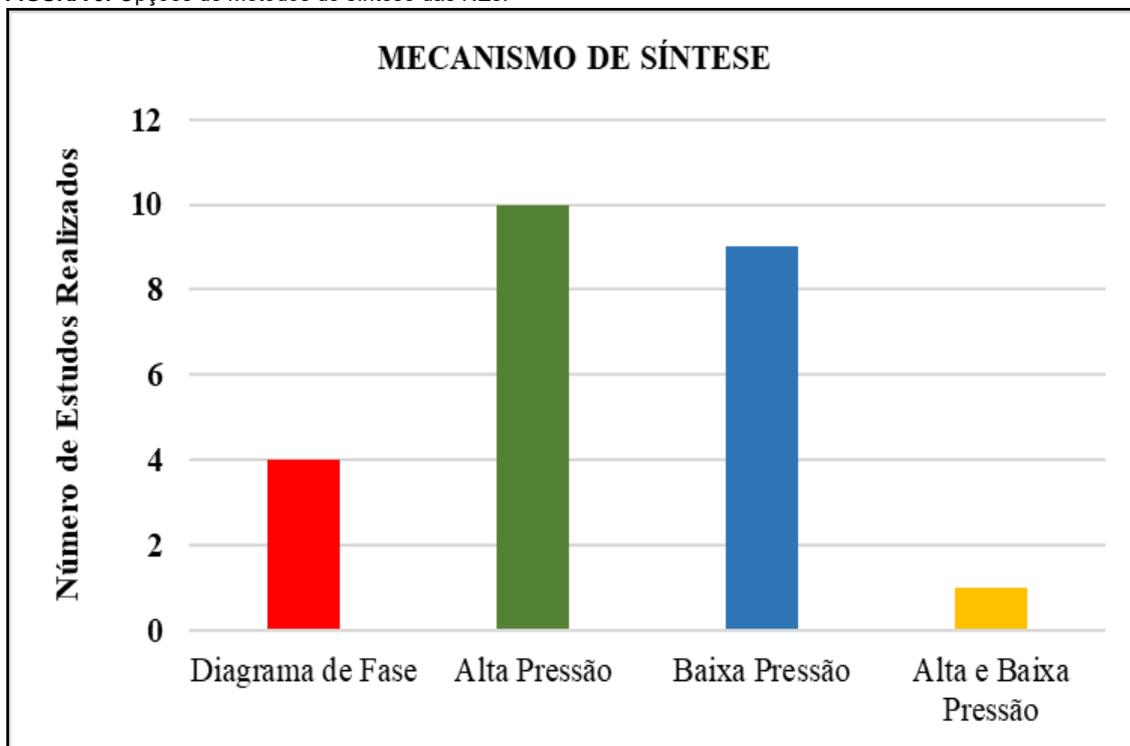
As emulsões, em especial as NEs, por serem constituídas de fase aquosa e fase oleosa, não se misturam espontaneamente, necessitando de um agente emulsionante, o tensoativo ou surfactante. Estão disponíveis diversos tipos de tensoativos como: Tween 20, Tween 60, Tween 80, Span 20, Span 60, Span 80, Triton-X, Éter laurílico etoxilado, Policaprolactona, Propilenoglicol, entre outros. Para a obtenção das NEs, são normalmente utilizadas o fármaco de interesse associado a formulação na forma de extrato vegetal, óleo essencial como: *Melaleuca alternifolia*, *Cymbopogon martinii*^[17]; óleo de semente de algodão^[18], *Syagrus romanzoffiana*^[19], *Prunus amygdalus*, *Bertholletia excelsa*^[20], óleo de girasol^[21], óleo essencial de laranja^[22], *Lippia sidoides*^[23], *Euterpe oleracea* e Cetoconazol^[10], óleo de *Copaifera* sp.^[11], óleo de azeite refinado^[24], *Philodendron fragrantissimum*^[25], *Gingko biloba* e própolis verde^[26], *Lippia gracilis*^[27], *Aleurites moluccanus* L.^[28], *Rosmarinus officinalis* ^[7], *Pinus taeda* L.^[29], óleo de laranja ^[30].

Outros estudos associam a Fase Aquosa e Fase Oleosa a fármacos alopáticos convencionais como nucleosídeos, antifúngicos e até mesmo, analgésicos e anti-inflamatórios. As NEs obtidas através da associação de óleo de germen e aciclovir apresentaram características físicas aceitáveis^[31]. A combinação dos fármacos miltefosina e fluconazol foi alcançada, pois através da adição do manitol, houve diminuição da afinidade do fluconazol impedindo sua migração para fase aquosa, obtendo formulações estáveis quando avaliadas as características organolépticas e físico-químicas^[2]. O desenvolvimento de NEs associando Anfotericina B e Itraconazol à base de óleo de oliva e de peixe, demonstraram atividade antifúngica contra os agentes da cromblastomicose *in vivo*, sendo menos nefrotóxica que a formulação convencional^[31], enquanto NEs associadas apenas a Anfotericina B foram eficazes em ensaios para avaliar a eficácia sobre formas amastigotas Leishmanicidas^[32]. Para Marques et al.^[33], foi possível o desenvolvimento de formulações de um sistema viável de NEs associada a Ibuprofeno preparadas pelo método da inversão de fases.

As emulsões múltiplas podem ser obtidas pelo método da etapa única baseando-se no conceito de que essas emulsões consistem em mesofase (sistema intermediário) entre simples sistemas A/O e O/A e podem ser formadas durante o processo de inversão de fases, sobretudo quando o tensoativo não-iônico é empregado na formulação^[34,15].

Com relação aos métodos de obtenção de NEs, que consistem basicamente na emulsificação das duas fases (aquosa e oleosa) estabilizada por um tensoativo com a aplicação de alta ou baixa de energia para realizar o processo. Dos mecanismos mais utilizados, destacam-se os de baixa pressão (**FIGURA 3**).

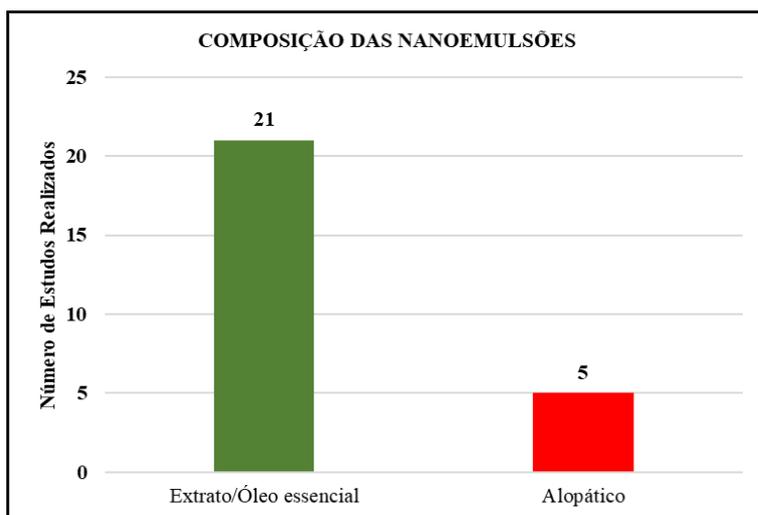
FIGURA 3: Opções de métodos de síntese das NEs.



Os métodos de emulsificação por baixa energia fazem uso de propriedades físico-químicas do sistema e utilizam a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de gotículas de tamanho reduzido, são eles: Inversão de Fases pela temperatura e Inversão de Fases pela alteração da fração volumétrica^[28].

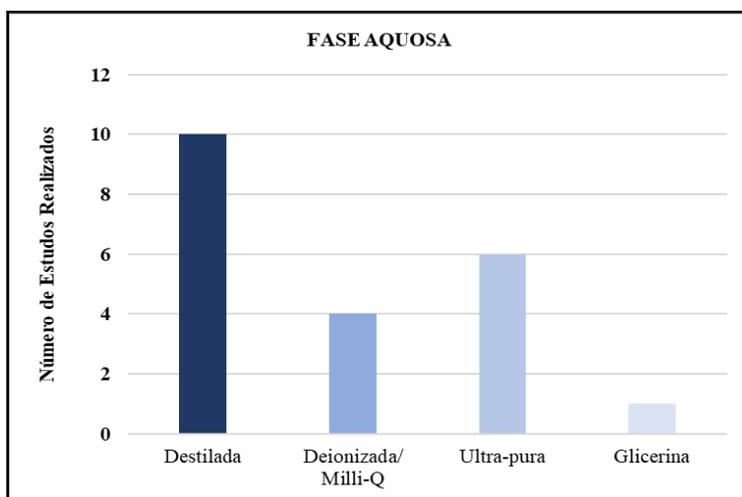
Uma grande vantagem do método de alta energia é, portanto, o fato de que muito menos surfactantes (ou tensoativos) é necessário para formar uma NE. Sendo assim, esse método possibilita benefícios econômicos e práticos, entre eles, menor custo com ingredientes; sabores desagradáveis reduzidos (associados a surfactantes); e menos problemas com a formação de espumas^[35].

Muitos têm sido os estudos de liberação controlada de fármacos em escala nanométrica, sendo destacada a síntese de microemulsões e nanoemulsões, com grande número de estudos evidenciando uma nova alternativa farmacêutica. Como os sistemas de emulsões são divididos em duas fases, aquosa e oleosa, estas últimas são escolhidas, normalmente, extratos de plantas ou óleos essenciais para testes do fármaco de interesse e associações com fármacos alopáticos convencionais (**FIGURA 4**), a exemplos de estudos realizados utilizando Fluconazol, Aciclovir realizados^[2,31], que obtiveram NEs combinadas a estes fármacos com características físicas aceitáveis.

FIGURA 4: composição da fase oleosa das NEs.

As fases oleosa e aquosa também são denominadas fases lipofílica e hidrofílica, respectivamente. A fase oleosa influencia as microemulsões em dois aspectos: forma e tamanho das partículas e permeabilidade através da pele^[24]. Em se tratando das nanoemulsões, normalmente é selecionada com base na solubilidade do fármaco a ser veiculado, na sua estabilidade, bem como na estabilidade da formulação desenvolvida^[36].

Na fase aquosa, rotineiramente são utilizadas águas Milli-Q, destilada, pura / ultra-pura e glicerina (**FIGURA 5**). A quantidade de água a utilizar é muito importante, pois influencia a estrutura interna das MEs^[37].

FIGURA 5: Composição da Fase Aquosa das NEs.

Composição e Técnicas de obtenção de NES

As NEs são citadas na literatura com diferentes nomenclaturas, sendo também conhecidas como miniemulsões, microemulsões instáveis, submicroemulsões, entre outros^[38]. Trata-se de uma derivação das emulsões, que consistem em misturas heterogêneas com pelo menos um líquido imiscível disperso em outro, na forma de gotículas com diâmetros geralmente maiores que 100 nm^[39]. No entanto, para NEs, essa definição está relacionada em função do tamanho e com o aspecto transparente ou translúcido quando apresentam tamanhos inferiores a 200 nm e um aspecto leitoso quando têm tamanhos variando entre 200

e 500 nm^[38]. Para Bedin^[40], as NEs podem ser classicamente definidas como uma dispersão nanométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo adequado, cujo tamanho das partículas (gotículas) pode variar de 100 a 500 nm.

Para que ocorra a formação de um sistema nanoemulsionado, é necessário que duas condições sejam mantidas: a agitação constante, para que ocorra a dispersão de um líquido no outro; e a presença de pelo menos um agente emulsificante, para estabilizar o sistema^[41,42,11]. Dessa forma, é possível assegurar uma interação entre o óleo e a água, reduzindo a tensão interfacial do sistema, impedindo assim que a coalescência das gotas ocorra^[43,44]. Para que ocorra a obtenção de NEs é necessário fornecer energia, visto que elas não se formam espontaneamente, e esta energia pode ser fornecida por um dispositivo mecânico como homogeneizadores de alta-pressão ou ultrassom, que são capazes de realizar uma taxa de cisalhamento e, conseqüentemente, a formação de gotículas^[38]. Os homogeneizadores de alta-pressão consistem basicamente de uma bomba de deslocamento positivo a qual injeta o líquido a ser homogeneizado sob pressão elevada em uma válvula homogeneizadora^[14,45]. Já no ultrassom, o fluido é conduzido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória onde sofre impacto, ocorrendo a formação das gotículas de tamanho reduzido devido a vibração da lâmina que produz ondas ultrassônicas capazes de exercer o efeito de corte^[14].

A adição de agentes tensoativos tem a capacidade de diminuir a tensão interfacial do sistema e de formar um filme interfacial com propriedades esféricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna^[15]. Os tensoativos são substâncias que, quando presentes em um sistema, têm a capacidade de adsorver na superfície (interface em que uma fase é gasosa) ou na interface (fronteira entre duas fases imiscíveis) e alterar sua energia livre^[46,27]. A estabilidade coloidal inerente das NEs deve-se ao processo de obtenção das mesmas, que lhe atribui estabilização estérica quando se faz uso de tensoativos não iônicos e/ou polímeros^[10]. Em alguns casos, a utilização de um co-tensoativo é necessária para aumentar a estabilidade do sistema. Com essa adição de co-tensoativo, pode ocorrer um aumento na estabilidade e na região de ocorrência de microemulsão^[47,27].

Os tensoativos possuem uma natureza anfílica, ou seja, possuem uma região hidrofóbica, que possui afinidade por solventes apolares e uma região hidrofílica, que tem afinidade por solventes polares, sendo que a região hidrofóbica pode ser formada por cadeias hidrocarbônicas saturadas ou insaturadas, ou, em poucos casos, anéis aromáticos. A outra região, que é a hidrofílica, pode ser aniônica, catiônica, anfótera e não-iônica^[48,27]. Portanto, os tensoativos são classificados em iônicos, não-iônicos e anfóteros. Nesse sentido, os sistemas nanoemulsionados são compostos de fase aquosa, fase oleosa, tensoativo (ou surfactante) e, quando necessário, o co-tensoativo^[24]. O co-tensoativo tem a finalidade de reduzir as tensões interfaciais em níveis mais baixos, interagir de várias formas na camada interfacial e melhorar a fluidez do filme, muito utilizado para tensoativos não-iônicos^[49,50]. Esta molécula geralmente é um álcool, apresentando um grupamento polar a apolar^[50]. Além disso, associações com nanopartículas metálicas também são comuns^[11].

É necessária a escolha do tensoativo adequado ao tipo de forma farmacêutica que se pretende utilizar. Estes componentes estão disponíveis em grande número, mas o seu uso na formação de Microemulsões para aplicação tópica é limitado devido à sua toxicidade, irritação potencial e mecanismo de ação^[24]. A utilização de tensoativos não-iônicos é mais frequente para a síntese de NEs. Entretanto, nanoemulsões

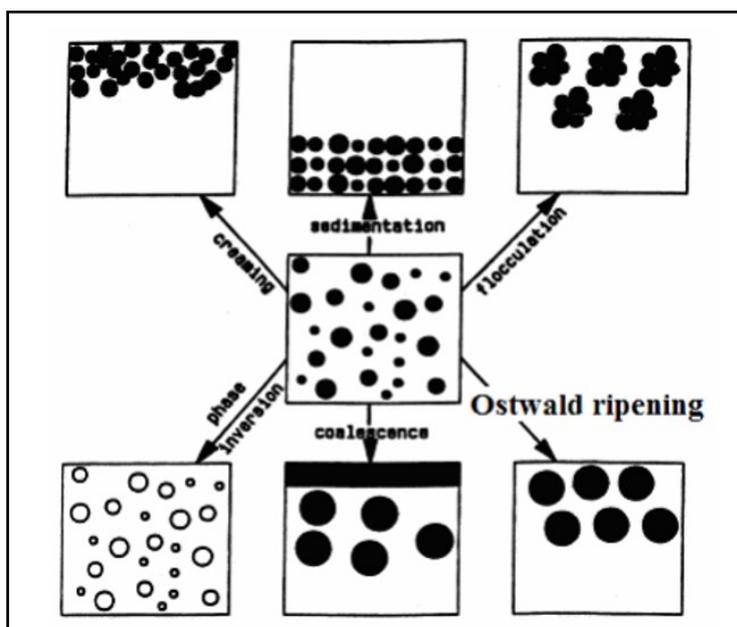
catiônicas O/A têm sido propostas como potenciais sistemas de liberação para macromoléculas como Oligonucleotídeos antisense (ON) ou Ácido desoxirribonucleico DNA^[51].

Para a uniformização do sistema nanoemulsionado, são utilizadas metodologias de alta e baixa energia^[14]. Os métodos de alta energia de emulsificação (homogeneizadores de alta pressão ou ultrassom), e métodos de baixa energia, no qual está incluído a Inversão de Fases e o método da temperatura de Inversão de Fases^[42]. Esse processo depende de vários tipos de equipamentos que permitem produzir emulsões em escala laboratorial ou industrial, sendo eles, os agitadores mecânicos, homogeneizadores, ultrasonicadores e moinhos coloidais^[39].

A intensidade de sonicação é um parâmetro com grande influência no processo, uma vez que o seu aumento diminui o tamanho das partículas. Com o aumento do tempo de sonicação, a temperatura também aumenta, o que pode ser prejudicial no caso de materiais termolábeis ou no caso de reagentes que possam evaporar, como é o caso do etanol^[24]. Durante o período de agitação inicial usada para emulsificação formam-se gotículas, e à medida que a agitação continua, a probabilidade de colisão das gotículas aumenta, também ocorre coalescência, o que pode diminuir a viscosidade de uma emulsão^[39].

De acordo com Morais^[15], as principais etapas e/ou mecanismos de processos de instabilidade observadas em emulsões podem ser: floculação, cremação, coalescência, maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*) e inversão de fases (**FIGURA 6**). Para que se evitem processos de instabilidade, é necessária a utilização correta de tensoativos que são obtidos através de cálculos matemáticos determinando o Equilíbrio-hidrófilo-lipófilo (EHL). Esse sistema irá representar o balanço do tamanho e força desses dois grupos e irá traduzir as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um composto anfílico em termos de escala numérica, os valores de EHL vão aumentando à medida que a substância se torna mais hidrofílica^[39].

FIGURA 6: Representação esquemática do processo de instabilidade de emulsões^[52].



Aspectos Toxicológicos das NES

Os estudos de toxicidade são imprescindíveis para comprovação da eficácia terapêutica dos nanofármacos, pois a combinação dos constituintes da formulação, bem como os métodos de síntese, interfere nas propriedades do produto final como estabilidade e interações do nanomedicamento. Como as NEs possuem a dimensão na escala nanométrica, são necessários cuidados quanto a interação das nano-formulações com organismos vivos. Estudos demonstram que os tamanhos das partículas podem alterar as propriedades biológicas de nanomateriais, como solubilidade, e que partículas menores possuem uma área de superfície maior, o que interfere diretamente na sua bioatividade^[53,54]. Além disso, as altas concentrações de surfactantes e co-surfactantes (ou tensoativos), em algumas formulações de NEs, podem ser tóxicas para os tecidos onde se acumulam ou são aplicadas, resultando em hemólise, dano celular e inflamação tecidual^[39].

Os óleos essenciais, bastante utilizados em nano-formulações, além de serem utilizados para estudos de atividade terapêutica, tem demonstrado atividade no controle *in vitro* de fitopatógenos^[35], sendo uma alternativa na prática Biotecnológica. Em estudos utilizando óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*) com propriedade antifúngica, anti-helmíntica, entre outras e sua nanoemulsão^[55], comprovou seu uso para atividades inseticidas e manejo de populações resistentes. Apesar do uso de plantas para fins terapêuticos ser muito difundido, as pessoas desconhecem o fato de que elas podem apresentar toxicidade, tanto para o homem, quanto para os animais: assim, é importante avaliar seu grau toxicológico, pois mesmo possuindo atividades medicinais, sendo tóxico, seu uso se tornará inviável^[56,57]. Vários desses produtos, que ocorrem naturalmente em plantas, têm mostrado propriedades quimiopreventivas contra carcinogênese utilizando modelo *in vitro* e animais^[58]. Portanto, metodologias que expõe as NEs em testes para avaliar parâmetros obtendo características de toxicidade utilizando microorganismos ou organismos vivos, oferecem resultados seguros.

Os testes que envolvem atividade antimicrobiana são bastante empregados em ensaios de toxicidade. Alguns dados na literatura reportam que as ocorrências de bactérias resistentes a antibióticos têm despertado o interesse de pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, pois o fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública^[57]. Diante disso, os produtos derivados de plantas vêm ganhando destaque como fonte alternativa de compostos antimicrobianos, como exemplo, extratos de plantas ricos em compostos fenólicos^[59, 60], taninos, esteroides e alcaloides^[61,62,57].

Ensaio para comprovação de atividade antimicrobiana foi melhorada, de uma forma geral, quando os compostos isolados óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e geraniol passaram a integrar uma nanoemulsão, mas principalmente quando as nanopartículas de prata foram acrescentadas^[63]. Além da atividade antimicrobiana, testes de genotoxicidade também são realizados como indicador secundário de toxicidade. As nanoemulsões formuladas com óleo essencial de *Eucalyptus globulus* não ocasionou redução na viabilidade celular; não desencadeou a formação de espécies reativas de nenhuma natureza; onde, também, não se constatou perfil genotóxico nessa formulação em nenhuma das concentrações^[64].

Conclusão

Com base nos resultados obtidos através da metodologia aplicada, podemos concluir que existe um grande interesse da comunidade científica em obter novas formas farmacêuticas em escala nanométrica utilizando extratos de plantas. Ainda é possível detectar a possibilidade relativamente diversa, do planejamento experimental, quanto aos métodos de síntese e caracterização das nanoemulsões a serem obtidas, bem como a sua viabilidade, pois, as amostras obtidas nos estudos apresentam características físico-químicas compatíveis com um sistema estável, característica desse tipo de nanofármaco. Faz-se importante a continuidade de estudos que apontem as propriedades toxicológicas e mutagênicas dos produtos sintetizados, já que boa parte é elaborada com o propósito de uso *in vivo*. As análises desse tipo de comportamento, utilizando os protocolos experimentais biotecnológicos, contribuirão para a validação dos nanofármacos e seu uso com segurança.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Estadual de Maringá pelo apoio e incentivo à pesquisa.

Referências

1. Contreras CAM. **Efeito da nanoemulsão lipídica associada a paclitaxel na prevenção da doença vascular do coração transplantado. Estudo experimental em coelhos.** São Paulo. 2010. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Ciências / Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular] - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP. São Paulo. 2010. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
2. Cappelaro AMS. **Desenvolvimento de nanoemulsão combinando os fármacos Leishmanicidas miltefosina e fluconazol para uso oral.** São Paulo; 2012. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Farmácia] - Universidade Bandeirante de São Paulo. [[Link](#)].
3. Irache JM, Esparza I, Gamazo C, Agueeros M, Espuelas S. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Vet Parasitol.** 2011; 180(1-2): 47-71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]. Acesso em: 15 de nov. 2019.
4. Sidônio IAP. **Avaliação do efeito letal da nanoemulsão de *Rosmarinus officinalis* L. sobre *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock (DIPTERA: TEPHRITIDAE).** Macapá; 2017. 51 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical] - Universidade Federal do Amapá, UNIFAP. Macapá. 2017. [[Link](#)].
5. Sanches AR, Stulzer HK, **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões contendo o antiviral Acyclovir.** Anais do XIX EAIC – UNICENTRO. 2010. Acesso em: 15 de nov. 2019. Disponível em: [[Link](#)].
6. Assunção LS. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas ricas em β -caroteno obtidas pela técnica de deslocamento de solvente.** Salvador. 2016. 108 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos] - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia, UFBA. 2016. [[Link](#)].
7. Zibetti FM. **Desenvolvimento de formulação nanoestruturada contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. para o tratamento tópico do herpes.** Niterói. 2016. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos da Saúde] - Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói. 2016. [[Link](#)].

8. Ostertag F, Weiss J, McClements DJ. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **J Colloid Interf Sci.** 2012; 388(1): 95-102. [[CrossRef](#)] Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 14 de nov. 2019.
9. Pey CM, Maestro A, Solé I, González C, Solans C, Gutiérrez JM. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial desing study. **Coll Surf A: Physicochem.** 2006; 288(1-3): 144-150. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em 14 de nov. 2019.
10. Contente DML. **Obtenção e caracterização de nanoemulsão óleo em água a partir de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* M.).** Belém. 2016. 92 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade Federal do Pará, UFPA. Belém. 2016. [[Link](#)].
11. Porto AS. **Desenvolvimento de nanoemulsões O/A a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de zinco.** Brasília; 2015. xiii, 100 f., il. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia] - Universidade de Brasília, UNB. Brasília. 2015. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
12. Sólans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Celma MJG. Nanoemulsions. **Curr Opin Coll Interf Sci.** 2005; 10(3-4): 102-110. [[CrossRef](#)]. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 19 de nov. 2019.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Resolução nº 2**, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas e revoga a Resolução nº. 104 de 14 de maio de 1999; Brasília.
14. Pereira GG. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões.** Ribeirão Preto; 2008. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade de São Paulo, USP. Ribeirão Preto. 2008. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
15. Morais JM, Santos ODH, Nunes JRL, Zanatta CF, Rocha-Filho PA. W/O/W multiple emulsion obtained by one-step emulsification method and evaluation of the involved variables. **J Disper Sci Technol.** 2008; 29(1): 63-69. [[CrossRef](#)]. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 15 de nov. 2019.
16. Florence AT, Whittehill D. The formulation and stability of multiple emulsions. **Inter J Pharm.** 1982; 11(4): 277-308. ISSN 0378-5173. [[CrossRef](#)]. Acesso em: 11 de nov. 2019.
17. Luiz C. **Nanoemulsões de aloe vera e óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Cymbopogon martinii* como indutores de resistência contra a mancha angular do morangueiro (*xanthomonas fragarie*).** Florianópolis. 2017. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais] - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC. Florianópolis. 2017. [[Link](#)].
18. Romeiro JG. **Avaliação da ação epigenética e da citotoxicidade de um derivado de um análogo da curcumina veiculado em nanoemulsão lipídica em linhagens tumorais.** São Paulo; 2013. 65f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Farmácia] - Universidade Bandeirante de São Paulo, UNIBAN. São Paulo. 2013. [[Link](#)].
19. Mezadri H. **Desenvolvimento de nanoemulsão contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico desses extratos.** Ouro Preto; 2010. 94 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP. Ouro Preto. 2010. [[Link](#)].
20. Rosani L. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais.** São Carlos; 2011. 85 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Química] - Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR. São Carlos; 2011. [[Link](#)].

21. Rodrigues LM. **Desenvolvimento e estudo de estabilidade preliminar de emulsões óleo/água (O/A) a base de óleos vegetais para prevenção e/ou adjuvante no tratamento de úlceras por pressão.** Brasília. 2013. 45 f. Monografia de Conclusão de Curso. [curso de Farmácia], Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia. Disponível: [\[Link\]](#). Acesso em: 23 de set. 2020.
22. Oliveira PF, Costa JA, Spinelli L, Mansur CRE. **Determinação da temperatura de inversão de fases de sistemas óleo/água/tensioativo por reometria.** Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu. 2009. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 18 de nov. 2019.
23. Frederico Pinto NO. **Desenvolvimento de nanoformulações do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.** Fortaleza. 2014. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química] - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, UFC. Fortaleza. 2014. [\[Link\]](#).
24. Preto VLMS. **Desenvolvimento de microemulsões para aplicação tópica.** Bragança; 2016. 94 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química] - Instituto Politécnico de Bragança, IBP. Bragança, Portugal. 2016.
25. Saavedra, M.G. **Avaliação da atividade larvicida da nanoemulsão do óleo essencial das raízes de *Philodendron fragrantissimum* (hook.) g.don (araceae) contra *Aedes aegypti* (linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae).** Macapá; 2018. 80 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde] - Universidade Federal do Amapá, UNIFAP. Macapá. 2018. [\[Link\]](#).
26. Souza PA. **Determinação do fator de proteção solar in vitro e avaliação da estabilidade preliminar de emulsão de água em silicone contendo extratos de *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) e própolis verde.** Juiz de Fora. 2016. Monografia de Conclusão de curso. [Graduação em Farmácia] - Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF. Juiz de Fora. 2016.
27. Nascimento VSA. **Sistemas microemulsionados contendo óleo essencial de *lippia gracilis*: obtenção, caracterização e potencial ação amebicida.** São Cristóvão; 2016. 91 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade Federal de Sergipe, UFS. São Cristóvão. SE. 2016.
28. Rocha ACF. **Desenvolvimento de nanoemulsão contendo extratos de folhas de *Aleurites moluccanus* L. Willd (Euphorbiaceae) com atividade anti-inflamatória tópica.** Itajaí; 2017. 163 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI. Itajaí. 2017. [\[Link\]](#).
29. Bertoldi FC, Marchiori NC, Furtado W, Almeida AR, Maciel MVOB, Barreto PLM. **Nanoemulsão de óleo essencial de *Acícula de Pinus taeda* L.** III Congresso óleos e gorduras. Campinas, São Paulo. 2018; p.36. Disponível em: [\[Link\]](#).
30. Kourniatis LR, Spinelli LS, Mansur CR. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. *Rev Quím Nova*. 2010; 33(2): 295-300. ISSN 0100-4042. [\[CrossRef\]](#). Acesso em: 15 de nov. 2019.
31. Daboit TC. **Nanoemulsões de anfotericina b e itraconazol: avaliação da atividade antifúngica in vitro e in vivo em agentes da Cromoblastomicose.** Porto Alegre; 2013. 225 f. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS. Porto Alegre. 2013. [\[Link\]](#).
32. Araújo GMF. **Nanoemulsões de Anfotericina-B: desenvolvimento, caracterização e atividade leishmanicida.** Campina Grande. 2013. 93 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013. [\[Link\]](#).
33. Marques MV, Medeirosa BP, Alves SL, Barreto LV, Lima EM, Zampieria ALTC. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões contendo ibuprofeno para aplicação tópica. *Rev Biotecnol Ciên*. 2015;

4(1Supl.Esp.). II Congresso de Ciências Farmacêuticas do Brasil Central. ISSN 2238-6629. [\[Link\]](#). Acesso em: 14 de nov. 2019.

34. Sajjadi S, Jahanzad F, Brooks BW. Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions: effect of surfactant concentration. **Ind Eng Chem Res**. 2002; 41(24):6033-6041. [\[CrossRef\]](#). Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 15 de nov. 2019.

35. Botelho BO, Melo DCA, Fontes CS, Queiroz, VT, Costa AV, Martins IVF. **Aplicação de nanoemulsões na agricultura e medicina veterinária**. Cap. 10. Tópicos especiais em ciência animal VII. 2018. p.143-156. ISBN: 978-85-54343-12-5. Disponível em: [\[Link\]](#).

36. Bruxel F, Laux M, Bartmann W, Fraga M, Koester LS, Teixeira HF. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Rev Quím Nova**. 2012; 35(9): ISSN 0100-4042. [\[CrossRef\]](#). Acesso em: 14 nov. 2019.

37. Santos PSS. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e microemulgeles contendo ibuprofeno**. Portugal; 2015. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e da Saúde] - FF-UP. 2015.

38. Ferreira MS. **Caracterização estrutural de sistemas formados por compostos siliconados: mesofases, microemulsões e nanoemulsões**. Campinas. 2011. 125 f. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Ciências] – Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Campinas. 2011. [\[Link\]](#).

39. Castro RML. **Emulsão: uma revisão bibliográfica**. João Pessoa. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Farmácia] - Universidade Federal da Paraíba, UFPB. João Pessoa. 2015. [\[Link\]](#).

40. Bedin AC. **Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação *in vitro***. Toledo. 2011. 110 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Farmacologia] - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Toledo, 2011. [\[Link\]](#).

41. Lui W, Sun D, Li C, Liu Q, Xu J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nanoemulsions prepared by the emulsion inversion point method. **J Colloid Inter Sci**. 2005; 303(2): 557-563. ISSN 0021-9797. [\[CrossRef\]](#). Acesso em: 15 de nov. 2019.

42. Bernardi DS. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. Ribeirão Preto. 2011. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências] - Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto. 2011. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).

43. Morales D, Guierrez JM, Gracia-Celma MJ, Solans YC. A study of the relation between biocontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation. **Langmuir**. 2003; 19(18): 7196–7200. [\[CrossRef\]](#). Acesso em: 15 de nov. 2019.

44. Becher P. Emulsions: theory and practice. 3rd ed. New York: Oxford University Press. **J Am Chem Soc**. 2002; 124(26): 7876–7877. 514p. ISBN: 0-8412-3496-5. [\[CrossRef\]](#).

45. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. trad.: Pinto JF, Ana IF. Editora Fundação Calouste Gulbenkian. 2001; vol. II, p. 509-1517.

46. Rosen MJ, Kunjappu JT. Surfactants and Interfacial Phenomena [on-line]. Wiley. 4^o ed; 2012. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 13 nov. 2019.

47. Gomes FES. **Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos bioativos**. Natal. 2010. 174 f. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Química /Fitoquímica] – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN. Natal. 2010. [\[Link\]](#).

48. Rossi CGFT, Dantas TNDeC, Dantas Neto AA, Maciel MAM. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Rev Ciên Ex Terra Serop**. 2007; 26(1-2): 45-67. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 18 de nov. 2019.
49. Vale T Y F. **Desenvolvimento de tensoativos e sistemas microemulsionados para a recuperação de petróleo**. Natal; 2009. 276 f. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Química] - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN. Natal. 2009.
50. Oliveira AC. **Avaliação da aplicação de microemulsão, nanoemulsão e solução de tensoativo na recuperação avançada de petróleo**. Natal; 2015. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Química] - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 23 de set. 2020.
51. Silva C, Martini E, Tavares G, Silveira T, Oliveira MC, Teixeira E. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farm Bonae**. 2006. 25 (1): 17-21. ISSN 0326-2383. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 17 de nov. 2019.
52. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans, C. Formation and stability os nanoemulsions. **Adv Colloid Interf Sci**. 2004; 108-109: 303-318. [\[CrossRef\]](#). Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 19 de nov. 2019.
53. Setyawati MI, Tay CY, Docter D, Stauber RH, Leong DT. Understanding and exploiting nanoparticles intimacy with the blood vessel and blood. **Chem Society Rev**. 2015; 44(22). [\[CrossRef\]](#). Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 17 de nov. 2019.
54. Freitas SCMP. **Veiculação do quimioterápico paclitaxel em nanoemulsões lipídicas no tratamento da aterosclerose experimental: importância do tamanho das partículas da nanoemulsão**. São Paulo. 2016. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Ciências] - Universidade de São Paulo, USP. São Paulo. 2016. [\[CrossRef\]](#).
55. Santos AMO. **Análise química e efeitos letais e sub-letais do óleo essencial de patchouli e sua nanoemulsão em populações de *Sithophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)**. São Cristóvão; 2013. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais] - Universidade Federal de Sergipe, UFS. São Cristóvão. 2013.
56. Pereira VS, Saraiva CRN, Rocha JE, Costa Lopes J, Nascimento Silva MK, Bandeira SMF. (2014). Estudo químico, toxicidade e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. **Rev Interf Saú Human Technol**.
57. Braquehais ID, Vasconcelos FR, Ribeiro ARC, Da Silva ARA, Franca MGA, De Lima DR et al. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Rev Bras PI Med**. 2016; 18(2 Supl 1): 582-587. ISSN 1983-084X. [\[CrossRef\]](#). Acesso em: 14 nov. 2019.
58. Silva RC. **Fototoxicidade de nanoemulsão de extrato de crajiru (*Arrabidaea chica*) em linhagem de células de adenocarcinoma mamário murino (4t1)**. Brasília; 2013. 125 f. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal] - Universidade de Brasília, UNB. Brasília. 2013. [\[Link\]](#).
59. 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): 492-499.
60. De Pinho L et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciên Rural**. 2012; 42(2). ISSN 0103-8478. [\[CrossRef\]](#). Acesso em: 15 de nov. 2019.
61. Mendes LPM, Maciel K, Vieira ABR, Mendonça LCV, Silva R, Rolim-Neto PJ et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pelúcida* e *Portulaca pilosa*. **Rev Ciên Farm Bás Aplic**. 2011; 32(1): 121-125. ISSN 1808-4532. [\[Link\]](#). Acesso em: 12 de nov. 2019.

62. De Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev Bras PI Med.** 2013; 15(4 Supl1): 692-707. ISSN 1516-0572. Disponível em: [[CrossRef](#)]. Acesso em: 14 nov. 2019.

63. Lyra LPS. **Desenvolvimento de nanoemulsão de geranio e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes*.** Botucatu. 2019. 129 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada] – Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP. Botucatu. 2019. [[Link](#)].

64. Godoi SN. **Avaliação da cito-genotoxicidade e da atividade frente a *haemonchus contortus* de nanoemulsões contendo óleo de eucalipto.** Santa Maria. 2018. 92 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Nanociências] - Universidade Franciscana de Santa Maria. Santa Maria. 2018. [[Link](#)].

Histórico do artigo | Submissão: 27/07/2020 | **Aceite:** 21/08/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Porto AS, Almeida IV, Vicentini VEP. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 513-527. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revistafitos/article/view/1060>>. 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.



***In vitro* antileishmanial activity and phytochemical analysis of *Casearia javitensis* Kunth (Salicaceae)**

DOI 10.17648/2446-4775.2020.950

Silva, Carolina Moraes da¹; Eiró, Luciana Guimarães²; Silva-Silva, João Victor³; Correa-Barbosa, Juliana²; Coelho-Ferreira, Márlia⁴; Silveira, Fernando Tobias⁵; Marinho, Andrey Moacir do Rosário⁶; Almeida, Maria das Graças Carvalho⁷; Brígido, Heliton Patrick Cordovil⁸; Dolabela, Maria Fâni^{2,8*}.

¹Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Av. Generalíssimo Deodoro, 92, Umarizal, CEP 66055-240, Belém, PA, Brasil.

²Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, *Campus* Universitário Guamá, Rua Augusto Corrêa, 01, CEP 66075-110, Belém, PA, Brasil.

³Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação, Coordenação de Botânica, Museu Paraense Emílio Goeldi, Avenida Governador Magalhães Barata, 376, São Brás, CEP 66040-170, Belém, PA, Brasil.

⁵Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Instituto Evandro Chagas, Departamento de Parasitologia, Rodovia BR-316 KM 7, s/n, Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua, PA, Brasil.

⁶Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN), Faculdade de Química, *Campus* Universitário Guamá, Rua Augusto Corrêa, 01, CEP 66075-110, Belém, PA, Brasil.

⁷Centro Universitário do Estado do Pará, Faculdade de Farmácia, Av. N^o Sra. de Nazaré, 630 - Nazaré, CEP 66035-170, Belém, PA, Brasil.

⁸Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, *Campus* Universitário Guamá, Rua Augusto Corrêa, 01, CEP 66075-110, Belém, PA, Brasil.

*Correspondência: fanidolabela20@gmail.com.

Abstract

The objective of this study was to carry out phytochemical analysis of the bark extract of *Casearia javitensis* and to evaluate its antipromastigote activity against *Leishmania amazonensis*. The ethanol extract (EE) was fractionated in open-column chromatography to obtain the hexane (FrHex), dichloromethane (FrDcm), ethyl acetate (FrAcOET) and methanol (FrMeOH) fractions. The EE and its fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC). FrDcm was analyzed in high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). The antipromastigote assay of *Leishmania amazonensis* and the cytotoxicity test against the acute monocytic leukemia cell line (THP-1) were performed by the MTT colorimetric assay. The phytochemical profile in TLC detected terpenes in all samples. However, in the ultraviolet spectrum (HPLC-DAD) for FrDcm suggested the presence of a phenolic compound. FrHex and FrDcm showed antipromastigote activity ($IC_{50} = 116.6 \pm 0.9$ and $59.4 \pm 1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) and low cytotoxicity ($CC_{50} = 333.4 \pm 3.2$ and $241.2 \pm 1.9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). The selectivity index for FrDcm was 4.1. We conclude that the FrDcm of *C. javitensis* has potential as a leishmanicide, and this activity may be related to the presence of phenolic compound.

Keywords: Leishmaniasis. Antipromastigote. Cytotoxicity (THP-1). Phenolic Compound.

Introduction

The leishmaniasis are a group of infectious disease, non-contagious, caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, which affects skin and mucous membranes, transmitted to humans by the bite of infected female phlebotomine sandflies^[1]. Endemic in 97 countries, an estimated 1 billion people live in an area at risk for the disease worldwide and there are no optimistic forecasts for its control for the next few years^[1,2].

The Amazon was responsible for 57.3% of all cases of leishmaniasis in Brazil, with the states of Pará (30.2%), Mato Grosso (17.3%), Amazonas (15.0%) and Maranhão (13.4%) presented the most cases of Leishmaniasis in this region^[3,4].

The treatment of leishmaniasis is mainly carried out with pentavalent antimonial drugs (sodium stibogluconate and meglumine antimoniate), whereas Pentamidine and Amphotericin B are the second choice in therapy^[5]. However, the use of these drugs is questionable because of the limitations of toxicity, variable efficacy, requirements for parenteral administration and/or length of treatment regimens, and a high cost^[5-7]. In addition, there are reports of parasite resistance, including the global HIV/AIDS epidemic with its accompanying impact on the immune system^[8], having high *Leishmania*-HIV coinfection rates reported from Brazil, Ethiopia and the state of Bihar in India^[9].

Moreover, in the Amazon, therapeutic failure may be related to the resistance of the parasite to drugs, to the irregular and distant use of individuals who live far enough away from health services^[10]. Therefore, it is necessary to search for new therapeutic alternatives, with medicinal plants being an important source of bioactive compounds.

The Amazon region still presents high rates of infectious and parasitic diseases, with an expressiveness of deaths^[11] that may be associated with the population's poor access to health services. Given this scenario, traditional knowledge about the use of medicinal plants often symbolizes the only therapeutic resource for these communities^[12]. Among the plants, it stands out the genus *Casearia* (Salicaceae), composed of about 180 species throughout the tropical and subtropical regions of the globe, including Africa, Asia, Australia, North America and South America, and the Pacific islands^[13], with 70 species belonging to the American continent and 37 present in Brazil^[14], they stand out because they have species known for medicinal use in the Amazon, with potential cicatrizant activity^[15].

The morphology of this genus is described as shrubs or small trees, found more frequently in forest vegetation^[16], and are noted for their medicinal importance, with wide recommendations in traditional medicine for the treatment of wounds, ulcer^[17], to cicatrizing^[18], in addition to being used frequently for the treatment of different skin diseases^[19], which may be related to leishmaniasis.

In addition, species of the *Casearia* genus present in the literature a study with antiparasitic activity, with activity between trypanomastigotes of *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ ranging from 0.53 to 2.77 µg mL⁻¹) for clerodane diterpenes (casearins A, B, G, and J) and for *Leishmania infantum* promastigotes were also susceptible to casearins obtained from *Casearia sylvestris*, with IC₅₀ values ranging from 4.45 to 9.48 µg mL⁻¹^[20], and the

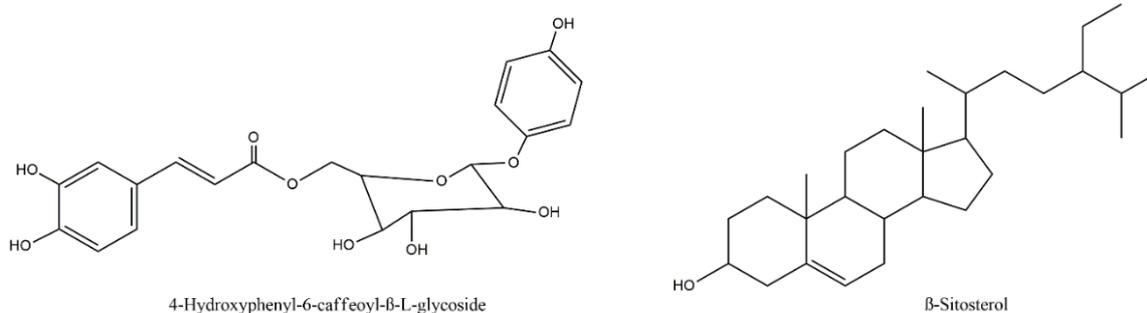
tricine compound, a flavone, obtained from of *C. arborea* demonstrated activity against the intracellular amastigotes of *L. infantum*, with an IC₅₀ value of 56 µM^[21].

Phytochemical studies on different species of the *Casearia* genus revealed the predominance of terpenoids, emphasizing clerodanic diterpenes^[22]. Sesquiterpenes and monoterpenes, phenylpropanoids, steroids, phenolic glycosides, alkaloids and flavonoids have also been isolated^[13,23]. Several of these chemical compounds, isolated from plant extracts, have been reported leishmanicidal activity^[24], especially the terpene compounds obtained from *Casearia Sylvestris*^[20] and flavonic compounds obtained from *C. arborea*^[21] present in the genus *Casearia*.

The *Casearia* genus has 180 species, of which 287 compounds have already been isolated, and the terpenoids, in particular the diterpenoids clerodans, are the predominant and representative constituents in the *Casearia* genus^[13]. *Casearia javitensis* Kunth is a species found very frequently in the Amazon region^[15], Preliminary phytochemical studies detected the presence of terpenes and hexanoic and caproic acids^[13,25], besides phenolic glycosides, steroids and flavonoids^[23]. In analysis by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) of the fractions obtained by fractionation of the dichloromethane extract, made it possible to detect triterpene friedelina and β-friedelanol and steroid β-sitosterol^[15], but only in one study, 4-hydroxyphenyl-6-caffeoyl-β-L-glucoside and β-sitosterol were isolated from the hexane and methanol extracts of the leaves^[26] (FIGURE 1).

However, several species of the genus lack validation studies of leishmanicidal activity, especially *Casearia javitensis* Kunth, with limited validation studies of biological activity and cytotoxicity assays.

FIGURE 1: Structures of substances isolated from *Casearia javitensis*.



In summary, despite the existence of phytochemical studies of the species, there are no reports of studies that evaluated the leishmanicidal activity. In view of the above, this work had the objective to evaluate the leishmanicidal potential of *Casearia javitensis*.

Material and methods

Plant material

The trunk bark of a *C. javitensis* individual was collected in an area of the Museu Paraense Emílio Goeldi in January 2016, in the municipality of Belém, state of Pará, Brazil (01°27'00" S, 48°26'47" W). The exsicata was deposited in the herbarium "João Murça Pires" of the respective museum under registration MG-Etn-00559.

Biological material

The parasite used was *Leishmania (L.) amazonensis*, isolated from a human case from Ulianópolis, Pará State (MHOM/BR/2009/M26361). Cell lines from acute monocytic leukemia (THP-1; ATCC N° TIB 202) were purchased from the cell bank of Rio de Janeiro (BCRJ).

Phytochemical analysis

The powder from the barks underwent maceration with ethanol (1:10), and the macerated material was concentrated in a rotary evaporator until residue precipitation. The ethanol extract (EE, 0.125 g) was fractionated in an open chromatographic column, using as a stationary phase silica gel (0.1-0.2 mm/70-130 mesh) and mobile phase gradient solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol.

In order to detect the presence of alkaloids and terpenes, EE, hexane fraction (FrHex), dichloromethane fraction (FrDcm), ethyl acetate fraction (FrAcOET) and methanol fraction (FrMeOH) (95:5:0.2) for alkaloids and Hexane, Ethyl Acetate (8:2), for the detection of terpenes the ultraviolet light (365 nm) and reagents from Dragendorff, and Liebermann-Burchard were used as developers^[27]. FrDcm was subjected to high-performance liquid chromatography with a diode-array detector (HPLC-DAD).

Biological activity

Promastigotes of *L. amazonensis* were obtained after primary isolation in NNN (Novy–MacNeal–Nicolle) medium. Then the strains were subcultured and adapted to the RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium. The parasite was cultured at 26°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco®, Grand Island, NY, USA), penicillin (100 U mL⁻¹) and streptomycin (100 µg mL⁻¹)^[28].

The culture of log phase promastigotes was adjusted to 5x10⁶ parasites 0.1 mL⁻¹. Susceptibility test determination was performed on 96-well plates. The extract and fractions were analyzed in triplicate in a concentration gradient (200 to 3.125 µg mL⁻¹). The negative control was performed only with parasites and the incubation medium. The positive control was made with amphotericin B (25 to 0.3906 µg mL). After 24 h of incubation at 26°C under 5 %CO₂ atmosphere, 10 µl of tetrazolium salt (5 µg mL) was added to each well, and the parasites were quantified in an enzyme-linked immunosorbent assay reader^[28]. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined by linear regression (Graph Pad Prism versão 5.04).

To determine cell viability, the colorimetric MTT (tetrazolium dye, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) metabolic activity assay was used^[29]. THP-1 cells (4x10⁵ cells 0.1 mL⁻¹) were grown in RPMI-1640 medium (Sigma Aldrich®, EUA), supplemented with 5% fetal serum, maintained under 5% CO₂ at 37°C. Cells were treated with extract and fractions at different concentrations (between 25 and 500 µg mL⁻¹). After 24 h additional incubation MTT (5.0 mg mL⁻¹) was added. The plate was incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 4 h. Dimethylsulfoxide was added to each well to solubilize the formazan crystals. Optical density was determined at 490 nm (Stat Fax 2100 microplate reader, Awareness Technology, Inc., USA). The cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined by linear regression^[29].

To determine the selectivity index (SI), the ratio of the CC₅₀ value of the cytotoxic activity to the IC₅₀ value of the antiprotozoal activity was calculated. When the SI value is >1, that compound presents more active against protozoa and less active against mammalian cells^[30].

Results and discussion

The yield was of 3.67% (11.025 g) of EE. Fractionation of referred extract on an open chromatographic column generated fractions of different polarities, such as higher yield for methanol fraction (FrMeOH 91.95% - 7.356 g; **TABLE 1**).

TABLE 1: Yields and thin layer chromatography of *Casearia javitensis*.

Samples	Yield (%)	TLC			
		Dragendorff	UV	Liebermann-Burchard	UV
EE	3.67	-	-	+	+
FrHex	1.68	-	-	+	+
FrDcm	1.33	-	-	+	+
FrAcOET	4.06	-	-	+	+
FrMeOH	91.95	-	-	+	+

Legend: TLC, thin-layer chromatography; UV, ultraviolet rays; EE, Ethanol Extract; FrHex, Hexane Fraction; FrDcm, Dichloromethane Fraction; FrAcOET, Ethyl Acetate Fraction; FrMeOH, Methanol Fraction.

The solvents influenced the final extraction content, the methanol solvent being the most selective for the extraction of the metabolites present in the casings *Casearia javitensis* and previous studies with *Casearia sylvestris* Sw. observed the presence of flavonic glycosides, with predominance of condensed tannins, metabolism groups^[31].

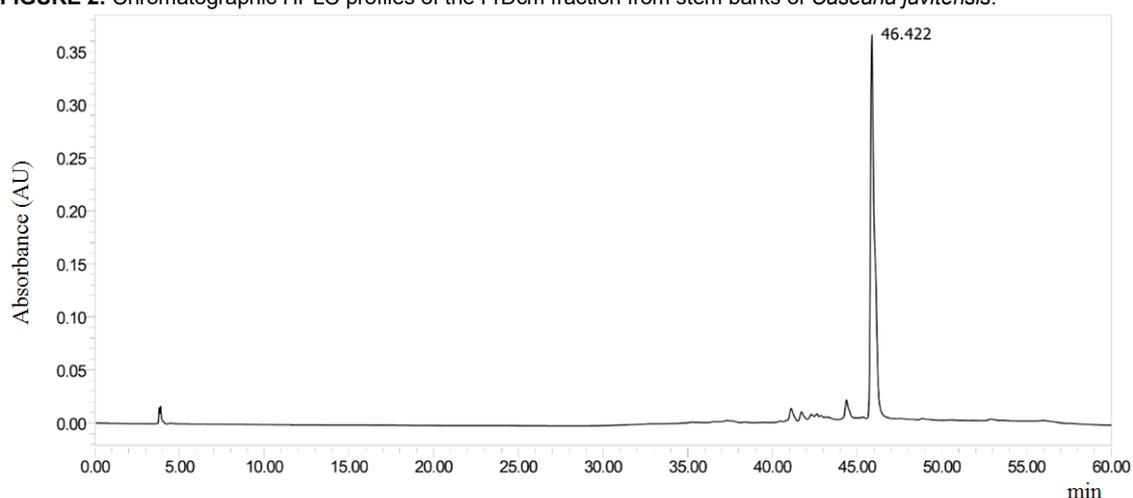
Phytochemical studies on different species of the *Casearia* revealed the predominance of terpenoids, emphasizing clerodan diterpenes^[22]. Therefore, this may explain the suggestive results for the presence of terpenes, and absence of alkaloids (**TABLE 1**). In the study of *Casearia sylvestris* Sw. also no alkaloid was observed^[31].

Several of these chemical compounds, isolated from plant extracts, have proven leishmanicidal activity, such as terpenoids, aminoglycosideroids, aminosteroids, naphthoquinones, chalcones, iridioid glycosides, flavonoids, lignans and alkaloids^[24].

Phytochemical studies of species of the genus, especially *C. corymbosa*, *C. grewiifolia*, *C. membranacea* and *C. sylvestris* allowed the isolation and structural characterization of 152 clerodan diterpenes, of which 41 were isolated from *C. sylvestris*^[13]. More than 287 compounds have been identified from the *Casearia* genus and it can be said that terpenoids are the predominant class of metabolites, highlighting clerodane diterpenes^[13]. For example, two clerodane diterpenes, Casearlucine A and Caseamembrol A also showed activity against *L. amazonensis* amastigote axenic stages (5.98 ± 6.8 and 10.5 ± 0.4 μM , respectively) and promastigote (11.1 ± 0.2 μM , for both)^[32].

Phytochemical studies suggest the presence of terpenes in the EE and in all fractions obtained (**TABLE 1**). On the other hand, none of the samples presented a positive result for alkaloids. Following the thin layer chromatography profile analysis, the FrDcm fraction was selected for HPLC-DAD analysis, as it showed a better chromatographic profile when tested with the Liebermann-Burchard reagent and observed in ultraviolet light (UV). The FrDcm submitted to the analysis in HPLC-DAD presented a signal with greater intensity (TR = 46.422 min.) with UV spectrum with λ of 258.3 and 383.4 (**FIGURE 2**).

FIGURE 2: Chromatographic HPLC profiles of the FrDcm fraction from stem barks of *Casearia javitensis*.



The chromatogram suggests that the major peak of FrDcm is a phenolic compound, since the absorption at 258.3 nm is suggestive of that of the band II (ring A, benzoyl portion). While the peak at 383.4 nm may be related to the Band I (ring B, cinamoyl portion) of the flavonoid^[33,34]. From the maximum absorption value of Band I, it is possible to infer about the nature of the flavonoid, especially between flavones (304-350 nm) and flavonols (352-385 nm)^[33,35]. The maxima absorption obtained from the FrDcm suggests that this compound is a flavonol.

Casearia javitensis extract was inactive against promastigote forms of *L. amazonensis*, presenting an $CI_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$. FrHex ($CI_{50} 116.6 \pm 0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$) was considered moderately active. FrDcm ($IC_{50} 59.38 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtained the best result among the samples tested, being considered active. FrAcOET ($CI_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$) and FrMeOH ($CI_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$) were inactive (**TABLE 2**). Thus, the results of the antipromastigote activity showed that the fractionation process contributed to the improvement of the biological activity, with a medium polarity profile (FrDcm) presenting better biological response.

TABLE 2: The anti-promastigote, activity Cytotoxicity and selective index of *Casearia javitensis*.

Samples	<i>L. amazonensis</i> CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	THP-1 cell line CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SI
EE	>200	88.77 ± 2.8	Nd
FrHex	116.6 ± 0.9	333.4 ± 3.2	2.85
FrDcm	59.38 ± 1.1	241.2 ± 1.9	4.06
FrAcOET	>200	30.5 ± 5.3	Nd
FrMeOH	>200	101.4 ± 3.1	Nd
Amphotericin B	0.1699 ± 0.0	162.8 ± 3.7	958.2

Legend: THP-1, Human *monocytic leukemia cell line*; Nd, Not determined; SI, selective index; EE, Ethanol Extract; FrHex, Hexane Fraction; FrDcm, Dichloromethane Fraction; FrAcOET, Ethyl Acetate Fraction; FrMeOH, Methanol Fraction.

In the cell viability assay, EE ($CC_{50} 88.77 \mu\text{g mL}^{-1}$), FrAcOET ($CC_{50} 30.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and FrMeOH ($CC_{50} 101.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) showed toxicity to THP-1 monocytic cells. FrHex and FrDcm showed low cytotoxicity at the concentrations tested ($CC_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$; **TABLE 2**). Thus, selective index results (**TABLE 3**) show that FrHex and FrDcm are 2.8 and 4.06 fold less toxic to THP-1 cells than to promastigote forms. Thus, it can be observed that fractions of low and medium polarity have secondary metabolites with low capacity to cause damage to the cell.

The activity observed in FrDcm may be related to the presence of flavonoids detected in HPLC-DAD. Two important members of the flavonoid family, namely quercetin and luteolin, have been reported to have marked leishmanicidal activity. Studies have shown that quercetin may induce the death of *L. amazonensis* by increasing the production of reactive oxygen species and by collapsing the mitochondrial potential^[36]. Quercetin has also been reported to have multiple targets, including arginase, which is an important enzyme in the polyamine biosynthesis pathway^[37], topoisomerase II in kinetoplasts, which induces DNA cleavage leading to apoptosis^[38] and iron metal, which is important for parasite growth and replication^[39].

It is worth mentioning that the observed values were obtained from fractions, in this way, new studies are required using the bioguided fractionation to aid in the isolation of the substances responsible for leishmanicide activity, which may improve by the inhibitory capacity of the parasite and consequently its selectivity.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. Furthermore, the authors express their gratitude to Laboratory of phytochemistry and microbiology of the Centro Universitário do Estado Pará (CESUPA) and Laboratory of Pharmacology and Neglected Diseases of Universidade Federal do Pará (UFPA).

References

1. World Health Organization (WHO). **Leishmaniasis: Situation and trends**. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 03 abr. 2019.
2. World Health Organization (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 03 abr. 2019.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, grandes regiões e Unidades Federadas 1990 a 2017**. Brasília: MS/SVS. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mar. 2019.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2017**. Brasília: MS/SVS. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mar. 2019.
5. Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim Nova**. 2003; 26(4): 550-5. ISSN 1678-7064. [\[CrossRef\]](#).
6. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**. 2003; 19(11): 502-8. ISSN 1471-4922. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
7. Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**. 2005; 16(1): 77-82. ISSN 0102-695X. [\[CrossRef\]](#).
8. Ponte-Sucré A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl Trop Dis**. 2017; 11(12): e0006052. ISSN 1935-2727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
9. World Health Organization (WHO). **Leishmaniasis: Leishmania-HIV co-infection**. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 03 abr. 2019.

10. Rodrigues AM, Hueb M, Santos TARR, Fontes CJF. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2006; 39(2): 139-45. ISSN 1678-9849. [[CrossRef](#)].
11. Viana RL, Freitas CM, Giatti LL. Saúde ambiental e desenvolvimento na Amazônia legal: indicadores socioeconômicos, ambientais e sanitários, desafios e perspectivas. **Saúde Soc.** 2016; 25(1): 233-46. ISSN 1984-0470. [[CrossRef](#)].
12. Lira TM, Chaves MPSR. Comunidades ribeirinhas na Amazônia: organização sociocultural e política. **Interações (Campo Grande).** 2016; 17(1): 666-76. ISSN 1518-7012. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
13. Xia L, Guo Q, Tu P, Chai X. The genus *casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochem Rev.** 2015; 14(1): 99-135. ISSN 1572-980X. [[CrossRef](#)].
14. Shen Y-C, Wang C-H, Cheng Y-B, Wang L-T, Guh J-H, Chien C-T et al. New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranacea*. **J Nat Prod.** 2004; 67(3): 316-21. ISSN 0163-3864. [[CrossRef](#)].
15. Wyrepkowski CDC. **Estudo fitoquímico e bioatividade de extratos de *Casearia javitensis* Kunth.** Manaus. 2010. 143 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia] - Universidade Federal do Amazonas, UFAM. Manaus. 2010. [[Link](#)].
16. Marquete R. **O gênero *Casearia* no estado do Rio de Janeiro, Brasil - Flacourtiaceae.** Rio de Janeiro, 2005. 167 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Botânica] - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, IJBRJ. Rio de Janeiro, 2005. [[Link](#)].
17. Ferreira PMP, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Barros FWA, Martins AMA, Cavalheiro AJ et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **An Acad Bras Ciênc.** 2011; 83(3): 1373-84. ISSN 0001-3765. [[CrossRef](#)].
18. Souza CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Bot Bras.** 2006; 20(1): 135-42. ISSN 1677-941X. [[CrossRef](#)].
19. Rodrigues VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande - Minas Gerais. **Ciênc Agrotecn.** 2001; 25(1). Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 03 abr. 2019.
20. Bou DD, Tempone AG, Pinto EG, Lago JH, Sartorelli P. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. **Phytomedicine.** 2014; 21(5): 676-81. ISSN 0944-7113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
21. Santos AL, Yamamoto ES, Passero LFD, Laurenti MD, Martins LF, Lima ML et al. Antileishmanial Activity and Immunomodulatory Effects of Tricin Isolated from Leaves of *Casearia arborea* (Salicaceae). **Chem Biodivers.** 2017; 14(5): e1600458. ISSN 1612-1880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
22. Ferreira PMP, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS et al. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chem Biol Interact.** 2010; 188(3): 497-504. ISSN 0009-2797. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
23. Rayanil K, Nimnoun C, Tuntiwachwuttikul P. New phenolics from the wood of *Casearia grewiifolia*. **Phytochem Letters.** 2012; 5(1): 59-62. ISSN 1874-3900. [[CrossRef](#)].
24. Bezerra J, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn.** 2006; 16(supl.): 631-37. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].

25. Prieto AM, Dos Santos AG, Oliveira APS, Cavalheiro AJ, Silva DHS, Bolzani VS et al. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food Chem Toxicol.** 2013; 53(1): 153-59. ISSN 0278-6915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
26. Achin-Espinar MT, Souza MCS, Nunez CV. Isolamento de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo e β -sitosterol e avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante e tóxica sobre *Artemia salina* de *Casearia javitensis*. **Rev Fitos.** 2017; 10(3): 268-282. ISSN 2446-4775. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
27. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography.** Berlin: Springer-Verlag. 1984. ISBN: 978-3-642-00573-2.
28. Mota EF, Rosário DM, Veiga ASS, Brasil DS, Silveira FT, Dolabela MF. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmacogn Mag.** 2015; 11(43): 601-6. ISSN 0976-4062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** 1983; 65(1-2): 55-63. ISSN 0022-1759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
30. Almeida TL, Monteiro JÁ, Lopes GKP, Chiavelli LUR, Santin SMO, Silva CC et al. Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta*. **Quím Nova** 2014; 37(7): 1151-7. ISSN 0100-4042. [[CrossRef](#)].
31. Luz SFB, Sato MEO, Duarte MR, Santos CAM. Parâmetros para o controle da qualidade de folhas de *Casearia sylvestris* SW. - Guaçatonga. **Rev Bras Farmacogn.** 1998; 7-8(1): 1-11. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
32. Jullian V, Bonduelle C, Valentin A, Acebey L, Duigou A-G, Prévost M-F et al. New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. **Bioorg Med Chem Lett.** 2005; 15(22): 5065-70. ISSN 0960-894X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
33. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. **The ultraviolet spectra of flavones and flavonols.** Berlin: Springer; 1970. p. 41-164. ISBN: 978-3-642-88458-0.
34. Alonso-Salces RM, Barranco A, Abad B, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. **J Agric Food Chem.** 2004. 52(10): 2938-52. ISSN 1520-5118. [[CrossRef](#)].
35. Markham KR, Mabry TJ. **Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids.** In: Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H, editors. The Flavonoids. London: Chapman and Hall; 1975. p. 62-75. ISBN: 978-1-4899-2909-9.
36. Fonseca-Silva F, Inácio JDF, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE** 2011; 6(2): e14666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
37. Da Silva ER, Maquiaveli CC, Magalhães PP. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Exp Parasitol.** 2012; 130(3): 183-8. ISSN 0014-4894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
38. Mitra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Mol Med.** 2000; 6(6): 527-41. ISSN 1528-3658. [[CrossRef](#)].
39. Sen G, Mukhopadhyay S, Ray M, Biswas T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. **J Antimicrob Chemother.** 2008; 61(5): 1066-75. ISSN 1460-2091. [[CrossRef](#)].

Histórico do artigo | Submissão: 07/01/2020 | **Aceite:** 15/09/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Silva CM, Eiró LG, Silva-Silva JV, Correa-Barbosa J et al. *In vitro* antileishmanial activity and phytochemical analysis of *Casearia javitensis* Kunth (Salicaceae). **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 528-537. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/950>>. 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.



Desenvolvimento de fitoterápicos a partir das folhas da noqueira-da-índia (*Aleurites moluccanus*): relato de experiência de parceria entre uma Universidade Comunitária e indústrias farmacêuticas nacionais

Development of herbal medicines from the leaves of the walnut tree (*Aleurites moluccanus*): report experience of Community University and national pharmaceutical company

DOI 10.17648/2446-4775.2020.935

Bresolin, Tania Mari Bellé¹; Silva, Ruth Meri Lucinda da¹; Meyre-Silva, Christiane²; Quintão, Nara Lins Meira¹; Cechinel Filho, Valdir³.

¹Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Escola de Ciências da Saúde-CCS, Faculdade de Farmácia. Rua Uruguai, 458, Centro, CEP 88302-901, Itajaí, SC, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

³Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas - NIQFAR - CCS. Rua Uruguai, 458, Centro, CEP 88302-901, Itajaí, SC, Brasil.

*Correspondência: tbresolin@univali.br.

Resumo

Este trabalho, de parcerias entre uma Universidade Comunitária e empresas farmacêuticas nacionais relata o desenvolvimento de novos e efetivos fitoterápicos obtidos a partir das folhas de *Aleurites moluccanus* (Euphorbiaceae), uma espécie exótica, proveniente da Ásia, adaptada no Brasil. Este projeto, embora ainda não tenha alcançado o estágio final de estudos clínicos e registro junto à ANVISA, representa uma experiência relevante a ser analisada à luz das dificuldades e superações no decorrer das etapas que compõem a cadeia de estabelecimento de um novo medicamento fitoterápico no Brasil. Com aprovação nas etapas de estudos não clínicos e na etapa clínica-fase I foram desenvolvidos, em escala piloto, comprimidos a base do extrato seco padronizado de *A. moluccanus*. Além disso, foram estabelecidas formulações como creme tópico e suspensão oral. A superação dos desafios para padronização do extrato em escala industrial, sob boas práticas de fabricação (BPF) e os aspectos de estabilidade das formulações, assim como a continuidade dos estudos, depende do cenário e consequente direcionamento do mercado. Este relato proporcionou uma visão sobre os percalços e as superações vivenciadas por pesquisadores de uma Universidade Comunitária brasileira, com foco na pesquisa e desenvolvimento de novo, efetivo e seguro fitoterápico analgésico e anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Aleurites moluccanus*. Fitoterápicos. Universidade Comunitária. Inovação terapêutica. Analgesia. Inflamação.

Abstract

This work, of partnerships between a Community University and national pharmaceutical companies reports the development of new and effective phytotherapies obtained from the leaves of *Aleurites moluccanus* (Euphorbiaceae), an exotic species, from Asia, adapted in Brazil. The project, although it has not yet reached the final stage of clinical studies and registration with ANVISA, represents a relevant experience to be analyzed in light of the difficulties and overcomes during the stages that make up the chain of establishment of a new herbal medicine in Brazil. Tablets were developed based on the standardized dry extract of *A. moluccanus*, on pilot scale, with approval in the stages of non-clinical studies and in the clinical stage-phase I. In addition, formulations such as topical cream and oral suspension were established. The overcoming of challenges related to the standardization of the extract on an industrial scale, under good manufacturing practices (GMP) and the stability aspects of the formulations, the continuity of studies depends on the scenario and consequent market direction. Therefore, this report provides an insight into the setbacks and overcoming experienced by researchers from Brazilian Community University with a focus on research and development of new, effective and safe analgesic and anti-inflammatory herbal medicine.

Keywords: *Aleurites moluccanus*. Herbal medicine. Community University. Therapeutical innovation. Analgesy. Inflammation.

Introdução

O uso terapêutico de espécies vegetais tem passado por momentos de extrema relevância, desde o sofisticado e sistemático uso de fitomedicamentos na Mesopotâmia, há mais de 2600 a.C, a fundamental importância na criação de grandes laboratórios farmacêuticos, como o Laboratório Merck em Darmstadt (Alemanha), que começou a extrair morfina e outros alcaloides em 1826, passando por fases marcadas por estagnação, devido ao surgimento das técnicas de *high-throughput screening* (HTS) entre os anos de 1990-2000. Porém, em função do baixo número de novas moléculas resultantes desta última estratégia, o interesse na descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais, apesar de sua alta complexidade, a qual exige ampla abordagem de pesquisa interdisciplinar, vem sendo aos poucos revitalizado^[1].

Entre as dificuldades relacionadas à produção de fitomedicamentos ou fármacos baseados em plantas medicinais, vários autores pontuam especialmente a acessibilidade ao material vegetal, considerando que a sua origem nem sempre se baseia em cultivo padronizado, mas advém de colheita silvestre, em *habitat* naturais ecologicamente e edaficamente diversos, levando ao risco da colheita extrativista e insustentável^[2]. Outro aspecto importante diz respeito à repartição de benefícios, bem como questões de patenteabilidade. Neste contexto, a Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica (CBD), embora tenha estabelecido uma base para os países regularem e definirem aspectos relacionados à bioprospecção, por outro lado deixou muitas questões em aberto, particularmente na questão do acesso e repartição de benefício, causando insegurança jurídica e dificultando investimentos^[3]. Com o protocolo de Nagoya, houve maior vinculação jurídica e maior clareza com relação às questões mencionadas na CBD^[4]. No Brasil, em 2015, entrou em vigor a Lei da Biodiversidade, Lei nº 13.123/2015, vislumbrando aumentar a confiança do

setor produtivo na exploração da biodiversidade. Destaca-se que, no Brasil o registro de fitoterápicos baseia-se em uma rígida norma sanitária, a RDC nº 26/2014^[5], a qual apresenta nível de exigências semelhante ao dos medicamentos sintéticos, relativo à qualidade de produtos, o que muitas vezes leva à descontinuidade no investimento para produtos oriundos de plantas.

Associado à questões pontuadas, soma-se ainda questões voltadas à qualidade e composição dos insumos vegetais, a qual depende de vários fatores que influenciam na produção dos princípios ativos, incluindo a época de colheita, composição do solo, altitude, condições climáticas, de processamento e de armazenamento, entre outros. Além disso, durante as etapas de processamento do material vegetal e obtenção dos derivados vegetais e fitoterápicos, pode ocorrer degradação de compostos com comprometimento da eficácia e segurança^[6].

A *Aleurites moluccanus* (L.) Willd., Euphorbiaceae (**FIGURA 1a**), conhecida popularmente como “noqueira-do-iguape” ou “noqueira-da-Índia”, é uma árvore oriunda da Ásia, introduzida no Brasil por colonizadores portugueses, com desenvolvimento espontâneo especialmente no Sul e Sudeste, onde predominou-se a extração do óleo das amêndoas utilizado para a fabricação de vernizes, sabão, velas, combustíveis e lubrificantes, e taninos usados em curtumes^[7,8]. É uma árvore de porte médio e grande coroa de propagação, que pode atingir 20 m de altura, de 9 a 11 m de diâmetro, de casca marrom acinzentada, folhas de formas bem distintas, flor monoica de coloração branca levemente esverdeada, fruto verde a marrom podendo conter de 2 a 3 sementes em seu interior^[9]. O uso medicinal dos diferentes órgãos vegetativos desta espécie é relacionado principalmente ao efeito anti-inflamatório, além de ser utilizada também no tratamento de gonorréia, dor de cabeça, asma, conjuntivite, úlceras, antitumoral, cicatrização de feridas e erupções na pele e como desintoxicante alimentar. No entanto, por apresentar toxicidade e, devido ao uso indevido para emagrecimento, a utilização da noz (**FIGURA 1b**) foi recentemente proibida pela ANVISA^[10].

FIGURA 1: *Aleurites moluccanus* (a), detalhe dos frutos (b).

a



b



Material e Método

O presente artigo foi construído a partir de revisões bibliográficas, vivências e pesquisa científica, realizada pelos autores nos últimos 24 anos.

Resultados e Discussão

Motivado pelos relatos de uso popular, na forma de chá e unguentos das folhas da noqueira da Índia, Carlos Picoli, o dono de uma fazenda de 105 hectares, com cerca de 6.000 indivíduos de *A. moluccanus*, localizada no município de Tijucas (SC), após várias tentativas de parcerias para estudos da planta, procurou pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em 1993. Na ocasião o Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho desenvolvia seu projeto de doutorado e era docente do recém-criado curso de Farmácia, na Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Os estudos científicos com esta planta iniciaram em 1995, sob sua orientação, com alunos de iniciação científica da UNIVALI, e resultaram na publicação dos primeiros artigos científicos envolvendo informações sobre a composição fitoquímica e os efeitos farmacológicos nos modelos pré-clínicos disponíveis^[11-14].

A primeira parceria *Universidade x Empresa* iniciou em 1997, quando o Prof. Valdir Cechinel Filho teve sua proposta aprovada pela empresa Eurofarma (São Paulo, SP) para aprofundamento dos estudos fitoquímicos e biológicos da planta, fazendo parte dos 10 projetos aprovados, entre 16 propostas recebidas pela empresa. Os recursos foram utilizados para equipar laboratórios de pesquisa do recém-criado Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) na UNIVALI, em parceria com a UFSC. Em 2002, houve novo aporte de recursos, por meio do edital CNPq (Fundo Verde-Amarelo), ainda em parceria com a UFSC quando foram adquiridos equipamentos de maior porte para a UNIVALI, implementando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para aprofundar os estudos fitoquímicos e prosseguir com estudos farmacológicos^[15,16].

Em 2005, o projeto alcançou maior maturidade com a aprovação do edital MCT/FINEP/Ação Transversal – Cooperação ICTs-Empresas em conjunto com o Laboratório Farmacêutico Eurofarma e a inclusão de uma equipe interdisciplinar, envolvendo, além da área fitoquímica e farmacológica, as áreas de tecnologia farmacêutica e desenvolvimento analítico, na UNIVALI. Nesta etapa foram contemplados os estudos agrônomo-botânicos, em parceria com a empresa Centroflora (Botucatu, SP).

Um dos grandes entraves no decorrer do desenvolvimento de um fitoterápico reside na transposição dos achados fitoquímicos com padronização do extrato bioativo para a escala industrial. Os solventes utilizados no fracionamento e seleção dos metabolitos vegetais nos estudos fitoquímicos da matéria-prima vegetal não podem ser utilizados na produção do derivado vegetal em escala ampliada, por se tratarem de solventes orgânicos tóxicos e poluentes. Porém, a elucidação da composição é uma importante etapa inicial, visando estabelecer marcadores (ativo ou analítico)^[5], os quais viabilizam o monitoramento das especificações nas etapas industriais.

Dada a dificuldade de obter o marcador ativo selecionado nas condições da escala laboratorial, a empresa Lychnoflora (Ribeirão Preto, SP) foi contratada, pela Empresa Eurofarma, para a obtenção em maior escala das SQRs swertisina e swertisina 2"-O-ramnosil. Também foi desenvolvido um extrato seco padronizado, a validação da metodologia analítica quali e quantitativa por CLAE e aprofundados os estudos farmacológicos na Univali.

O último aporte de recurso, em parceria com a Eurofarma, ocorreu em 2008 com o Edital CT-Biotecnologia/CT-Saúde/MCT/CNPq/Ms/SCTIE/DECIT-BIOINOVA n° 20/2007. Nesta etapa foram realizados os estudos de prospecção e sustentabilidade agrônômica, *scale-up* do processo de coleta e extração (coleta de 6.340 kg de folhas secas, a partir de 20 árvores), produção de lotes piloto (3 x 5 kg), estudo reprodutibilidade industrial (3 lotes de 100 kg), estabelecimento das especificações e estudos de estabilidade nos lotes industriais, com a Centroflora^[17,18]. Na UNIVALI foram exploradas as provas de conceito, com a avaliação da atividade anti-inflamatória (8 modelos), atividade analgésica em modelos agudos e crônicos (6 modelos) e elucidação do mecanismo de ação analgésico e anti-inflamatório^[19-21], investigação da ação anti-inflamatória tópica^[22]. Recentemente foi evidenciado o efeito do extrato em modelo experimental de artrite reumatoide^[23]. Também foram realizados, pela Empresa Eurofarma, os estudos de farmacocinética com o marcador selecionado, sendo terceirizados os estudos toxicológicos não-clínicos em duas espécies animais (ratos e mini-pigs), pelas empresas: Tecam (Campinas, SP) e Ciallyx (São Paulo, SP). Além disso, foi finalizada a Fase Clínica I com os comprimidos de *A. moluccanus*, pela empresa Synchrophar (Campinas, SP). Embora o protocolo para realização da fase clínica II tenha sido aprovado pela ANVISA em 2013, a Empresa Eurofarma interrompeu a condução dos estudos em 2015, frente às novas prioridades de investimentos da empresa.

O processo extrativo foi aprimorado com ajustes no líquido extrator e no método e tempo de extração. Os ajustes foram necessários para permitir a ampliação de escala, principalmente devido ao aspecto resinoso do extrato. Os estudos de melhoria do extrato foram biomonitorados pela avaliação da atividade antinociceptiva *in vivo*, assim como, pela quantificação dos marcadores químicos por CLAE. O extrato seco foi desenvolvido em escala laboratorial, sendo avaliados diferentes adjuvantes de secagem e condições experimentais de secagem. A tecnologia de obtenção do extrato seco foi transferida para a empresa Centroflora (Botucatu-SP) por meio de contrato para produção de extrato seco nas escalas piloto (3 lotes de 5 kg) e industrial (3 lotes de 100 kg). A ampliação de escala de produção do extrato foi acompanhada pelos pesquisadores da Universidade com o biomonitoramento da atividade farmacológica e teor de marcadores. A transferência de tecnologia e ampliação de escala de produção obteve sucesso, mostrando a importância do modelo de parceria adotado no projeto Universidade-Empresa de insumos vegetais-Laboratório Farmacêutico no desenvolvimento de insumos farmacêuticos ativos vegetais (IFAVs), por se tratarem de produtos de alta complexidade e difícil acompanhamento somente por análises químicas quali e quantitativas.

Os estudos farmacotécnicos foram realizados na UNIVALI com acompanhamento ativo do setor de desenvolvimento da Eurofarma, inicialmente com o estudo de formas farmacêuticas para via oral. Foram desenvolvidas cápsulas e comprimidos contendo 250 e 500 mg do extrato seco padronizado e, optou-se pela forma de comprimidos. A formulação foi reproduzida na empresa, com transposição para escala piloto. Foi adicionado o processo de revestimento nos comprimidos. Os comprimidos foram aprovados em estudo de estabilidade acelerada. As metodologias de controle de qualidade e estudo de dissolução foram desenvolvidas na Universidade, sempre em parceria com a Empresa.

Prospectando o uso do produto por pacientes pediátricos e com dificuldades de deglutição, para via oral também foi desenvolvido um produto líquido na forma de suspensão contendo 50 mg/mL do extrato padronizado^[24]. Além da via oral, a aplicação tópica do extrato foi estudada por avaliação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório e o desenvolvimento de um produto semissólido. O desenvolvimento da formulação do tipo creme contendo o extrato seco padronizado foi acompanhado por biomonitoramento e análises de controle de qualidade, sendo a metodologia analítica adaptada e validada^[25]. Posteriormente,

a incorporação do extrato em sistemas do tipo nanoemulsões demonstrou a potencialização da atividade anti-inflamatória tópica do extrato, ou seja, houve decréscimo da concentração necessária do extrato para o efeito farmacológico^[26].

Quanto à proteção intelectual, foi depositada patente junto ao INPI em outubro de 2007, bem como foi depositado o PCT em 2008 (PCT - BR2008/000319) com extensão para a Comunidade Europeia, EUA e Canadá. Também foram depositadas patentes internacionais na Venezuela, Argentina, Chile, Colômbia e México. Porém, devido ao elevado custo de manutenção das taxas, a UNIVALI desistiu de manter os pedidos de patente, mantendo somente a patente concedida no México e aguardando o resultado da exigência do INPI, respondida no final de 2018. Cabe ressaltar que várias reivindicações não foram aceitas, tais como o fato de que a obtenção de extratos convencionais não é considerada como inventiva, além disso, desde o depósito da patente no INPI houve mudança na legislação, motivando exigência com indeferimento de várias reivindicações constantes na versão original da patente^[27].

Recentemente, em 2019, iniciou-se um convênio entre a UNIVALI e outro Laboratório Farmacêutico nacional para a continuidade do projeto. Tendo em vista o interesse da empresa, novos experimentos farmacológicos estão em curso com perspectiva de protocolar a fase clínica II junto à ANVISA.

A experiência adquirida no desenvolvimento deste fitoterápico e as parcerias abraçadas neste projeto revelam como principais desafios no percurso do desenvolvimento de um produto de origem natural o estabelecimento de especificações de qualidade para os extratos vegetais e fitoterápicos, tendo em vista a indisponibilidade comercial de SQRs, especificamente do material vegetal em questão, a dificuldade na definição da atividade biológica dos marcadores ativos e o estabelecimento de métodos analíticos confiáveis, seletivos e mais abrangentes possíveis, visando quantificar um maior número de substâncias, tendo em vista a sinergia comumente observada nos IFAVs. Soma-se ainda a sensível questão da estabilidade dos IFAVs e a necessidade de métodos analíticos indicativos de estabilidade para monitorar os estudos de estabilidade acelerado e de longa duração dos fitoterápicos.

Neste projeto foi possível vivenciar desde o estabelecimento dos marcadores ativos, o seu desenvolvimento e obtenção a partir da própria planta, o desenvolvimento de métodos analíticos racionais, baseados em um dos marcadores mais estável, disponível comercialmente, bem como a validação analítica de métodos seletivos e confiáveis. Ao longo do desenvolvimento do projeto várias adaptações foram sendo necessárias, de modo a cumprir os requisitos regulatórios, como as recentes legislações relativas à validação analítica^[28].

Cabe ressaltar que, mesmo diante dos promissores resultados obtidos com o extrato em modelos animais, se fazem necessárias provas de conceito e reprodução de resultados em laboratórios distintos da origem para comprovar e adequar o projeto à legislação vigente. Ainda assim, perspectivas para novos usos terapêuticos do extrato estão sendo investigadas graças à parceria recente com outro laboratório nacional. Os resultados promissores obtidos permitiram várias conquistas que demonstraram inequivocamente o sucesso da parceria, como o 1º Lugar no Prêmio Caspar Stemmer de Inovação-FAPESC-SC, Protagonista de Inovação, 2012 e Finalista do Prêmio Santander, Guia do Estudante – Parceria com o Setor Privado, 2013.

Conclusão

Para uma Universidade Comunitária, que depende basicamente de recursos de mensalidades e captados via órgãos de fomento para sustentar atividades de pesquisa e desenvolvimento, a participação neste promissor projeto em parceria com indústrias farmacêuticas foi muito relevante e vantajosa^[29], destacando-se: i) melhoria da infraestrutura para melhorar a qualidade de ensino, pesquisa e extensão, por meio da aquisição de equipamentos de ponta e construção de novos laboratórios, ii) contribuição expressiva na formação de recursos humanos especializados por meio de bolsas aos alunos de graduação e pós-graduação, iii) aumento considerável da produção científica, por meio de publicação em periódicos de impacto, participação em eventos científicos, etc., iv) premiação pelos resultados alcançados, dando maior visibilidade institucional.

Referências

1. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol. Advances**. 2015; 33(8): 1582–1614. ISSN 0734-9750. [[CrossRef](#)].
2. Cordell GA. Sustainable medicines and global health care. **PI Med**. 2011; 77(5): 1129-1138. ISSN 1439-0221. [[CrossRef](#)].
3. Cragg GM, Katz F, Newman DJ, Rosenthal J. The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research. **Nat Prod Rep**. 2012; 29(12): 1407–1423. ISSN 1460-4752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
4. Burton G, Evans-Illidge EA. Emerging R and D law: the Nagoya Protocol and its implications for researchers. **ACS Chem Biol**. 2014; 9(3): 588–591. ISSN 1554-8937. [[CrossRef](#)].
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014, D.O.U. 14/05/14. [[Link](#)].
6. Bucar F, Wube A, Schmid M. Natural product isolation - how to get from biological material to pure compounds. **Nat Prod Rep**. 2013; 30(4): 525–545. ISSN 1460-4752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
7. Dall'orto FAC, Garlipp RCD, Brauner JL, Miranda MT. Concentrações de alguns macro e micronutrientes em essências florestais do parque da escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. **Anais da E. S. A de Luiz de Queiroz**, 1976, p. 233-242.
8. Lorenzi H. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003. 368 p. ISBN: 8586714194.
9. Krisnawati H, Kallio MH, Kanninen M. ***Aleurites moluccana* (L.) Willd.: ecology, silviculture and productivity**. Center for International Forestry Research - CIFOR, Bogor, Indonesia. 2011. ISBN: 978-602-8693-40-0. [[CrossRef](#)].
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução **RE nº 322**, de 6 de fevereiro de 2017. D.O.U. 07/02/2017. [[Link](#)].
11. Meyre-Silva C, Mora TC, Santos ARS, Dal Magro J, Yunes RA, Delle-Monache F et al. A triterpene and a flavonoid C-glycoside from *Aleurites moluccana* L. (Willd.) (Euphorbiaceae). **Lat Am J Pharm**. 1997, 16: 169-172. ISSN 0326-2383.

12. Meyre-Silva C, Mora TC, Biavatti MW, Santos ARS, Dal Magro J, Yunes RA et al. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves L. (Willd.). **Phytomedicine** 1998a, 5(2): 109-113. ISSN 0944-7113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
13. Meyre-Silva C, Mora TC, Delle-Monache F, Dal Magro J, Santos ARS, Yunes RA et al. Investigação fitoquímica e análise farmacológica das folhas e cascas de *Aleurites moluccana* L. (Willd.). **Alicance**. 1998b; 2: 71-76. ISSN 1983-716X.
14. Meyre-Silva C, Santos ARS, Cechinel Filho V, Mora TC, Dal Magro J. Atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico e de compostos isolados da *Aleurites moluccana* (L.). **Alicance**. 1998c; 2: 46-52. ISSN 1983-716X.
15. Meyre-Silva C, Yunes RA, Santos ARS, Dal Magro J, Delle-Monache F, Cechinel Filho V. Isolation of C-glycoside flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* leaves. **PI Med**. 1999, 65(3): 293-294. ISSN 1439-0221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
16. Pedrosa RC, Meyre-Silva C, Cechinel Filho V, Benassi JC, Oliveira LFS, Zancanaro V et al. Hypolipidaemic activity of methanol extract of *Aleurites moluccana*. **Phytother Res**. 2002; 16(8): 1-4. ISSN 1099-1573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
17. Matos DCS, Meyre-Silva C, Lucinda-Silva RM, Cechinel-Filho V, Bresolin TMB. Assay of total flavonoids in dried extract of *Aleurites moluccana*. **Lat Am J Pharm**. 2011; 30(2): 213-219. ISSN 0326-2383.
18. Cesca TG, Block LC, Machado MS, Witkowski C, Meyre-Silva C, Souza MM et al. Validation of Stability Indicating HPLC method for the major flavonoids in the of spray dryer leaf extract of *Aleurites moluccana* L. Willd. **Curr Pharm Anal**. 2012a; 8(4): 349-359. ISSN 1875-676X. [[CrossRef](#)].
19. Quintão NLM, Silva CM, Silva G, Antonniali CS, Rocha LW, Silva RML et al. *Aleurites moluccana* L. Willd leaves: mechanical antinociceptive properties of a standardized dried extract and its chemical markers. **Evid Based Complement Altern Med**. 2011; 2011: 1-10. (print); 1741-4288 (web). ISSN 1741-427X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
20. Quintão NLM, Antonniali CS, da Silva GF, Rocha LW, de Souza MM, Malheiros A et al. *Aleurites moluccana* and its main active ingredient, the flavonoid 2-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. **Pharmacol Biochem Behav**. 2012; 102(2): 302-311. ISSN 0091-3057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
21. Quintão NLM, Rocha LW, da Silva GF, Reichert S, Claudino VD, Lucinda-Silva RM et al. Contribution of α,β -Amyrenone to the Anti-Inflammatory and Antihypersensitivity Effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. **BioMed Res Int**. 2014; 2014: 1-11. ISSN 2314-6141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
22. Hoepers S, Tolentino SHGM, Quintão NLM, Santin JR, Cechinel-Filho V, Lucinda-Silva RM et al. Topical anti-inflammatory activity of semisolid containing standardized *Aleurites moluccana* L. Willd (Euphorbiaceae) leaves extract. **J Ethnopharmacol**. 2015; 173: 251-255. ISSN 1872-7573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
23. Quintão NLM, Pastor MVD, Antonniali CS, Da Silva GF, Rocha LW, Berté TE et al. *Aleurites moluccanus* and its main active constituent, the flavonoid 2--O-rhamnosylswertisin, in experimental model of rheumatoid arthritis. **J Ethnopharmacol**. 2019; 235: 248-254. ISSN 1872-7573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
24. Mac Donald R, Camargo SS, Meyre-Silva C, Quintão NLM, Cechinel-Filho V, Bresolin TMB et al. Development of an oral suspension containing dry extract of *Aleurites moluccanus* with anti-inflammatory activity. **Rev Bras Farmacogn**. 2016; 26(1): 68-76. ISSN 1981-528X. [[CrossRef](#)].
25. Cesca TG, Faqueti L, Rocha LW, Meira NA, Bittencourt CMS, Souza MM et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euphorbiaceae standardized leaf extract. **J Ethnopharmacol**. 2012b; 143(1): 355-362. ISSN 1872-7573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

26. Furaer da Rocha AC. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extrato de folhas de *Aleurites moluccanus* L. Willd (Euphorbiaceae) com atividade anti-inflamatória tópica.** 168f. Itajaí; 2017. Dissertação de Mestrado [em Ciências Farmacêuticas] - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Itajaí, SC; 2017. [[Link](#)].

27. Brasil. Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI. **Manifestação sobre invenção, modelo de utilidade, certificado de adição de invenção em 1ª instância.** Número do Processo: PI 0804525-9. Petição 870180164578, 2018.

28. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **RDC Nº 166**, de 24 de julho de 2017. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". D.O.U. Poder Executivo, de 25/07/2017.

29. Cechinel Filho V. **Medicamentos de origem vegetal: atualidades, desafios, perspectivas.** 2ª ed. Editora UNIVALI: Itajaí-SC; 2017. 223p.

Histórico do artigo | Submissão: 17/12/2019 | **Aceite:** 24/08/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Bresolin TMB, Silva RML, Meyre-Silva C, Quintão NLM, et al. Desenvolvimento de fitoterápicos a partir das folhas da noqueira-da-índia (*Aleurites moluccanus*): relato de experiência de parceria entre uma Universidade Comunitária e indústrias farmacêuticas nacionais. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 538-546. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/935>>. 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.



Contributions of bioinformatics to study natural antifungals: review in a pharmacological context

DOI 10.17648/2446-4775.2020.944

Miozza, Valeria¹; Barceló, Sebastián¹; Passero, Pablo¹; Farah, Ezequiel²; Pérez, Cristina^{1*}.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Odontología, Farmacología, Buenos Aires, Argentina.

²Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Farmacología, Buenos Aires, Argentina.

*Correspondência: cristina.perez@odontologia.uba.ar.

Abstract

In the last decades, computational techniques have become valuable tools for research of biological systems. They are applied to biochemistry, immunology, pharmacology, etc. Regarding antimicrobial agents, the search for new medicaments or pharmacological strategies is fully justified because of different reasons such as emergence of resistance and drug interactions, particularly in immunocompromised patients. In this work we proposed to update knowledge about application of computational methods to research on natural antifungal compounds. We searched scientific findings through electronic databases according to pertinence and relevance of the information. Then, we analyzed and selected articles in order to organize the information in different items according to set schedules. We updated information about *in silico* studies regarding new and already known natural antifungal agents. Data were then placed in a pharmacological context regarding molecular targets, mechanisms of therapeutic and toxic effects, as well as resistance mechanisms and their reversion, with special focus on human mycoses. Thus, in this review we summarized important contributions of bioinformatics studies to the design and discovery of new potential agents. We also integrated data related to pharmacology and other disciplines in order to provide a framework for the bioinformatics findings.

Keywords: Bioinformatics. Computational studies. Theoretical studies. Antifungal agents. Natural products.

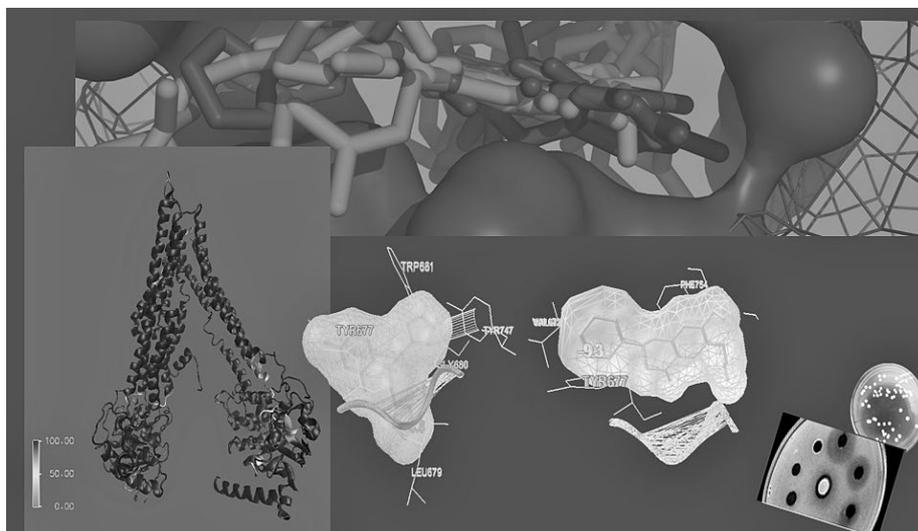
Introduction

Computational techniques have become valuable tools for drug studies over the last decades. When they are applied to biochemical phenomena, bioinformatics arises. It is defined as the science of managing and analyzing biological data using advanced computing techniques, according to the International Human Genome Sequencing Consortium^[1].

According to other authors, bioinformatics would be a practical discipline that employs a wide range of computational techniques, database design and data mining, macromolecular geometry, phylogenetic tree construction, prediction of protein structure and function, gene finding and expression data clustering. Some authors have integrated a variety of computational methods and heterogeneous data sources^[2].

Bioinformatics allows the knowledge of new chemical structures and functions and new targets to drive drug design in a more precise and accurate way. Since 1980, the idea of rational use of drugs arises applying the "rational design of new drugs" (structure-guided drug design) and using technologies related to structural biology to generate a target protein and small molecules *in silico* as basis for drug generation^[3] (FIGURE 1).

FIGURE 1: Different bioinformatics techniques are applied to diverse biological fields.



Computational methods offer the advantage of low costs and rapid acquisition of information. They could be complemented by experimental research to optimize the route of scientific work. In this way, bioinformatics serves to expand the horizon of the experimental conclusions, and *vice versa*. It is being applied to different fields as biochemistry, biophysics, genetics, pharmacology, toxicology, immunology, bromatology and agriculture. Bioinformatics is largely involved in the development of new drugs. In 2016, Tamay-Cach et al.^[4] summarized the methods most used in the search and design of drugs used against bacteria, virus and parasites.

Our labs have complemented experimental and computational studies on antifungal agents and updated contributions of bioinformatics to pharmacology of natural products ^[5-9]. These investigations take place in the frame of recommendations of the World Health organization (WHO), which promotes the search of pharmacological products from natural resources. Considering current increase in resistance to antimicrobial agents, particularly to antifungal ones (as discussed below), the discovery of natural drugs and biological activities is absolutely necessary for the safe treatment of infections.

In this review we update information on advances in natural antifungal agents, particularly regarding bioinformatics studies. We integrate data related to pharmacology and other disciplines in order to provide a framework for the bioinformatics findings.

Thus, this review has been prepared by collecting information about natural antifungal products with therapeutic efficacy, their molecular targets and the eventual resistance developed. We have looked especially for bioinformatics data related to the study of the items above mentioned.

Material and methods

Methodology used for the review

Information about *in silico* studies regarding new and already known natural antifungal agents was updated. Scientific findings were searched and screened through electronic databases according to article titles and abstract text. Selected articles were then analyzed in order to organize the information in different items according to set schedules. Data were related to molecular targets, mechanisms of therapeutic and toxic actions as well as resistance mechanisms and their reversion, with special focus on human mycoses.

Electronic databases used: PubMed (Medline), Scopus, Lilacs, Web of Science, Google Scholar.

The terms used in the searches were related to the above mentioned data and may be summarized as follows: *in silico*, bioinformatics, computational, theoretical, docking studies AND/OR natural antifungal, antimicrobial products, antifungal therapeutic and adverse effects, resistance mechanisms, bioinformatics studies and biological activities related to human mycoses.

Criteria for inclusion or exclusion of articles were the scientific pertinence and relevance of the information reported in relation to the topics focused.

Studies on natural products

Different biological activities

Since prehistoric times, people have used natural resources for nutritional and medicinal purposes. For example, they consume numerous plants for the preparation of meals and beverages using different techniques that may alter the chemical composition of some compounds. Plants can be used as cheap sources of different nutritive substances like proteins, carbohydrates, lipids and crude fibers. Numerous studies about nutritional quality of diverse plants have been made^[10].

In recent years, the interest in the development of functional foods and nutraceuticals has increased due to the beneficial health effects associated with their intake. Since 1950, microalgae were mainly viewed as an alternative food source and functional biomolecules^[11].

Custódio et al.^[12] found that organic and water extracts of some microalgae species exhibit antioxidant, antitumoral activities and acetyl cholinesterase inhibition, besides a highly unsaturated fatty acids profile. These results suggest that those microalgae, particularly *I. galbana* T-ISO, could be a source of biomolecules for pharmaceutical and food industries.

Regarding medicinal fields, plants belonging to diverse families are popularly used to treat different diseases. Some scientific works have identified various compounds which are responsible for many therapeutic effects^[13,14].

The Argentine folk medicine employs many plants to counteract diverse diseases such as catarrh, bronchitis, pneumonia and diarrheas. Our labs have carried out several studies on antimicrobial activity related to some of the mentioned plants. The antimicrobials reported can be extracted easily in an aqueous medium. This observation may be useful in isolating these principles from consumption residues (*i.e.* fruit pericarp of oranges and pomegranates) at a reduced cost. Moreover, *Citrus aurantium* L. (bitter orange) pericarps are

codified in the Pharmacopeias of Argentina and Great Britain. They contain flavonoids as naringin and hesperidin, which are active against *Candida albicans* and dermatophytes. Besides antimicrobial properties, flavonoids show antioxidant anti-inflammatory, antiasmatic, antiagregant and hormonal effects^[15-17].

We have conducted other studies in relation to natural compounds isolated from plants of Argentina. The compounds studied were mainly flavonoids with different chemical formulae and some of them were present in essential oils. Others have an infrequent distribution in nature and exhibit specific biological activities that allow them to be classified as potential medicaments to collaborate with others existing in the pharmaceutical market^[5,18,19]. Other compounds showing bioactivity are alkaloids, lectins, saponins and peptides, which were found in plants as well as in microorganism's cultures contained in soil samples^[20].

β -citronellol, a monoterpene contained in several plant essential oils, modulates expression of ERG genes and ergosterol levels as part of its antifungal effect^[21]. The results suggest that β -citronellol has various modes of action, including inhibition of morphological transition in *C. albicans* and decrease of the secretion of hydrolytic enzymes involved in the early stage of infection as well as modulation of the expression of associated genes. In fact, it has a significant inhibitory effect on biofilm formation and secretion of extracellular proteinases and phospholipases as well in the membrane ergosterol levels.

Among the medicaments of vegetal origin, we can mention the cardiotoxic digoxin, the analgesic morphine, the antitumoral vincristine and the antiseptic agent eugenol, widely used in Odontology. Coming from other natural resources, the betalactam antibiotics are produced by fungal cultures and the polypeptides ones by soil bacteria.

Recently, investigation on natural resources has been increased due to vital need for new agents. In this sense, it can be also applied to different fields such as medicine, pharmacy, biochemistry, bromatology, cosmetology, agriculture, etc.

Research on natural antifungal agents. Human mycoses

Fungal infections are a public health problem. The most common fungal pathogens for humans are the species of *Candida* and *Aspergillus*. Opportunistic yeast *Candida*, mainly *C. albicans*, is responsible of 50-90% human candidiasis^[22].

The use of antimicrobial drugs always carries the risk that resistance appears due to adaptable nature of the microorganism populations^[23]. The need for safe and effective antifungal drugs has increased in parallel with the expansion of immunocompromised patients at risk for fungal infections.

The major limitations associated with currently used antifungal compounds are low efficacy rate and severe side effects. Thus, it is necessary to search for new compounds with low toxicity on human cells.

Commonly used antifungal drugs belong to various pharmacological groups and are characterized by different mechanisms of action and spectrum of activity. They act mainly in cell membrane, cell wall and intracellular entities^[24]. Several actions have been stated for antifungal therapy; usually they are related to synthesis inhibition of ergosterol, squalene epoxidase, glucan, chitin, nucleic acids, proteins and microtubules^[25].

There are several chemical structures which have demonstrated antifungal activity such as those belonging to the groups of azoles, morpholines and other heterocyclic compounds. Different natural compounds have been reported as possible antifungal agents, such as phenols, flavonoids, coumarins, quinones, saponins, xanthenes, alkaloids and terpenoids^[26,27].

For many years, the treatment of invasive fungal infections was limited to amphotericin B. Afterwards, azoles and echinocandins have been mostly used for the treatment of fungal infections with high mortality rate^[28].

Antifungal drug targets

Sterol 14 alpha demethylase CYP51

Sterol 14 alpha demethylase is the main enzyme involved in ergosterol synthesis. Due to its inhibition, depletion of ergosterol is produced and accumulation of 14-methyl sterols results in impaired fungal cell growth. In *Candida albicans*, the enzyme is called CYP51 and is a member of Cytochrome P450 family that converts lanosterol into 4,4'-dimethylcholesta-8,14,24-triene-3-beta-ol. The essential role of CYP51 enzyme in fungi and yeast metabolism makes it an important target for antifungal drug design. Thus, azoles interfere with the synthesis of ergosterol by inhibiting this enzyme^[29,30].

There are many studies that apply informatics tools to natural and synthetic products. In 2015, Irfan and Abid^[31] carried out docking studies to build a three dimensional model of *Candida albicans* CYP51 and study its interactions with eighteen newly synthesized triazoles derived from naturally bioactive scaffolds.

Docking studies using I-TASSER (iterative threading assembly refinement) server for 3D showed that a compound containing the quinoline ring NT-03 binds with higher affinity the enzyme at the predicted site for medicaments, in accordance with experimental bioactivity data. The authors concluded that similar triazole derivatives can be developed as more effective antifungal agents.

N-Myristoyl transferase

Other therapeutic target is the enzyme N-Myristoyl transferase (NMT), which catalyzes the transfer of the 14-carbon saturated fatty acid myristate from myristoyl-CoA to the N-terminal glycine residue of a variety of eukaryotic cellular and viral proteins. NMT exists as isoenzymes that are involved in a wide variety of biological processes and function as protein kinases, kinase substrates, protein phosphatases, α -subunits of many heterotrimeric G-proteins and endothelial cell nitric oxide synthase^[32]. NMT participates in diverse biological processes, including signal transduction cascades and apoptosis. It has even been employed as drug target for human pathogens like *Candida* sp and proposed in antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics^[33,34].

Guerrero-Perilla et al.^[35] studied the docking of thirty-two natural compounds to the active site of N-myristoyl transferase (NMT) in comparison with a previously reported synthetic inhibitor. Among the tested compounds, alkaloids, flavonoids, xanthenes and quinones exhibited a stronger mean interaction with NMT than terpenoids, coumarins and phenolic derivatives. Particularly, affinities for an aporphine alkaloid, a prenylated flavonoid and two xanthenes resulted to be comparable with the reference inhibitor. The results allowed selecting three possible lead structures to continue search for antifungal drugs.

Mevalonate-5-diphosphate decarboxylase and other molecular targets of wortmannin

Fungal strains from soil samples are able to produce narrow to broad spectrum antifungal metabolites. Among them, *Penicillium sp* have ubiquitous occurrence in diverse ecological niches and demonstrate some important functional attributes associated with plant growth such as solubilisation of phosphorus, biological control of root diseases and phytohormone production^[36]. Several metabolites from *Penicillium spp*, such as paxisterol and compactin, have been reported for analgesic and antifungal properties in animals^[37].

Using soil samples as antifungal resources, Singh et al.^[38] isolated a cell-permeable metabolite known as wortmannin (Wtmn) from *Penicillium radicum*. It showed a broad spectrum on antifungal activity and irreversible inhibition of phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Among 38 fungal species, wortmannin was active against various strains of *Candida sp*, *Cryptococcus terreus*, *Trichophyton rubrum*, *Rhizoctonia oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigates*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium moniliforme* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Virtual screening predicted that the hydrophobic estrogen-related wortmannin may inhibit some targets more efficiently than known antifungal agents such as voriconazole and nikkomycin. The targets are: a) mevalonate-5-diphosphate decarboxylase (1FI4), responsible for sterol/isoprenoid biosynthesis; b) exocyst complex component SEC3 (3A58) where Rho- and phosphoinositide-dependent localization is present and c) Kre2p/ Mnt1p, a Golgi alpha 1,2-mannosyltransferase involved in the biosynthesis of yeast cell wall glycoproteins Singh et al.^[38].

The authors suggest that wortmannin produced by *P. radicum* is a promising lead compound which could be potentially used as efficient antifungal drug in the near future after appropriate structural modifications to reduce toxicity and improve stability.

Thioredoxin reductase on paracoccidioidomycosis

Invasive fungal infections have been important causes of morbidity and mortality, especially in the large population of immunocompromised patients^[39]. These infections have also increased significantly and represent a serious public health problem, because they are associated with prolonged length of hospital stay and, consequently, high costs for critically ill patients. The most important microorganisms agents involved in opportunistic mycoses are *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus spp*, whereas the most commonly endemic mycoses are due to *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Coccidioides spp*.

P. brasiliensis is known to cause the systemic granulomatous mycosis paracoccidioidomycosis. However, recent phylogenetic studies have established the involvement of a new species, named *Paracoccidioides lutzii*^[40]. The disease is restricted to Latin America, where ten million people are supposed to be infected with this fungus. The chronic form is the most frequent one among adult males and progresses slowly. The acute form is fast (weeks or months) and more severe, leading to high mortality levels^[41].

In this context, one promising fungal target is the thioredoxin reductase (TRR1), a flavoprotein enzyme involved in the oxidative stress resistance, regulation of DNA and methionine biosynthesis, cell growth, gene transcription and apoptosis. Abadio et al.^[42] studied the docking of *P. lutzii* TRR1 to 3,000 small molecules that had showed antifungal activity against *Paracoccidioides spp*. Twelve compounds were selected from

the results and then tested experimentally on *Paracoccidioides lutzii* and *P. brasiliensis*. Three of the compounds tested showed inhibitory activity against the fungal enzyme and were patented. Another compound demonstrated both selectivity and high antifungal activity against *Paracoccidioides* species. Once again, a rational combination of molecular modeling simulations and virtual screening of new drugs has provided a cost-effective solution to an early-stage medicinal challenge.

Emergence and reversion of antifungal resistance

In the three past decades a significant increase in the prevalence of resistance to antimicrobial agents has been detected. Resistance has important implications for morbidity, mortality and health care in hospitals as well as in the community.

The study of resistance to antifungal agents has lagged behind that of antibacterial resistance for several reasons. Perhaps fungal diseases were not recognized as important pathologies until relatively recent times. For example, the annual death rate due to candidiasis was steady between 1950 and 1970. Since 1970, this rate increased significantly in association with more widespread use of therapies that decrease the immune system, the indiscriminate use of broad-spectrum antibacterial agents, the advent of AIDS, etc.^[43].

For more than 30 years, amphotericin B was the sole drug available to control serious fungal infections, in spite of its nephrotoxicity. The approval of azoles in late 1980 meant a major achievement in consideration of the safety/efficacy ratio. However, their widespread use has been correlated with antifungal resistance.

It was tempting to compare mechanism of resistance to antifungal and antibacterial agents. Although it may be useful to develop a perspective common to the two kingdoms, there are some limitations due to their differences in biological structures, the generation time, the pharmacological targets and functions to be inhibited^[43].

The mechanisms of resistance to antifungal agents are closely related to those of action. The three main groups of antifungal agents in clinical use, azoles, polyenes and allylamine/thiocarbamates, interact directly or indirectly with ergosterol, which is the predominant component of the fungal cell membrane.

Resistance related to ergosterol synthesis

Resistance linked to this pathway may be mediated either by modification of the enzyme sterol 14 alpha-demethylase or by an overexpression of its encoding gene ERG11^[44]. Some fungal species are naturally resistant to azole drugs due to the chemical structure of the enzyme, which presents polymorphism. For example, *Aspergillus fumigatus* intrinsic resistance is related to the isoenzyme known as Cyp51Ap. Edlind et al.^[45] compared *in silico* the enzyme sequences from *Candida albicans* and *A. fumigatus*. They found that the substitution of the polar T315 residue by the non-polar alanine (T315A) in *C. albicans* enzyme is enough to confer fluconazole resistance to the yeast.

Aminoacid substitutions Y132 and K143 in ERG11 sequences of *Candida auris* confer a phenotype of resistance to fluconazol similar to that described for *Candida albicans*^[46]. *Candida auris*, recently recognized MDR yeast found in healthcare settings, is considered a major threat to ICU patients. Worldwide reports of *C. auris*, which was initially described in 2009, have considerably increased in less than a decade, witnessing its spread in different continents^[47,48]. MDR *C. auris* is causing persistent colonization and invasive infections

among hospitalized patients. In 2016, international health agencies including the US CDC^[49], ECDC^[50] and Pan American Health Organization (PAHO)/WHO^[51] warned about it.

Later experimental studies confirmed that the natural polymorphism I301 in the *Aspergillus fumigatus* enzyme Cyp51A_p is necessary and sufficient to explain the fluconazole intrinsic reduced susceptibility of the yeast. Thus, molecular changes in the enzyme may reverse the resistance to antifungal agents^[52].

Aspergillus fumigatus is the most common hyphomycete to cause disease in humans^[53,54]. It is intrinsically resistant to ketoconazole and fluconazole but normally susceptible to other available azole antifungal agents as itraconazole and posaconazole^[55,56].

Resistance related to efflux pumps

ABC transporters cdr

Polymorphism of other molecules such as drug transporters may also generate antifungal resistance. Efflux pumps are important molecular targets involved in antifungal resistance. Thus, reduced intracellular accumulation of drugs as a consequence of their rapid efflux is another prominent mechanism of resistance in *Candida* cells^[44,57].

Most commonly, genes encoding drug efflux pumps belonging to ATP binding cassette (ATP) and Major Facilitator superfamilies (MFS) of proteins are overexpressed, since ABC and MFS transporters are among the major players that contribute to azole resistance in clinical isolates of *Candida*.

The genome of *C. albicans* possesses 28 ABC and 95 MFS proteins; however, only ABC transporters *Ca cdr1*, *Ca cdr2*, *Cdr6p/Roa1p* and MFS transporter *Ca mdr1* are known to be multidrug transporters which play major role in drug extrusion from resistant strains. *Cdr1* is the major drug exporter in *C. albicans* and plays a key role in antifungal resistance. Even when *Ca cdr2* exhibits 84% identity with *Ca cdr1*, it has a distinct drug resistance profile^[58,59].

ABC proteins of *C. albicans* are divided into four subfamilies: PDR/ABCG, MDR associated protein (MRP)/ABCC, MDR/ABCB and adrenoleukodystrophy protein/ABCD. These transporters are usually located in plasma membrane, specifically *Cdr1p*, *Cdr2p*, *Cdr3p*, and *Cdr4p*, but can also be found in vacuolar membrane like *Adp1*^[60].

ABC proteins are generally made up of two domains located into the plasmatic membrane and two nucleotide-binding regions situated in the cytoplasm, being the non catalytic nucleotide-binding site essential in the transport mechanism of *Cdr1*'s protein^[59,60]. The transporters require energy from the ATP hydrolysis which is carried out at the last mentioned sites.

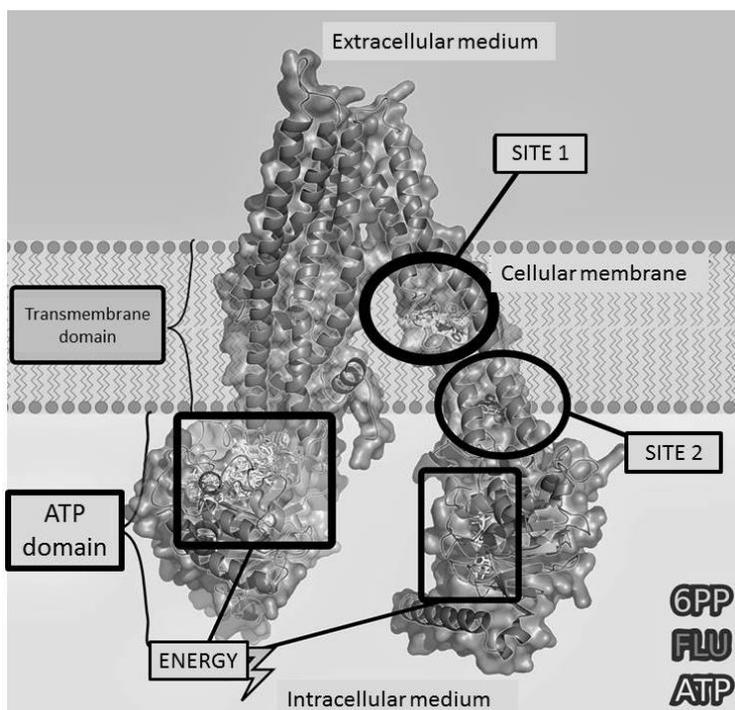
The range of *Ca cdr1* substrates varies enormously and includes structurally unrelated compounds such as azoles, lipids and steroids. This promiscuity towards substrates is a characteristic feature of most ABC-type drug transporters and makes their functionality more complex to understand^[57]. Nim et al.^[61] identified tetrazolium chloride and trimethyltin chloride like new substrates, and also discovered new substrate recognition sites. TMH 1, -2, -4, -8 and -11 harbour multiple overlapping drug-binding sites^[59].

Puri et al.^[62] made studies to build computational models for classification of substrates and non-substrates of *Ca cdr1* and *Ca mdr1*. Then they selected randomly 67 compounds of different characteristics in order to evaluate toxicity on *S. cerevisiae* strains over-expressing the mentioned transporters using experimental methods. Berberine, vinblastine and quinidine were found among the natural compounds that result common substrates of *Ca cdr1* and *Ca mdr1*.

In the search for novel modulators or inhibitors of these efflux pump proteins, our labs had reported that the prenylated flavonoid 2',4'-hydroxy - 5'-(1'' -methylallyl)- 6-prenyl pinocembrine (6PP) inhibits the ATP-dependent *cdr* transporters through a competitive mechanism and reverses azole resistance in *Candida albicans*. Besides this, it has an antimicrobial activity by itself ^[5,6].

In order to further analyze the possible molecular interactions between the transporters *cdr1* and *cdr2* with the ligands 6PP, fluconazole and adenosine triphosphate (ATP), preliminary bioinformatics studies were conducted. The compound 6PP and fluconazole could compete in different ways by a transmembrane stereo specific site of *Candida albicans* *cdr* pumps. The most probable site is shared by *cdr1* and *cdr2* and contributes selectively with some amino acids. In addition, 6PP may compete with ATP in the cytosolic domain and fluconazole would mimic it ^[7] (FIGURE 2). Since 6PP chemical formula was reviewed as 2',4'-hydroxy -5'-(1'' -methylallyl)-8-prenylpinocembrine (8PP), current bioinformatics studies are currently updated.

FIGURE 2: Structure of *Candida albicans* *cdr2* transporter showing proposed binding sites for 6PP, fluconazole and ATP. The models were generated and visualized through the VINA-AUTODOCK and PYMOL programs^[7].



Substitution of residues in *Ca cdr1* and other fungal ABC transporters plays an important role in ATP binding and hydrolysis and therefore are essential for drug efflux^[67].

ABC transporter pdr5 (Pdr5p)

There is a high structural and functional similarity between *Candida albicans* cdr1 and *Saccharomyces cerevisiae* pdr5 (Sc pdr5), even when some distinct functional features tend to distinguish them.

As the best-studied and most abundant ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, pdr5 mediates cellular detoxification and multidrug resistance (MDR). The predicted topological structure of pdr5p shows that it contains two nucleotide binding domains and two transmembrane domains which harbor twelve transmembrane helices, six extracellular loops and four intracellular loops. Pdr5 shares similar secondary topological structure with other similar molecules^[63].

To clarify the mechanisms of how pdr5 recognizes and extrudes a wide variety of compounds out of the cells, numerous mutants had been generated by random or site-directed mutagenesis. To investigate the potential loss-of-function mechanism Chen et al.^[60] used mutants of the ABC transporter and evaluated its efficacy by comparing results from computational and experimental methods. In order to study the structure–function relationship of pdr5, they used a recently published 3D model of the transporter mutations to perform a study on molecular docking to different compounds.

Mutations adjacent to the end of transmembrane helices 6 and 7 affect drug efflux capacity of yeast pdr5. These mutations might disturb interactions between the drugs and pdr5, preventing the drugs from approaching the intracellular or extracellular portal and subsequently from being exported by the transporter.

Methods used by bioinformatics

Bioinformatics uses different techniques and programs that have been reviewed by Tamay-Cach et al.^[4] and Diniz and Canduri^[64], in relation to their application in the knowledge of biological systems and in the study of antimicrobial agents. Different bioinformatics approaches discussed by Bencurova et al.^[65] help in the identification of novel fungal drug targets.

Among most used methods, virtual screening (VS), docking simulation, molecular dynamics (MD) simulations, biological sequence comparison by alignment, quantitative structure-activity relationship (QSAR), multi-target quantitative structure-activity relationship (mtQSAR) and multi-tasking quantitative structure biological effect relationships (mtk-QSBER) can be mentioned. Some examples and applications are stated below.

Biomolecular docking

According to Chaskar et al.^[66], docking methods are concerned with the study of the possible molecular interactions between a ligand and the binding site of a target macromolecule, usually an enzyme, a receptor or a transporter. In this context, Irfan and Abid^[31] applied docking methods to study the interactions of diverse triazole drugs with the enzyme lanosterol 14- α demethylase of *Candida albicans* (see section “Antifungal molecular targets” above).

A new way to find therapeutic targets of a given drug is the inverse docking. In this technique, the ligand is evaluated *in silico* for binding to different potential targets included into a digital protein cavity database. For example, the natural compound tanshinone has been associated with 10 potential disease targets related

to cortisone reductase deficiency and other disorders^[67]. Meanwhile, the natural flavanone 8PP could bind to different target macromolecules such as ATP cdr transporters, Hsp90 molecular chaperone and epidermal growth factor receptor^[8].

Alignments

Sequential and structural alignment is another bioinformatics method which compares DNA, RNA or protein structures. Study of similarities between compared sequences assigns function to genes and proteins that may be involved not only in medicine but in agriculture and other fields^[68,69]. Edlind et al.^[45] compared *in silico* the Cyp51A enzyme sequences from *Candida albicans* and *A. fumigatus* (see section “Resistance related to ergosterol synthesis” above). The multiple sequence alignment (MSA) is a powerful tool to include a function or a structure by a determined consensus sequence^[70].

Conclusion

From its beginning, bioinformatics has grown by leap and bounds. Many laboratory groups in the world perform several bioinformatics studies to have a better vision of the experimental hypothesis or to complement it. Moreover, the use of bioinformatics techniques allows the research groups to direct an experimental design towards a positive outcome, obtaining a virtual preliminary result of what would happen in reality.

Bioinformatics has made important contributions to the study of compounds with diverse pharmacological activities. Among them, antifungal agents deserve special consideration due to the emergence of resistance. In this sense, the search for strategies addressed to reverse it or to find new agents with high efficacy and low toxicity are fully justified, particularly taking into account that other factors, such as drug interactions, may occur. Complementing *in silico* and experimental methods may be useful to optimize cost of resources and time.

Acknowledgments

This work was granted by the University of Buenos Aires (grant UBACYT 2018, 20020170200079BA). We thank to Milagros Muthular for technical assistance.

References

1. **International Human Genome Sequencing Consortium**. The Human Genome Project. Information Archive glossary. 2001. [\[Link\]](#).
2. Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. **Methods Inf Med**. 2001; 40(4): 346-358. ISSN 0026-1270. [\[PubMed\]](#).
3. Peláez F. Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. **An Real Soc Española Quim**. 2011; 107(1): 36-45. ISSN 1575-3417. [\[Link\]](#).
4. Tamay-Cach F, Villa-Tanaca ML, Trujillo-Ferrara JG, Alemán-González-Duhart D, Quintana-Pérez JC, González-Ramírez IA et al. *In Silico* Studies Most Employed in the Discovery of New Antimicrobial Agents. **Curr Med Chem**. 2016; 23(29): 3360-3373. ISSN 1875-533X. [\[CrossRef\]](#).

5. Pérez C, Tiraboschi IN, Ortega MG, Agnese AM, Cabrera JL. Further antimicrobial studies on 2' 4'-dihydroxy- 5'-(1'''-dimethylallyl)- 6-prenylpinocembrin from *Dalea elegans*. **Pharm Biol.** 2003; 41(3): 171-174, ISSN 1744-5116. [[CrossRef](#)].
6. Peralta MA, Calise M, Fornari MC, Ortega MG, Diez RA, Cabrera JL et al. A prenylated flavanone from *Dalea elegans* inhibits rhodamine 6G efflux and reverses fluconazole resistance in *Candida albicans*. **PI Med.** 2012; 78(10): 981-987. ISSN 0032-0943.
7. Barceló S, Peralta MA, Ortega MG, Cabrera JL, Pérez C. Interacciones moleculares de un flavonoide prenilado con transportadores de antimicóticos dependientes de ATP. **Rev Fac Odon UBA.** 2014; 29(66): 26-36. ISSN 1668-8538.
8. Barceló S, Farah E, Pérez C. Interacciones de un compuesto de origen vegetal con distintos blancos terapéuticos. In **IX international symposium on natural products chemistry and applications**. Termas de Chillán, Chile. November 22-25. 2016; 134.
9. Barceló S, Miozza V, Passero P, Farah E, Pérez, C. Aplicaciones de la informática en el estudio de productos naturales. **Rev Fac Odontol UBA.** 2017; 32(72): 22-31. ISSN 1668-8538. [[Link](#)].
10. Saldanha LG, Dwyer JT, Betz JM. Culinary spice plants in dietary supplement products and tested in clinical trials. **Adv Nutr.** 2016; 7(2): 343-348. ISSN 2156-5376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
11. Chacón-Lee TL, González-Maríño GE. Microalgae for “healthy” foods—possibilities and challenge. **Comp Rev Food Sci Food Saf.** 2010; 9(6): 655–675. ISSN 1541-4337. [[CrossRef](#)].
12. Custódio L, Soares F, Pereira H, Barreira L, Vizetto-Duarte C, João Rodrigues M et al. Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. **J Appl Phycol.** 2014; 26(1): 151-161. ISSN 1573-5176. [[CrossRef](#)].
13. Cicero AFG, Colletti A. Combinations of phytomedicines with different lipid lowering activity for dyslipidemia management: The available clinical data. **Phytomedicine.** 2016; 23(11): 1113-1118. ISSN 1618-095X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
- 14 Oliveira JS, Silva AA, Silva VA Jr. Phytotherapy in reducing glycemic index and testicular oxidative stress resulting from induced diabetes: a review. **Braz J Biol.** 2017; 77(1): 68-78. ISSN 1678-4375. [[CrossRef](#)].
15. Anesini C, Pérez C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol.** 1993; 39(2): 119-128. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)].
16. Pérez C, Suarez C. Antifungal activity of plant extracts against *Candida albicans*. **Am J Chin Med.** 1997; 25(2): 181-184. ISSN 1793-6853. [[CrossRef](#)].
17. Elingold I, Isollabella MP, Casanova M, Celentano AM, Pérez C, Cabrera JL et al. Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. **Chem Biol Interact.** 2008; 171(3): 294-305. ISSN 1872-7786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
18. Pérez C, Agnese AM, Cabrera JL. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): Chemical composition and antimicrobial activity tests. **J Ethnopharmacol.** 1999; 66(1): 91-96. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
19. Agnese AM, Pérez C, Cabrera JL. *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. **Phytomedicine.** 2001; 8(5): 389-394. ISSN 1618-095X. [[CrossRef](#)].
20. Pérez C, Suarez C, Castro G. Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15. **J Biotechnol.** 1992; 26(2-3): 331-336. ISSN 1873-4863. [[CrossRef](#)].

21. Sharma Y, Rastogi SK, Perwez A, Rizvi MA, Manzoor N. β -citronellol alters cell surface properties of *Candida albicans* to influence pathogenicity related traits. **Med Mycol**. ISSN 1365-280X. [[CrossRef](#)].
22. Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM, Hundeiker M, Bonifaz A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **J Dtsch Dermatol Ges**. 2013; 11(5): 381-394. ISSN 1610-0387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
23. Anderson JB. Evolution of antifungal - drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. **Nat Rev Microbiol**. 2005; 3(7): 547-556. ISSN 1740-1534. [[CrossRef](#)].
24. Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clin Proc**. 2011; 86(8): 805-817. ISSN 1942-5546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
25. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorg Med Chem**. 2012; 20(19): 5678-5698. ISSN 0968-0896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
26. Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS et al. Natural products-antifungal agents derived from plants. **J Asian Nat Prod Res**. 2009; 11(7): 621-638. ISSN 1028-6020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
27. Arif T, Mandal TK, Dabur R. "Natural products: Anti-fungal agents from plants". In: **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**; V.K. Tiwari, B.B. Mishra (editors), Research Signpost: Kerala, India, 2011; pp. 283-311. ISBN 9788130804484.
28. Mansfield BE, Oltean HN, Oliver BG, Hoot SJ, Leyde SE, Hedstrom L et al. Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. **PLoS Pathog**. 2010; 6(9). [[CrossRef](#)].
29. Bard M, Lees ND, Turi T, Craft D, Cofrin L, Barbuch R et al. Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. **Lipids**. 1993; 28(11): 963-967. ISSN 1558-9307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
30. Lamb DC, Kelly DE, Schunk WH, Shyadehi AZ, Akhtar M, Lowe DJ et al. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. **J Biol Chem**. 1997; 272(9): 5682-5688. ISSN 1083-351X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
31. Irfan M, Abid M. Three dimensional structure modeling of lanosterol 14- α demethylase of *Candida albicans* and docking studies with new triazole derivatives. **Chem inform**. 2015; 1(1,4):1-8. ISSN 2470-6973. [[Link](#)].
32. Bhatnagar RS, Fütterer K, Farazi TA, Korolev S, Murray CL, Jackson-Machelski E et al. Structure of N-myristoyl-transferase with bound myristoylCoA and peptide substrate analogs. **Nat Struct Biol**. 1998; 5(12): 1091-1097. ISSN 1072-8368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
33. Gelb MH, Van Voorhis WC, Buckner FS, Yokoyama K, Eastman R, Carpenter EP et al. Protein farnesyl and N-myristoyl transferases: Piggy-back medicinal chemistry targets for the development of antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics. **Mol Biochem Parasitol**. 2003; 126(2):155-63. ISSN 0166-6851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
34. Wright MH, Heal WP, Mann DJ, Tate EW. Protein myristoylation in health and disease. **J Chem Biol**. 2010; 3(1): 19-35. ISSN 1864-6158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
35. Guerrero-Perilla C, Bernal FA, Coy-Barrera ED. Molecular docking study of naturally-occurring compounds as inhibitors of N-myristoyl transferase towards antifungal agents discovery. **Rev Colomb Cien Quím Farm**. 2015; 44(2): 162-178. ISSN 0034-7418. [[CrossRef](#)].

36. Wakelin SA, Ryder MH, Warren RA. Effect of soil properties on growth promotion of wheat by *Penicillium radicum*. **Aust J Soil Res**. 2004; 42(8): 897–904. ISSN 0004-9573. [[CrossRef](#)].
37. Vining LC. Functions of secondary metabolites. **Annu Rev Microbiol**. 1990; 44: 395-427. ISSN 0066-4227. [[CrossRef](#)].
38. Singh V, Tripathi CKM, Katti SB, Praveen V, Tripathi D, Haque S. Isolation, characterization and antifungal docking studies of wortmannin isolated. **Sci Rep**. 2015; 5: 11948. [[CrossRef](#)].
39. Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **J Clin Microbiol**. 2005; 43(9): 4434-4440. ISSN 0095-1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
40. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**. 2009; 52(2): 273-283. ISSN 1095-9513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
41. Restrepo A, Benard G, Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**. 2008; 29(2): 182-197. ISSN 1069-3424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
42. Abadio AKR, Kioshima ES, Leroux V, Martins NF, Maigret B, Felipe MSS. Identification of new antifungal compounds targeting thioredoxin reductase of *Paracoccidioides* Genus. **PLoS ONE**. 2015; 10(11): e0142926. [[CrossRef](#)].
43. Ghannoumand MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**. 1999; 12(4): 501-517. ISSN 1098-6618. [[PubMed](#)].
44. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **J Infect Dis**. 2017; 216(3): S445-S451. ISSN 1537-6613. [[CrossRef](#)].
45. Edlind TD, Henry KW, Metera KA, Katiyar SK. *Aspergillus fumigatus* CYP51 sequence: potential basis for fluconazole resistance. **Med Mycol**. 2001; 39(3): 299-302. ISSN 1369-3786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
46. Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, Kordalewska M, Kumar A, Sarma S et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. **J Antimicrob Chemother**. 2018; 73(4): 891-899. ISSN 1460-2091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
47. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathog**. 2017; 13(5): 1-10, e1006290. [[CrossRef](#)].
48. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clin Infect Dis**. 2017; 64(2):134-140. ISSN 1537-6591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
49. Clinical Alert to U.S. Healthcare Facilities—June 2016. **Global Emergence of Invasive Infections Caused by the Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris***. [[Link](#)].
50. ***Candida auris* in Healthcare Settings-Europe**. [[Link](#)].
51. Pan American Health Organization/ World Health Organization (PAHO/ WHO). ***Candida auris*' Outbreaks in Health Care Services — Epidemiological Alert**. [[Link](#)].
52. Leonardelli F, Macedo D, Dudiuk C, Cabeza MS, Gamarra S, Garcia-Effron G. *Aspergillus fumigatus* intrinsic fluconazole resistance is due to the naturally occurring T301I substitution in Cyp51Ap. **Antimicrob Agents Chemother**. 2016; 60(9): 5420-5426. ISSN 1098-6596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

53. Doligalski CT, Benedict K, Cleveland AA, Park B, Derado G, Pappas PG et al. Epidemiology of invasive mold infections in lung transplant recipients. **Am J Transplant**. 2014; 14(6): 1328-1333. ISSN 1600-6143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
54. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. **J Infect**. 2012, 65(5): 453-464. ISSN 1532-2742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
55. Garcia-Effron G, Dilger A, Alcazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigates*. **J Clin Microbiol**. 2008; 46(4): 1200-1206. ISSN 1098-660X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
56. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyannis DP, Marr KA et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**. 2008; 46(3): 327-360. ISSN 1537-6591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
57. Prasad R, Sharma M, Kaur Rawal M. Functionally Relevant Residues of Cdr1p: A Multidrug ABC Transporter of Human Pathogenic *Candida albicans*. **J Amino Acids**, 2011, Article ID 531412. ISSN 2090-0112. [[CrossRef](#)].
58. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology**. 1997; 143(Pt2): 405-416. ISSN 1465-2080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
59. Prasad R, Balzi E, Banerjee A, Khandelwal NK. All about CDR transporters: Past, present, and future. **Yeast**. 2019; 36(4): 223-233. [[CrossRef](#)].
60. Chen Z, Li J, Wang W, Guo X, Li Y, Mao X et al. Mutations adjacent to the end of transmembrane helices 6 and 7 independently affect drug efflux capacity of yeast ABC transporter Pdr5p. **Biochim Biophys Acta**. 2014; 1838(3): 932-939. ISSN 0005-2736. [[CrossRef](#)].
61. Nim S, Monico A, Rawal MK, Duarte N, Prasad R, Di Pietro A et al. Overcoming multidrug resistance in *Candida albicans*: Macrocyclic diterpenes from Euphorbia species as potent inhibitors of drug efflux pumps. **PI Med**. 2016; 82(13): 1180-1185. ISSN 0032-0943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
62. Puri N, Prakash O, Manoharlal R, Sharma M, Ghosh I, Prasad R. Analysis of physico-chemical properties of substrates of ABC and MFS multidrug transporters of pathogenic *Candida albicans*. **Eur J Med Chem**. 2010; 45(11): 4813-4826. ISSN 0223-5234. [[CrossRef](#)].
63. Rutledge RM, Esser L, Ma J, Xia D. Toward understanding the mechanism of action of the yeast multidrug resistance transporter Pdr5p: A molecular modeling study. **J Struct Biol**. 2011; 173(2): 333-344. ISSN 1047-8477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
64. Diniz WJS, Canduri F. Review article. Bioinformatics: an overview and its applications. **Genet Mol Res**. 2017; 16(1): 1-21. ISSN 1676-5680. [[Link](#)]. [[CrossRef](#)].
65. Bencurova E, Gupta SK, Sarukhanyan E, Dandekar T. Review. Identification of antifungal targets based on computer modeling **J Fungi (Basel)**. 2018; 4(3): 81. ISSN 2309-608X. [[CrossRef](#)].
66. Chaskar P, Zoete V, Röhrig UF. Toward On-The-Fly Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) Docking: Development and Benchmark of a Scoring Function. **J Chem Inf Model**. 2014; 54(11): 3137-3152. ISSN 1520-5142.
67. Chen SJ. A potential target of Tanshinone IIA for acute promyelocytic leukemia revealed by inverse docking and drug repurposing. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2014; 15(10): 4301-4305. ISSN 2476-762X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

68. Singh VK, Singh AK, Chand R, Kushwaha C. Role of Bioinformatics in agriculture and sustainable development. **Int J Bioinformatics Res**. 2011; 3(2): 221-226. ISSN 0975-9115. [\[Link\]](#).
69. Taylor WR, Orengo CA. Protein structure alignment. **J Mol Biol**. 1989; 208(1): 1-22. ISSN 0022-2836.
70. Lipman DJ, Altschul SF, Kececioglu JD. A tool for multiple sequence alignment. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1989; 86(12): 4412-4415. ISSN 1091-6490.

Histórico do artigo | **Submissão:** 20/12/2019 | **Aceite:** 17/08/2020 | **Publicação:** 18/12/2020

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

Como citar este artigo: Miozza V, Barceló S, Passero P, Farah E, Pérez C. Contributions of bioinformatics to study natural antifungals: review in a pharmacological context. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(4): 547-562. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/944>>. 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.

[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 Ensaio Clínicos listados pela Organização Mundial da Saúde ou no National Institute of Health (NIH) (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 Medicinais: 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) e com a Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>). Cultivares ou variedades devem ser correlacionados ao nome científico (por exemplo, *Ximenia 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. $1 \times 10^{-5} \text{ m}^3$) ou litro (e.g. 5 μL , 5 mL, 5 L). Para concentrações, usar μM , $\mu\text{mol L}^{-1}$ or mg L^{-1} . 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.

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 aríete: método gráfico. Belo Horizonte: Ed. UFMG; 1988. (Inédito)

Patente

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

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

Legislativa

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

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

Base de Dados

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

Documentos de Associações/Organizações

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

Antes de submeter o manuscrito é importante:

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

