

Volume 12 - Número 3
Julho - Setembro 2018

REVISTA

Fitos[®]

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

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos

Avanços no desenvolvimento de fitoterápicos no país

Características macroscópicas e microscópicas de *Hamamelis virginiana*, comercializada como chá em farmácias e drogarias de Mogi das Cruzes

Effect of indolebutyric acid on *in vitro* root production of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae)

Estudo *in silico* das atividades de esteroides e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson

Garrafadas: uma abordagem analítica

In vitro propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes under different concentrations of Indoleacetic Acid

Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais

Himatanthus articulatus (Vahl) Woodson



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 Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde (NGBS): Glauco de Kruse Villas-Bôas

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

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

Editores Adjuntos: Érica Speaglich, USP
Ivanildes Vasconcelos Rodrigues, UFJF
Vanilde Citadini Zanette, UNESC

Editor Executivo: Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu, FIOCRUZ

Corpo Editorial: Benjamin Gilbert, FIOCRUZ
Cecília Veronica Nunez, INPA
Claudia do Ó Pessoa, UFCE
Edeltrudes de Oliveira Lima, UFPB
Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha, UFPB
Jislaine de Fátima Guilhermino, FIOCRUZ
João Marcos Hausmann Tavares, UFRJ
José Maria Guzman Ferraz, UFSCar, Unicamp
Mahabir Gupta, Universidad do Panamá
Maria Aparecida Medeiros Maciel, UFRN
Maria Augusta Arruda, FIOCRUZ
Maria Cristina Marcucci Ribeiro, UNIBAN
Norma Albarello, UERJ
Sônia Soares Costa, UFRJ

REVISTA FITOS

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde - NGBS

Correspondência / Mail

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde – NGBS

FIOCRUZ, Farmanguinhos, Complexo Tecnológico de Medicamentos - CTM

Av. Comandante Guarany, 447 Jacarepaguá - Rio de Janeiro

RJ - 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 on-line / On line 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 - NGBS

Assistente Editorial – Yolanda de Castro Arruda

Revisora – Tatiana Vasconcelos Chaves Pontes

Apoio NGBS

Gestão – Preciosa de Jesus Meireles de Oliveira

Divulgação e Comunicação – Denise Monteiro da Silva

Administrador SEER e Design – Eugênio Fernandes Telles

Associada à ABEC

**Associação Brasileira
de Editores Científicos**



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

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

Anual: 2007 e 2011
Interrompida: 2008, 2014
Quadrimestral: 2010
Trimestral: 2012, 2015, 2016
Semestral: 2005, 2006, 2009, 2013

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.
Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde.

CDD 615.32

Revista Fitos

e-ISSN 2446-4775 | ISSN 1808-9569

Volume 12, número 3

Julho - Setembro, 2018

EDITORIAL

Avanços no desenvolvimento de fitoterápicos no país

204

Mônica Freiman de Souza Ramos, Arianne Cunha dos Santos Vaucher.

ARTIGO DE PESQUISA

Características macroscópicas e microscópicas de *Hamamelis virginiana* L., comercializada como chá em farmácias e drogarias de Mogi das Cruzes

205-217

Macroscopic and microscopic characteristics of *Hamamelis virginiana* L., marketed as tea in pharmacies and drugstores from Mogi das Cruzes

Botânica

Flávio Sussumu Yasuda, Carolina Passarelli Gonçalves, Maria Cristina Marcucci.

Effect of indolebutyric acid on *in vitro* root production of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae)

218-226

Botânica

Simone da Silva, Spartaco Astolfi-Filho.

Estudo *in silico* das atividades de esteroides e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson

227-242

Quality assessment of medicinal plants marketed in the Municipal Market of Campos dos Goytacazes-RJ

Botânica

Maria Fâni Dolabela, Amanda Roberta Palheta da Silva, Letícia Hiromi Ohashi, Mírian Letícia Carmo Bastos, Milena Cristina Martins da Silva, Valdicley Vieira Vale.

Garrafadas: uma abordagem analítica

243-262

Garrafadas: an analytical approach

Botânica

Luciene de Andrade Quaresma Ferreira, Carlos Alexandre Marques.

In vitro propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes under different concentrations of Indoleacetic Acid

263-268

Botânica

Simone Silva, Ester Neta Pinheiro, Laís Medeiros Assunção, Efigênia Lopes Silva, Daniele Carvalho Rodrigues, Flávio Freires Ferreira, Vitor Rafael Pereira Marinho, Spartaco Astolfi-Filho

REVISÃO

Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais

269-280

Production of secondary metabolites by plant tissue culture

Botânica

Julio Cezar de Souza, Cristine Luciana de Souza Rescarolli, Cecília Verônica Nunez.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Normas para submissão e apresentação do manuscrito

281-291

Avanços no desenvolvimento de fitoterápicos no país

A consolidação das políticas públicas estabelecidas pelo Ministério da Saúde para o setor de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil teve como marco inicial a publicação da Portaria Ministerial MS/GM nº 971, de 03 de maio de 2006, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Esta iniciativa foi seguida pelo Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Desde então, inúmeras ações vêm sendo realizadas nos mais diferentes setores visando solidificar, com bases científicas, o emprego de plantas medicinais e de fitoterápicos no sistema de saúde brasileiro. Um importante fruto destas ações foi a publicação, pela ANVISA, da 1ª edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira em 2011. O formulário é constituído de 47 monografias de drogas vegetais para infusos e decoctos, 17 tinturas e 18 monografias de diferentes formas farmacêuticas como xarope, pomada, sabonete, cremes e soluções. Este ano a ANVISA publica o 1º suplemento do Formulário, no qual o capítulo de tintura foi revisado (15 monografias) e 25 novas monografias acrescidas. Uma particularidade é a inclusão do capítulo de cápsulas, não contemplada no Formulário de 2011, com 28 monografias sendo que, destas, 19 espécies não estavam descritas no Formulário (2011). A recente chamada do CNPq e Ministério da Saúde (MS), por intermédio do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (Decit/SCTIE) - Chamada CNPq/MS/SCTIE/Decit Nº 19/2018 / Fitoterápicos – demonstra que há uma continuidade deste trabalho, pois a mesma objetiva, em suas duas linhas temáticas (linha 1 - inovação em fitoterápicos; linha 2 - estudos clínicos utilizando fitoterápicos), o estudo com 9 espécies que já constam no formulário e/ou no 1º suplemento e mais 8 novas espécies. Esta iniciativa retrata o reconhecimento, por parte dos órgãos de fomento, que os estudos envolvendo produtos naturais são partes de um arsenal de trabalhos de pesquisa realizados pelas Universidades e Institutos de pesquisa em todo país e que, sem dúvida, devem ser incentivados, mesmo em momentos difíceis como os que estamos vivenciando hoje, frente aos cortes de recursos voltados para as áreas de educação, saúde e de ciência e tecnologia.

Mônica Freiman de Souza Ramos,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia

Arianne Cunha dos Santos Vaucher,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Características macroscópicas e microscópicas de *Hamamelis virginiana* L., comercializada como chá em farmácias e drogarias de Mogi das Cruzes

Macroscopic and microscopic characteristics of *Hamamelis virginiana* L., marketed as tea in pharmacies and drugstores from Mogi das Cruzes

DOI 10.17648/2446-4775.2018.628

Yasuda, Flávio Sussumu^{1*}; Marcucci, Maria Cristina¹; Gonçalves, Carolina Passarelli².

¹Faculdade Anhanguera Pitágoras de Jundiaí, Instituto de Farmácia, Departamento de Ensino, Laboratório de Desenvolvimento e Pesquisa em Farmácia, Rua do Retiro, 3.000, Jardim das Hortências, CEP: 13209-355, Jundiaí, SP, Brasil.

²Universidade Anhanguera de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Biotecnologia e Inovação em Saúde, Laboratório de Produtos Naturais e Quimiometria. Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3.305, Pirituba, CEP: 05145-200, São Paulo, SP, Brasil.

*Correspondência: sfyasuda@gmail.com

Resumo

As bebidas de infusão são utilizadas desde a antiguidade como medicamentos. De fato, muitos dos medicamentos que hoje fazem parte da alopatia tradicional, são provenientes de extratos vegetais. Hoje, é possível comprar folhas e ervas, de forma industrializada ou semi-industrializada, em Farmácias, drogarias e, até, em supermercados. O problema é que o produto industrializado nem sempre se apresenta “puro”, além de possibilitar o uso indiscriminado. Alguns fitoterápicos, se usados de forma inadequada podem perder as suas propriedades funcionais ou pior, podem provocar males maiores do que benefícios à saúde do usuário. Neste trabalho, será feita análise do chá de *Hamamelis virginiana* L. encontrado em farmácias e drogarias e, serão verificadas as condições do produto segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA e da Farmacopeia Brasileira e, também, quanto à sua caracterização Farmacobotânica.

Palavras-chave: *Hamamelis virginiana* (L.). Análise Macroscópica. Análise Microscópica.

Abstract

Infusion drinks are widely used since antiquity as medicines. In fact, many of the drugs that are now part of traditional allopathy come from plant extracts. Today, it is possible to buy in pharmacies, drugstores and even supermarkets, leaves and herbs in an industrialized or semi-industrialized way. The problem is that the industrialized product does not always present itself "pure", besides allowing the indiscriminate use. Some herbal medicines, if used improperly can lose their functional properties or worse, can cause greater ills than benefits to the health of the user. In this work, we will perform an analysis of *Hamamelis virginiana* L. tea

found in pharmacies and drugstores and, we will verify the conditions of the product according to ANVISA and Brazilian Pharmacopoeia norms, as well as the pharmacobotanical characterization.

Keywords: *Hamamelis virginiana* (L.). Macroscopic analysis. Microscopic analysis.

Introdução

A biodiversidade brasileira e a tradição popular facilitam no aumento da ingestão de chás. Não há, pelo Brasil afora, comadre ou avó que não tenha a receita de um chazinho para curar qualquer tipo de mal-estar. De fato, muitos dos medicamentos que hoje fazem parte da alopatia tradicional, são provenientes de extratos vegetais. Atualmente, encontram-se, no mercado nacional várias espécies de plantas, comercializadas como chás. O chá preto, o mais tradicional, divide as prateleiras dos supermercados com diferentes tipos de chás oriundos de plantas consideradas terapêuticas ou medicinais⁽¹⁾. Nas farmácias e drogarias é possível encontrar pacotes com folhas, cascas ou raízes consideradas terapêuticas ou medicinais comercializados como chás, que é o caso de nossa planta de estudo, a *Hamamelis virginiana* L. Tendo em vista o grande consumo popular de bebidas de folhas, cascas ou raízes, com finalidade terapêutica, realizou-se este estudo para verificar se a comercialização do “pacote” de *Hamamelis virginiana* L., encontrado em farmácias e drogarias, está de acordo com a legislação vigente para medicamentos ou fitoterápicos e, se as informações fornecidas ao consumidor são suficientes para que a ingestão deste produto não seja prejudicial à saúde. Também foi realizada revisão bibliográfica e avaliação para caracterização botânica da planta contida na embalagem.

Hamamelis virginiana L.

A *Hamamelis virginiana* L. é uma árvore pequena ou arbusto, frequente nos bosques úmidos da zona norte e oriental dos Estados Unidos da América e do Canadá, sendo vulgarmente cultivado na Europa⁽²⁾. O fato de as flores florescerem na mesma altura em que os frutos, explica por que a árvore foi batizada de *Hamamelis*, palavra cujas raízes gregas significam “fruto” e folha “simultaneamente”. Em inglês, witch hazel, parece estar relacionado com a crença americana de que os ramos flexíveis desta planta conseguem localizar cursos de água subterrâneos⁽³⁾. A *Hamamelis* era muito utilizada como planta medicinal pelos nativos americanos, devido às suas propriedades adstringentes. Utilizava-se a casca da árvore para tratar úlceras, chagas, queimaduras na pele, feridas, tumores e hemorroidas, enquanto que o vapor, originado pelos galhos aquecidos em pedras quentes, constituía um veículo de purificação por sudação em rituais religiosos, as decocções dos troncos eram empregadas topicamente, para manter a flexibilidade muscular⁽⁴⁾. O chá da planta era ainda usado no tratamento de disenterias, constipações, tosse, para purificar o sangue e reduzir o sangramento menstrual excessivo⁽⁵⁻⁷⁾. No século XIX, o produto da destilação dos ramos da planta tornou-se vulgarmente conhecido como água-de-hamamelis, pela mão do americano Theron T. Pond, proprietário de uma destilaria em Connecticut. A água-de-hamamelis viria a ser um dos primeiros extratos aquosos de plantas patenteadas, ainda hoje as destilarias de Connecticut são responsáveis pela maioria da produção americana de destilado de *Hamamelis*⁽⁸⁾.

Propriedades medicinais

Hamamelis virginiana é hoje, considerada pelos herbalistas, uma das melhores plantas com ação venotrópica e anti-hemorrágica, de aplicação vantajosa em casos de insuficiência venosa. As infusões e

destilações das folhas e da casca são ricas em flavonóides (compostos com ação anti-inflamatória e antioxidante, que promovem o aumento da resistência dos capilares) e taninos (substâncias que atuam como antidiarreicos, antimicrobianos e cicatrizantes), entre eles o hamamelitanino e várias proantocianidinas, componentes apontados como responsáveis pelas propriedades adstringentes da planta⁽⁹⁻¹¹⁾. O nível externo, a *Hamamelis* é útil no tratamento de veias varicosas, problemas circulatórios, varizes, pernas cansadas, eczema, couperose, hemorroidas, inflamação ocular, infecções e sangramento das gengivas, desinfecção de feridas, picadas e cortes na pele, e queimaduras solares ligeiras⁽¹²⁾. A utilização interna não é tão comum. Infusões e cápsulas são ingeridas no sentido de promover a reabsorção de edemas venosos, aliviando os sintomas de pernas pesadas, varizes e hemorroidas. Pode ser encontrada em cremes, pomadas, folhas secas, tinturas, supositórios renais, loções, água destilada e cápsulas, sendo vulgarmente utilizada como ingrediente nas fórmulas de fármacos de venda livre e no fabrico de vários produtos cosméticos e de higiene pessoal, incluindo desodorizantes, géis de banho, xampus, loções pós-barba, sabonetes e cremes⁽¹¹⁾.

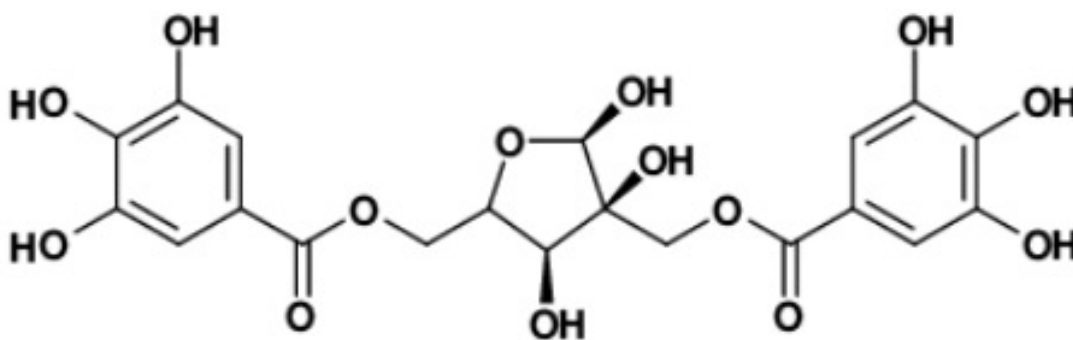
Dosagens e Contraindicações

Recomenda-se uma dosagem de 2g por 150 mL de infusão (folhas secas), 5 a 10g em 250 mL de água para a aplicação de compressas. Quanto à água-de-hamamelis, pode ser aplicada sem restrições. Apesar de esta planta ser utilizada há cerca de 200 anos como analgésico externo, no alívio de irritações cutâneas e das mucosas, sem o registro de efeitos secundários mais graves que não vão além de uma esporádica sensibilidade cutânea, deve ser evitada durante a gravidez e lactação, uma vez que poucos estudos clínicos foram realizados. A ingestão de elevadas concentrações de extratos de *Hamamelis*, em especial da casca, à semelhança do que ocorre com outras plantas ricas em taninos, poderá também não ser segura, provocando distúrbios gastrointestinais, desde náuseas e vômitos, a uma eventual hepatotoxicidade, afetando o fígado e os rins. As dosagens recomendadas não devem, por isso, ser excedidas⁽¹²⁾.

Constituintes químicos

Ácido gálico, ácidos graxos, canferol, catecol, ésteres, eugenol, flavonóides, flobafenos, hamamelitanino (**FIGURA 1**), hamamelose livre, isopreno, mucilagens, oxalato de cálcio, quercetol, resinas, saponinas, sesquiterpenos isopreno⁽¹³⁾.

FIGURA 1: Estrutura química do hamamelitanino, substância encontrada na *Hamamelis virginiana* L.



Características da *Hamamelis virginiana* L.

Classificação científica

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Saxifragales*

Família: *Hamamelidaceae*

Gênero: *Hamamelis virginiana* L.

Característica Botânica

A *Hamamelis virginiana* L. é encontrada na forma de um grande arbusto de folhas caducas (**FIGURA 2A**), ovais e denteadas, com um denso aglomerado de hastes a partir da base, possui normalmente um tronco curto, embora possa atingir os cinco metros de altura. A casca é castanho claro, lisa, escamosa e avermelhada. Os ramos são púberes no início, depois suaves, marcados com pontos brancos ocasionais. Os botões são folhagens agudas, ligeiramente falciforme, felpudo, marrom claro. As folhas (**FIGURA 2B**) são ovais, 3,7-16,7 cm de comprimento e 2,5-13 cm, oblíquas na base, aguda ou arredondada no ápice, com uma margem ondulada de dentes ou rasa, e um curto, robusto pecíolo 6-15 mm de comprimento; a nervura central é mais ou menos peluda, robusta, com seis a sete pares de veias primárias. As suas distintas flores amarelas (**FIGURA 2C**), são reunidas em glomérulos axilares a dois ou a três com quatro sépalas cada uma, quatro pétalas, quatro estame e dois estilos. Os frutos são cápsulas lenhosas, contendo duas a quatro sementes, que são mecanicamente dispersadas: as cápsulas, quando maduras, explodem, literalmente, projetando as sementes a uma distância média de cerca de 5 metros da árvore⁽¹⁴⁾.

FIGURA 2A: Aspectos botânicos da *Hamamelis virginiana* L.



Fonte: Sungro horticulture.

FIGURA 2B: Aspectos botânicos das folhas da *Hamamelis virginiana* L.



Fonte: VIRBOGA the Virtual Botanic Garden.

FIGURA 2C: Aspectos botânicos da *Hamamelis virginiana* L.



Fonte: VIRBOGA the Virtual Botanic Garden.

Características Organolépticas

Folha: Inodora, gosto: adstringente, ligeiramente aromático, amargo.

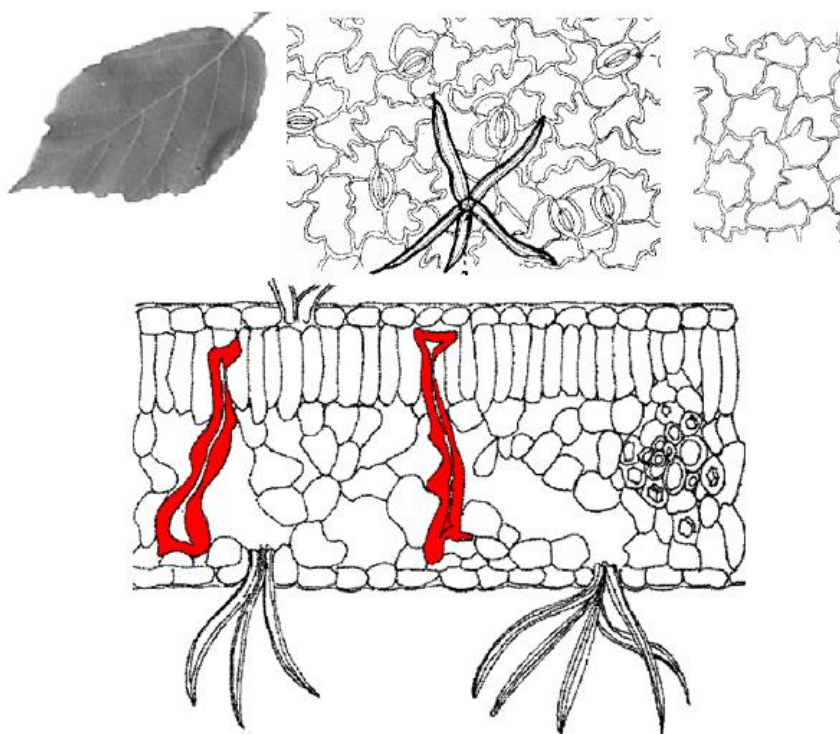
Casca: Inodoro, gosto: fortemente adstringente ligeiramente amargo.

Características Microscópicas

Folhas

- a. Epiderme superior composta de células ligeiramente compridas, com reta para paredes ligeiramente sinuosas, moderadamente engrossadas; estomas ausentes; as células de paliçada subjacentes são bastante pequenas e distintas. A mais baixa epiderme está composta de células poligonais com um esboço muito sinuoso; as paredes estão mais magras que as da epiderme superior e são mais uniformes, estomas de parasitas são bastante numerosos, mas bastante lânguidos e indistintos; as células subjacentes do mesofilo esponjoso aparecem como uma rede de favo de mel claramente definida e são frequentemente marrons (**FIGURA 3**);
- b. Tricomas são achados inteiros ou, normalmente, fragmentados. Os tricomas são compostos de quatro a doze (ou às vezes mais) células compridas, cônicas unidas à base, para formar uma estrutura radial;
- c. Um idioblasto linear característico compõe a célula lignificada, que se estende completamente pelas densidades da lâmina;
- d. Fibras são achadas em grupos ou como fragmentos isolados. São lignificadas e grossas, acompanhadas por um prisma de oxalato de cálcio;
- e. Os prismas de oxalato de cálcio são encontrados espalhados e também formando um círculo de envoltura cristalina que variam em tamanho, mas são bastante regulares em forma;
- f. Muitos fragmentos ocasionais da epiderme do pecíolo ou talos jovens, aparecem em vista superficial.

FIGURA 3: Características macroscópicas das folhas de *Hamamelis virginiana* L.



Fonte: Apostila de aula Prática de Farmacognosia Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Casca

- a. Esclereides muito abundantes;
- b. Fibras abundantes acontecem em grupos cercados por um prisma de oxalato de cálcio;
- c. Células parenquimatosas estão finamente cercadas e, várias estão cheias com conteúdo marrons escuros. Os raios medulares são uniseriados, composto de células arredondadas com paredes ligeiramente engrossadas;
- d. Células finamente cercadas e em visão poligonal da superfície. É vista uma camada de esclereides que, frequentemente está por baixo das células de cortiça;
- e. Os prismas abundantes de oxalato de cálcio se espalham também nas células parenquimatosas que cercam as fibras;
- f. Fragmentos muito infrequentes de tecido de xilema lignificado, aderido à madeira, são vistos; estes consistem em tricoides estreito com covas limitadas conspícuas, acompanhadas por fibras finas e células de raio medular descaroçadas;
- g. Grânulos engomados são muito raros, também podem ser encontrados alguns grânulos pequenos, esféricos em algumas das células parenquimatosas⁽¹⁵⁾.

Materiais e métodos

A amostra para a análise é um “pacote” contendo folhas, casca, flores e sementes de *Hamamelis virginiana* L. adquirido em uma farmácia, aleatoriamente. O mesmo será analisado para os seguintes parâmetros: Análise da embalagem e de suas características, análise macroscópica do conteúdo, perda por secagem (umidade), propriedades organolépticas e características microscópicas. Os resultados obtidos serão comparados com os dados de monografia da Farmacopeia Brasileira⁽¹⁶⁾ e com informações contidas na literatura. Para efetuar as análises macroscópicas do conteúdo do pacote, foram utilizados “vidros de relógio”, microscópio estereoscópico com zoom. Para as análises microscópicas do conteúdo será necessário um microscópio, lâminas, lamínulas, pedaços de isopor, placas de Petri, lâmina de Gillette, corantes (vermelho de safranina e azul de Metileno), água destilada e solução de hipoclorito. Para a análise de umidade usou-se uma balança, um dissecador e uma estufa a 50°C. Outros parâmetros, mesmo que descritos na Farmacopeia⁽¹⁶⁾, não foram analisados.

Resultados e Discussão

Análise do Pacote

Informações do pacote: Pacote é lacrado, da marca Companhia da Mata (**FIGURA 4A e B**). Segundo a embalagem, o produto é esterilizado por radiação (na EMBRARAD), possui 10g e, apresenta a informação de que é isento de registro no ministério da saúde de acordo com as RDC N° 23 e RDC N° 278⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

FIGURA 4: Pacote de *Hamamelis virginiana* L. comercializada na região. Na foto A, está a parte frontal da embalagem e na foto B a parte posterior da embalagem.



O pacote fechado foi pesado e, o peso encontrado foi de 15,5g e a embalagem pesa 2g, logo, o produto (*Hamamelis*) pesa 13,5g, diferente do que a embalagem informa. Ao pesquisar as RDCs informadas na embalagem, percebeu-se que as mesmas tratam de alimento e não medicamentos. O Anexo I da RDC N° 23⁽¹⁷⁾, informa que chás (alimentos) estão dispensados de registro, no entanto, no anexo II, da mesma Resolução informa que: “[...] se o produto tiver alegação de propriedades funcionais ou de saúde, o registro deverá ser obrigatório”. Tentamos contato com o SAC da empresa que comercializa o produto na região, mas sem sucesso. Segundo a Resolução - RDC N° 48⁽¹⁹⁾, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos: “Não é objeto de registro ou cadastro planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada”, sendo o produto controlado apenas pelas Boas Práticas de Fabricação-BPFs do fabricante (licença da ANVISA).

Análise Macroscópica

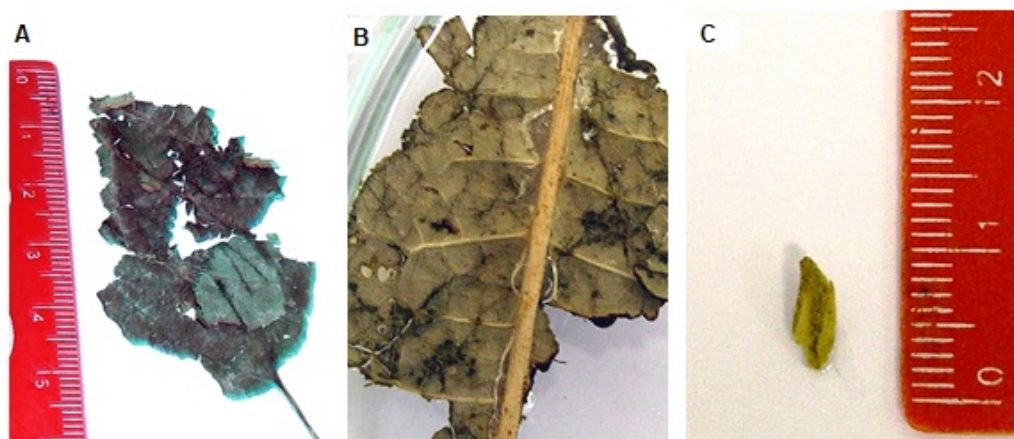
Na análise macroscópica do conteúdo do pacote (**FIGURA 5**), observam-se folhas na maior parte, mas também encontram pedaços de cascas, talos, sementes, flores e uma “pedrinha”. Alguns pedaços de folhas apresentavam sinais de fungos.

FIGURA 5: Resultado da análise macroscópica realizada na amostra de *Hamamelis virginiana* L.



Abaixo uma foto da "montagem" da folha de *Hamamelis* a partir das folhas retiradas do pacote (**FIGURA 6A**). Observa-se margens com dentes a ponta mais aguda que arredondada e, tamanho de aproximadamente 5 cm e, na outra foto (**FIGURA 6B**), observa-se a nervura central e, as veias primárias. Tem-se, também, a semente (**FIGURA 6C**), com aproximadamente 1 cm.

FIGURA 6: Resultado da análise macroscópica realizada na amostra de *Hamamelis virginiana* L.



Análise Microscópica

Foram feitos cortes histológicos nas folhas de *Hamamelis* e corados com vermelho de safranina e azul de Metileno e, observadas algumas fibras com cristais de oxalato, Xilema, Floema e, alguns escleroides além de epiderme e mesoderme (**FIGURAS 7, 8, 9, 10, 11**).

FIGURA 7: Análise Macroscópica das folhas de *Hamamelis virginiana* L. em corte transversal.

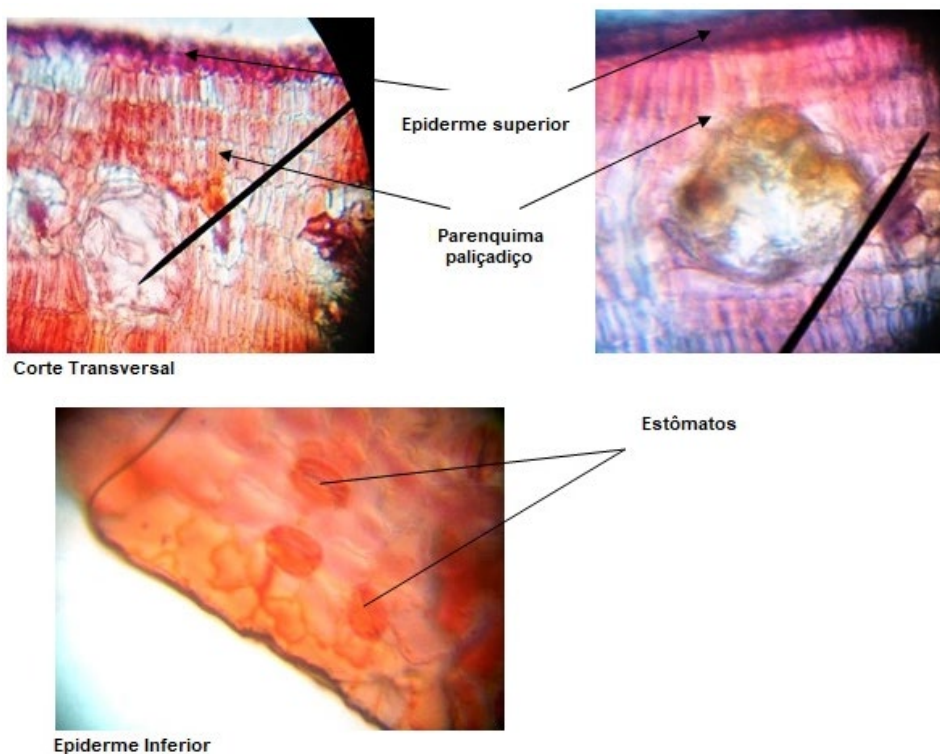


FIGURA 8: Análise Macroscópica das folhas de *Hamamelis virginiana* L. em corte transversal.

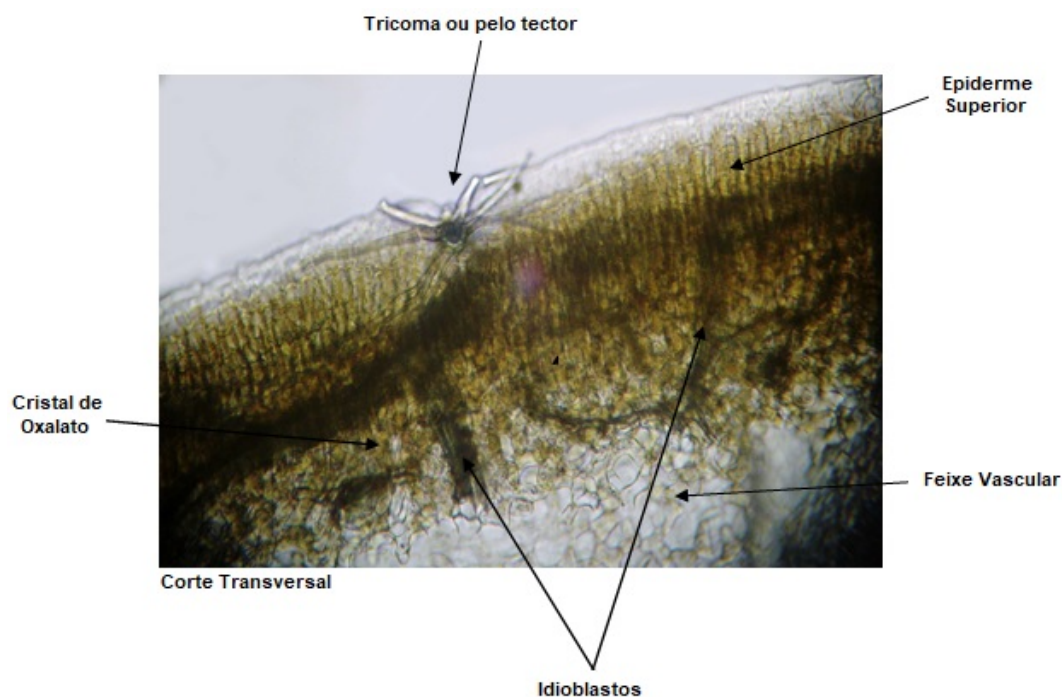


FIGURA 9: Análise Macroscópica das folhas de *Hamamelis virginiana* L.

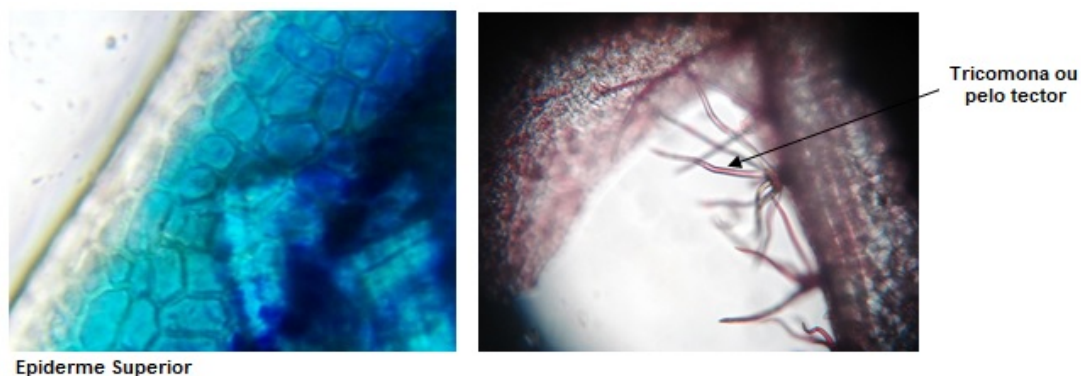


FIGURA 10: Análise Macroscópica do caule de *Hamamelis virginiana* L. em corte transversal.

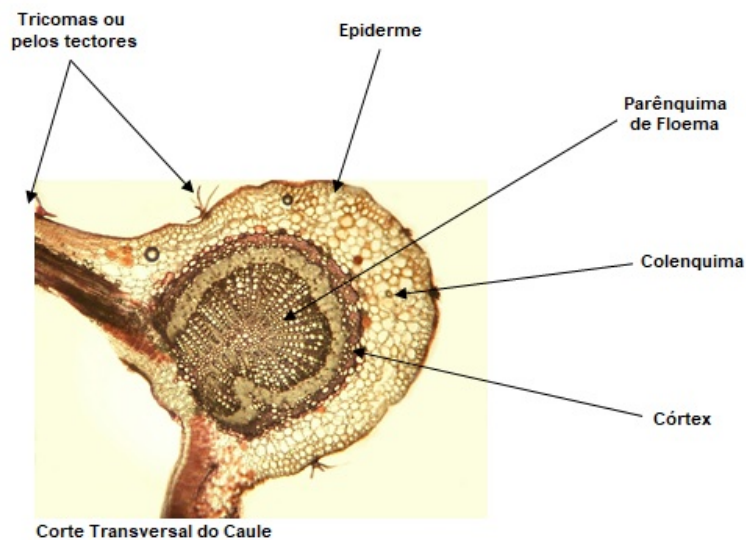
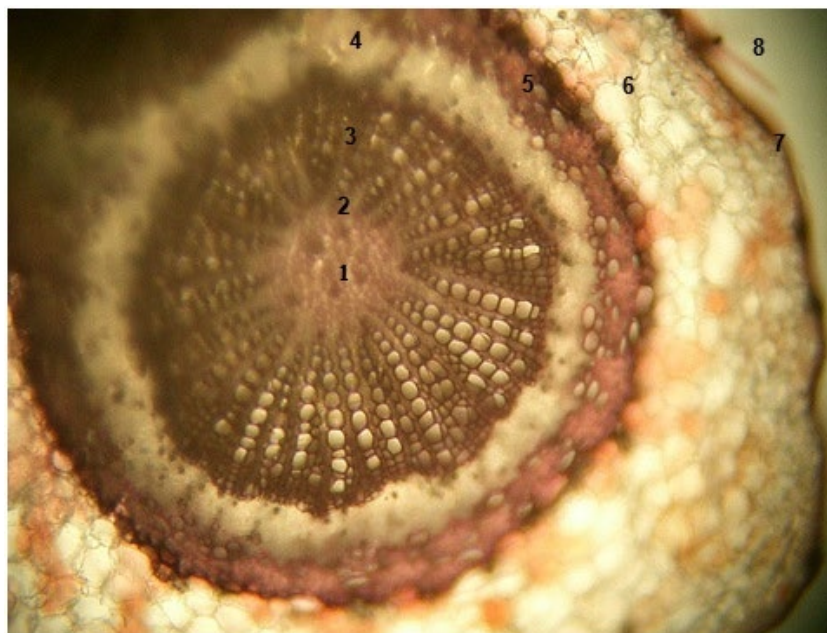


Figura 11: Corte transversal do caule.



1. Parequima Medular
2. Protoxilema
3. Xilema
4. Floema
5. Córtex
6. Colequima
7. Epiderme
8. Tricoma

Teor de Umidade

Utilizando uma balança, um dissecador e uma estufa, procedeu-se ao teste de verificação do teor de umidade do produto contido na embalagem. Vale salientar que o produto já se encontrava seco.

Procedimento:

1. Pesou-se 2 gramas do produto macerado, numa placa de Pétri que foi colocado em estufa a 50°C por 1 hora.
2. Retirou-se o produto que foi colocado em dissecador por 15 min.
3. Procedeu-se à pesagem.
4. Observando o peso verificou-se uma diminuição de 0,1 g.
5. Repetindo-se os passos de n° 1 ao n° 3, com meia hora de estufa.
6. Repetindo-se o passo n° 4, houve a diminuição de 0,02 g.
7. Repetiu-se mais uma vez o procedimento, desta vez o peso não diminuiu.
8. Repetindo-se todo o procedimento mais uma vez e, o peso se manteve constante.

O produto perdeu aproximadamente 0,12 g ou 6,0 % de seu peso inicial.

Considerações finais

Embora com uma série de ressalvas, no que se refere à forma de comercialização, e após exaustiva análise comparativa, concluiu-se que o produto comercializado em farmácias e drogarias como “planta” *Hamamelis virginiana* L., apresenta características que nos permitem afirmar que se trata realmente de *Hamamelis virginiana* L. Vale comentar que desde março de 2010 entrou em vigor a RDC n° 10 que regulamenta o registro e notificação de drogas vegetais no âmbito da ANVISA, assim consideradas as plantas medicinais

ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas. A RDC não foi utilizada como parâmetro para este estudo, uma vez que, o objeto deste foi “processado” antes da sua vigência ⁽²⁰⁾.

Referências

1. Brasil, INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. 1998. [\[Link\]](#). Acesso em: 04 mar. 2018.
2. UNITED States Department of Agriculture - Natural Resources Conservation Service. **USDA - Natural Resources Conservation Service**. [\[Link\]](#). Acesso em: 03 jan. 2018.
3. Meyer LM, Schmidt KA, Robertson BA. Evaluating exotic plants as evolutionary traps for nesting Veeries. **The Condor: Ornithological Applications**. 2015; 117(3): 320-327. ISSN: 1938-5129. [\[CrossRef\]](#).
4. Niedenthal T, Mayer JG. Drink before breakfast and vomit. **Zeitschrift für Phytotherapie**, 2017; 38: 137-144. [\[CrossRef\]](#).
5. Costa JGM, Leite GO, Dubois AF, Seeger RL, Boligon AA, Athayde ML, Campos AR, da Rocha JB. Antioxidant effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): potential involvement in its therapeutic use. **Molec**. 2012 jan.18; 17(1): 934-950. ISSN: 1420-3049. [\[CrossRef\]](#). [\[PubMed\]](#).
6. Faivre C, Ghedira K, Goetzet P, Le Jeune R. *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae). **Phytothérapie**. 2009; 7(4): 215-220. ISSN: 1765-2847. [\[CrossRef\]](#).
7. Ferreira Filho JCC, Pereira IF, Cunha DA, Valença AMG. Avaliação da atividade antibacteriana das tinturas de *Hamamelis virginiana* L. e *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. frente a bactérias bucais. **Rev Bras Cienc Sau**. 2013; 17(1): 71-78. ISSN: 1415-2177. [\[CrossRef\]](#).
8. Edwards SE, Rocha IC, Williamson EM, Heinrich M. **Phytopharmacy: An Evidence-Based Guide to Herbal Medicinal Products**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd. 2015. 414p. ISBN: 978-1-118-54356-6.
9. Bele AA, Jadhav VM, Kadam VJ. Potential of Tannins: A Review. **A J PLant Scien**. 2010; 9(4): 209-214. [\[CrossRef\]](#).
10. Silva AP, Rocha R, Silva CM, Mira L, Duarte MF, Florêncio MH. Antioxidants in medicinal plant extracts. A research study of the antioxidant capacity of *Crataegus*, *Hamamelis* and *Hydrastis*. **Phytother Res**. 2000; 14(8): 612-616. [\[PubMed\]](#).
11. Saric S, Clark AK, Sivamani RK. Systematic Review of Oral and Topical. **Dermat**. 2017; 2(2): 21-30. [\[CrossRef\]](#).
12. Mackay D. Hemorrhoids and Varicose Veins: A Review of Treatment Options. **Altern Med Rev**. 2018; 6(2):126-40. [\[PubMed\]](#).

13. Edwards EJ, Spriggs EL, Chatelet DS, Donoghue MJ. Unpacking a century-old mystery: Winter buds and the latitudinal gradient in leaf form. **Am J Bot.** 2016;103(6): 975-978. [[CrossRef](#)].
14. Endress PKA. Suprageneric taxonomic classification of the Hamamelidaceae. **Taxon**, 1989; 38(3): 371-376. [[CrossRef](#)].
15. Upton R, Graff A, Jolliffe Georgina J, Länger R, Williamson Elizabeth W. **American Herbal Pharmacopeia: Botanical Pharmacognosy-Microscopic Characterization of Botanical Medicines.** 1st ed. [S.l.]: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2011. ISBN-13: 978-1420073263.
16. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira - 4^a Ed.** Parte II. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira. Atheneu, São Paulo. 1996.
17. Brasil, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RCD nº 23, 15 mar. 2000, 2000. [[Link](#)].
18. Brasil, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 278, 22 ago. 2005, 2005. [[Link](#)].
19. Brasil, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48, 25 out. 2013, 2013. [[Link](#)].
20. Brasil, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 10, 09 mar. 2010, 2010. [[Link](#)].

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

Histórico do artigo: Submissão: 18/04/2018 | Aceite: 03/09/2018 | Publicação: 29/10/2018

Como citar este artigo: Yasuda FS, Marcucci MC, Gonçalves CP. Características macroscópicas e microscópicas de *Hamamelis virginiana* L., comercializada como chá em farmácias e drogarias de Mogi das Cruzes. **Revista Fitos.** Rio de Janeiro. 2018; 12(3): 205-217. e-ISSN 2446-4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/628>>. 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 indolebutyric acid on *in vitro* root production of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae)

DOI 10.17648/2446-4775.2018.616

Silva, Simone da^{1*}; Astolfi Filho, Spartaco².

¹Centro de Biotecnologia da Amazônia, Coordenação de Biotecnologia Vegetal. Avenida Governador Danilo Areosa, Distrito Industrial I, CEP: 69075-351, Manaus, AM, Brasil.

²Universidade Federal do Amazonas, Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM. Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, Coroado I, CEP: 69077-000, Manaus, AM, Brasil.

*Correspondência: simonydasilva@gmail.com

Abstract

Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes (Rubiaceae) is a medicinal plant commonly known as ipecac, which contains two alkaloids of high pharmacological value (emetine and cephaeline) with anti-diarrheal, amebicidal, expectorant and anti-inflammatory properties. The risk of extinction and the difficulty of the conventional cultivation of the species combined with great market demand has generated a need for studies of cultivation methods that allow the economic exploitation of this species. This work presents data on the development of an *in vitro* root culture protocol for *P. ipecacuanha*. Leaf, nodal, internodal and root segments were used, which were introduced in culture media containing different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mg.mL⁻¹) of indolbutyric acid (IBA). The best treatment for root formation included the use of nodal segments in culture media containing 2.5 and 3.0 mg.mL⁻¹ of IBA, which gave rise to 100% root formation at 60 days of culture. Regarding the number of roots per explant, the best result (13:1) were obtained with the use of internodal segments in medium supplemented with 2.5 mg.mL⁻¹ IBA and, the best root length was obtained in root segments developed in medium enriched with 1.5 mg.mL⁻¹ IBA, with an average increment of 0.87 cm per root.

Keywords: Ipecac. Root culture. *In vitro* culture. Plant biotechnology.

Introduction

Psychotria ipecacuanha, a perennial shrub that is popularly known as *ipecac*, ipecacuanha, poaia, ipeca-verdadeira, poaia cinzenta, poaia legítima, ipeca-preta and ipeca-do-Mato-Grosso. This species belongs to the family Rubiaceae, whose center of origin is Brazil; it has the highest occurrence in the State of Mato Grosso, mainly in the city of Cáceres⁽¹⁾. The species is distributed along the Atlantic, Amazonian, Central American and Colombian ranges⁽²⁾.

It is a medicinal species of great economic potential due to the pharmacological properties of the roots, which contain high concentrations of emetine and cephaeline⁽³⁻⁴⁾. These compounds show activity against bronchial diseases through anti-inflammatory properties, can combat fever and malaria, and show amebicidal activity⁽⁵⁻⁷⁾. These medicinal properties are well-known and have been used by native populations since before the discovery of Brazil. This knowledge was passed on to the European settlers, contributing to the integration of the species in the list of tropical products exported by Brazil in the colonial period, and it was considered as the species with the highest medicinal value at that time⁽⁸⁻⁹⁾.

Brazil is among the main exporters of ipeca followed by Panama and Costa Rica⁽¹⁰⁾. The Brazilian ipeca is preferred in the world market because it contains higher concentration of emetic alkaloids, which has led Brazil to become one of the main exporters of this product⁽¹¹⁾.

The roots of ipeca are obtained mostly by extractivism, and the species has become increasingly rare in natural habitat such as sub-forests of tropical forests⁽¹⁻²⁾. *P. ipecacuanha* is a species threatened with extinction due to having undergone intense extraction in the past two centuries, which opened new agricultural frontiers while reducing areas of natural occurrence for this species⁽¹²⁾. The slow growth, the low percentage of production and germination of seeds, in addition to the loss of viability of the seeds after storage create challenges for cultivation⁽²⁾. Another relevant factor for production is deforestation, which has reduced the availability of adequate habitat and contributed to uncontrolled collection by native populations; this has further accelerated the demographic decline of wild populations of ipeca^(2,6,13). It is important to point out that the long period (3-4 years) for cultivating crops with a higher concentration of root emetic alkaloids also contributes to variation in the demand of the pharmaceutical industry⁽¹⁴⁾.

The use of natural products as a model for drug synthesis or even common use by the population is a growing trend, and many studies evaluating these products have been carried out⁽¹⁵⁾. Literature review reveals high medicinal and commercial value of the roots of *P. ipecacuanha*, but there is strong variability in the production of the chemical compounds of interest (emetine and cephaeline) and little information on the standardization of raw plant material for increasing the concentration of these constituents⁽¹⁾.

Due to high economic and pharmacological value of this species and associated market demand combined with the risk of extinction and the difficulty of conventional cultivation methods, the objective of this work was to develop an *in vitro* root culture protocol for *P. ipecacuanha*. These results will contribute to the future chemical characterization of this species in order to obtain standardized extracts that may help to meet the demands of the pharmaceutical industries for this product.

Materials and Methods

The experiments took place at the Coordenação de Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) in Manaus, AM.

For the establishment of the micropropagation protocol of *P. ipecacuanha*, *in vitro* cultures from the Embrapa Amazônia Oriental germplasm bank (already identified by the IAN Herbarium - Embrapa Amazônia Oriental) were used as donors of explants for tests.

In order to select the best organogenetic expression for rooting *in vitro*, we used different sources of propagules (leaf fragments, nodal, internodal and root segments) that were inoculated in semi-solid culture media with a basic composition, without growth regulators (MS0) and supplemented with 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 and 3.0 mg.mL⁻¹ of indolebutyric acid (IBA) plus 3% sucrose⁽¹⁶⁾. The pH was adjusted to 5.8 and the media was sterilized by autoclaving at 120 °C and 1.1 kg/cm² for 15 minutes. Glass vials containing 40 ml of culture medium and 30 copies of each explant type were used for each treatment. Cultures maintained at 25°C, illuminated with fluorescent lamps (Sylvania, Phillips/daylight) with intensity of 30.0 moles -2 e -1, and kept under a 16-hour photoperiod. Cultures nutrient medium was changed every four weeks, and the analysis of development was performed in the same period by counting the percentage of root formation per explant, the number of roots emitted by the explants, and by measuring the length of the roots (cm).

The effect of different concentrations of IBA on root development per explant were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by the Tukey-Kramer test at a significance level of 5%. These evaluations were performed using Graph Pad in Stat version 3.01. In the analysis of the rooting percentages according to the medium used, the percentage difference test (p1 and p2) at the 5% level of significance was run using Statistical for Windows TM Software. The experimental design was completely randomized and used 30 explants per treatment performed in triplicate.

Results and Discussion

The different types of explants of ipeca were submitted to the different concentrations of IBA (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 and 3.0 mg.mL⁻¹). ANOVA indicated a significant interaction between IBA dose and the origin of explant groups (leaf, nodal, internodal and radicular segments) (**Tables 1-4**), showing significant differences between the explants for the percentage of root formation, the number of roots and average length. In addition, significant differences were observed for both parameters evaluated, being influenced by the increase of IBA doses.

After 8 weeks of cultivation, using the leaves as explants, the best root formation (46%) resulted from the treatment with 3.0 mg.mL⁻¹ of IBA, which produced 3 roots per explant with a mean length of 0.25 cm (**Table 1**).

TABLE 1: Effect of different concentrations of indolebutyric acid (IBA) on root formation using leaves explants of *Psychotria ipecacuanha*.

Culture Medium	Root Formation (%)	Number of Roots	Root Length (cm)
MS0	0	0	0
0.5 mg.mL ⁻¹ IBA	20 ^d	2.0 ^c	0.12 ^d
1.0 mg.mL ⁻¹ IBA	20 ^d	2.0 ^c	0.25 ^a
1.5 mg.mL ⁻¹ IBA	24 ^c	1.0 ^d	0.17 ^b
2.0 mg.mL ⁻¹ IBA	28 ^b	2.0 ^c	0.16 ^c
2.5 mg.mL ⁻¹ IBA	24 ^c	4.0 ^a	0.12 ^d
3.0 mg.mL ⁻¹ IBA	46 ^a	3.0 ^b	0.25 ^a

a-d: Equal letters in the same column indicate that there was no significant difference between the values.

For nodal segments, the best culture media were those supplemented with 2.5, 3.0 and 2.0 mg.mL⁻¹ of IBA, yielding 100, 100 and 96% root emission with 11, 7 and 7 roots each measuring 0.23, 0.41, and 0.2 cm, respectively (**Table 2**).

TABLE 2: Effect of different concentrations of indolebutyric acid (IBA) on root development in nodal segments of *Psychotria ipecacuanha*.

Culture Medium	Root Formation (%)	Number of Roots	Root Length (cm)
MS0	0	0	0
0.5 mg.mL ⁻¹ IBA	52 ^d	2.0 ^e	0.25 ^b
1.0 mg.mL ⁻¹ IBA	88 ^b	6.0 ^c	0.25 ^b
1.5 mg.mL ⁻¹ IBA	80 ^c	5.0 ^d	0.41 ^a
2.0 mg.mL ⁻¹ IBA	96 ^a	7.0 ^b	0.2 ^d
2.5 mg.mL ⁻¹ IBA	100 ^a	11.0 ^a	0.23 ^c
3.0 mg.mL ⁻¹ IBA	100 ^a	7.0 ^b	0.41 ^a

a-e: Equal letters in the same column indicate that there was no significant difference between the values.

For internodal segments, the best culture medium was supplemented with 2.5 mg.mL⁻¹ IBA, with 96% root emission and 13 roots per explant (mean length 0.32 cm) (**Table 3**).

TABLE 3: Effect of different concentrations of indolebutyric acid (IBA) on root development in internodal segments of *Psychotria ipecacuanha*.

Culture Medium	Root Formation (%)	Number of Roots	Root Length (cm)
MS0	0	0	0
0.5 mg.mL ⁻¹ IBA	76	7.0 ^d	0.38 ^a
1.0 mg.mL ⁻¹ IBA	80 ^c	5.0 ^e	0.29 ^d
1.5 mg.mL ⁻¹ IBA	44 ^d	5.0 ^e	0.25 ^e
2.0 mg.mL ⁻¹ IBA	88 ^b	11.0 ^b	0.36 ^b
2.5 mg.mL ⁻¹ IBA	96 ^a	13.0 ^a	0.32 ^c
3.0 mg.mL ⁻¹ IBA	92 ^a	8.0 ^c	0.24 ^e

a-e: Equal letters in the same column indicate that there was no significant difference between the values.

The best results with the use of root segments were observed in MS medium plus IBA 1.5 mg.mL⁻¹, with an increase in root growth of 0.87 cm, 96% secondary root formation, and mean production of five secondary roots for each main root (5:1).

Regarding the best treatment to stimulate the production of secondary roots, the most efficient treatment was 2.5 mg.mL⁻¹ IBA, with 100% formation and average production of 11 secondary roots for each primary root (11:1) (**Table 4**).

TABLE 4: Effect of different concentrations of indolebutyric acid (IBA) on the growth of root segments and the development of secondary roots in *Psychotria ipecacuanha*.

Culture Medium	Increase in root length (cm)	Formation of secondary roots (%)	Number of secondary roots
MS0	0.38 ^f	44 ^e	1.0 ^h
0.5 mg.mL ⁻¹ IBA	0.44 ^e	88 ^b	7.0 ^c
1.0 mg.mL ⁻¹ IBA	0.73 ^c	76 ^c	4.0 ^e
1.5 mg.mL ⁻¹ IBA	0.87 ^a	96 ^a	5.0 ^d
2.0 mg.mL ⁻¹ IBA	0.81 ^b	96 ^a	10.0 ^b
2.5 mg.mL ⁻¹ IBA	0.6 ^d	100 ^a	11.0 ^a
3.0 mg.mL ⁻¹ IBA	0.7 ^c	64 ^d	3.0 ^f

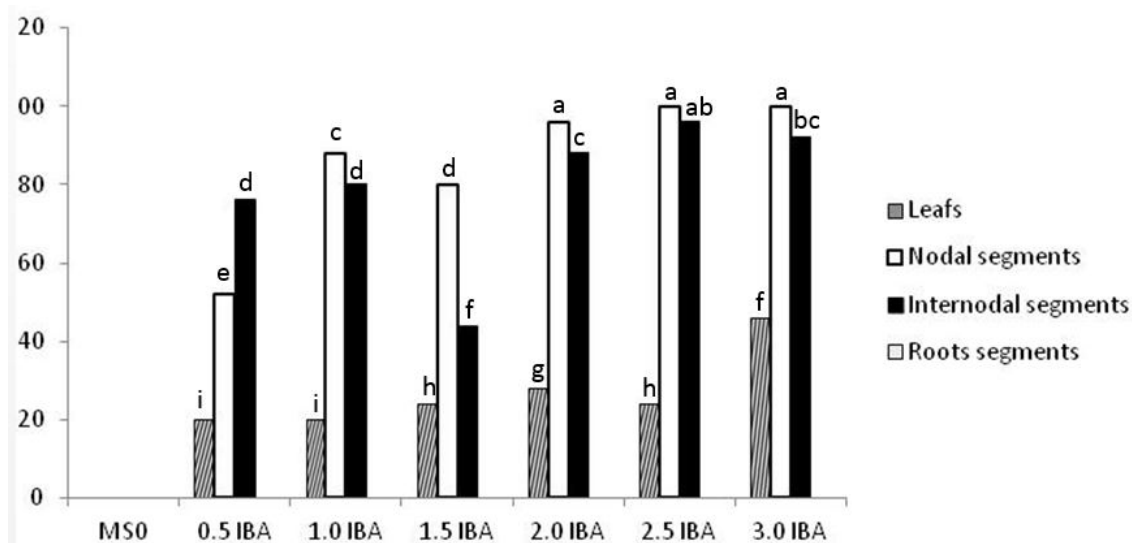
a-h: Equal letters in the same column indicate that there was no significant difference between the values.

These results show that the best results for root formation (100%) observed using the nodal segments as explant with the addition of 2.5 and 3.0 mg.mL⁻¹ of IBA to the MS medium. However, these results were statistically similar to those obtained with MS medium plus IBA 2.0 mg.mL⁻¹ and for internodal segments in medium supplemented with IBA 2.5 mg.mL⁻¹ (96% in both treatments) (**Figure 1**).

The use of plant growth regulators induces the root formation process, increasing the percentage of rooted cuttings, the number and quality of roots formed, and the uniformity of rooting⁽¹⁷⁾. Auxins are the plant regulators indicated for induction of rooting, and indolebutyric acid (IBA) is one of the most commonly used and most efficient due to photostability and resistance to biological activity⁽¹⁸⁾.

In a study with *Ixora coccinea* L., was observed that the IBA treatment was five times more efficient than the control, with rooting percentage increasing from 8.89% to 44.44%; this was also confirmed in a study in which the *Ixora* rooting rate increased by more than 35.55% using IBA⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

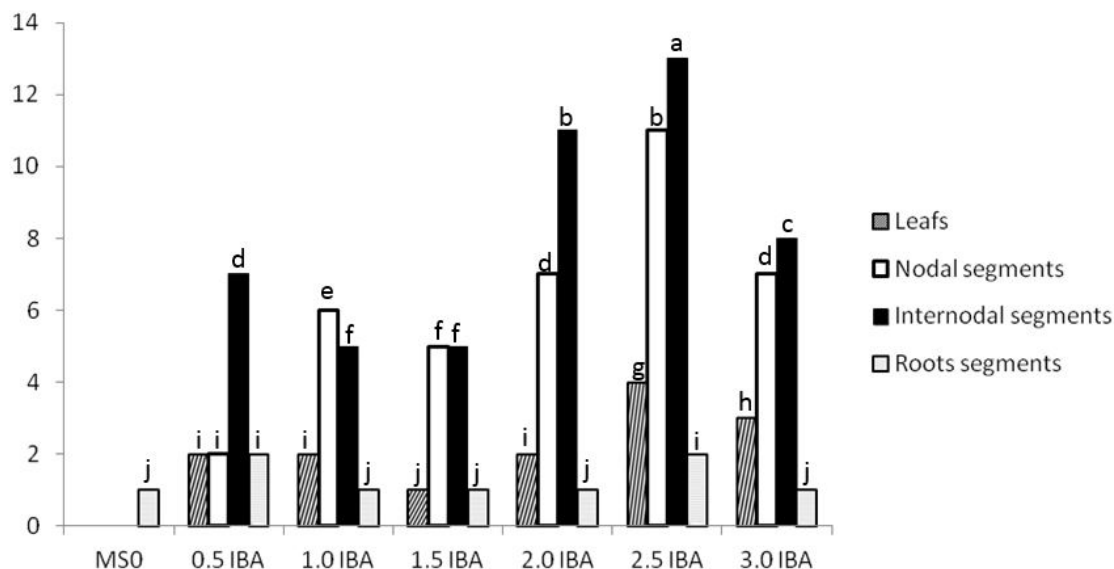
FIGURE 1: Effect of different *Psychotria ipecacuanha* explants and indolebutyric acid (IBA) concentrations on root development.



** Means indicated by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test at 5% probability.

Regarding the number of roots per explant, the best result was obtained with the use of internodal segments in a semi-solid medium plus 2.5 mg.mL⁻¹ IBA, with the formation of 13 roots per explant, followed by semi-solid culture medium plus 2.0 mg.mL⁻¹ IBA, which gave rise to 11 roots per explant (**Figure 2**). However, with the dose of 3.0 mg.mL⁻¹ of IBA in the culture medium there was a decrease in root production in both explants used. This behavior may be related to the fact that high concentrations of auxin may be toxic to the plant, affecting root formation⁽²¹⁾.

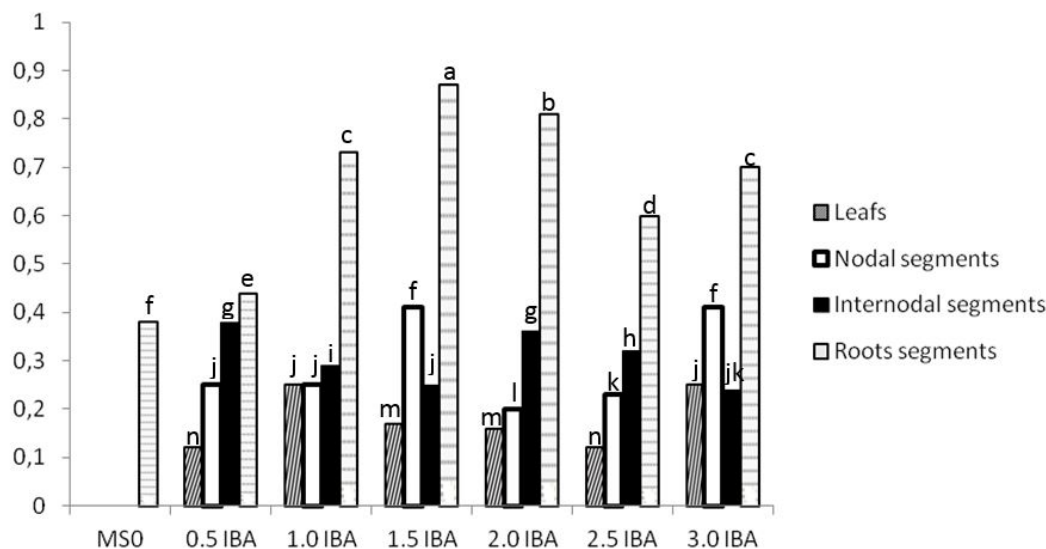
FIGURE 2: Effect of different *Psychotria ipecacuanha* explants and indolebutyric acid (IBA) concentrations on the number of roots.



** Means indicated by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test at 5% probability.

With respect to root length, root segments in MS + 1.5 mg.mL⁻¹ IBA medium were found to be more efficient, with an additional growth of 0.87 cm compared to the initial length (fragments of 1.0 cm) at 60 days of culture (**Figure 3**).

FIGURE 3: Effect of different *Psychotria ipecacuanha* explants and indolebutyric acid (IBA) concentrations on root length.



** Means indicated by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test at 5% probability.

Auxins are essential in the rooting process, possibly by stimulating the synthesis of ethylene, which favors the emission of roots⁽²²⁾. The *in vitro* culture of plants allows the evaluation of the performance of the crops under certain conditions, such that it is possible to evaluate the role of several agents on various aspects of plant developmental physiology. Thus, it is possible to work with significant quantities of plants in limited space and over a relatively short time period compared to field cultivation conditions. Because the plants are genetically standardized, the interference of genetic variability in the results can be eliminated. Consequently, the results obtained are effects of the variables introduced into the process as part of the experimental design.

The use of adequate growth regulator dosages is very important because the optimum concentrations vary by species and with various types of synthetic inductors⁽²³⁾. After treatment of the stem base with the root-inducing growth regulator, the carbohydrates translocated to the treated area, increasing the rate of respiration and resulting in transformation of the carbohydrates and organic nitrogen compounds. The growth regulator can accelerate normal metabolism and increase the number of primordial radicles.

The application of auxin promotes faster formation, and higher quality and uniformity of the root system⁽²⁴⁾. Root emission in greater number and length is fundamental when the objective is the production of seedlings on a commercial scale, since these factors are fundamental in the success of implantation in field areas⁽²⁵⁾. In addition, a well-formed root system increases the harvested soil area, favoring the absorption of nutrients and water, which promotes better seedling development in the field⁽²⁶⁾.

Conclusion

Under the current study conditions, our results indicate that the type of explant and the concentration of indolebutyric acid in the culture media influence the percentage of root formation and root development. The use of indolebutyric acid increased rooting efficiency, providing benefits in terms of increased production and root length in ipeca.

Acknowledgments

The authors thank the Superintendence da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA) and the Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) for financial support for this research. We also thank Dr. Osmar Alves Lameira and the Brazilian Agricultural Research Company (EMBRAPA - Eastern Amazon) for the donation of *Psychotria ipecacuanha* seedlings for *in vitro* cultivation experiments.

References

1. Lameira OA. Cultivo da ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. **Circ Tec.** 2002; 28: 1-4. [\[Link\]](#).
2. Oliveira LO, Venturini BA, Rossi AAB, Hastenreiter SS. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genet Mol Biol.** São Paulo. 2010; 33(1):86-93. ISSN: 1415-4757. [\[CrossRef\]](#).

3. Ferreira Júnior WS, Cruz MP, Santos LL, Medeiros MFT. Use and importance of quina (*Cinchona* spp.) and ipeca (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson): Plants for medicinal use from the 16th century to the present. **J Herb Med.** 2012; 2(4):103-144. ISSN: 2210-8033. [\[CrossRef\]](#).
4. Brandão MGL, Pignal M, Romaniuc S, Graef CFF, Fagg CFF. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **J Ethnoph.** 2012; 143(2): 488-500. ISSN: 0378-8741. [\[CrossRef\]](#). [\[PubMed\]](#).
5. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farm.** João Pessoa. 2008; 18(3):472-508. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).
6. Otoni WC, Silva ML, Azevedo AA, Carvalho IF, Rossi AAB, Castrillon SI. Morfoanatomia dos sistemas gemíferos de poaia (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson) – Rubiaceae. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2015; 9(1): 9-17. [\[CrossRef\]](#).
7. Andrade CRS, Lameira OA. Padrão de venação de *Psychotria ipecacuanha* (Brotero) Stokes (Rubiaceae). **Rev Trópica: Cien Agr Biol.** 2017; 9(1): 104-110. [\[Link\]](#).
8. Miranda GO. **A poaia: um estudo em Barra do Bugres.** 1983. Monografia [Especialização em História e Historiografia de Mato Grosso] – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.
9. Corrêa MX. Ensaio bibliográfico sobre a Economia da Poaia na Zona da Mata Mineira. Em: XX ciclo de estudos históricos. **Anais do XX ciclo de estudos históricos.** Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz. 2010.
10. Costa MP, Pinto JEB, França SC. Crescimento e teor de emetina em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard.) obtidas *in vitro* e submetidas às condições de soluções nutritivas em casa de vegetação. **Rev Cien Agrotec.** 2000; 24(1): 46-53. [\[Link\]](#).
11. Vieira LS. **Manual da medicina popular: A Fitoterapia da Amazônia.** Belém: Agronomia Vozes, 1991. 247p.
12. Rocha TT, Lameira OA. Avaliação do período de floração e frutificação do BAG ipecacuanha. Em: 15º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa. Belém, PA. **Anais do XV Seminário de Iniciação Científica da Embrapa:** Embrapa Amazônia Oriental, 2011. [\[Link\]](#).
13. Cncflora. **Carapichea ipecacuanha in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Acesso em: 16 jan 2018. [\[Link\]](#).
14. Yoshimatsu K, Shimomura K. *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. (Brazilian ipeca) Micropropagation and the production of emetine and cephaeline. Em: Bajaj Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture Forestry: Medicinal and Aromatic Plants,** Berlin: Springer Verlag. 1993; 21(4): 87-103.
15. Kingston DGI. Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. **J Nat Prod.** Berlin: Springer Verlag. 2011; 74(3): 496-511. [\[CrossRef\]](#).

16. Murashige T, Skoog FA. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Phys Plant.** 1962; 15: 473-497. [\[CrossRef\]](#).
17. Miranda CS, Chalfun NJ, Hoffmann A, Dutra LF, Coelho GVA. Enxertia recíproca e AIB como fatores indutores do enraizamento de estacas lenhosas dos porta-enxertos de pessegueiro 'Okinawa' e umezeiro. **Cien Agrotec.** 2004; 28: 778-784. [\[CrossRef\]](#).
18. Figueiredo LS, Bonfim FPG, Ferraz EO, Castro CE, Souza MF, Martins ER. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) em leito com umidade controlada. **Rev Bras Plan Medic.** 2009; 11: 33-36. [\[CrossRef\]](#).
19. Duarte EF, Resende Júnior PM, Carneiro IF. Enraizamento de estacas de ixora (*Ixora coccinea* L.) com o uso de AIB e solução mineral. Em: Congresso de pesquisa, ensino e extensão da UFG - CONPEEX 3. 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do III Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação** [CD-ROM], Goiânia: Universidade Federal de Goiânia, 2006. [\[Link\]](#).
20. Vasques GH, Mesquita KAC. Avaliação de diferentes substratos e doses de hormônio no enraizamento de estacas de ixora (*Ixora coccinea* L. inn "compacta"). Em: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 14, **Anais do Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas**, 1, Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 101p.
21. Pasqual M, Chalfun NNJ, Ramos JD, Vale MR, Silva CRR. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas.** Lavras: UFLA. 137p. 2001.
22. Ramos JD, Matos LES, Gontijo TCA, Pio R, Junqueira KP, Santos FC. Enraizamento de estacas herbáceas de 'mirabolano' (*Prunus cerasifera* EHRN) em diferentes substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Rev Bras Frutic.** 2003; 25(1):189-91. ISSN: 1806-9967. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
23. Krysczun DK, Siilva JAG, Marolli A, Trautmann APB, Lucio AD, Carbonera R. Growth regulator on oat yield indicators. **Rev Bras Eng Agr Amb.** 2017; 21(12):828-833. [\[CrossRef\]](#).
24. Hartmann HT, Kester DE, Davies RT, Geneve RL. **Plant propagation: principles and practices.** 8ª ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915p.
25. Zietemann C, Roberto SR. Efeito de diferentes substratos e épocas de coleta no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. Paluma e Século XXI. **Rev Bras Frut.** 2007; 29:31-36. [\[CrossRef\]](#).
26. Carvalho Júnior WGO, Melo MTP, Martins ER. Comprimento da estaca no desenvolvimento de mudas de alecrim pimenta. **Cien Rural.** Santa Maria. 2009; 39:2199-2202. ISSN: 1678-4596. [\[CrossRef\]](#).

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

Histórico do artigo: Submissão: 08/03/2018 | Aceite: 06/08/2018 | Publicação: 29/10/2018

Como citar este artigo: Silva S, Astolfi Filho S. Effect of indolebutyric acid on *in vitro* root production of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Fitos.** Rio de Janeiro. 2018; 12(3): 218-226. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/616>>. 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 *in silico* das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson

In silico activities prediction of triterpenes and iridoids isolated from *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson

DOI 10.17648/2446-4775.2018.602

Dolabela, Maria Fâni^{1*}; da Silva, Amanda Roberta Palheta¹; Ohashi, Letícia Hiromi¹; Bastos, Mirian Letícia Carmo¹; da Silva, Milena Cristina Martins¹; Vale, Valdicley Vieira¹.

¹Universidade Federal do Pará – UFPA, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde (ICS). Rua Augusto Corrêa, 01, Campus Universitário do Guamá, Campus III – Complexo da Saúde, CEP: 66075-110, Belém, Pará, Brasil.

*Correspondência: fanidolabela@gmail.com

Resumo

O presente trabalho realizou estudos *in silico* para predição das atividades farmacocinética, toxicológica e biológica de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus*, utilizada popularmente contra malária, afecções na pele, helmintíases, úlceras gástricas, gastrites, tumores e sífilis. As comparações foram realizadas através dos programas: ChemSketch, PreADMET e PASS online. As características físico-químicas dos compostos foram estimadas pelos servidores *online* Mcule property calculator e Chemicalize.org. Os resultados revelaram que os triterpenos e os iridoides não glicosilados (plumericina e isoplumericina) apresentaram absorção intestinal acima de 90%. Apenas a plumericina e a isoplumericina seguem a regra de Lipinsk, além de apresentarem atividade antineoplásica, antibacteriana e antifúngica. O cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina e acetato de lupeol provavelmente atuam nos sinais e sintomas da malária, porém, o acetato de lupeol apresentou maior número de reações adversas. Todas as substâncias mostraram carcinogenicidade, mas apenas os triterpenos demonstraram mutagenicidade. Em termos farmacocinético, toxicológico e biológico, apenas a plumericina e a isoplumericina apresentaram resultados satisfatórios.

Palavras-chave: *Himatanthus articulatus*. Farmacologia. Toxicologia. Predição.

Abstract

This study predicted by *in silico* methods, the pharmacokinetic, toxicological and biological activities of triterpenes and iridoids isolated from *Himatanthus articulatus*, used in Brazilian folk medicine to treat malaria, skin conditions, helminthiasis, gastric ulcers, gastritis, tumors and syphilis. The comparisons were made through the ChemSketch, PreADMET and PASS online programs. The physicochemical characteristics of the compounds were estimated by Mcule property calculator and Chemicalize.org.online

servers. The triterpenes and non-glycosylated iridoids (plumericin and isoplumericin) presented intestinal absorption above 90%. Only plumericin and isoplumericin follow the rule of Lipinsk, besides presenting antineoplastic, antibacterial and antifungal activity. Lupeol cinnamate, α -amirin cinnamate and lupeol acetate probably act on the signs and symptoms of malaria, but lupeol acetate presented a greater number of adverse reactions. All substances showed carcinogenicity, but only triterpenes demonstrated mutagenicity. In pharmacokinetic, toxicological and biological terms, only plumericin and isoplumericin presented satisfactory results.

Keywords: *Himatanthus articulatus*. Pharmacology. Toxicology. Prediction.

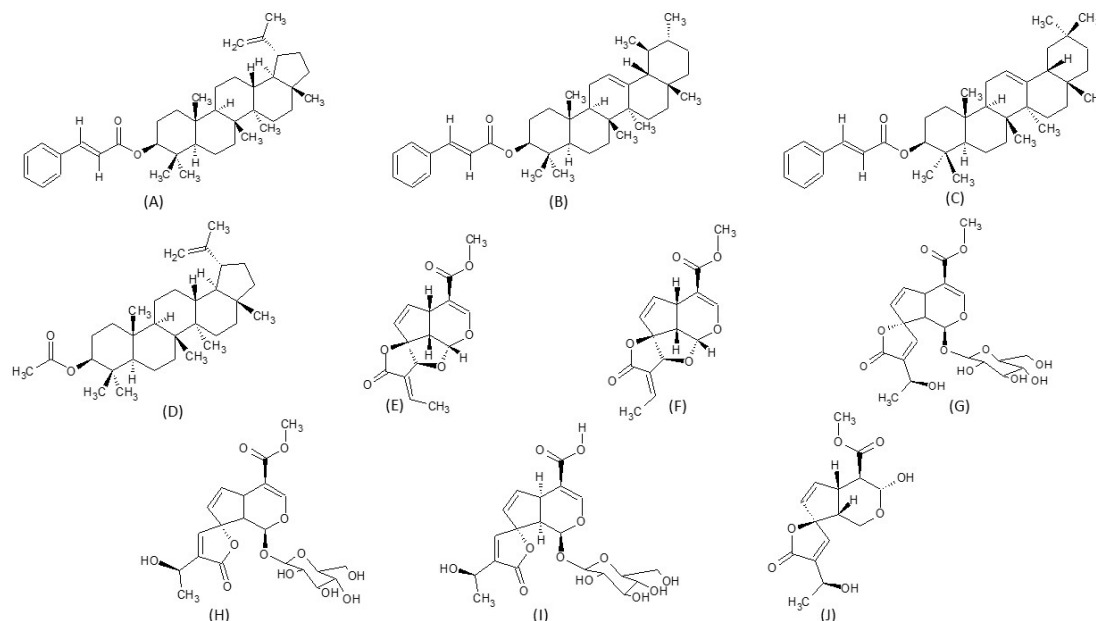
Introdução

A espécie *Himatanthus articulatus* (família Apocynaceae) é encontrada na Bolívia, Panamá, Colômbia, Peru, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e no Brasil, ocorrendo neste último nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Roraima, Goiás e Mato Grosso⁽¹⁾. Conhecida popularmente como súcuba, janaguba ou sucuuba, seu látex e o decocto das cascas são usados na medicina popular na Amazônia peruana e brasileira para o tratamento da malária⁽²⁾. Outros usos relatados são: tratamento de afecções na pele, helmintíases, úlceras gástricas, gastrites⁽³⁾, tumores⁽⁴⁾ e sífilis⁽⁵⁾.

Botanicamente, *H. articulatus* e *H. sucuuba* foram tratadas como espécies diferentes. No entanto, em revisão do gênero, estas passaram a ser consideradas sinonímias e o nome aceito é *H. articulatus*⁽¹⁾. Caracteriza-se por ser uma árvore que pode atingir 10 a 20 metros de altura, apresenta tronco vultoso e casca gretada, folha simples, alterna espiralada, glabra, coriácea e de margem inteira, com flores brancas em campânulas de base amarela, os frutos são fálicos verdes, quando imaturos e marrom escuro quando maduros⁽⁶⁾.

O extrato hexânico de *H. sucuuba* foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica gel, utilizando eluentes de polaridades crescentes, isolando os seguintes ésteres triterpenos: cinamato de lupeol (**FIGURA 1A**), cinamato de α -amirina (**FIGURA 1B**), cinamato de β -amirina (**FIGURA 1C**), acetato de lupeol (**FIGURA 1D**). Também foram isolados os iridoides, plumericina (**FIGURA 1E**) e isoplumericina (**FIGURA 1F**)⁽⁷⁾. Do extrato etanólico isolou-se o iridoide plumierídeo (**FIGURA 1G**)⁽⁸⁾. Em outro estudo, realizado com o extrato aquoso, obtido por infusão das cascas de *H. sucuuba*, foi isolado e identificado o isoplumierídeo (**FIGURA 1H**)⁽⁹⁾. Do látex, isolou-se o ácido 15-desmetilisoplumierídeo (**FIGURA 1I**)⁽¹⁰⁾. O Plumeridóide C (**FIGURA 1J**) foi isolado a partir das cascas por meio de partição líquido-líquido, além de várias outras técnicas cromatográficas e cristalização⁽¹¹⁾.

FIGURA 1: Substâncias isoladas de *H. articulatus*.



Legenda: A- cinamato de lupeol, B- cinamato de α -amirina, C- cinamato de β -amirina, D- acetato de lupeol, E- plumericina, F- isoplumericina, G- plumierídeo, H- isoplumierídeo, I- ácido 15-desmetilisoplumierídeo e J- plumeridídeo C.

Estudos anteriores demonstraram diversas atividades biológicas atribuídas a estes compostos. O cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina e o acetato de lupeol apresentaram atividades anti-inflamatória e analgésica (12,13). O extrato, frações e plumierídeo obtidos da casca de *H. articulatus* foram considerados inativos ($CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$) para atividade antiplasmodica *in vitro* (cepas W2 do *P. falciparum*), contudo, em testes com camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, promoveram maior sobrevivência. Provavelmente, o uso popular desta espécie como antimalárico, pode estar relacionado ao fato de ocorrer uma redução dos sinais e sintomas da doença como, por exemplo, prevenção da malária cerebral (8).

Em termos fitoquímicos, os infusos, chás e látex de *H. articulatus* contêm, provavelmente, diferentes metabólitos secundários, conforme dito anteriormente. No entanto, a maioria desses constituintes carece de informações sobre os aspectos farmacocinéticos e toxicológicos. Este artigo descreve, pela primeira vez, os resultados farmacocinéticos, toxicológicos e atividades biológicas obtidos nos estudos *in silico* das moléculas isoladas de *H. articulatus*.

Materiais e métodos

1. Coleta de dados

Neste trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico dos estudos realizados com *H. articulatus*, selecionando os principais triterpenos e iridoides já isolados.

2. Estudos *in silico*

No estudo foram utilizados os seguintes programas: ChemSketch versão 11.02, 2008, para o desenho das estruturas químicas; PreADMET (versão 2.0, Copyright® 2005) ⁽¹⁴⁾, para as predições farmacocinéticas e toxicológicas; PASS online -*Prediction of activity spectra for substances* (Way2Drug.com® 2011 versão 2.0 – 2016) ⁽¹⁵⁾, para as previsões de espectros de atividades biológicas, Sistema operacional Windows 2010 ⁽¹⁶⁾; os servidores *online* Mcule property calculator (Mcule – 2017) ⁽¹⁷⁾ e Chemicalize.org (ChemAxon, Southan 2013 - Copyright® 1998-2017 ChemAxon Ltd.) ⁽¹⁸⁾, para estimar as características físico-químicas dos compostos.

Os cálculos de ADMEtox foram realizados por comparação com substância semelhante, seguindo a regra de Lipinski ou "regra dos cinco" e de Líder-similar, nos quais se estabelece que uma molécula deve apresentar valores para 4 parâmetros múltiplos de 5: log P menor ou igual a 5, Massa Molecular menor ou igual a 500, aceptores de ligação de Hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 ⁽¹⁹⁾.

Nos estudos farmacocinéticos avaliou-se a permeabilidade cutânea (alta permeabilidade: <0,1, Baixa permeabilidade: > 0,1) e a absorção intestinal (Human intestinal absorption = HIA), sendo considerados os seguintes parâmetros: HIA 0-20% (baixa absorção), 20-70% (moderada absorção), >70% (elevada absorção) ⁽²⁰⁾; Permeabilidade em células Caco2 e MDCK - Alta permeabilidade >70 nm/sec, média permeabilidade 4-70 nm/sec e baixa permeabilidade <4 nm/sec ⁽²¹⁾. Em relação à distribuição das substâncias se utilizou os seguintes referenciais: ligado fortemente à albumina >90% e ligação moderada a fraca à albumina <90% ⁽¹⁴⁾. Em relação à substância atravessar ou não a barreira hematoencefálica, utilizou-se os seguintes critérios: atravessa livremente a BHE >2,0, atravessa de forma moderada a BHE 2,0-0,1 e atravessa de forma reduzida ou não atravessa <0,1 ⁽²²⁾.

Para avaliação dos resultados de metabolismo foram utilizados os seguintes critérios: se as substâncias sofrem metabolismo de fase 1, se inibem alguma CYP e quais CYP foram inibidas. Substâncias que inibem 2 ou mais CYP, em especial CYP3A4 e CYP2C9, podem interferir no metabolismo de um grande número de fármacos e outras substâncias, podendo contribuir para elevação da sua toxicidade. Para substâncias que inibem apenas uma CYP, pode ocorrer redução do número de fármacos que possuem interação farmacocinética com esta. Substâncias não inibidoras e não indutoras de CYP são consideradas substâncias ideais, pois não interferem no metabolismo de outros fármacos.

Para a predição da mutagenicidade utilizou-se o Teste Ames, sendo usadas várias estirpes da bactéria *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 e TA1535). A variável testada é a capacidade de o agente mutagênico provocar a reversão para o crescimento em meio isento de histidina ⁽²³⁾. Para interpretação dos resultados do teste de Ames considerou-se positivo quando houve reversão da mutação em uma ou mais bactérias, negativo quando não foi observada reversão da mutação nas mesmas. Quando houve falso positivo, isto é, não houve reversão da mutação em nenhum clone da bactéria e mesmo assim o programa classificou como mutagênico, o resultado não foi considerado.

A predição do potencial carcinogênico dos compostos em roedores (Rodent Carcinogenicity) foi realizada a partir dos dados de National Toxicology Program (NTP) e FDA (Food and Drug Administration). Os resultados foram expressos em: + carcinogênico e – não carcinogênico.

Quanto à avaliação dos critérios de toxicidade em organismos marinhos, foram considerados os seguintes parâmetros: toxicidade em algas - tóxicos < 1 mg/L e não tóxicos > 1 mg/L⁽²⁴⁾; toxicidade em *Daphnia* sp - tóxico < 0,22 µg/mL e não tóxico > 0,22 µg/mL⁽²⁵⁾; toxicidade em peixes Medaka - muito tóxico < 1 mg/L, tóxico entre 1-10 mg/L, prejudiciais entre 10-100 mg/L e não tóxico > 100 mg/L⁽²⁶⁾.

A atividade biológica das substâncias foi avaliada por similaridade com mais de 250.000 substâncias biologicamente ativas, incluindo fármacos e compostos tóxicos. Como critério de avaliação adotou-se o Pa (Probabilidade de atividade) de 0,7, ou seja, 70%⁽¹⁶⁾.

Resultados e Discussão

Para realização deste estudo foram selecionados os principais metabólitos isolados de *H. articulatus*, tais como: triterpenos (cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina, acetato de lupeol), iridoides não glicosilados (plumericina, isoplumericina e plumieróide C) e iridoides glicosilados (plumierídeo, isoplumierídeo e ácido 15-desmetilisoplumierídeo) (**FIGURA 1**), que em estudos anteriores demonstraram-se promissores para atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, atividade antitumoral, entre outras⁽¹³⁾.

Em relação à absorção dos compostos, o programa Preadmet avaliou a permeabilidade em células epiteliais, células Caco2 e células MDCK. As células Caco2 são oriundas de adenocarcinoma de cólon humano (intestino grosso) e possuem a capacidade de diferenciar-se em enterócitos. Os resultados demonstram que todas as substâncias avaliadas apresentaram alta permeabilidade cutânea, porém média permeabilidade em células Caco2. As células MDCK (Madin-Darby canine kidney) são oriundas de rim canino e sofrem diferenciação em células epiteliais colunares com membranas semipermeáveis quando cultivadas, por isso, são utilizadas para avaliação da permeabilidade *in vitro* de novos compostos desde 1989⁽²⁷⁾. Ambas, Caco2 e MDCK são utilizadas para prever a absorção de compostos, pois, formam junções entre as células⁽²⁸⁾. Em células MDCK, os iridoides glicosilados apresentaram média permeabilidade enquanto que triterpenos e iridoides não glicosilados se mostraram menos permeáveis. Isso significa que todas as substâncias avaliadas possuem média absorção em células do intestino grosso, mas apenas os iridoides glicosilados tem média permeabilidade em células renais.

Os triterpenos cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina, acetato de lupeol – possuem absorção de 100% pelo trato gastrointestinal, enquanto, os iridoides possuem uma menor taxa de absorção. Observou-se que, os iridoides não glicosilados (plumericina= 96,05%, isoplumericina= 96,05% e plumieróide C= 78,38%) apresentaram maior absorção no trato gastrointestinal que os iridoides glicosilados (plumierídeo = 21,46%, isoplumierídeo = 21,46%, ácido 15-desmetilisoplumierídeo= 11,76%) (**TABELA 1**). Tais fatos estão relacionados aos coeficientes de partição óleo-água, isto é, os triterpenos possuem coeficiente de partição (Log P em torno de 8,0), possuindo elevada lipossolubilidade e isso favorece sua absorção atravessando as membranas por difusão passiva. Os iridoides glicosilados possuem caráter polar, o que dificulta a travessia em barreiras celulares, porém, pode contribuir para a solubilidade em meio aquoso devido ao maior número de hidroxilas presentes na molécula⁽²⁹⁾ (**TABELA 2**).

As moléculas de isômeros plumericina e isoplumericina apresentam coeficiente de partição baixo (Log P 0,84), assim como o C (-0,47), sugerindo elevado caráter polar. No entanto, se enquadram perfeitamente

nas regras dos cinco: a molécula para ser bem absorvida deve possuir $\text{Log P} \leq 5$ (ser capaz de solubilizar em água e atravessar membranas), peso molecular menor que 500 Da, no máximo 10 grupos aceptores de hidrogênio e no máximo 5 doadores (**TABELA 2**). Ambas as estruturas apresentam 6 grupos aceptores e nenhum grupo doador de hidrogênio. Essas características são essenciais para uma estrutura química candidata a fármaco⁽¹⁹⁾.

Os triterpenos, provavelmente, ligam-se fortemente às proteínas plasmáticas (100%), o que pode ser considerado um resultado superestimado, pois existe um equilíbrio entre a fração ligada à proteína plasmática e a fração livre. Em geral, fármacos e hormônios sexuais (que possuem anel esteroidal) ligam-se fortemente a Globulina Transportadora de Hormônios Sexuais e de forma muito reduzida à albumina⁽³⁰⁾. Devido às semelhanças estruturais entre os triterpenos e os hormônios sexuais, provavelmente, estes triterpenos podem se ligar a esta proteína, visto que, o programa trabalha com comparação ao seu banco de dados e há substâncias parecidas com os triterpenos, como os próprios esteroides humanos.

Como é de se esperar, os iridoides glicosilados (plumierídeo, isoplumierídeo e ácido 15-desmetilisoplumierídeo) não atravessam, de forma eficiente, a barreira hematoencefálica, enquanto os iridoides não glicosilados (plumericina, isoplumericina e o plumeridóide C) atravessam de forma moderada. Os triterpenos, devido ao seu anel esteroidal, atravessam esta barreira de forma eficiente (**TABELA 1**). Semelhante à absorção, os aspectos relacionados à lipossolubilidade interferem neste aspecto farmacocinético. Isto é, quanto maior for a lipossolubilidade, maior a capacidade de a substância atravessar a membrana⁽²⁹⁾.

No que concerne ao metabolismo por CYP, os triterpenos são metabolizados pela CYP3A4, pois possuem caráter mais lipofílico e tendem a permanecer no organismo. Desta forma, estas substâncias passam pelo processo de biotransformação e se transformam em metabólitos com características mais hidrofílicas. Contudo, os iridoides não glicosilados (plumericina e isoplumericina) que possuem caráter polar são, também, metabolizados pela CYP3A4, ficando ainda mais hidrofílicos. O plumeridóide C, por possuir duas hidroxilas a mais, em sua estrutura, comparada a estrutura da plumericina e da isoplumericina, torna-se mais polar, ligando-se fracamente à CYP3A4. Os iridoides glicosilados, por possuírem um caráter mais hidrofílico, devido à presença da molécula de glicose em sua estrutura, se ligam fracamente à CYP3A4 e são facilmente excretados na urina.

Os triterpenos e os iridoides não glicosilados são capazes de inibir as enzimas CYP2C9 e CYP3A4 (**TABELA 1**). A potência de um inibidor é determinada por seu caráter lipofílico e pela força de ligação⁽³¹⁾. Quando se avalia o caráter lipofílico destas moléculas, pode-se sugerir que os triterpenos, possivelmente, são mais potentes inibidores destas enzimas que os iridoides não glicosilados. A cimetidina é um inibidor reversível relativamente mais fraco (baixa lipossolubilidade e menor afinidade pelo CYP). Por outro lado, o cetoconazol é um potente inibidor do CYP (alta lipossolubilidade)⁽³²⁾. Os iridoides glicosilados possuem menor lipossolubilidade, sendo observado, no estudo preditivo, a inibição de CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, sendo provável que esta seja fraca.

Tabela 1: Predições farmacocinéticas das substâncias isoladas de *Himatanthus articulatus*.

Moléculas	Absorção				Distribuição		Metabolismo	Inibição
	Cutânea	IG-MDCK (nm/sec)	IG Caco2 (nm/sec)	AIH(%)	PP (%)	BHE	Fase 1	CYP
Triterpenos								
Cinamato de lupeol	Alta	0,045	53,50	100,0	100,0	Alta	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9
Cinamato de α -amirina	Alta	0,049	53,80	100,0	100,0	Alta	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9
Cinamato de β -amirina	Alta	0,045	53,55	100,0	100,0	Alta	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9
Acetato de lupeol	Alta	0,066	51,03	100,0	100,0	Alta	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9
Iridoides								
Plumericina	Alta	2,46	23,14	96,05	76,21	Baixa	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9
Isoplumericina	Alta	2,46	23,14	96,05	76,21	Baixa	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9
Plumierídeo	Alta	15,89	18,06	21,46	33,37	Baixa	Fracamente	CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19
Isoplumierídeo	Alta	15,89	18,06	21,46	33,37	Baixa	Fracamente	CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19
Ácido 15-desmetilisoplumierídeo	Alta	18,82	17,01	11,76	32,75	Baixa	Fracamente	CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19
Plumeridóide C	Alta	0,69	20,97	78,38	47,18	Baixa	Fracamente	CYP3A4, CYP2C9,

Legenda: Permeabilidade cutânea – alta permeabilidade: <0,1, Baixa permeabilidade: > 0,1; Permeabilidade em células Caco2 e MDCK – Alta permeabilidade: >70 nm/sec, Média permeabilidade: 4-70 nm/sec, Baixa permeabilidade <4 nm/sec; Absorção intestinal – Alta absorção: 70-100%, Absorção moderada: 20-70%, Mal absorvida: 0-20%; Ligação às proteínas plasmáticas – Fortemente >90%, Fracamente <90%; Distribuição na Barreira hematoencefálica – Alta distribuição > 2,0, Média distribuição 2,0-0,1, Baixa distribuição >1,0.

Outro fator importante a ser observado em relação à inibição de CYP é a massa molecular. Isto é, moléculas com menor peso molecular podem inibir de forma mais efetiva a enzima por facilitar o contato dessas com os sítios alostéricos. Dessa forma, quem tem a menor massa molecular são os iridoides não glicosilados plumericina e a isoplumericina com massa de apenas 290,26 g/mol. No entanto, observou-se que os iridoides glicosilados inibiram maior diversidade de enzimas CYP (**TABELA 2**). Isto pode estar relacionado ao número de aceptores de Hidrogênio.

De acordo com a regra de Lipinski⁽¹⁹⁾, além da massa molecular, outros fatores físico-químicos devem ser considerados, como o Log P e o número de aceptores de Hidrogênio. Quando se avalia o Log P apenas os triterpenos apresentam valores acima de 5, garantindo a essas substâncias caráter lipofílico. No que concerne ao número de aceptores de Hidrogênio, o maior número de aceptores propicia maior quantidade de sítios que podem reagir com resíduos de aminoácidos, através de ligações de hidrogênios. Quem tem maior número de aceptores são os iridoides glicosilados que possuem 12, e em menor quantidade os triterpenos com apenas 2 aceptores de hidrogênio (**TABELA 2**).

Então, considerando os parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos, as moléculas mais promissoras são a plumericina e a isoplumericina. As análises demonstraram que estes compostos, teoricamente, terão bom comportamento farmacocinético, biodisponibilidade e bioatividade, portanto, poderão seguir estudos para a obtenção de novos fármacos⁽¹⁹⁾.

Tabela 2: Predição das características físico-químicas das substâncias isoladas de *Himatanthus articulatus*

Moléculas	Massa molecular (g/mol)	logP	Solubilidade*	HBA**	HBD***
Triterpenos					
Cinamato de lupeol	556.85	10,28	Baixa	2	0
Cinamato de α -amirina	556.85	10,28	Baixa	2	0
Cinamato de β -amirina	556.85	10.43	Baixa	2	0
Acetato de lupeol	468.75	8.59	Baixa	2	0
Iridoides					
Plumericina	290.26	0.84	Alta	6	0
Isoplumericina	290.26	0.84	Alta	6	0
Plumierídeo glicosilado	470.42	-2.37	Alta	12	5
Isoplumierídeo glicosilado	470.42	-2.37	Alta	12	5
Ácido 15-desmetilisoplumierídeo	456.39	-2.46	Alta	12	6
Plumierídeo C	310.29	-0.47	Alta	7	2

Legenda: *Solubilidade em solvente aquoso; **HBA - hydrogen-bond acceptors (Aceitadores de ligação de hidrogênio); *** HBD - hydrogen-bond donors (número de doadores de ligação de hidrogênio). Massa molecular ≤ 500 ; Log P ≤ 5 ; HBA ≤ 10 ; HBD ≤ 5 .

Vários triterpenos e iridoides mostraram-se ativos em diferentes linhagens celulares, apresentaram atividade antimicrobiana e alterações metabólicas (inibição da síntese de colesterol, aumento da liberação de insulina e atividade antioxidante). Os triterpenos, na predição de atividade biológica, apresentaram atividade antineoplásica e o possível mecanismo envolvido nesta atividade, com exceção do acetato de lupeol, é a indução de apoptose, estando envolvidas as caspases 3 e 8 (**TABELA 3**).

As caspases são proteases que clivam proteínas após o resíduo de ácido aspártico, sendo essencial para apoptose. Falhas no processo de apoptose podem levar ao desenvolvimento de tumores, doenças autoimunes, isquemia e mal de Alzheimer⁽³³⁾. No presente estudo os triterpenos mostraram-se promissores ativadores de caspases 3 e 8, consequentemente, devem induzir a apoptose.

Plumierídeo e ácido 15-desmetilisoplumierídeo, nos estudos *in silico*, apresentaram ativação seletiva para a caspase 8. Enquanto os triterpenos (cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina e cinamato de β -amirina) e os iridoides não glicosilados, não apresentaram seletividade, isto é, ativam tanto a caspase 3, quanto a caspase 8 (**TABELA 3**). Os triterpenos são substâncias com maior lipossolubilidade, podendo realizar ligações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com as enzimas, enquanto que os iridoides possuem caráter mais polar. Em síntese, os triterpenos, podem ser mais promissores na indução de apoptose.

Em relação à predição de atividades, antibacteriana e antifúngica, os iridoides glicosilados e não glicosilados mostraram-se ativos em ambos os microrganismos. Estudos preditivos demonstraram que os triterpenos (cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina e acetato de lupeol) possuem atividades, antifúngica e anti-leishmania. Contudo, apenas o cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina apresentaram atividade antiviral.

Alguns fármacos antifúngicos como, por exemplo, o cetoconazol, da família dos imidazóis, inibem enzimas do citocromo P450 do microrganismo, bloqueando a síntese do ergosterol a partir da desmetilação do lanosterol, interferindo na permeabilidade da membrana e a viabilidade dos fungos⁽³⁴⁾. As moléculas (iridoides e triterpenos) possuem ação inibitória sobre as CYP. Talvez este seja o mecanismo envolvido na atividade antifúngica (**TABELA 3**).

Os estudos *in silico* não identificaram nenhuma molécula com atividade antiplasmodica. Em estudos *in vitro*, utilizando clone de *Plasmodium falciparum* sensível (3d7) e resistente à cloroquina (W2), os iridoides também não foram capazes de reduzir significativamente a parasitemia^(35,8). Logo, existe uma coerência entre os estudos *in silico* e *in vitro*.

No entanto, no ensaio *in vivo* em camundongos infectados com *P. berghei*, observou-se uma melhora clínica nos animais tratados com o extrato etanólico de *H. articulatus* (200 mg/Kg), não havendo perdas por mortes neste grupo. Também se observou redução nos níveis de nitrito e nitrato cerebral, provavelmente, esta proteja os camundongos da malária cerebral. Ainda foi observada redução dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pulmonar. Essa redução sugere diminuição no processo inflamatório relacionado a peroxidação lipídica das células pulmonares, aumentando a sobrevivência do animal. Além disso, há indícios de que os iridoides possam atuar como anti-inflamatórios, por serem antioxidantes. Assim, a planta pode atuar como antimalárica e não como antiplasmodica, ou seja, atua na melhora clínica da doença e não inibindo o crescimento do parasito, podendo ser utilizada como um coadjuvante na terapia⁽⁹⁾. Outra explicação para este fato são os compostos presentes na espécie atuarem de forma sinérgica para ação antimalárica, assim como o ocorrido entre a associação de alcaloides isolados de cascas de Cinchona: quinina, quinidina e cinchonina. Ensaio, utilizando clone de *P. falciparum* resistente quinina, avaliou a atividade destes alcaloides de forma isolada e associada, sendo observada uma diminuição drástica na concentração inibitória 50% (CI₅₀) nesta associação⁽³⁶⁾.

Conforme dito anteriormente, o uso popular desta espécie pode estar relacionado a seu efeito sobre a patogênese da malária. Isto é, a alterações oxidativas e efeito anti-inflamatório, pois, tanto o parasito quanto o hospedeiro, frente a infecção por malária, produzem uma grande quantidade de radicais livres, que no caso do hospedeiro é para eliminação do parasito. O parasito, por outro lado, utiliza a produção de radicais livres para infectar as células, primeiro as do fígado (hepatócitos), depois as sanguíneas, causando processos inflamatórios⁽³⁷⁾.

Observou-se que todos os triterpenos e iridoides apresentaram atividade antioxidante, ou seja, serão responsáveis pela captura de radicais livres, impedindo estes de danificar as células. Apenas os triterpenos (A, B, C, D) inibem a síntese de óxido nítrico (NO), diminuindo a chance da malária evoluir para as formas severas. Os triterpenos cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, acetato de lupeol (A, B, D) e os iridoides glicosilados (G, H, I) apresentaram atividade anti-inflamatória (**TABELA 3**), reduzindo o processo inflamatório causado pela infecção às células pelo parasito. Dessa forma, observa-se que os mais

promissores quanto a atividade antioxidante, inibição da síntese de NO e o efeito anti-inflamatório são os triterpenos cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, acetato de lupeol (A, B, D).

Os triterpenos (cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina e acetato de lupeol) possuem semelhança estrutural com os corticosteroides, devido à presença do anel esteroidal (glicorticoide), ao qual tem sido atribuída atividade anti-inflamatória, estimulando a transcrição de proteínas anti-inflamatórias, além de reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-6 e IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandinas⁽³⁸⁾.

Nestes estudos preditivos várias alterações metabólicas foram observadas, em especial na redução dos níveis lipídicos e glicêmicos (**TABELA 3**). Vale ressaltar que, buscar novos fármacos hipoglicemiantes e redutores do colesterol é muito importante. Até o presente, nenhum estudo que avaliasse estes efeitos foi realizado com a *H. articulatus*.

Tabela 3: Predição de atividades biológicas de substâncias isoladas de *Himatanthus articulatus*.

Atividades	Triterpenos					Iridoides				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Câncer										
Antineoplásicos	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Indução de apoptose	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Estimulação de caspase 3	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Estimulação de caspase 8	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Microorganismos e parasitos										
Antibacteriano	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Antifúngico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antiviral	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Antiplasmódica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antileishmania	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Anti-inflamatório										
Anti-inflamatório	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Alterações metabólicas e efeito sobre o estresse oxidativo										
Hipolipêmico	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Inibição da síntese de colesterol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Aumento de liberação de insulina	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Antioxidante	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inibição da síntese de NO	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Legenda: A- cinamato de lupeol, B- cinamato de α -amirina, C- cinamato de β -amirina, D- acetato de lupeol, E- plumericina, F- isoplumericina, G- plumierídeo, H- isoplumierídeo, I- ácido 15-desmetilisoplumierídeo e J- plumeridóide. C. (+) possui atividade biológica; (-) não possui atividade biológica.

Em relação aos eventos adversos, os triterpenos, com exceção do cinamato de β -amirina, podem causar distúrbio de comportamento, mostrando que são possíveis substâncias psicoativas. Este resultado, possivelmente, ocorreu devido às semelhanças estruturais destas substâncias a outros esteroides, como os esteroides anabolizantes, causadores de comportamentos agressivos e síndromes comportamentais⁽³⁹⁾.

Os estudos preditivos sugerem que os triterpenos, de maneira geral, apresentaram uma maior diversidade de eventos. Dentre eles, destaca-se o acetato de lupeol, que além de causar distúrbios de comportamento, pode causar também hipercolesterolemia, nefrotoxicidade, fraqueza muscular e irritação (**TABELA 4**). No caso da hipercolesterolemia, talvez, esteja relacionado à molécula de acetato presente na substância, visto que o acetato está presente na estrutura da acetil-CoA, que é um precursor para a síntese de colesterol no organismo⁽⁴⁰⁾.

Tabela 4. Eventos adversos das substâncias isoladas de *Himatanthus articulatus*.

Tipos de eventos adversos	Triterpenos					Iridoides				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Sistema nervoso central										
Distúrbio de comportamento	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Alterações metabólicas										
Hipercolesterolemia	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sistema cardiovascular renal										
Nefrotoxicidade	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Outros										
Fraqueza	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Fraqueza muscular	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Ototoxicidade	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Irritação	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Sensibilização	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: A- cinamato de lupeol, B- cinamato de α -amirina, C- cinamato de β -amirina, D- acetato de lupeol, E- plumericina, F- isoplumericina, G- plumierídeo, H- isoplumierídeo, I- ácido 15-desmetilisoplumierídeo e J- plumeridóide. C. (+) possui o evento adverso; (-) não possui o evento adverso.

Os agentes mutagênicos podem alterar a sequência de bases do DNA, podendo desencadear a carcinogenicidade. Na **TABELA 5** observa-se que muitos compostos com potencial mutagênico podem ser carcinogênicos. No caso dos iridoides (plumericina, isoplumericina, plumierídeo e isoplumierídeo, observou-se que apresentam potencial mutagênico proporcional ao potencial de alquilação do DNA⁽⁴¹⁾. Em outro estudo, observou-se que em doses menores, o extrato demonstrou efeitos protetores para o DNA contra danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, indicando um importante efeito antígeno-tóxico. Por outro lado, em altas doses, são observados a formação de micronúcleos⁽⁴¹⁾.

Quanto ao ensaio em organismos marinhos, com objetivo de avaliar a toxicidade de substâncias com potencial farmacológico, os órgãos fiscalizadores sugerem que sejam utilizadas mais de uma espécie e que

pertencem a diferentes níveis tróficos. Assim, geralmente são utilizadas algas (base da cadeia alimentar), crustáceos (consumidores primários das algas), e os peixes, que são os consumidores secundários⁽⁴²⁾.

Nas predições de toxicidade em algas, todas as estruturas submetidas ao teste foram consideradas tóxicas (**TABELA 5**). Na avaliação de toxicidade em crustáceos *Daphnia* sp., apenas os triterpenos cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina e acetato de lupeol (**TABELA 5**) apresentaram-se tóxicos, possivelmente, devido a lipossolubilidade mais elevada em relação aos iridoides, sendo absorvidos de maneira mais eficiente pelos organismos. As algas são utilizadas para avaliar a toxicidade aguda, mensurando apenas as mortes, enquanto a *Daphnia* é utilizada como parâmetro tanto agudo quanto subcrônico e os peixes servem para demonstrar intoxicação aguda e crônica e, por serem animais maiores possibilita verificar as alterações tóxicas ocorridas em órgãos específicos desses animais⁽⁴³⁾.

Em relação à toxicidade em peixes Medaka, o aumento da hidrossolubilidade pela presença da molécula de glicose nas estruturas parece ser um bom preditivo para a diminuição ou anulação da toxicidade nesses organismos. Desse modo estruturas que não apresentam a molécula de açúcar ligado a seu esqueleto, como: os triterpenos cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina, cinamato de β -amirina e acetato de lupeol e os iridoides plumericina, isoplumericina e plumeridóide C, (**TABELA 5**) apresentaram-se como tóxicas para peixes.

Foram realizados testes *in vivo* de toxicidade sistêmica do látex de *H. articulatus* diluído em ratas da linhagem Wistar, os quais demonstraram que a referida amostra não alterou os parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina e fosfatase alcalina), nem alterou o peso (absoluto e relativo) dos órgãos como: fígado, rim, baço, útero, ovário, coração, pulmão e adrenais. Além disso, este estudo demonstrou não haver alterações gestacionais nas ratas tratadas com o látex da planta⁽⁴⁴⁾, corroborando com os estudos *in silico*, que foram negativos para a ação de embriotoxicidade e teratogenia das substâncias analisadas (**TABELA 5**).

Tabela 5. Eventos tóxicos das substâncias isoladas de *Himatanthus articulatus*.

Parâmetros avaliados	Triterpenos				Iridoides					
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Toxicidade										
Algas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Daphnia</i> sp.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Peixes Medaka	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Carcinogênico										
Ratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Camundongos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutagênico	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Citotóxico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Embriotóxico e Teratogenia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: A- cinamato de lupeol, B- cinamato de α -amirina, C- cinamato de β -amirina, D- acetato de lupeol, E- plumericina, F- isoplumericina, G- plumeridóide, H- isoplumeridóide, I- ácido 15-desmetilplumeridóide e J- plumeridóide C. (+) apresenta toxicidade; (-) não apresenta toxicidade.

Conclusão

Em relação à predição de atividade biológica, a plumericina e a isoplumericina demonstraram atividade antineoplásica, antibacteriana e antifúngica ratificando o uso popular desta planta. Os triterpenos cinamato de lupeol, cinamato de α -amirina e acetato de lupeol, podem possuir atividade antioxidante, anti-inflamatória e inibitória para síntese de óxido nítrico, atuantes nos sinais e sintomas da malária. Destes, o cinamato de lupeol e cinamato de α -amirina, provavelmente, possuem menor número de reações adversas. A plumericina e a isoplumericina destacaram-se como promissoras para candidatas ao desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos, antibacterianos, antifúngicos e antioxidantes. É necessário, porém, estudos pré-clínicos e clínicos para a comprovação destes resultados, bem como avaliação da carcinogenicidade em camundongos e ratos, haja vista estudos mostrarem que o efeito carcinogênico é dose-dependente.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento FAPESPA, Capes e CNPq.

Referências

1. Spina AP. **Estudo taxonômico, micro morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Wild. Ex. Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. 197p. 2004. Campinas. Tese de Doutorado [Instituto de Biologia], Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP. [\[Link\]](#).
2. Milliken W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima-Brazil. **Econ Bot.** 1997; 5(3):212-237. ISSN: 1874-9364. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
3. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. **Gentianales medicinais**. In: Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora da UNESP; 2002. p. 375-385. ISBN: 85-7139-411-3 [\[Link\]](#).
4. Van Den Berg ME. **Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento Sistemático**. 3ª ed. Belém: CNPq/PRU/MPEG. 2010. ISBN: 978-85-61377-19-9.
5. Gilbert B. Produtos naturais industrializáveis da Amazônia. **Rev Fitos.** 2006; 2(3):30-38. [\[Link\]](#).
6. Lorenzi H & Matos FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, São Paulo, p.68-9, 2002.
7. Silva JRA, Rezende CM, Pinto AC, Pinheiro, MLB, Cordeiro MC, Tamborini E, et al. Ésteres Triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Quim Nova.** 1998; 21(6):702-704. ISSN: 1678-7064. [\[CrossRef\]](#).
8. Vale VV, Vilhena TC, Trindade RCS, Ferreira MRC, Percário S, Soares LF, et al. Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Malar J.** 2015; 14: 132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).

9. Silva JRA, Amaral ACF, Silveira CV, Rezende CM, Pinto, AC. Quantitative determination by HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuuba*. **Acta Amazon**. 2007; 37(1):119-122. ISSN: 1809-4392. [[CrossRef](#)].
10. Barreto AS, Amaral ACF, Silva JRA, Schripsema J, Rezende CM, Pinto AC. Ácido 15-desmetilisolplumierídeo, um novo iridóide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthus sucuuba*. **Quim Nova**. 2007; 30 (5): 1133-1135. ISSN: 1678-7064. [[CrossRef](#)].
11. Waltenberger B, Rollinger JM, Griesser UJ, Stuppner H, Belbrich T. Plumeridoid C from the Amazonian traditional medicinal plant *Himatanthus sucuuba*. **Acta Crystallogr C**. 2011 oct; 67(Pt10):o409–o412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
12. Miranda ALP, Silva JRA, Rezende CM, Neves JS, Parrini SC, Pinheiro MLB. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Plan Med**. 2000; 66: 284-286. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
13. Vale VV. **Estudo fitoquímico e atividade antiplasmodica em *Plasmodium falciparum* (W2) de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae)**. 115p. 2014. Pará. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas], Universidade Federal do Pará. [[Link](#)].
14. PREADMET. ADME Prediction. [[Link](#)]. Acesso em: 15 ago 2017.
15. PASS Online. Prediction of biological activity. [[Link](#)]. Acesso em: 15 ago. 2017.
16. Filimonov DA, Poroikov VV, Karaicheva EI, Kazarian RK, Budunova AP, Mikhailovskii EM, et al. The Computerized Prediction of the spectrum of Biological Activity of Chemical Compounds by their structural formula: the PASS system. Prediction of activity Spectra for substance. **Eksp Klin Farmakol**. 1995; 58(2):56-62. [[PubMed](#)].
17. Mucle. Property calculator. [[Link](#)]. Acesso em: 28 nov. 2017.
18. Chemicalize. Instant cheminformatics solutions. [[Link](#)]. Acesso em: 28 nov. 2017.
19. Lipinski CA. Lead-and drug-like compounds: the rule of five revolution. **Drug Discov Today Technol**. 2004;1(4):337-341. ISSN: 1740-6749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
20. Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man – fact or myth. **Pharm Res**. 1997; 14 (6): 763-766. ISSN: 1573-904X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
21. Yazdanian M, Glynn SL, Wright JL, Hawi A. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. **Pharm Res**. 1998; 15(9):1490-1494. ISSN: 1573-904X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
22. Ajay A, Bermis GW, Murkco MA. Designing libraries with CNS activity. **J Med Chem**. 1999; 42(24):4942-4951. ISSN: 1520-4804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

23. Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**. 1975; 31: 347-364. ISSN: 0165-1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
24. Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim Nova**. 2008; 3(7):1820-1830. ISSN: 1678-7064. [[CrossRef](#)].
25. Guilhermino L, Diamantino T, Silva MC, Soares AMVM. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: Na alternative to mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? **Ecotoxicol Environ Saf**. 2000; 46(3):357-362. ISSN: 0147-6513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
26. Zucker E. Hazard Evaluation Division Standard Evaluation Procedure: Acute toxicity test for freshwater Fish. USEPA Publication 540/9-85-006, 1985. [[Link](#)].
27. Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE, Grove JR. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability Screening. **J Pharm Sci**. 1999; 88 (1): 28-33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
28. Balimane PV, Chong S. Cell cultures-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**. 2005; 10 (5): 335-343. ISSN: 1359-6446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
29. Martins CR, Lopes WA, Andrade JB. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Quim Nova**. 2013; 36 (8):1248-1255. ISSN: 0100-4042. [[CrossRef](#)].
30. Vieira JGH, Tachibana TT, Obara LH, Nishida SK, Lombardi MT, Maciel RMB. Desenvolvimento de ensaio imunofluorométrico para a medida da globulina ligadora de tiroxina (*thyroxine-binding globulin*, TBG) e sua aplicação em casos de deficiência desta proteína. **J Bras Patol Med Lab**. 2002;38(4):255-260. ISSN: 1678-4774. [[CrossRef](#)].
31. Guido RVC, Andricopulo AD, Oliva G. Planejamento de fármacos biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud Av**. 2010;24(70):81-98. ISSN: 0103-4014. [[CrossRef](#)].
32. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clin Pharmacokinet**. 1998; 35(5):361-390. ISSN: 1179-1926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
33. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? **IUBMB Life**. 2000; 50(2):85-90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
34. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**. 2006; 32(5):449-60 [[CrossRef](#)].
35. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **J Ethnopharmacol**. 2006; 106(3):390-402. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

36. Druilhe O, Brandicourt O, Chongsuphajaisiddhi T, Berthe J. Activity of a combination of three Cinchona bark alkaloids against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother**. 1988; 32(2):250-254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
37. Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, et al. Oxidative Stress in Malaria International. **J Mol Scien**. 2012;13(12): 16346-16372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
38. Alvarenga SM, Giorgi RDN, Chahade WH. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**. 2008; 6(Supl.1):S159-S6 [[Link](#)].
39. Martins CM, Carijó FH, Almeida MC, Silveira M, Mirailh MXN, Peixoto MM, et al. Efeito psicológico do abuso de anabolizantes. **Cien Cog**. 2005; 05: 84-91 [[Link](#)].
40. Nelson DL, Cox MM. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. ISBN: 9788536324180.
41. Hude WVD, Scheutwinkel-Reich M, Braun R. Bacterial mutagenicity of the tranquilizing constituents of *Valerianaceae* roots. **Mut Res**. 1986; 169(1-2):23-27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
42. Rebouças SO, Silva J, Berton RS, Decker N, Santos MS, Rossatto RR, et al. Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of *Himatanthus articulatus* bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. **J Ethnopharmacol**. 2013; 147(2): 474-480. ISSN: 0378-8741. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)].
43. Arenzon A, Lorenzo C, Coimbra NJ, Schulz UH. A determinação da toxicidade crônica para peixes baseada apenas na sobrevivência é suficiente? **Ecotoxicol Environ Contam**. 2013; 8(2): 65-68. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
44. Moura ER. **Avaliação da toxidade reprodutiva e sistêmica do látex de *Himatanthus sucubus* (Spruce) Woodson em roedores**. 60p. 2016. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal [Centro de Ciências Agrárias], Universidade Federal do Piauí. Teresina. [[Link](#)].

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

Histórico do artigo: Submissão: 24/01/2018 | Aceite: 05/09/2018 | Publicação: 29/10/2018

Como citar este artigo: Dolabela MF, da Silva ARP, Ohashi LH, Bastos MLC, da Silva MCM, Vale, VV. Estudo *in silico* das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(3): 227-242. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/602>>. 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.

Garrafadas: uma abordagem analítica

Garrafadas: an analytical approach

DOI 10.17648/2446-4775.2018.639

Ferreira, Luciene de Andrade Quaresma¹; Marques, Carlos Alexandre^{2*}.

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Instituto de Biologia, Centro de Ciências da Saúde. Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Sala A1-050, Cidade Universitária, CEP: 21941-902. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis. Rua Lúcio Tavares, 1045, Nova Cidade, CEP: 26530-060, Nilópolis, RJ, Brasil.

*Correspondência: carlos.alexandre@ifri.edu.br

Resumo

“Garrafadas” são combinações de plantas medicinais, podendo conter ainda produtos de origem animal ou mineral, e que têm como veículo aguardente ou vinho. Trata-se de uma preparação típica da medicina popular, utilizada no tratamento de enfermidades diversas. No presente trabalho, objetivou-se caracterizar a identidade botânica das espécies vegetais utilizadas; além de realizar testes fitoquímicos após a separação dos extratos, por cromatografia em camada delgada, a fim de detectar os metabólitos presentes nas amostras analisadas. Os resultados obtidos permitiram identificar, nesse tipo de estudo, resultados relacionados à identidade das espécies vegetais encontradas e a presença de metabólitos nos materiais analisados em laboratório.

Palavras-chave: Botânica aplicada. Medicina popular. Identidade botânica.

Abstract

“Garrafadas” are mixed medicinal plants which may contain mineral and animal products, and that uses a typical Brazilian alcoholic beverages, called “aguardente” or “cachaça” or wine as vehicle. It’s a typical folk drug used in the treatments of different diseases in Brazil. The objective of this paper was to characterize the botanical identity of the plant species used, besides performing phytochemical tests, after separating the extracts by thin layer chromatography to detect the metabolites presents in the samples. The results obtained allowed to identify, in this type of study, the results related to the identity of the plant species found and presence of metabolites in the materials analyzed in the laboratory.

Keywords: Applied botany. Folk medicine. Botanical identity.

Introdução

O uso popular das plantas como medicamentos tem sido uma característica que vem acompanhando os seres humanos desde os primórdios, sendo transmitida oralmente ao longo das gerações⁽¹⁾. No Brasil, as comunidades tradicionais, pertencentes a grupos étnicos distintos, geralmente ocorrem em regiões menos favorecidas e, em muitos casos, possuem somente o uso das plantas como alternativa terapêutica para suprir as necessidades de assistência médica primária⁽²⁾.

Com base em tais fatos, o estudo de plantas, como fonte de medicamentos, tem sido aceito e acompanhado pela Organização Mundial de Saúde, por organizações de diferentes aspectos regulatórios para os remédios à base de matérias-primas vegetais. Nesse sentido, o valor das observações sobre o uso popular e a eficácia das plantas medicinais está contribuindo de forma crescente para a divulgação dos benefícios terapêuticos dos vegetais, auxiliando os pesquisadores, não somente no estudo dos aspectos morfológicos, mas também dos aspectos que envolvem a etnobotânica, a farmacologia e a fitoquímica⁽²⁾. Como consequência, um número crescente de espécies vegetais medicinais tem sido descoberto e redescoberto nos últimos anos, devido às suas propriedades terapêuticas que têm sido avaliadas e comprovadas cientificamente, de acordo com seus princípios ativos, suas funções e seu grande apelo comercial pela população⁽³⁾.

De maneira geral, a etnobotânica e a etnofarmacologia, têm demonstrado serem poderosas e importantes ferramentas na busca por substâncias naturais com ação terapêutica⁽⁴⁻⁶⁾. Outros trabalhos têm sido desenvolvidos nestes campos do conhecimento. No entanto, algumas peculiaridades ainda carecem de maiores esclarecimentos, principalmente as relacionadas aos diferentes constituintes encontrados nas garrafadas, fato que determinará diretamente os efeitos causados sobre o público que as consome. Apesar de se constituírem exemplos legítimos de preparações típicas da medicina popular, seu uso desperta polêmica. Ao analisar o efeito das garrafadas em ratos por meio da avaliação de parâmetros bioquímicos⁽⁷⁾, verificou-se que há alterações hematológicas e histopatológicas hepáticas pronunciadas devido à presença de álcool. Os problemas que dizem respeito às plantas medicinais comercializadas na área do “mercadão de Madureira”, um importante comércio popular na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro-RJ, estão relacionados à conservação, ao potencial de toxidez e à identidade dos materiais botânicos⁽⁸⁾.

Baseando-se nas informações ora descritas, constitui-se como objetivo do presente trabalho a determinação da identidade botânica das espécies que compõem as garrafadas, através da análise dos caracteres morfológicos e anatômicos dos fragmentos vegetais que as constituem, além de realizar testes fitoquímicos, após separação dos extratos por cromatografia em camada delgada com o intuito de verificar a presença de metabólitos secundários nos materiais analisados, em duas áreas de comércio popular, nas cidades do Rio de Janeiro e de São João de Meriti, RJ.

Material e métodos

Na execução do presente trabalho, foram obtidas garrafadas em importantes áreas de comércio popular de dois municípios distintos no estado do Rio de Janeiro. Uma delas, denominada “mercadão de Madureira”, localizada à Avenida Ministro Edgard Romero, no bairro de Madureira, município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil (S 22.870439°, W 43.335805°). A outra área corresponde a uma feira livre na região central do município de São João de Meriti, RJ, Brasil, localizada nas imediações da Avenida Dr. Arruda Negreiros, área limítrofe com o bairro da Pavuna, que pertence ao Município do Rio de Janeiro, RJ (S 22.804055°, W 43.36853°). Tal feira

livre recebe a denominação popular “feirinha da Pavuna”. Em ambas as localidades, o comércio de plantas medicinais já está estabelecido há décadas.

Nas duas áreas de estudo, foram adquiridas cinco amostras de garrafadas junto aos comerciantes de plantas medicinais (**FIGURA 1**). Posteriormente, estas amostras foram analisadas separadamente no Laboratório de Microscopia do Instituto Federal do Rio de Janeiro, *campus* Nilópolis, e numeradas de acordo com a indicação de uso, a saber: garrafada número 1 - para problemas do estômago; 2 - para problemas uterinos; 3 - revigorante sexual; 4 - produto “bom para tudo” e 5 - para inflamações em geral.

Para a verificação da autenticidade botânica, os fragmentos vegetais foram retirados do recipiente, triados e colocados em etanol 70%. As características morfológicas e anatômicas das espécies vegetais contidas nas amostras foram analisadas, a fim de confirmar sua identificação botânica, através das metodologias apresentadas a seguir:

FIGURA 1: Detalhe de um dos exemplares analisados (garrafada número 5).



Autenticidade das matérias-primas vegetais

Após aquisição das garrafadas fez-se um levantamento bibliográfico relativo às espécies mencionadas como componentes, bem como suas indicações e formas de uso. Em seguida, foram feitas análises visando verificar a identidade botânica dos materiais, considerando-se tanto a descrição de caracteres morfológicos quanto a descrição dos aspectos anatômicos dos fragmentos encontrados. Para identificação do material botânico, procedeu-se a identificação dos ramos floríferos ao microscópio estereoscópico, comparando-se o material analisado com a bibliografia especializada disponível⁽⁹⁻²³⁾. A documentação desses fragmentos foi feita com equipamento fotográfico digital acoplado ao microscópio estereoscópico, nos aumentos de 20X e 40X. Para análise de fragmentos isolados ou de ramos estéreis, recorreu-se aos caracteres da morfologia foliar, aliado à análise dos aspectos anatômicos, a fim de confirmar a identidade botânica.

Para tal estudo, foram realizados os procedimentos de clarificação em hipoclorito de sódio, 50% em água destilada ou pela modificação do método de diafanização para observação dos caracteres anatômicos da epiderme. Neste procedimento, os materiais foram imersos em hidróxido de sódio a 5% em água por 3 a 4 horas, sendo, em seguida, lavados em água e colocados em hipoclorito de sódio a 50% em água, por 24 horas ou até sua completa despigmentação. Após nova lavagem em água destilada, colocaram-se os materiais em

cloral hidratado a 10% em água, por 24 horas, seguido por nova lavagem. Para a montagem de lâminas, o material clarificado foi corado com Safranina aquosa a 1% por, aproximadamente, dez minutos. Após a lavagem, fez-se a montagem entre lâmina e lamínula, usando-se glicerina 50% em água ou gelatina glicerina de Kaiser como meios de montagem⁽¹⁸⁾.

Para análises de fragmentos foliares, em corte transversal, utilizaram-se fragmentos do terço médio das folhas, incluindo a região da nervura mediana, da região intercostal e do bordo foliar, quando necessário. Primeiramente, fizeram-se cortes transversais com o auxílio de micrótomo de Ranvier. Os cortes obtidos foram clarificados em hipoclorito de sódio comercial a 50% em água durante 20-30 minutos, sendo, em seguida, lavados em água destilada. Fez-se a coloração dos cortes com a mistura Safranina aquosa 1% e Azul de Astra 1%, conforme descrito em Kraus e Arduin (*loc. cit.*). Posteriormente, foram montados entre lâmina e lamínula usando-se glicerina 50% em água como meio de montagem. A observação dos caracteres anatômicos foi feita ao microscópio fotônico binocular e a documentação dos resultados obtidos com o auxílio de um fotomicroscópio com equipamento fotográfico digital acoplado ao aparelho e a um microcomputador.

Análise cromatográfica e testes fitoquímicos

Para a realização dessas análises, foram utilizados os extratos correspondentes às porções líquidas das garrafadas, contendo os metabólitos vegetais polares extraídos pela aguardente. Todo o solvente foi removido ao evaporador rotatório a 50°C, até a obtenção de um extrato bruto seco.

Posteriormente, foram gerados cinco extratos, correspondentes a cada uma das garrafadas adquiridas. Os extratos foram aplicados em cromatoplaças analíticas de alumínio-sílica (gel Merck 60 F₂₅₄), para cromatografia em camada delgada (CCD). Como eluentes, testaram-se sistemas de solventes distintos com o objetivo de avaliar qual sistema permitiu a melhor separação dos constituintes presentes nos extratos (**QUADRO 1**). Após a eluição e escolha do melhor sistema de solventes, fizeram-se testes fitoquímicos, para verificar a presença de diversas classes de metabólitos especiais: fenóis, taninos, alcaloides, terpenos, flavonoides, indóis e aminas. Para a realização dos testes foram utilizados os seguintes reagentes: Ehrlich (solução A e B) para evidenciar aminas; Solkowski para indóis; Baljet (solução A e B) para glicosídeos cardiotônicos; Van-Urk para derivados de indóis; Prochazka para indóis e derivados de indóis; vanilina sulfúrica para terpenos; cloreto férrico para fenóis; Mayer para alcaloides; reagente de Mayer para alcaloides e sulfato cérico como revelador universal, seguindo-se os procedimentos usuais⁽²⁴⁾.

QUADRO 1. Mistura de eluentes testadas para cromatografia em camada delgada.

Sistemas de solventes testados
Metanol (100%)
Acetato de etila (100%)
Acetato de etila: Hexano (1:1)
Acetato de etila: Hexano (3:1)
Clorofórmio: Acetato de etila (1:1)
Metanol: Acetato de etila: clorofórmio (3,5: 3,5: 3)
Clorofórmio: Acetato de etila: Metanol (1:1: 1)
Clorofórmio: Acetato de etila: Metanol (3,5: 3,5:3)
Metanol: Clorofórmio (6:4)

Resultados e Discussão

O trabalho iniciou-se pela análise dos aspectos externos (embalagem e rotulagem). As garrafadas 1, 2 e 3 possuíam rótulo plástico impresso, colado no recipiente, contendo indicação de uso, empresa fabricante, endereço, prazo de validade e nome vulgar das plantas. Essas garrafadas estavam envasadas em garrafas plásticas (tipo pet). Duas dessas possuíam conteúdo líquido de 500 mL (garrafadas 1 e 2), a outra (garrafada 3) continha 1000 mL. Todas foram preparadas com aguardente. Já a garrafada 4 era envasada em garrafa de plástico, mas sem rótulo impresso e a garrafada 5 seguia um padrão mais tradicional, sendo envasada em garrafa de vidro com rolha. Ambas continham apenas uma etiqueta de papel colada com a indicação de uso escrita à mão. A garrafada 4 continha 1000 mL, já a garrafada 5 continha 800 mL. Essas garrafadas (4 e 5) foram preparadas com vinho tinto. Todas as garrafadas vendidas, que não continham rótulo, tinham a sua composição exposta em placas, cartazes ou eram anunciadas pelos vendedores.

Verificação da identidade botânica das matérias-primas vegetais e revisão sobre as propriedades medicinais das espécies encontradas

As informações sobre a utilização de cada garrafada, as espécies que as compõem e as partes vegetais utilizadas para a sua confecção estão sumarizadas na **TABELA 1**. Em seguida, foi feito um levantamento bibliográfico onde, para cada material botânico, mencionado como componente de cada garrafada, foram obtidas informações sobre o nome da espécie e família, parte da planta utilizada, metabólitos com atividade biológica e indicação de uso (**TABELA 2**).

Na etapa seguinte foi feita a triagem dos fragmentos contidos nas garrafadas, a fim de determinar sua identidade botânica, através de caracteres da morfologia externa ou interna, confrontando-se esses resultados com os dados obtidos nas **TABELAS 1 e 2**.

TABELA 1: Informações relativas às garrafadas analisadas.

Garrafadas	Composição	Indicação	Forma de uso	Parte utilizada
1	Espinheira-santa, Ipê-roxo, Angico, Alcachofra, Jurupitam, Cáscara-sagrada, Angélica e melão-de-São-Caetano.	Combate doenças do estômago, como úlcera e gastrite.	Uma colher de sopa 2 vezes ao dia.	Caule (casca)
2	Cana-crioula, Orelha-de-burro, Rosa-branca, Jatobá, Pata-de-vaca, Casca-de-cajueiro, unha-de-gato e uxi.	"Limpeza profunda do útero", "capaz de remover miomas".	Uma colher de sopa 3 vezes ao dia	Caule (casca)
3	Jabuticaba, Carambola, Catuaba, Mandioca, Coco (seco), Uva-verde, Maçã, Noz-moscada, Canela, Cravo e Cacau.	"Revigorante sexual sem efeito colateral"	Uma colher de sopa 3 vezes ao dia	Caule (casca)
4	Nó-de-cachorro, Ginseng, Catuaba, Jatobá, Guaraná, Agoniado e Pau-de-resposta.	"Cura todo e qualquer tipo de doença"	2 cálices ao dia	Caule (casca e lenho)
5	Malva, amor-do-campo, tanchagem, confrei, alecrim, quitoco, agoniada, Erva-de-santa-maria e hortelã.	"Cura todo e qualquer tipo de infamação"	3 cálices ao dia	Folhas

TABELA 2: Informações bibliográficas obtidas sobre cada espécie mencionada como componente das garrafadas 1 a 5 (20,25-30,31-32).

Nome vulgar e espécie	Família	Parte utilizada	Metabólitos com atividade biológica	Indicação
Espinheira-Santa- <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek	Celastraceae	Folhas	Terpenos, flavonoide, taninos.	Tratamento de úlceras, dispepsia, constipação intestinal e asma.
Ipê-roxo - <i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb.	Bignoniaceae	Folhas e casca	Lapachol, carobina e taninos.	Tratamento de úlceras, sífilis e diabetes.
Angico- <i>Parapiptadenia rigida</i> (Benth.) Brenan	Fabaceae	Caule	Gomas, taninos	Tratamento de problemas respiratórios e reumatismo.
Alcachofra - <i>Cynara scolymus</i> L.	Asteraceae	Folhas e raízes	Flavonoide, taninos, terpenos e glicosídeos.	É utilizada em constipação intestinal, afecção das vias urinárias, anemia, asma brônquica e bronquite crônica. Age como diurético.
Jurupitam – Mistura composta.	Não encontrada	Não encontrada	Não encontrada	Preparado de ação desobstruente, tônica, estimulante e reguladora da função hepato-esplênica. Indicado nas cólicas e congestões do fígado, cálculos biliares, cirrose, intoxicações alimentares, distúrbios gastrintestinais e dispepsias de fundo hepático.
Cascara-sagrada- <i>Rhamnus purshiana</i> DC.	Rhamnaceae	Casca	Ácidos graxos e antraquinonas.	Tratamento de constipação intestinal.
Angélica- <i>Angelica archangelica</i> L.	Apiaceae	Raízes, rizomas, caule, folhas, flores e sementes.	Resinas, taninos, açúcares, amido, fitosterol, vitamina B1, ácido angélico e ácido valeriânico.	Usada no tratamento de dispepsia, bronquite crônica, asma, náuseas, vômitos, e dores reumáticas.
Melão-de-São-Caetano- <i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Flor	Ácidos linolênicos conjugados, triterpenoides	Usada para o tratamento de diabetes, úlceras pépticas e feridas.
Cana-crioula	Não encontrada	Não encontrada	Não encontrada	Não encontrada
Orelha-de-burro- <i>Kalanchoe gastoni-bonnieri</i>	Crassulaceae	Folhas	Mucilagens, glicosídeos cardiotônicos	Antifúngica
Rosa-branca – <i>Rosa gallica</i> L.	Rosaceae	Flores	Luteína B, 3'-Epiluteína, Caltaxantina, (3R,3'S,6'R)-beta,epsilon-Caroteno-3,3'-diol	Dores de estômago, prisão de ventre.

Uxi - <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	Humiriaceae	Cascas e frutos	Óleo	Auxilia no tratamento de inflamação no aparelho reprodutor feminino
Jabuticaba – <i>Eugenia cauliflora</i> DC., <i>E. tomentosa</i> Aubl.	Myrtaceae	Fruto	Vitamina C, ferro, cálcio e fósforo	Ajuda no tratamento da pele e reumatismo
Carambola – <i>Averrhoa bilimbi</i> L.	Oxalidaceae	Fruto	2-dodecil-6-metoxicicloxa-2,5,dieno-1,4-diona, 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona, apigenina-6-C-(2''-O-rhamnopiranosil)-fucopiranosídeo, Colchicina, Cicloheximideo, Wortmannina	Diabetes, proteinúria, problemas renais (decorrentes do diabetes)
Catuaba ou pau-de-resposta - <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stellf.	Bignoniaceae	Casca e rizomas	Taninos	Tratamento de astenia, bronquite crônica, asma e ação afrodisíaca
Mandioca – <i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	Raiz	Amido, glicosídeos cianogênicos (Tóxicos)	Não encontrado
Coco – <i>Cocos nucifera</i> L.	Arecaceae	Semente (endosperma sólido e líquido)	Óleos (lipídios) e sais minerais (da água de coco)	Diurético, repositor de sais minerais (água) e fonte de lipídios (óleo do endosperma sólido)
Uvas-verdes- <i>Vitis</i> sp. L.	Vitaceae	Frutos e folhas	Glicosídeos, ácido cafeico, terpenos alcaide, quinonas, ácido salicílico, e lignanas.	Seu tratamento é de tabelas de obesidade, astenia, relacionado à distúrbios diarreicos
Maçã – <i>Malus</i> sp. L.	Rosaceae	Pseudofruto	Flavonoide, ácido málico	Antioxidante, digestivo
Noz-moscada- <i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Myristicaceae	Semente	Óleo essencial e ésteres fenólicos.	Tratamento de flatulência, astenia e dispepsia
Canela – <i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl e <i>C. zeylanicum</i> Blume	Lauraceae	Casca	Óleo essencial	Auxilia no tratamento de reumatismo
Cravo-da-Índia - <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	Myrtaceae	Botões florais	Eugenol, acetato de angenila, e cariofileno.	Tratamento de dispepsia, bronquite crônica, flatulências e regularizadora do intestino
Cacau – <i>Theobroma cacao</i> L.	Sterculiaceae	Frutos	Capsaicina, polifenóis, Cloreto de potássio e procianidina	Antineoplásica (câncer de mama), doenças relacionadas à junta temporomandibular
Nó-de-cachorro- <i>Heteropterys tomentosa</i> A. Juss.	Malphiaceae	Raízes	Flavonoide.	Auxilia no tratamento de disenterias, e possui ação afrodisíaca.
Jatobá - <i>Hymenaea courbaril</i> L.	Fabaceae	Caule	Xiloglicanos	Usada para diarreia, tosse, bronquite, problemas de estômago e fungos nos pés.
Agoniada - <i>Plumeria lancifolia</i> Müll. Arg.	Apocynaceae	Casca	Glicosídeos e ácido plumerâmico	Usada para o tratamento de cólicas menstruais,

ou <i>Himatanthus lancifolius</i> Müll. Arg.				febres, asma brônquica e brônquite crônica.
Ginseng – <i>Panax ginseng</i> C.A. Mey ou <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen ou <i>Hebanthe paniculata</i>	Araliaceae ou Amaranthaceae (<i>Pfaffia</i> e <i>Hebanthe</i>).	Raízes	Glicosídeos, triterpenos, vitaminas, ferro e fósforo.	Usada para o tratamento de astenia, indisposição. Fadiga e estimulante da circulação periférica.
Guaraná – <i>Paullinia cupana</i> Kunth	Sapindaceae	Sementes	Cafeína, taninos, teofilina, teobromina, saponinas e catequinas.	Usada para o tratamento de astenia, indisposição esgotamento físico e mental, cefaléias, diarreias e flatulências.
Amor-do-campo – <i>Desmodium axillare</i> (Sw.) DC.	Fabaceae	Folhas	Taninos	Diurético, <u>antiinflamatório</u> e regulador das funções intestinais.
Tanchagem- <i>Plantago major</i> L.	Plantaginaceae	Folhas, raízes e sementes	Flavonoide, taninos, polifenóis.	Antimicrobiana, analgésica, adstringente, bactericida, sedativa, diurética. Possui indicações contra câncer, distúrbios, anemia e hemorragias.
Alecrim - <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Folhas e flores	Terpenos, flavonoide, saponinas, taninos.	Possui efeito diurético, antimicrobiano e cicatrizante.
Quitoco - <i>Pluchea sagittalis</i> Lam. (Cabrera)	Asteraceae	Folhas e caule	Terpenos voláteis	Casos de bronquite crônica, dispepsia, flatulência, ansiedade, insônia e dores reumáticas.
Erva-de-Santa-maria- <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Chenopodiaceae	Folhas e frutos	Tanino, óleos essenciais, terpenos.	Abortiva, antiinflamatória, antiasmática, antifúngica, anticancerígena, cicatrizante, diurética.
Hortelã – <i>Mentha spicata</i> L.	Lamiaceae	Folhas	Óleo essencial, taninos, flavonoides, ácidos orgânicos, heterosídeos da luteolina e apigenina	Digestivo, estimulante, tônico em geral, carminativa, antiespasmódica, estomáquica, expectorante, antisséptica, colerética, colagoga e vermífuga (para giárdia, ameba e lombrigas)
Pata-de-vaca – <i>Bauhinia forficata</i> Link	Fabaceae	Folhas	Flavonoides (principalmente campferol, rutina e quercetina), ácidos orgânicos e heterosídeos.	Hipoglicemiante (diabetes) e diurética
Cajueiro – <i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	Cascas (na garrafada). Também se usam os frutos (castanhas) e o pseudofruto (pedúnculo)	Óleo-resina (cáustica), composto principalmente de ácido anacárdico, cardol (11,31%) e seus derivados. Dependendo da parte da planta: goma, proteínas, fibras, carboidratos, cálcio, fósforo, ferro, ácido ascórbico, vitamina A e C; kaempferol, ácido hidrobenzóico, quercetina, niacina, riboflavina, cardol,	Adstringente, antidiabético, anti-hemorragico, antiinflamatório, antirreumático, antitérmico, ulcerogênica, cáustico, diurético, laxante, purgante, tônico, vermífugo.

			gingkol, taninos, rhamnose, anidrido urônico.	
Unha-de-gato – <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC. e <i>U. guianensis</i> (Aubl.) J.F. Gmel	Rubiaceae	Raiz	Acetoxidiidronomilina, ácido alfa-triidroxi-ursenóico, carboxistrictosidina, ácido acetiluncárico, ácido adípico, alcaloides – especiofilina (uncarina D), isomitrafalina, isopteropodina (uncarina E), mitrafalina, pteropodina (uncarina C).	Antinflamatórios, processos inflamatórios articulares.
Malva – <i>Malva</i> sp. L. ou <i>Sida macrodon</i> DC. ou <i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér ex. Aiton	Malvaceae ou Asteraceae (<i>P. graveolens</i>)	Folhas e caule	Varia de acordo com a espécie	Espectorante, calmante, emoliente, antibiótico (em infecções).
Confrei – <i>Symphytum officinale</i> L.	Boraginaceae	Folhas	Alantoína, alcaloides pirrolizidínicos, taninos, mucilagens, vitaminas e ácido fólico.	Hemostático, antiinflamatório, cicatrizante, indutor da produção calcárea.

A triagem ao microscópio estereoscópico revelou que as garrafadas 1, 2 e 3 não continham fragmentos vegetais visíveis, macro ou microscopicamente, sendo constituídas apenas de extratos brutos etanólicos. Uma delas continha corante artificial de tonalidade “verde-limão”. A garrafada 4 possuía fragmentos de lenho e casca de diferentes espécies e a garrafada 5 era constituída por folhas em seus ramos caulinares, alguns deles contendo botões florais.

A garrafada de número 4, considerada “boa para tudo” era composta por fragmentos de seis espécies vegetais, a saber: nó-de-cachorro, jatobá, guaraná, agoniada, ginseng, pau-de-resposta (**TABELAS 1 e 2**). A recomendação para a “cura de todas as doenças” estimulou a análise mais acurada deste material em laboratório.

Inicialmente, a revisão bibliográfica mostrou que duas das espécies vegetais mencionadas nessa composição (catuaba e pau-de-resposta), deveriam corresponder à mesma espécie - *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae). Sabe-se que, dependendo da região, uma determinada espécie pode ser conhecida por nomes populares distintos. No estudo⁽³²⁻³³⁾ foi relatado que as cascas tradicionalmente comercializadas como “catuaba” e que têm sido identificadas como *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae), correspondiam, na verdade, à espécie *Trichilia catigua* (Meliaceae). Ao analisarem amostras comerciais obtidas em nove estados brasileiros, tal fato foi confirmado ⁽³⁴⁾.

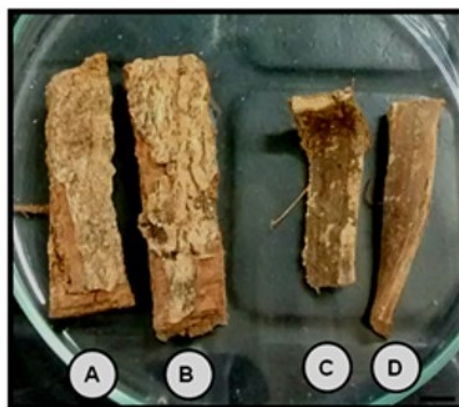
A composição botânica da garrafada 4 condiz com a sua indicação de uso^(27-28,35-36). Contudo, algumas das espécies mencionadas como componentes, como o guaraná (*Paullinia cupana*) e o ginseng (*Pfaffia glomerata* ou *Hebanthe paniculata*), não possuíam fragmentos, mesmo em pó, correspondentes à parte da planta utilizada, pois destas são utilizadas, respectivamente, as sementes e as raízes e, nesta garrafada, foram encontrados somente fragmentos de lenhos.

As análises, ao microscópio estereoscópico, revelaram que a catuaba presente nas amostras correspondia à espécie *Trichilia catigua*, tal como mencionado na bibliografia já citada. Foram observados caracteres

morfológicos diagnósticos, como fragmentos planares levemente encurvados, com aspecto grosseiramente granuloso. A face interna do fragmento possui coloração avermelhada de caráter fibroso, fibras finas e estriadas longitudinalmente (**FIGURA 2 A-B**). Os mesmos caracteres também foram observados⁽³⁷⁾, ao realizarem a análise comparativa das amostras de cascas de catuaba no estado da Bahia.

Outros fragmentos de casca, na mesma garrafada, foram identificados como *Hymenaea courbaril* L. (jatobá). Essa espécie possui casca externa com estrias finas e superficiais. A casca, ao longo do tronco, possui lenticelas salientes cuja coloração varia do bege (amarronzado) a cinza (**FIGURA 2 C-D**).

FIGURA 2: Fragmentos da casca de *Trichilia catigua* (Catuaba - A e B) e *Hymenaea courbaril* (Jatobá - C e D). Barra 1 = cm.



A identificação da espécie *Himatanthus lancifolius* (agoniada) também foi realizada através da triagem e observação morfológica dos fragmentos diagnósticos. A espécie *H. lancifolius* apresenta, na superfície externa das cascas, uma grande espessura, resultado da expansão contínua circunferencial do crescimento secundário, com aspecto tangencialmente esticado formando depressões e fissuras profundas⁽³⁸⁾. A sua casca pode ser importante para complementar a chave de identificação da espécie. Tais características foram observadas no fragmento analisado ao microscópio estereoscópico.

Fragmentos de *Heteropterys tomentosa*, vulgarmente denominada “nó-de-cachorro” estavam ausentes. Caracteres diagnósticos da raiz são usados como padrão para fins de comparação⁽³⁹⁾.

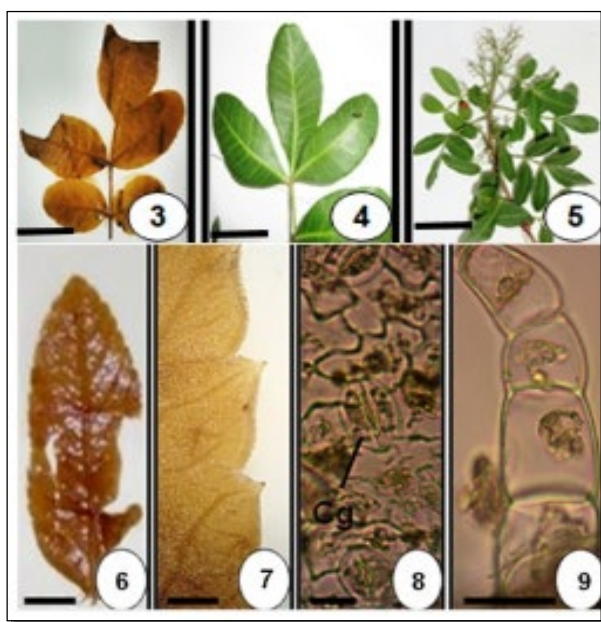
Na garrafada de número 5, constituída por folhas e ramos caulinares, observou-se que a mesma não possuía nove espécies, conforme informado na entrevista, mas apenas seis, sendo que duas destas não correspondiam a nenhuma das espécies mencionadas. Uma delas é *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) (aroeira); a outra apresentou caracteres compatíveis com uma espécie da família Fabaceae, mas que não correspondia à espécie popularmente denominada “amor-do-campo” (*Desmodium axillare*). As demais espécies vegetais mencionadas como componentes era *Pluchea sagittalis* (Asteraceae), conhecida como: “quitoco”; *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae), a “erva-de-santa-maria”; *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), o “alecrim” e *Plantago major* (Plantaginaceae), a “tanchagem”. Todas essas espécies foram identificadas através de caracteres da morfologia externa e interna das folhas e, quando necessário, do caule. Estavam ausentes: a “agoniada” (*Himatanthus lancifolius* – Apocynaceae) a “hortelã”, (*Mentha spicata* – Lamiaceae), o “confrei” (*Symphytum officinale* – Boraginaceae) e a “malva” (*Malva silvestris* – Malvaceae), apesar de terem sido citadas como componentes.

A análise microscópica de *S. terebinthifolius* mostrou a presença de folhas compostas, com 5 a 7 folíolos, ovados a lanceolados e nervação reticulada, coincidindo com o material usado como padrão de comparação. Neste caso, o padrão não foi bibliográfico, mas foi feita a análise comparativa entre o material da garrafada e um espécime cultivado no horto do IFRJ, *campus* Nilópolis, RJ (**FIGURAS 3-5**). Na epiderme, também se encontraram outros caracteres que auxiliaram na diagnose, como os estômatos paracíticos. Os tricomas estavam ausentes.

Pluchea sagittalis (Asteraceae) – “quitoco” é uma espécie herbácea, perene, amplamente distribuída na região norte da Argentina e introduzida no Brasil.

O quitoco apresenta folha simples, com margem dentada, extremidade pontiaguda, epiderme pilosa na face abaxial. A epiderme foliar é uniestratificada com células de paredes onduladas e irregulares em vista frontal. Na face abaxial há presença de estômatos anomocíticos (**FIGURA 8**), tricomas tectores (**FIGURA 9**) e glandulares. A folha é anfiestomática⁽¹¹⁾. Tais caracteres diagnósticos foram identificados, confirmando sua presença (**FIGURAS 6-9**).

FIGURAS 3-5: *Schinus terebinthifolius*. **FIGURA 3.** Fragmentos de folhas compostas encontrados na garrafada de número 5. **FIGURAS 4-5.** *S. terebinthifolius* coletado no horto do IFRJ, *campus* Nilópolis. Barra = 1cm. **FIGURAS 6-9.** *Pluchea sagittalis* **FIGURA 6.** Fragmentos de folhas encontrados na garrafada de número 5. Barra = 1cm. **FIGURA 7.** Detalhe do bordo foliar, na face adaxial, ao microscópio estereoscópico. Barra = 1cm. **FIGURA 8.** Detalhe da face abaxial da epiderme, com estômatos anomocíticos, em vista frontal. Barra = 5µm. Cg – células-guarda. **FIGURA 9** Detalhe de um tricoma unisseriado na face abaxial. Barra = 10µm.



Chenopodium ambrosioides. L. (erva-de-santa-maria) apresenta, em corte paradérmico, cutícula estriada e células com paredes anticlinalis sinuosas (**FIGURA 15**), sendo este caráter mais acentuado na face abaxial. Os estômatos são anomocíticos e os tricomas tectores são observados nas duas faces (**FIGURAS 13 – 15**). Na face adaxial, os tricomas tectores são vistos na região do bordo foliar. Estes são multicelulares e unisseriados, sendo a célula da base arredondada e a célula terminal alongada, com a forma de uma foice. Tricomas glandulares, ditos “vesiculosos” estão restritos à face abaxial e localizados em depressões da

lâmina foliar⁽¹³⁾. Tais características foram observadas em um dos materiais encontrados na garrafada de número 5, o que confirmou sua presença como um dos componentes (**FIGURAS 10-16**).

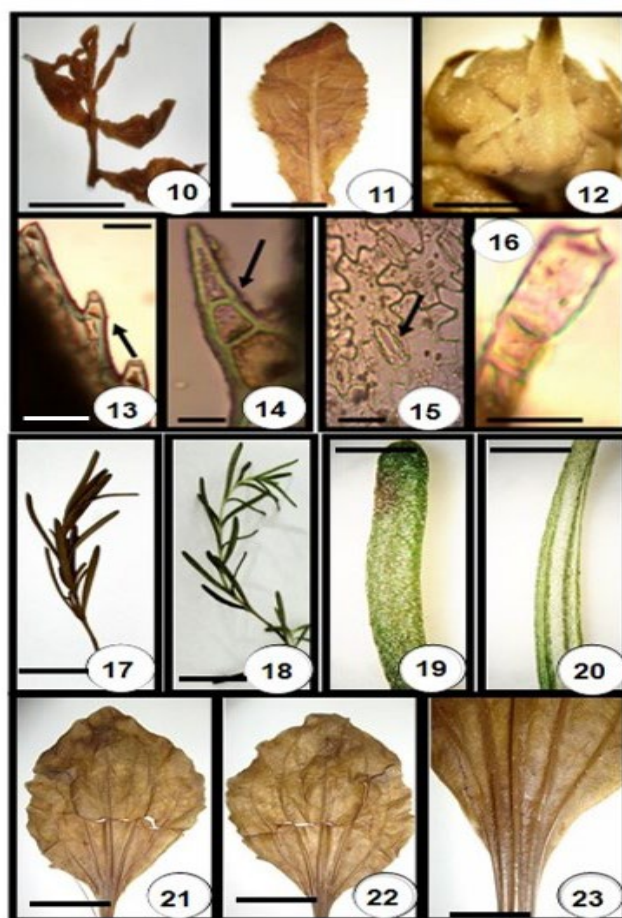
Outro componente identificado foi *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Neste material botânico a folha é sésstil, linear, inteira, coriácea, persistente e com margens de aspecto fortemente revoluto⁽⁴⁰⁾, (**FIGURAS 17-20**). Anatomicamente, a folha apresenta tricomas tectores e glandulares, ambos multicelulares e muito característicos que, por vezes, podem ser vistos em ambas as faces da epiderme, embora os caracteres da morfologia externa sejam suficientes para o seu reconhecimento.

A folha de *Plantago major* (tanchagem) foi facilmente reconhecida, tendo em vista suas características marcantes, como o formato ovado do limbo, de margens onduladas, o longo pecíolo, de aspecto achatado, alado, de onde partem 5 nervuras bem evidentes que percorrem a lâmina foliar. (**FIGURAS 21-23**). Outros fragmentos encontrados na garrafada de número 5 apresentaram caracteres compatíveis com uma espécie da família Fabaceae, mas que não eram compatíveis com a espécie *Desmodium axillare*, o “amor-do-campo” (**FIGURAS 24-26**).

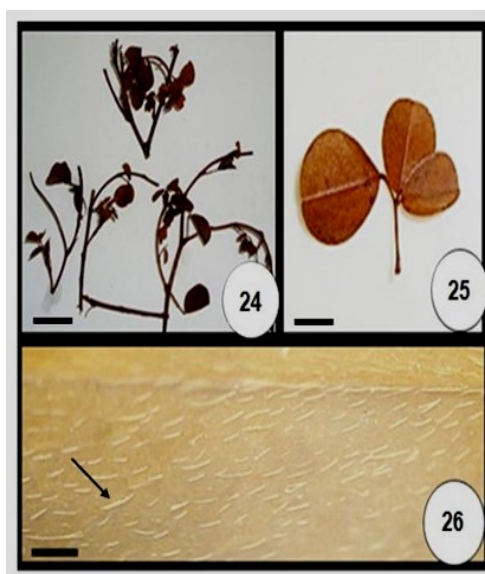
A descrição de *Desmodium axillare*⁽²¹⁾ como uma erva altamente ramificada na base, com tricomas unicelulares muito densos cobrindo lâminas foliares, pecíolos, caules e legumes. As folhas inferiores são alternas, unifolioladas e obovadas, as folhas superiores são trifolioladas, lanceoladas, sésseis a subsésseis e com estípulas. O mesmo autor descreveu ainda que as espécies de Fabaceae possuem folíolos com epiderme unisseriada, grandes células alongadas e grossas e cutícula bem espessa. Os estômatos são paracíticos e se localizam em ambas as faces, mas com maior intensidade na epiderme adaxial. A nervura central é bem desenvolvida, onde o xilema ocorre voltado para a face adaxial e o floema voltado para a face abaxial.

Foram descritos, também, os caracteres anatômicos foliares típicos de *Desmodium axillare* como a epiderme papilosa, estômatos paracíticos ou com três ou mais células subsidiárias em ambas às faces⁽²²⁾. Os tricomas possuem uma célula basal e uma longa e terminal. Este tricoma não é observado em Caesalpinaceae ou Mimosaceae. Na região da nervura mediana, ocorrem glândulas secretoras internas, normalmente ricas em taninos. Na epiderme foliar ocorrem cristais solitários. Na morfologia externa a folha é sempre trifoliolada com caule piloso.

FIGURAS 10-23: Fragmentos de folhas encontrados na garrafada de número 5. **FIGURAS 10-16:** *Chenopodium ambrosioides*. **FIGURA 10.** Ramo encontrado na garrafada. Barra = 2cm. **FIGURA 11.** Folha isolada de *C. ambrosioides*, em detalhe, também encontrada na garrafada. Barra = 1 cm. **FIGURA 12.** Botão floral em detalhe. Barra = 50mm. **FIGURAS 13-14.** Detalhe do bordo foliar contendo tricomas tectores na extremidade (seta) e tricoma tector pontiagudo em detalhe (seta). Barra = 5µm. **FIGURA 15.** Detalhe dos estômatos anomocíticos (seta) na epiderme. Barra = 5µm. **FIGURA 16.** Tricoma glandular em detalhe, na face abaxial. Barra = 10µm. **FIGURAS 17-20:** *Rosmarinus officinalis*. **FIGURA 17.** Ramo encontrado na garrafada de número 5. Barra = 1cm. **FIGURA 18.** Ramo de *Rosmarinus officinalis* cultivado no horto do IFRJ campus Nilópolis, usado para fins de comparação. Barra = 1cm. **FIGURAS 19-20.** Detalhe da face superior e inferior da folha, em vista frontal. Barra = 50 mm. **FIGURAS 21-23:** *Plantago major* L. **FIGURAS 21-22.** Faces superior e inferior respectivamente, das folhas Barra = 1cm. **FIGURA 23.** Detalhe das nervuras na base da lâmina foliar, na face abaxial. Barra = 50 mm.



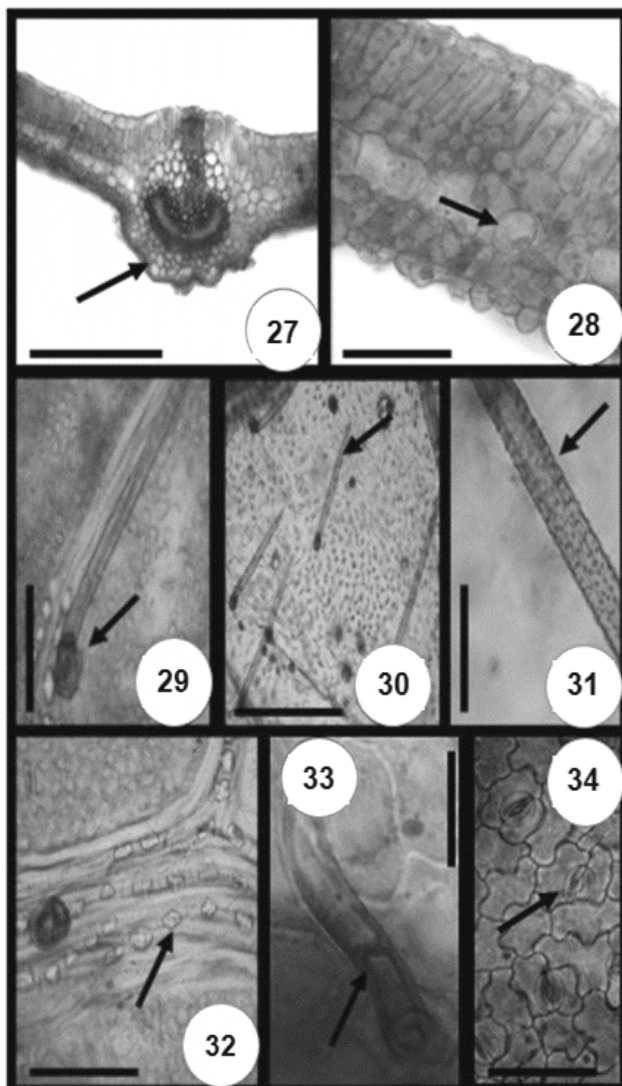
FIGURAS 24-26: **FIGURA 24.** Elemento vegetal presente na garrafada 5 identificado como uma espécie da família Fabaceae. **FIGURA 25:** Folha composta trifoliolada. **FIGURA 26.** Detalhe dos tricomas tectores na face superior da folha ao microscópio estereoscópico. Barra = 1cm.



No material estudado visualizaram-se estômatos em ambas as faces da epiderme que é uniestratificada, sendo estes paracíticos ou com três células subsidiárias (**FIGURA 34**). Possui tricomas tectores curtos ou longos, espessados na base e com paredes ornamentadas (**FIGURAS 29-31; 33**), as células secretoras (**FIGURA 28**) no mesofilo, podem ficar na região do parênquima lacunoso ou até alcançar a região da epiderme. Possui nervação reticulada com aréolas ortogonais, com células contendo cristais prismáticos de grandes dimensões, acompanhando as nervuras (**FIGURA 32**). Os tricomas localizam-se sobre e entre as nervuras. A nervação se ramifica até a oitava ordem, com esclereides que estão à margem das nervuras, compondo extensões da bainha junto com as fibras. No corte transversal, do terço basal da folha, a epiderme é papilosa, com paredes retas ou levemente sinuosas. O mesofilo tende ao padrão dorsiventral, com 1-2 estratos de parênquima paliçádico na face adaxial e 1 estrato de parênquima paliçádico voltado para a face abaxial (**FIGURA 28**). O parênquima lacunoso possui poucas camadas com células pequenas. A nervura mediana forma um arco acompanhado por fibras floemáticas (**FIGURA 27**). Próximo à epiderme adaxial, observou-se um feixe menor, de grande dimensão, distribuído em torno do feixe vascular.

Afirma-se, portanto, que a espécie em análise possui caracteres da família Fabaceae. Embora possua semelhanças, não corresponde a *D. axillare* (**FIGURAS 24-26**).

FIGURAS 27-34: Aspectos da lâmina foliar de uma espécie de Fabaceae, encontrada na garrafada 5. **FIGURA 27.** Detalhe na nervura mediana na forma de um arco (seta) Barra = 50µm. **FIGURA 28.** Corte transversal da folha mostrando o mesofilo tipicamente dorsi-ventral, além de uma célula secretora (seta). Barra = 10µm. **FIGURA 29 - 30.** Detalhe dos tricomas sobre a nervura (seta) e espalhados pela epiderme (seta). Barras = 10µm. **FIGURA 31.** Detalhe das paredes ornamentadas do tricoma (seta). Barra = 10µm. **FIGURA 32.** Detalhe dos cristais acompanhando as nervuras (seta). Barra = 10µm. **FIGURA 33.** Detalhe de um tricoma tector em desenvolvimento (seta). Barra = 10 µm. **FIGURA 34.** Detalhe da epiderme anfiestomática com estômatos paracíticos em ambas as faces (seta). Barra = 10µm.



Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e teste fitoquímicos.

O sistema de eluentes que demonstrou o melhor resultado e eficiência na visualização e separação entre as bandas foi o sistema contendo clorofórmio: acetato de etila: metanol (3,5: 3,5: 3). As análises por CCD possibilitaram a visualização de bandas em maior e menor comprimento de onda das amostras. Nesta análise verificou-se a confirmação das possíveis substâncias químicas presentes nos extratos das garrafadas. Os testes fitoquímicos confirmaram a presença de diferentes classes de metabólitos secundários contidos em cada extrato de cada garrafada e se encontram resumidos na **TABELA 3**.

Todos os testes em CCD realizados dos extratos das garrafadas 1, 2, 3 e 4 revelaram resultado positivo para quinonas, fenóis, terpenos, esteroides, alcaloides, açúcares, taninos, lactonas, ésteres, amidas e anidridos de ácido carboxílico e resultado negativo para indóis e glicosídeos cardiotônicos. Os testes

realizados no extrato da garrafada de número 5 mostraram resultado positivo apenas para indóis, derivados de indóis, terpenos e fenóis. Os demais testes revelaram resultado negativo (**TABELA 3**).

TABELA 3: Resultados dos testes para detecção de metabólitos após CCD. (+) positivo; (-) negativo.

Reagentes	Garrafadas				
	1	2	3	4	5
Reagente de Ehrlich A e B (para aminas)	+	+	+	+	-
Reagente Salkowsky (para indóis)	-	+	-	-	+
Reagente Baljet (para glicosídeos cardioativos)	-	-	-	-	-
Reagente Van Urk (para derivados de indóis)	-	-	-	-	+
Reagente Proshaska (para derivados de indóis e indóis)	-	+	+	+	+
Reagente Cloreto Férrico (para fenóis)	+	+	+	+	-
Reagente Vanilina (metabólitos diversos).	+	+	+	+	+
Reagente Sulfato Cérico (revelador geral para metabólitos diversos)	+	+	+	+	-
Reagente de Mayer (alcaloide)	-	-	-	-	-

Na garrafada 1, estavam presentes terpenos, taninos e flavonoides. O resultado positivo está de acordo com os metabólitos descritos para as espécies que compõem as garrafadas, como por exemplo, *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa), onde se encontraram flavonoides e taninos, além dos já reconhecidos alcaloides. Em *Tabebuia* sp. (Ipê-roxo) também se encontraram taninos, justificando assim os resultados positivos para os testes fitoquímicos realizados. Entretanto, o uso indiscriminado de *Tabebuia* pode ser muito perigoso pela presença de lapachol, metabólito com reconhecida toxidez.

As garrafadas 2, 3 e 4 revelaram o mesmo tipo de resultado para os testes realizados. No entanto, refere-se que, nessas garrafadas também estão contidos extratos de *Bauhinia fortificata* (pata-de-vaca), na garrafada 2, *Anemopaegma arvense* (Catuaba), e *Heteropteris aphrodisiaca* (Nó-de-cachorro), na garrafada 4 que possuem flavonoides, terpenos e taninos, justificando a atividade referida das garrafadas. As espécies vegetais mencionadas possuem flavonoides, taninos, terpenos como metabólitos ativos, justificando a sua atividade anti-inflamatória, confirmando os resultados positivos para os testes fitoquímicos feito para essas garrafadas.

Já a garrafada 5 revelou resultado positivo para indóis e seus derivados, terpenos e fenóis. O alecrim (*Rosmarinus officinalis*), por exemplo, um dos constituintes desta garrafada é rico em monoterpenos⁽¹²⁾, mas não foram encontradas referências que possam relacionar *Rosmarinus officinalis* a uma possível atividade anti-inflamatória.

Conclusões

À luz dos resultados obtidos, foi possível constatar que a análise das garrafadas revelou aspectos inesperados, tanto na embalagem e rotulagem que davam às garrafadas 1, 2 e 3 um aspecto industrializado,

quanto na identidade botânica dos seus componentes. Em um dos materiais (garrafada de número 5), encontraram-se fragmentos de “aroeira” (*Schinus terebinthifolius*) substituindo um dos componentes originalmente citados. Já na garrafada número “4”, a “catuaba” correspondia à espécie *Trichilia catigua* (Meliaceae), substituindo *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae). Muitas espécies mencionadas como componentes estavam ausentes.

Todos os testes fitoquímicos feitos após cromatografia em camada delgada (CCD), realizados nas garrafadas de “1 a 4”, revelaram resultado positivo para metabólitos secundários como fenóis e terpenos, com exceção dos testes para indóis e glicosídeos cardiotônicos. Já os testes fitoquímicos realizados na garrafada de número 5, revelaram resultado positivo somente para indóis, derivados de indóis e terpenos.

Estudos sobre este aspecto da medicina popular devem ter continuidade e ser expandidos nas grandes cidades, já que os resultados obtidos podem diferir sobremaneira dos demais estudos, realizados em comunidades tradicionais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao IFRJ pelo suporte financeiro e pela bolsa PIBIC conferida à primeira autora.

Referências

1. Arnous AH, Santos AS, Beinner RPC. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Rev Esp Sau.** 2006; 60(2):1-6. [\[Link\]](#).
2. Carvalho AR, Lacerda TJ, Oliveira FE, et al. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. **Rev Bras Farmacog.** 2000; 16(2). ISSN: 1981-528X.
3. Dias JFG, Virtuoso S, Davet A. Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd, Astereaceae. **Rev Bras Farmacog.** 2006;16(1): 83-87. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).
4. Elizabetsky E, Souza CG, Nascimento TV, Lacerda eu, Melo GJ, Lima ASC, et al. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas.** In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. 2003; 107-121. Porto Alegre/Florianópolis.
5. Albuquerque UP. **Introdução a Etnobotânica.** 93p. 2ª ed. Editora Interciência. Rio de Janeiro. 2005. ISBN: 8571931275.
6. Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacog.** João Pessoa. 2006.16(supl.0): 678-689. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).
7. Indras DM. **Estudo da toxicidade de garrafada de uso popular.** 2017. 84p. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas], Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017. [\[Link\]](#).

8. Bochner R, Fizson JT, Assis MA, Avelar KES. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev Bras Plan Med.** 2012. 14(3): 537-547. ISSN 1983-084X. [\[CrossRef\]](#).
9. Andreato RH, Travassos OP. **Chaves para determinar as famílias de Pteridophyta, Gymnospermae e Angiospermae.** Revisada e aumentada (Ed.), 134 p. Editora Universitária Santa Úrsula. Rio de Janeiro. 1994.
10. Barroso GM. **Sistemática de angiospermas no Brasil.** Vol. 1. 2ª ed. Editora UFV. Viçosa. 2002.
11. Cambi V, Bucciarelli A, Flemmer AR, Hansen P. Morfoanatomia de *Pluchea sagittalis* (Asteraceae), Espécie Nativa de Interés Medicinal. **Acta Farm Bonaerense.** 2006; 25: 43-49. ISSN: 0326-2383. [\[Link\]](#).
12. Silva MSA, Silva MAR, Hijino JS, Pereira MSV, Carvalho ATT. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Rev Bras Farmacog.** 2008;18(2):236-240. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).
13. Costa MVL, Tavares ES. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) – erva-de-Santa Maria. **Rev Bras Plan Med.** 2006; 8: 63 – 71. ISSN 1983-084X. [\[Link\]](#).
14. Rocha JF, Rosa MMT, Frade CCM, Diersmenn EM. Estudo anatômico e histoquímico em folhas de *Plantago major* L. e *Plantago australis* Lam. (Plantaginaceae). **Rev Univ Rur. Série Ciências da Vida.** 2002; 22(1): 33-41.
15. Hyakutake S, Grotta SA. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld var. *petiolata* Bignoniaceae. **Rev Fac Farm Bioq.** 1965; 3: 51-78.
16. Jacomassi E, Machado SR. Características anatômicas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek e *Maytenus aquifolia* Mart.) e mata-olho (*Sorocea bonplandii* (Baill) Burg. Lanj. e Boer.) para o controle de qualidade da matéria prima. **Rev Bras Plan Med.** Botucatu. 2003; 6(1):84-96. ISSN 1983-084X. [\[Link\]](#).
17. Souza VC, Lorenzi H. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2008; 704p. ISBN: 9788586714290.
18. Kraus JE, Arduin M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** 1ª ed. 133 p. Seropédica, UFRRJ. Rio de Janeiro. 1997. ISBN: 85-85720-11-5.
19. Leite KA. **Abordagem taxonômica da família Boraginaceae Juss. na ilha grande, angra dos reis – RJ.** 2006. Trabalho de Conclusão de Curso [Curso de Ciências Biológicas], Universidade Castelo Branco (UCB). 2009. [\[Link\]](#).
20. Marques CA. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **FI Amb.** 2001; 8(1):195 – 206. [\[Link\]](#).

21. Shaheen ASM. Morphological and anatomical investigations in *Desmodium tortuosum* (sw.) dc. (Fabaceae): a new addition to the egyptian flora. **Bangladesh Association of Plant Taxonomists**. 2008.15: 21-29. [\[Link\]](#).
22. Solereder H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**. v.1, p. 253- 272. Oxford at the Clarendon press. Oxford, UK. 1908.
23. Trópicos. **Missouri Botanical Garden**. [\[Link\]](#). Acesso em: 30 mai 2018.
24. Matos FJA. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª ed. Editora UFC. Fortaleza, CE. 1997.
25. Araujo CRF, Pereira MSV, Hijino JS, Pereira JV, Martins AB. Atividade antifúngica *in vitro* da casca do *Anarcadium occidentale* Linn., sobre leveduras do gênero candida. **Arquivos de Odontologia**. Belo Horizonte. 2005; 41(3):193-272.
26. Comparative Toxicogenomics Database (CTD). [\[Link\]](#) Acesso em: 20 dez 2017.
27. Corrêa AD, Quintas LEM, Batista RS. **Plantas medicinais do cultivo a terapêutica**. 2ª ed. Editora Vozes. Petrópolis, RJ. 1999.
28. Hosttetmann K, Queiroz EF, Vieira PC. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Editora Edufscar. São Paulo, SP. 2002.
29. IPÊ. Instituto de Pesquisas ecológicas. *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. p.1-4. 2018.
30. Legramandi VHP. **Kalanchoe gastonis-bonnierei Raym.-Hamet e Kalanchoe pinnata Pers. (Crassulaceae): atividade antifúngica e estudo farmacognóstico comparativo**. 62p. 2011. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas], Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. [\[Link\]](#).
31. Martins ER, Castro DM, Castellani CD, Dias JE. **Plan Med**. 1ª ed. Editora UFV. Viçosa, MG. 1994.
32. Marques LC. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal Catuaba. **Rev Rac**. 1998. 43: p. 8-11.
33. Marques LC, Pieri C, Roman-júnior WA, Cardoso MLC, Milaneze-Gutierre MA, Mello JCP. Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae). **Rev Bras Farmacog**. 2007.17: 604-615. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).
34. Beltrame FL, Rocha DC, Carmo MRB, Cass QB. Estudo morfo-anatômico de amostras comerciais de catuaba. **Publicações UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde**. 2010; 16(2):111-118. [\[Link\]](#).
35. Mauro C, Pereira mas, Silva CP, Missima J, Ohnuki T, Rinaldi RB. Estudo anatômico das espécies de cerrado *Anemopaegma arvense* (Vell.) Steff. ex de Souza (catuaba), *Zeyheria montana* Mart. (bolsa-de-pastor) e *Jacaranda decurrens* Chamisso (caroba) – Bignoniaceae. **Rev Bras Farmacog**. 2007;17(2): 262-265. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).

36. Valente LMM, Alves FF, Bezerra GM, Almeida MBS, Rosário SL, Mazzei JL, d'Avilla LA, Siani AC. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pantaciclícos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Rev Bras Farmacog**. 2006;16(2): 216-223. ISSN: 1981-528X. [[CrossRef](#)].
37. Oliveira KP, Sofiat TF, Mourão KSM, Marques LC. Análise Farmacognóstica comparativa de dois lotes de cascas de *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae), a catuaba da Bahia. **Rev Pesq Inov Farm**. 2011;3(1):2-8. ISSN: 2176-9532. [[Link](#)].
38. Baratto LC, Hohlemwerger SVA, Guedes MLS, Duarte MR, Baratto CAM. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae: estudo farmacobotânico de uma planta medicinal da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição. **Rev Bras Farmacog**. 2010. 20(5): 651-658. ISSN: 1981-528X. [[CrossRef](#)].
39. Coelho MFB, Jorge as, Macedo M, Nogueira-Borges BH, Spiller C. Nó-de-cachorro (*Heteropterys tomentosa* A. Juss.): espécie de uso medicinal em Mato Grosso, Brasil. **Rev Bras Plan Med**. Botucatu. 2011;13(4):475-485. ISSN: 1983-084X. [[CrossRef](#)].
40. Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. **Farmacog**. São Paulo/Rio de Janeiro: Ed. Atheneu. 412p. 1991.

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

Histórico do artigo: Submissão: 30/05/2018 | Aceite: 15/08/2018 | Publicação: 29/10/2018

Como citar este artigo: Ferreira LAQ, Marques CA. Garrafadas: uma abordagem analítica. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(3): 243-262. e-ISSN 2446-4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/639>>. 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* propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes under different concentrations of Indoleacetic Acid**

DOI 10.17648/2446-4775.2018.620

Silva, Simone da^{1*}; Pinheiro, Ester Neta²; Assunção, Laís Medeiros de²; Silva, Efigênia Lopes da³; Rodrigues, Daniele de Carvalho²; Ferreira, Flávio Freires²; Marinho, Vitor Rafael Pereira¹; Astolfi-Filho, Spartaco⁴.

¹Centro de Biotecnologia da Amazônia-CBA, Coordenação de Biotecnologia Vegetal. Avenida Governador Danilo de Matos Areosa, 690, Distrito Industrial I, 69075-351, Manaus, AM, Brasil.

²Universidade Federal do Amazonas, Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM. Avenida General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, Coroado I, 69077-000, Manaus, AM, Brasil.

*Correspondência: simonydasilva@gmail.com

Abstract

Psychotria ipecacuanha is a medicinal plant that is native to the Americas with the largest area of occurrence in the State of Mato Grosso in Brazil. It is critically endangered due to overexploitation of natural populations. Due to difficulties in conventional propagation, the aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of the growth regulator indoleacetic acid (IAA) on *in vitro* propagation of this species. Stem node explants were cultured in Murashige and Skoog medium (MS) without growth regulators (control) and supplemented with four concentrations (0.05, 0.5, 1.5 and 2.0 mg.L⁻¹) of indoleacetic acid (IAA) in semisolid media. After 60 days of cultivation, nodal segments (n=30) grown in Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 0.05 mg.L⁻¹ of IAA produced on average 4.56 nodal segments per explant. The seedlings were successfully acclimatized without detection of any morphological anomalies or variation.

Keywords: Plant biotechnology. Tissue culture. Micropropagation. Rubiaceae. Ipecac.

Introduction

Psychotria ipecacuanha Brot. Stokes (Rubiaceae), commonly known as ipecac, is recognized worldwide as a medicinal plant and is officially listed in the pharmacopoeia of several countries, such as Brazil, India, Japan, England, the United States, and Portugal⁽¹⁾. It is a species that is distributed in bands along the extension of the Atlantic, the Amazon, Central America and Colombia⁽²⁾. Its economic importance is due to the pharmacological properties present in its roots, where emetine and cephaeline are concentrated⁽³⁻⁵⁾. These constituents give the plant emetic activity against bronchial diseases through anti-inflammatory properties, and makes them useful for combating fevers and malaria. They also show amoebicidal activity via acting as inhibitors of protein and DNA synthesis⁽⁶⁻⁷⁾.

P. ipecacuanha is threatened by genetic erosion and is in the process of extinction due to intense extraction over the past two centuries, opening new agricultural frontiers while reducing areas of natural occurrence⁽⁷⁾. The cultivation of the species is hampered by slow growth, low percentage of production and seed germination, and loss of seed viability after storage⁽⁸⁾. Another relevant aspect is attributed to the long period (3-4 years) required to produce higher concentrations of the emetic alkaloids in the roots⁽⁹⁻¹⁰⁾. These factors contribute to oscillations in meeting the demands of the pharmaceutical industry.

In order to commercialize the product of Brazilian origin, licensing by IBAMA is required, attesting that the material comes from cultivation and not extractivism. *P. ipecacuanha* is currently one of the most promising agricultural crops, with India being one of the largest producers. Thus, better methodology for asexual propagation of the species is one of the primary needs for successful commercial cultivation⁽¹¹⁾.

Given the commercial value of this plant, some initiatives for cloning and micropropagation in the laboratory have already been carried out, but there is still a need to optimize these protocols to test different dosages of growth regulators to increase seedling productivity, ensuring the economic viability of this cultivation technique⁽¹²⁾.

Due to the high economic and pharmacological value of the species and associated market demand combined with the extinction risk and the difficulty of the conventional cultivation, the objective of this study was to evaluate the effect of different dosages of the regulator (IAA) on the *in vitro* development of the plant. The purpose of this study is to establish an efficient protocol for large-scale production of seedlings to allow economic exploration and consequently, the creation of new productive chains.

Materials and Methods

Plant material

For the establishment of the micropropagation protocol of *P. ipecacuanha*, *in vitro* cultures from the Embrapa Amazônia Oriental germplasm bank (already identified by the IAN Herbarium - Embrapa Amazônia Oriental) were used as donors of explants for tests with different concentrations of the indoleacetic acid growth regulator (IAA) in semisolid culture medium.

The explants (nodal segments) were introduced into glass flasks (250 ml) containing 40 ml of MS semi-solid medium without growth regulators (MS0) and supplemented with different concentrations (0.05, 0.5, 1.5 and 2.0 mg.L⁻¹) of IAA plus 3% sucrose and solidified with 2% phytigel⁽¹³⁾. The pH was adjusted to 5.8 and the media was sterilized by autoclaving at 120 °C and 1.1 kgf.cm² for 15 minutes. Each explant or phytomer was composed of an internodal region without leaves with a size of approximately 1 cm.

Cultures were maintained at 25 °C and were illuminated with fluorescent lamps (Sylvania, Phillips/daylight) with intensity of 30.0 moles.m⁻².s⁻¹ and a 16-hour photoperiod. The parameters evaluated for the effects of the different IAA concentrations were the multiplication rate, seedling height, and rooting after two months of cultivation.

Statistical analysis

The effects of the different concentrations of indoleacetic acid on *in vitro* seedling development were analyzed by analysis of variance (ANOVA), and the means were compared using the Tukey-Kramer test at a significance level of 5%. These analyses were performed using Graph Pad in Stat version 3.01. For the analysis of rooting percentages according to the means, a percentage difference test (p1 and p2) at the 5% significance level was carried out using Statistica for Windows TM version 5.0⁽¹⁴⁾.

The experimental design was completely randomized and consisted of five treatments with 30 explants per treatment, which were performed in triplicate.

Acclimatization

After being withdrawn from the culture flasks, the seedlings obtained *in vitro* were washed in running water for complete removal of the culture medium and packed in polypropylene bags (1 kg) containing substrate. The plants were kept in a greenhouse for 30 days with a nebulization irrigation system. The plants were then transferred to another greenhouse with a microaspiration irrigation system, where they remained for additional 23 months.

Results and Discussion

Data on the *in vitro* development of *P. ipecacuanha* with different concentrations of indoleacetic acid (IAA) were compared with those obtained in MS0. After 60 days of *in vitro* culture, the multiplication rate was not significantly affected by the presence of the IAA. Although the highest multiplication rate (4.56:1) was obtained in MS medium plus 0.05 mg.L⁻¹ of IAA, this result did not differ statistically from the other treatments tested, including the control (**TABLE 1**). However, the action of IAA in the *in vitro* development of the plant was in accordance with known data for the effects of such hormones⁽¹⁵⁻¹⁶⁾.

TABLE 1: *In vitro* development of *Psychotria ipecacuanha* under different concentrations of indoleacetic acid (IAA).

Culture medium	Multiplication Rate	Seedling Height (cm)	Rooting Rate (%)	Number of Roots	Root Height (cm)
MS0	4.52 ^a	1.70 ^b	15 ^d	2.25 ^{ab}	0.60 ^a
0.05 mg.L ⁻¹ IAA	4.56 ^a	1.79 ^{ab}	52 ^c	2.00 ^b	0.27 ^b
0.5 mg.L ⁻¹ IAA	3.41 ^a	1.54 ^c	86 ^a	3.15 ^{ab}	0.25 ^b
1.5 mg.L ⁻¹ IAA	3.50 ^a	1.80 ^a	70 ^b	2.93 ^{ab}	0.24 ^b
2.0 mg.L ⁻¹ IAA	3.33 ^a	1.63 ^b	71 ^b	4.27 ^a	0.27 ^b

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

The formation of 5.95 and 5.41 new shoots using internode segments of *P. ipecacuanha* sized 1.0 and 1.5 cm, respectively, was observed in MS medium plus 2.0 mg.L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) alternated with the same culture medium with the addition of 0.5 mg.L⁻¹ of gibberellic acid (GA₃)⁽¹⁷⁾. When cultivating nodal segments of *P. ipecacuanha*, some authors report the importance of using juvenile explants, mainly in *in vitro* culture establishment, as an ideal material for micropropagation and genetic manipulation^(10,18-19). In addition to serving as an alternative tool for a fast multiplication and conservation of species for which propagation by conventional methods is challenging, this technique is especially advantageous for the preservation of genotypes producing compounds of interest⁽²⁰⁾.

Regarding the height of the seedlings, the best result was obtained with the use of 1.5 mg.L⁻¹ of IAA in the culture medium, providing an average growth of 1.8 cm for seedlings; this result was statistically similar to that obtained with 0.05 mg.L⁻¹ IAA = 1.79 cm (**TABLE 1**).

The *in vitro* rooting of *P. ipecacuanha* was significantly affected by the addition of IAA to the culture medium (**TABLE 1**). Statistical analysis showed a greater increase in rooting percentage (86%) with a mean of 3.15 roots per plantlet with a height of 0.25 cm when 0.5 mg.L⁻¹ of IAA was used.

Among the main factors related to rooting of *in vitro* cultivated plants are the endogenous auxin levels and the inherent conditions of the parent plant such as juvenility and genotype, among others⁽²¹⁾. Endogenous IAA acts as a gene activator, boosting the early formation of the primordial radicals, and the application of synthetic auxins favors conjugation of endogenous IAA and amino acids that promote the synthesis of specific proteins necessary for the formation of the initial roots⁽²¹⁾.

The acclimatization process used for *in vitro* cultivation of *P. ipecacuanha* was successful, resulting in a survival rate of 100% (n = 450). This demonstrates that the protocol developed in this study is appropriate for the regeneration of ipecac.

The adaptation of *in vitro* seedlings to natural conditions is crucial for the success of any protocol. This is due to the fact that there are large differences between the growing conditions in the growing room, greenhouse conditions, and the natural conditions in terms of quantity and quality of light, nutrients and substrate and relative humidity⁽²²⁾.

Conclusion

The results of the present work demonstrate that the micropropagation of *P. ipecacuanha* using IAA is feasible for mass propagation and conservation. This species demonstrated strong *in vitro* rooting ability, and the seedlings were successfully acclimatized.

Acknowledgments

The authors thank the Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA) and the Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) for financial support for this research. We also thank Dr. Osmar Alves Lameira and the Brazilian Agricultural Research Company (EMBRAPA - Eastern Amazon) for the donation of *Psychotria ipecacuanha* seedlings for *in vitro* cultivation experiments.

References

1. Trease GE, Evans WC. Ipecacuanha. In: **Pharmacogn**. 13th ed. London. Baillieri Tindal. 1989; p.595-599.
2. Oliveira LO, Venturini BA, Rossi AAB, Hastenreiter SS. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genet Mol Biol**. 2010; 33: 86-93. ISSN: 1415-4757. [[CrossRef](#)].

3. Ferreira Júnior WS, Cruz MP, Santos LL, Medeiros MFT. Use and importance of quina (*Cinchona* spp.) and ipeca (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson): Plants for medicinal use from the 16th century to the present. **J Herb Med.** 2012; 2(4): 103-112. ISSN: 2210-8033. [\[CrossRef\]](#).
4. Brandão MGL, Pignal M, Romaniuc S, Graef CFF, Fagg CFF. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **J Ethnoph.** 2012; 143(2): 488-500. ISSN: 0378-8741. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
5. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn.** 2008; 18(3):472-508. ISSN: 1981-528X. [\[CrossRef\]](#).
6. Burhans WC, Vassiley LT, Wu JM, Nallaseth FS, Depamphilis ML. Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replication by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation. **EMBO J.** 1991;10 (13):4351-4360. [\[Link\]](#).
7. Rocha TT, Lameira OA. Avaliação do período de floração e frutificação do BAG ipecacuanha. Em: 15º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa. Belém, PA. **Anais do 15º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa:** Embrapa Amazônia Oriental, 2011. [\[Link\]](#).
8. Oliveira LO, Venturini BA, Rossi AAB, Hastenreiter SS. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genet Mol Biol.** 2010; 33: 86-93.
9. Shimomura K. Production of emetic alkaloid by *in vitro* culture of *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. **Plant Cell Rep.** 1988; 7(4): 278-280. ISSN: 1432-203X. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
10. Yoshimatsu K, Shimomura K. *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. (Brazilian ipeca) Micropropagation and the production of emetine and cephaeline. Em: Bajaj Y.P.S. **Biotech Agric Forest: Medicinal and Aromatic Plants**, Berlin: Springer Verlag. 1993; 21(4): 87-103.
11. Coelho MFB, Teixeira VA, Azevedo RAB, Albuquerque MCF. Propagação da poaia (*Psychotria ipecacuanha*) em diferentes substratos e posicionamento das estacas. **Hortic Bras.** 2013; 31: 467-471. [\[Link\]](#).
12. Silva ML, Azevedo AA, Silva GM, Carvalho IF, Rossi AAB, Otoni, WC. Germinação *in vitro* e organogênese direta em explantes hipocotiledonares com polaridade invertida de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. **Rev Fitos.** 2013; 8(1): 5-12. [\[Link\]](#).
13. Murashige T, Skoog FA. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol Plantarum.** 1962; 15: 473-497. [\[Link\]](#).
14. Silva S, Ferreira FF, Gato AMG. Efeitos de diferentes concentrações de 6-Benzilamioipurina no cultivo *in vitro* de *Manihot esculenta* Crantz. **Scien Amazon.** 2015; 4(1): 105-111. ISSN: 2238.1910. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
15. Cleland RE. Auxin and cell elongation. In: Davies P.J. (ed.), **Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 214-227, 1995.

16. Silva S, Lage CLS, Esquibel MA, Gil Rass, Sato A. *In vitro* propagation of *Melissa officinalis* L. and production of essential oil. **Plant Cell Culture e Micropropagation**. Editora UFLA. Lavras. 2006; 2(2): 53-60. ISSN: 1808-9909. [\[Link\]](#).
17. Reis ES, Pinto JEBP, Corrêa RM, Lameira OA. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. **Cien Agrotec**. 2004; 28(3):703-709. ISSN: 1413-7054. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
18. Singh SK, Meghwal PR, Sharma HC, Singh SP. Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. Cv. Allahabad Safeda. **Scien Hortic**. 2002; 95: 213-221.
19. Paiva Neto VB, Mota TR, Otoni WC. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 2003; 75(2): 159-167. ISSN: 1573-5044. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
20. Parveen S, Shahzad AA. Micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. From root explants. **Acta Physiol Plantarum**. 2011; 33(3): 789-796. ISSN: 1861-1664. [\[CrossRef\]](#).
21. Olatunji D, Geelen D, Verstraeten I. Control of endogenous auxin levels in plant root development. **Int J Mol Sci**. 2017; 18(12): 1-29. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
22. Silva ML, Azevedo AA, Otoni WC, Carvalho IF, Rossi AAB, Silva GM, et al. Morfoanatomia dos sistemas gemíferos de poaia (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson) – Rubiaceae. **Rev Fitos**. 2015; 9(1): 9-17. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).

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

Histórico do artigo: Submissão: 13/03/2018 | Aceite: 15/08/2018 | Publicação: 29/10/2018

Como citar este artigo: Silva S, Pinheiro EN, Assunção LM, Silva EL, Rodrigues DC, Ferreira FF, Marinho VRP, Astolfi-Filho S. *In vitro* propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes under different concentrations of Indoleacetic Acid. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(3): 263-268. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/620>>. 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.

Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais

Production of secondary metabolites by plant tissue culture

DOI 10.17648/2446-4775.2018.550

Souza, Júlio Cezar de¹; Rescarolli, Cristine Luciana de Souza¹; Nunez, Cecília Verônica^{1*}.

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Av. André Araújo, 2.936, Petrópolis, CEP 69067-375, Manaus, AM, Brasil.

*Correspondência: cecilia@inpa.gov.br

Resumo

A técnica de cultura de células e tecidos vegetais *in vitro* tem sido estudada para a produção de plantas e biomassa vegetal com alto padrão de qualidade fitossanitária e genética. Esta técnica baseia-se na capacidade da célula vegetal de praticamente qualquer tecido, de regredir ao seu estado indiferenciado, se multiplicar e/ou redefinir nova via metabólica para tornar-se outro tipo celular, podendo gerar novos tecidos e até mesmo uma nova planta completa. O desenvolvimento vegetal *in vitro* depende da disponibilidade de condições ideais, como a composição do meio de cultura, balanço de reguladores de crescimento, estimulação com elicitores, entre outras. As indústrias farmacêuticas e de produtos naturais tem se beneficiado da biotecnologia vegetal pela possibilidade de produzir metabólitos secundários *in vitro*, produção esta que seria mais vantajosa devido à redução de tempo, qualidade e quantidade de material vegetal a ser extraído pela indústria, quando comparado à produção *in natura*. Segundo diversos estudos mostrados na literatura, a produção destes metabólitos pode ser maior *in vitro* do que nos extratos de plantas de campo.

Palavras-chave: Cultura de tecidos vegetais. Calos. Metabólitos secundários. Produção *in vitro*.

Abstract

The *in vitro* plant cell and tissue culture technique has been studied for the production of plants and plant biomass with high phytosanitary and genetic quality standards. This technique is based on the ability of the plant cell of virtually any tissue to regress to its undifferentiated state and multiply and/or redefine the new metabolic pathway to become another cell type, generating new tissues and even a whole new plant. *In vitro* plant development depends on the availability of ideal conditions, such as composition of the culture medium, growth regulator balance, stimulation with elicitors, among others. The pharmaceutical and natural products industries have benefited from plant biotechnology through the possibility of producing secondary metabolites *in vitro*, which would be more advantageous due to the reduction in the time, quality and quantity of plant material to be extracted by the industry when compared to the *in natura* production. According to

several studies shown in the literature, the production of these metabolites may be higher *in vitro* than in wild plant extracts.

Keywords: Plant cell culture. Callus. Secondary metabolites. *In vitro* production.

Introdução

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é uma técnica na qual, em condições assépticas, células, órgãos, tecidos ou mesmo a planta inteira, podem ser mantidos em cultivo em laboratório sob condições controladas de fatores ambientais e nutricionais. Estas condições incluem a oferta adequada de nutrientes, pH, temperatura, fotoperíodo e fonte de carbono ⁽¹⁾

Pequenos pedaços de tecido vegetal, denominados explantes (**FIGURA 1**), podem ser retirados de uma planta matriz e utilizados para produzir milhares de novas plantas num processo contínuo, em um período de tempo relativamente curto ⁽²⁾.

FIGURA 1: Explantes retirados de folha e de segmento nodal de andiroba (*Carapa guianensis*).



Esta técnica de cultivo vegetal tem sido amplamente estudada desde o início do século XX, com a finalidade de compreender rotas metabólicas primárias e secundárias, além de auxiliar nos estudos relacionados à morfogênese vegetal. No entanto, o potencial medicinal e nutracêutico de plantas oriundas da cultura de tecidos vegetais vêm sendo mais profundamente estudados nos últimos 50 anos ^(3,4).

Metodologia

A consulta de fontes bibliográficas foi realizada em livros da área e artigos disponíveis nos bancos de dados como: PubMed, SciELO, SciFinder, Science Direct e Periódicos Capes. As palavras-chave utilizadas na consulta foram: cultivo vegetal, cultura de tecidos vegetais, reguladores de crescimento, calo, metabólitos *in vitro* e elicitores (em português e inglês).

Revisão bibliográfica

Cultura de tecidos vegetais *in vitro*

Recentemente, a biotecnologia vegetal vem tornando-se importante para as indústrias farmacêutica e de produtos naturais, através da propagação vegetativa *in vitro*, que permite a eliminação de doenças e o melhoramento genético das plantas. Essa técnica leva à produção de microplantas e/ou biomassa vegetal de excelente qualidade fitossanitária e genética, em curto espaço de tempo e reduzida área física, o que é de extrema importância na produção de metabólitos secundários ⁽¹⁾.

Com a crescente demanda por produtos de origem natural contrapondo-se à perda de populações vegetais, à diversidade genética e à degradação do meio ambiente e extinção de espécies, a cultura de tecidos e células vegetais *in vitro* surgiu como uma ferramenta para a produção em larga escala de biomassa vegetal, para diversificados fins ⁽⁵⁾.

Segundo a literatura⁽⁶⁾, a principal motivação para a adoção do cultivo de plantas *in vitro* no setor florestal brasileiro tem sido a pesquisa com a finalidade de aumentar a produção sustentável de madeira e produtos florestais não-madeireiros, incluindo a caracterização genética, manipulação e melhoramento de espécies florestais nativas do Brasil. Segundo os mesmos autores, essências aromáticas, frutas e óleos da Amazônia, utilizados como matérias-primas pelas indústrias químicas de cosméticos, produtos farmacêuticos, inseticidas e fungicidas provenientes de espécies amazônicas podem ser consideradas fontes renováveis de ativos biológicos.

Sendo assim, essa tecnologia deve ser aprimorada constantemente para que seja capaz de suprir a demanda, e sua exploração deve ser feita em uma base sustentável, pois espécies como *Aniba rosaeodora* (pau-rosa) e *Dicypellium caryophyllaceum* (pau-cravo) se encontram na lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção devido ao seu uso indiscriminado^(6,7).

Totipotência celular

A técnica de cultura de tecidos é baseada no conceito de totipotência celular. Essa técnica é caracterizada como:

“[...] a capacidade de uma célula vegetal viva, nucleada, com sistema laminar intacto e já diferenciada, de ser induzida a voltar ao estado meristemático, podendo redefinir seu padrão de diferenciação celular e desenvolver novos órgãos e, até mesmo, indivíduos inteiros” ⁽⁸⁾.

Todo tecido vegetal que possui células vivas e nucleadas é totipotente e, por assim dizer, pode vir a desenvolver crescimento e/ou diferenciação celular induzida pelo meio. Após uma sinalização correta ao tecido do explante, as células estabelecem um processo contínuo de mitose ⁽⁹⁾. Juntamente com a totipotência, a capacidade das células para alterar o seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento também é igualmente fundamental.

Meios de cultura e reguladores de crescimento

Para que o potencial da totipotência seja expresso na sua totalidade, é necessário fornecer ao explante as condições nutricionais e a devida sinalização hormonal. É normalmente utilizado como base, o meio de cultura desenvolvido por Murashige e Skoog em 1962⁽¹⁰⁾ (meio MS), composto de macronutrientes,

micronutrientes, vitaminas, ferro, EDTA, entre outras substâncias orgânicas, fonte de carbono e a presença ou não de um agente geleificante (para meios sólidos ou semissólidos).

O pH do meio também é importante, pois afeta a absorção dos nutrientes e reguladores de crescimento presentes no meio de cultura. Recomenda-se⁽¹⁰⁾ o ajuste do pH entre 5,7 e 5,8, porém, algumas espécies como as bromeliáceas podem ter ajuste de pH entre 6,5 a 7.

Com o passar do tempo, foram feitas suplementações e alterações nos componentes, e novos meios foram surgindo para adequar-se ao metabolismo de diversas espécies vegetais. A manipulação da formulação dos meios de cultura, assim como, das fontes de sacarose, combinações e concentrações de reguladores de crescimento, naturais e/ou sintéticos, além do uso de diversos agentes físicos ou químicos como elicitores, tem sido utilizado para mudanças morfogênicas e acúmulo de metabólitos de interesse⁽¹¹⁾.

A composição do meio de cultura, especialmente dos reguladores de crescimento, tem efeitos profundos sobre a resposta do explante nas diferentes fases do cultivo *in vitro*. Os reguladores de crescimento são responsáveis pela determinação do desenvolvimento de células, tecidos ou plantas em meio de cultura.

Reguladores de crescimento são um grupo de substâncias de ocorrência natural nos tecidos vegetais e, assim como seus análogos sintéticos, possuem ação de sinalizadores, influenciando os diferentes estágios do desenvolvimento da planta. Para a cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*, a utilização de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura é necessária para garantir que o objetivo do estudo seja alcançado ⁽¹²⁾.

As auxinas e citocininas são as duas classes de reguladores de crescimento mais utilizadas. A concentração e combinação dos diferentes tipos de auxinas e citocininas para suplementar o meio de cultura, dependem principalmente da espécie da planta, do tipo de tecido ou órgão e do objetivo da pesquisa ⁽¹³⁾.

As auxinas possuem diversas funções no desenvolvimento vegetal na natureza, entre as quais, o alongamento do caule, dominância apical e o enraizamento, e são amplamente utilizadas nas culturas de células e tecidos por induzir a divisão celular. Na planta, as auxinas são produzidas nas regiões de crescimento celular localizadas nos ápices dos ramos e, em menor quantidade, das raízes, e seu transporte ocorre do topo da planta em direção à base ⁽¹⁴⁾.

Já, as citocininas estão envolvidas em processos de divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea e são utilizadas nas culturas *in vitro* para a regeneração das plantas ou indução de novos ramos. Na planta, a síntese das citocininas ocorre nas raízes e seu transporte é feito da base em direção às partes aéreas ^(15,16,12).

Estes dois reguladores são, portanto, produzidos em locais diferentes e possuem funções antagônicas. Se houver um equilíbrio entre as concentrações de ambas, ocorrerá o desenvolvimento de uma massa celular indiferenciada comumente chamada de *callus* ou *calo* ⁽¹⁷⁾.

Produção de calos

Na natureza, as plantas podem gerar calo em resposta a um estresse, causado por ferimento ou infecção patogênica. A formação de calo, também denominada calogênese, pode também ser induzida *in vitro* por

níveis elevados de reguladores de crescimento, onde ocorre a dediferenciação das células do explante, que são induzidas a retornarem ao estado inicial meristemático ⁽¹⁸⁾.

As regiões do explante que sofreram sinalização se estabelecem primeiramente na periferia do explante isolado e, de forma gradativa, em pontos internos do tecido, onde camadas e regiões de crescimento ativo na forma de cunhas passam a se formar e dependendo do balanço dos reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura, diversos tipos celulares do explante poderão se dediferenciar, caracterizando assim o novo sistema que passa a ser chamado de calo ⁽³⁾.

O estabelecimento da cultura de calos a partir de explantes (sendo raízes, caules, folhas, flores, etc.) é dividido em três etapas ^(9,19) (**FIGURA 2**):

(1) indução: preparação do tecido isolado com a ativação do metabolismo para a dediferenciação e divisão celular (mitose);

(2) divisão propriamente dita: as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor, iniciando pelas periféricas e posteriormente ocupando a região central do explante;

(3) dediferenciação: o tecido perde sua identidade histológica, as células tornam-se maiores, vacuolizadas, a taxa de divisão diminui e então ocorre o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular.

FIGURA 2. Sequência da formação de calo, da periferia para o centro, em explante foliar de andiroba (*Carapa guianensis*). (1) Preparação do tecido, (2) Divisão das células, (3) Dediferenciação celular.



O calo pode ser produzido em resposta a uma injúria física ou química, mas é necessário saber que nem todas as células de um explante formam calo com facilidade ou produzem o metabólito de interesse, por isso a escolha do explante é fundamental para um bom resultado ⁽²⁰⁾. No entanto, é sabido que, os tecidos jovens são mais adequados que os adultos. O parênquima foi descrito ⁽²⁰⁾ como o melhor tecido para o desenvolvimento de calos, pois se trata de um tecido de considerável plasticidade.

A formação de calo é importante na biotecnologia vegetal, podendo ser utilizada na propagação de clones saudáveis de uma determinada espécie, como tem sido estudada para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, como o pau-brasil ⁽²¹⁾ e espécies alimentícias, como o adoçante *Stevia rebaudiana* ⁽²²⁾ e, amazônicas, o cacau e o cupuaçu ⁽²³⁾; além de ser necessária para a incorporação de genes por biobalística e para suspensão celular para a produção de metabólitos secundários ⁽²⁴⁾.

A suspensão celular é utilizada atualmente para culturas em grande escala de células vegetais, a partir das quais podem ser extraídos metabólitos secundários. Uma cultura em suspensão é feita por meio da

transferência de uma quantidade de calo para um meio líquido e mantida sob condições adequadas de aeração, agitação, luz, temperatura, entre outros parâmetros ⁽²⁵⁾. A vantagem desse método é que uma vez otimizado o protocolo, é possível o fornecimento de uma fonte contínua de biomassa. Outra vantagem inclui a possibilidade de induzir a produção de metabólitos secundários de uma forma contínua utilizando elicitores tanto bióticos quanto abióticos ⁽²⁶⁾.

Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas configurações de biorreatores, que têm se adaptado com sucesso à produção de células e tecidos *in vitro*. O uso desta tecnologia possibilita que os nutrientes sejam efetivamente entregues às células, diferentemente do que pode ocorrer em cultivo em meio de cultura semissólido ^(27,7). Neste ambiente também é possível manipular as variáveis citadas anteriormente, além de aeração e forma de fornecimento do meio de cultura, podendo ocorrer de forma constante ou não.

Produção de metabólitos secundários *in vitro*

As plantas possuem um grande potencial biossintético, porém, o percentual deste potencial utilizado atualmente é apenas uma fração do que as plantas podem nos oferecer. A procura por novas fontes de produtos naturais e fármacos oriundos de plantas tem se expandido, principalmente sobre aqueles com acentuado potencial terapêutico já comprovado ⁽²⁸⁾.

A produção de fármacos provenientes de plantas, principalmente aqueles obtidos de espécies de arbóreas, é dificultada por diversos fatores, tais como: qualidade da matéria prima utilizada, acessibilidade, raridade de espécies de valor comercial e medicinal, principalmente aquelas localizadas em ecossistemas ameaçados de extinção ^(29,1). Além disso, algumas espécies produzem quantidades muito pequenas da substância bioativa de interesse, como é o caso do taxol, utilizado no tratamento contra o câncer, onde são necessárias as cascas de três árvores de aproximadamente cem anos de idade para produzir a quantidade suficiente para o tratamento de uma pessoa ⁽³⁰⁾.

A biossíntese de metabólitos secundários é restrita a alguns tipos de células e tecidos especializados, o que dificulta os processos laboratoriais e industriais de extração e purificação dos metabólitos secundários ⁽³¹⁾.

As principais vantagens ⁽³²⁾ da produção de metabólitos *in vitro* são: a independência dos fatores ambientais, o aumento do controle da produção, o uso de linhagens que garantam uma qualidade consistente do produto, a simplificação dos métodos de processamento e a recuperação do produto alvo, o aproveitamento de novas rotas de síntese a partir de linhagens mutantes, a utilização de elicitores no direcionamento da produção e o aproveitamento das biotransformações que ocorrem durante o cultivo de células vegetais *in vitro*, entre outras.

Estudos comparativos de metabólitos secundários produzidos em plantas obtidas da natureza com plântulas e/ou calos cultivados *in vitro* tem sido realizados, assim como ensaios de atividades biológicas, como por exemplo, atividade antioxidante realizados na espécie *Thymus lotocephalus*, onde extratos hidroalcoólicos de calos apresentaram maior concentração de substâncias antioxidantes do que as plantas coletadas, particularmente ácido rosmarínico, apresentando assim, um maior potencial antioxidante do que extratos obtidos de plantas de campo ⁽³³⁾.

Estudos comparativos realizados com o gênero *Cyclopia*, mostraram que este possui atividade biológica comprovada como antioxidante, antimutagênica, anticancerígena, fitoestrogênica, antidiabética e redutora

de colesterol. Foram identificadas diversas substâncias polifenólicas nos extratos a partir de plantas de campo e calo, onde três substâncias diferentes das encontradas em plantas de campo foram identificadas no calo, sendo a primeira vez que derivados de benzofenona e dihidrochalcona foram encontradas no gênero *Cyclopia*⁽³⁴⁾.

A vincristina e vimblastina são substâncias com comprovada ação antitumoral, porém as quantidades dessas substâncias na planta (*Catharanthus roseus*) é muito pequena⁽³⁵⁾. Diversos grupos de pesquisa pelo mundo estão trabalhando para o melhoramento da produção dessas substâncias e para isto estão utilizando a produção de células em suspensão pela indução por meio de elicitores tanto físicos quanto químicos^(36,37), quanto a indução *in vitro* através da genética^(38,39), demonstrando que esta técnica pode ser uma grande ferramenta para auxiliar tanto na pesquisa quanto na produção de metabólitos com aplicações farmacológicas.

A artemisinina, importante antimalárico extraído de espécies do gênero *Artemisia*, é outra substância para a qual está sendo estudado o aumento da produção por suspensão celular. Seguindo o mesmo plano de ação para a vincristina e vimblastina, estão sendo testados o aumento da produção em suspensão celular utilizando elicitores^(40,41).

Foram quantificados ⁽⁴²⁾ os principais metabólitos secundários de espécies do gênero *Ocimum* (alfavaca e manjerição) obtidos de culturas *in vivo*, culturas de calos *in vitro* com elicitores e *in vitro* sem elicitores. Observaram-se volumes mais elevados de fenóis, alcaloides e terpenoides nas culturas de calos *in vitro* com elicitores.

A produção de camptotecina⁽⁴³⁾ foi 3 vezes maior em suspensão celular de calos de *Ophiorrhiza mungos*, se comparado aos níveis encontrados na planta *in vivo*. A camptotecina é um alcaloide quinolínic com ação anticancerígena que está sendo utilizado em medicamentos de última geração. O aumento na produção de substâncias fenólicas e tocoferóis também foi observado em culturas de calos de uma espécie de uva (*Vitis vinifera*) com elicitores^(44,45).

No entanto, a produção de metabólitos secundários de cultura de calos *in vitro*, muitas vezes pode ser menor do que a obtida em plantas de campo ou ser até mesmo nula. Pois, a desdiferenciação pode levar à perda da capacidade de produção dos metabólitos de interesse ⁽³⁵⁾. Além de apresentar um custo elevado.

Assim, a obtenção destes metabólitos a partir de tecidos diferenciados *in vitro* pode ser igual ao obtido na planta de campo. A produção em larga escala de tecido diferenciado *in vitro* (raízes fasciculadas, microplantas, embriões somáticos, etc.), torna-se economicamente inviável por necessitar de maior área e mais gasto com insumos para a produção^(46,47).

A vantagem de se obter biomassa vegetal a partir de calos está na possibilidade de se conseguir maior quantidade de material vegetal, onde há a possibilidade de manipulação dos fatores que influenciam a produção dos metabólitos secundários através do uso de elicitores e/ou biorreatores^(48,49).

Conclusão

A cultura de células/tecidos vegetais *in vitro* é uma ferramenta eficaz para a produção em larga escala de biomassa vegetal para a extração de metabólitos secundários de interesse, sem que ocorra a exploração

predatória de populações selvagens. Uma vez que os demais métodos de cultivo vegetal são muitas vezes limitados, onerosos e demandam mais tempo para produção dos metabólitos.

A produção e investigação de princípios ativos oriundos de plantas úteis às mais diversas vertentes do ramo da biotecnologia, tais como as indústrias cosméticas e farmacêuticas, tem incentivado a realização de pesquisas com essa técnica. Com isto, espécies vegetais comerciais e inclusive espécies pouco estudadas ou sem estudos prévios quanto a sua constituição química, quando cultivadas *in vitro*, podem fornecer alternativas para a produção de biomassa para a produção de fármacos através da biotecnologia vegetal e culturas de tecidos *in vitro*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelos auxílios financeiros concedidos (projetos CT-Agro/CNPq, PPBio/CNPq e REPENSA/CNPq/FAPEAM), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (projeto Pro-Amazônia/CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM (projeto REPENSA/CNPq/FAPEAM).

Referências

1. Morais TP, Luz JMQ, Silva SM, Resende RF, Silva A. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Rev Bras Plan Med.** FapUNIFESP. Botucatu. 2012; 14(1):110-21. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#).
2. Akin-Idowu PE, Ibitoye DO, Ademoyegun OT. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **Afr J Plant Sci Biotech.** 2009 August; 8(16): 3782-88. ISSN: 1684-5315. [\[Link\]](#).
3. Davies KM, Deroles SC. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. **Curr Opin Biotechnol.** Elsevier BV. 2014 Apr; 26:133-40. ISSN: 0958-1669. [\[CrossRef\]](#).
4. Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICFR. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Ind Crops Prod.** Elsevier BV; 2016 Apr; 82:9-22. ISSN: 0926-6690. [\[CrossRef\]](#).
5. Toso RD, Melandri F. Sustainable sourcing of natural food ingredients by plant cell cultures. **Agro Food Ind Hi Tech.** 2011; 22(2): 26-28. [\[Link\]](#).
6. Nunes EC, Pilatti FK, Rescarolli CL, Gerber T, Benson EE, Viana AM. The *in Vitro* Conservation of Plants Native to the Brazilian Amazon and Atlantic Forests. **Conserv Trop Plant Species.** Springer. New York. 2012 Jun; 27: 347-72. ISBN: 978-1-4614-3776-5. [\[CrossRef\]](#).
7. Murthy HN, Georgiev MI, Park S-Y, Dandin VS, Paek K-Y. The safety assessment of food ingredients derived from plant cell, tissue and organ cultures: A review. **Food Chem.** Elsevier BV. 2015 Jun; 176:426-32. ISSN: 0308-8146. [\[CrossRef\]](#).

8. Termignone RR. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 2012. 182p. ISBN: 85-7025-810-0.
9. Aitchison, PA, Macleod AJ, Yeoman MM. **Growth patterns in tissue (callus) cultures**. In: Street HE., editor. *Plant tiss. and cell cult.* 2ª ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977, p.267-306. ISBN: 0-520-02411-7. [\[Link\]](#).
10. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiol Plant**. Wiley-Blackwell. 1962 Jul; 15(3):473-97. [\[CrossRef\]](#).
11. Namdeo AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. **Pharmacogn Rev**. 2007 May; 1(1): 69-79. [\[Link\]](#).
12. Taiz L, Zeiger E. **Fisiol Veg**. 5ª ed, Artmed, Porto Alegre, 2012. ISBN: 978-85-363-2795-2.
13. Jardim LS, Sampaio PTB, Costa SS, Gonçalves CQB, Brandão HLM. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazon**. FapUNIFESP. Manaus. 2010;40(2):275–9. ISSN: 0044-5967. [\[CrossRef\]](#).
14. Botin AA, Carvalho A. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Rev Cien Agro**. Alta Floresta, MT, 2015; 13(1): 83-96. [\[Link\]](#).
15. Hartmann H.T, Kofranek AM, Rubatzky VE, Flocker WJ. **Plant Science: growth, development and utilization of cultivated plants**. 5ª ed. New Jersey: Regents/Prentice Hall. 2011. ISBN: 13: 9780135068502.
16. Narayanaswamy, S. Plant cell and tissue culture. Nova Delhi: **Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited**. 1994. ISBN: 13: 978-0-07-460277-5.
17. Hussain MS, Rahman MA, Fareed S, Ansari S, Ahmad I, Saeed M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **J Pharm Bioall Sci**. Medknow; 2012; 4(1):10. [\[CrossRef\]](#).
18. Vijayasree N, Udayasri P, Aswani KY, Ravi BB, Phani KY, Vijay VM. Advancements in the Production of Secondary Metabolites. **J Nat Prod**. 2010; 3:112-123. [\[Link\]](#).
19. Stafford A, Warren G. **Plant cell and tissue culture**. Melksham: RedWood Press, 1991. 251p. ISSN: 1573-5044. [\[Link\]](#).
20. Pinto JEBP, Lameira AO. **Micropropagação e Metabólitos Secundários *in vitro* de Plantas Medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001;102p. [\[Link\]](#).
21. Werner ET, Milanez CRD, Mengarda LHG, Vendrame WA, Cuzzuol GRF. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Bot Bras**. FapUNIFESP. Feira de Santana. 2010 Dec; 24(4):1046–51. ISSN: 0102-3306. [\[CrossRef\]](#).

22. Ahmad N, Fazal H, Zamir R, Khalil SA, Abbasi BH. Callogenesis and Shoot Organogenesis from Flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). **Sugar Tech**. Springer. Nature. 2011 Jun; 13(2):174–7. [[CrossRef](#)].
23. Venturieri GA, Venturieri GC. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazon**. FapUNIFESP; 2004 Dec;34(4):507–11. [[CrossRef](#)].
24. Pistelli L, Giovannini A, Ruffoni B, Bertoli A, Pistelli L. Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production. **Adv Exp Med Biol**. Springer US. 2010; 167–84. ISBN: 978-1-4419-7347-4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
25. Fumagali E, Gonçalves RAC, Machado MFPS, Vidoti GJ, Oliveira AJB. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev Bras Farmacogn**. João Pessoa. 2008 Out./Dez; 18(4). ISSN: 1981-528X. [[CrossRef](#)].
26. Cusido RM, Onrubia M, Sabater-Jara AB, Moyano E, Bonfill M, Goossens A, et al. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. **Biotechnol Adv**. Elsevier BV. 2014 Nov; 32(6):1157–67. [[CrossRef](#)].
27. Georgiev MI, Eibl R, Zhong J-J. Hosting the plant cells *in vitro*: recent trends in bioreactors. **Appl Microbiol Biotechnol**. Springer. Nature. 2013 Mar; 97(9):3787-800. [[CrossRef](#)].
28. Foglio MA, Queiroga CL, Sousa IMO, Rodrigues RAF. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. In: Construindo a História dos Produtos Naturais. **Mult Rev Interd UNICAMP**. UNICAMP. 2006; [[Link](#)].
29. Gonçalves S, Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnol Adv**. [Internet]. Elsevier BV. 2013 Mar; 31(2):166-74. [[CrossRef](#)].
30. Nosov AM. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin. **Appl Microbiol Biotechnol**.. Pleiades Publishing Ltd. 2012 Oct 24; 48(7):609–24. [[CrossRef](#)].
31. Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Agropecuária. Guaíba. 2001; 463p. ISBN: 85-85347-76-7.
32. Grattapaglia D, Machado MA. Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. Editores. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas** 1ª ed. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. 1998; 1:183-260. ISBN: 85-7383-044-1.
33. Costa P, Gonçalves S, Valentão P, Andrade PB, Coelho N, Romano A. *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chem**. Elsevier BV. 2012 Dec; 135(3):1253-60. [[CrossRef](#)].
34. Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Sowinski P, Glod D, Gorynski K, Bucinski A. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and *in vitro* cultures. **Food Chem**. Elsevier BV. 2012 Aug; 133(4):1373-82. [[CrossRef](#)].

35. Saiman MZ, Mustafa NR, Pomahočová B, Verberne M, Verpoorte R, Choi YH, Schulte AE. Analysis of metabolites in the terpenoid pathway of *Catharanthus roseus* cell suspensions. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** (PCTOC). Springer. Nature. 2014 Feb; 117(2):225-39. ISSN: 1573-5044. [\[CrossRef\]](#).
36. Fukuyama T, Ohashi-Kaneko K, Watanabe H. Estimation of Optimal Red Light Intensity for Production of the Pharmaceutical Drug Components, Vindoline and Catharanthine, Contained in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Environ Control Biol.** Japanese Society of Agricultural, Biological and Environmental Engineers and Scientists. 2015; 53(4):217-20. [\[CrossRef\]](#).
37. Fatima S, Mujib A, Tonk D. NaCl amendment improves vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*: a case of stress signalling as evidenced by antioxidant enzymes activities. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** Springer. Nature. 2015 Jan 20; 121(2):445-58. ISSN: 1573-5044. [\[CrossRef\]](#).
38. Prakash P, Ghosliya D, Gupta V. Identification of conserved and novel microRNAs in *Catharanthus roseus* by deep sequencing and computational prediction of their potential targets. **Gene.** Elsevier BV. 2015 Jan; 554(2):181-95. [\[CrossRef\]](#).
39. Van Moerkercke A, Fabris M, Pollier J, Baart GJE, Rombauts S, Hasnain G, et al. CathaCyc, a Metabolic Pathway Database Built from *Catharanthus roseus* RNA-Seq Data. **Plant Cell Physiol.** Oxford University Press (OUP). 2013 Apr 3; 54(5):673-85. [\[CrossRef\]](#).
40. Ali M, Abbasi BH. Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **J Photochem Photobiol.** Elsevier BV. 2014 Nov; 140:223-7. ISSN: 1011-1344. [\[CrossRef\]](#).
41. Tariq U, Ali M, Abbasi BH. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in *callus* cultures of *Artemisia absinthium* L. **J Photochem Photobiol.** Elsevier BV. 2014 Jan; 130:264-71. ISSN: 1011-1344. [\[CrossRef\]](#).
42. Matthew R, Sankar PD. Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field-grown plants of *Ocimum*. **Int J Pharm Pharm Sci.** 2014 Feb; 6(2):102-106. ISSN: 0975-1491. [\[Link\]](#).
43. Deepthi S, Satheeshkumar K. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 2015 Nov; 124(3):483–93. ISSN: 1573-5044. [\[CrossRef\]](#).
44. Cetin E. Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. Öküzgözü callus cultures. **Biol Res.** 2014; 47(1):37. ISSN: 0717-6287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
45. Cetin E, Babalik Z, Hallac-Turk F, Gokturk-Baydar N. The effects of cadmium chloride on secondary metabolite production in *Vitis vinifera* cv. cell suspension cultures. **Biol Res.** 2014; 47(1):47 [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
46. Verpoorte R, Van Der Heijden R, Ten Hoopen HJG, Memelink J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnol Lett.** 1999; 21(6):467-479. ISSN: 1573-6776. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).

47. Saiman MZ, Mustafa NR, Choi YH, Verpoorte R, Schulte AE. Metabolic alterations and distribution of five-carbon precursors in jasmonic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 2015; 122:351–362. ISSN: 1573-5044 [[CrossRef](#)].
48. Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochem Rev**. 2002; 1:13–25. ISSN: 1572-980X. [[CrossRef](#)].
49. Trejo-Tapia G, Rodríguez-Monroy M. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. **Interciencia**. Caracas. 2007; 32(10): 669-674. ISSN: 0378-1844. [[Link](#)].

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

Histórico do artigo: Submissão: 30/08/2017 | Aceite: 06/08/2018 | Publicação: 29/10/2018

Como citar este artigo: Souza JC, Rescarolli CLS, Nunez CV. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(3): 269-280. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/550>>. 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.

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

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

- **Artigos:** resultado de pesquisa experimental ou conceitual, respeitando fundamentação e metodologia científica, com o máximo de 6.000 palavras. Deverá ser estruturado com itens identificados com subtítulos de introdução, metodologia, resultados e/ou discussão e conclusão.
- **Revisão:** revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes, com o máximo de 8.000 palavras. A submissão de revisões está sujeita somente ao convite ou à consulta prévia pelo editor de área.
- **Comunicação Breve:** relato de resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados como revisão ou na estrutura de artigo, mas de forma sucinta, com o máximo de 1.700 palavras.
- **Perspectivas:** análises de temas conjunturais, de interesse imediato e sobre a importância do tema, em geral a convite da equipe editorial, com o máximo de 2.200 palavras.
- **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.
- **Resenhas:** resenha crítica de livro, dissertações, teses e outros, publicado nos últimos dois anos, com o máximo 1.200 palavras.
- **Cartas:** crítica a artigo publicado em números anteriores da Revista Fitos, com no máximo 700 palavras.

1. Informações gerais do manuscrito

- São publicados manuscritos científicos inéditos e originais e que não estejam em avaliação simultânea em nenhum outro periódico.
- Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico, o manuscrito será desconsiderado.
- Todos os autores deverão preencher o termo de Cessão de Direitos Autorais, que deverá ser inserido no sistema.
- Todo conceito e opiniões expressos nos artigos, bem como a exatidão e a procedência das citações, são de exclusiva responsabilidade dos autores.
- Informar no formulário de submissão, qualquer conflito de interesse que envolva o manuscrito.
- Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado de auxílio à pesquisa.
- Caso não tenha recebido financiamento, os autores devem declarar esta informação.
- Caso o trabalho envolva estudos em humanos ou animais deverão estar acompanhados dos seus respectivos Pareceres do Comitê de Ética de Pesquisa, tanto em Seres Humanos, quanto em Animais.
- Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem, obrigatoriamente, estar acompanhados do número e entidade de registro do ensaio clínico.

2. Formatação do manuscrito

- Redigidos em Word do MS Office doc, docx ou Write do Libre Office.
- Não serão recebidos artigos em formatos fechados para edição como PDF ou similares.
- **Página A4**, margem de **2 cm** em cada um dos **quatro lados**, incluindo **figuras, quadros e tabelas**.
- Letra em fonte **Arial**, tamanho **12**.
- Espaçamento **duplo** entre linhas em todo o artigo, incluindo os resumos e referências.
- Texto **justificado**.
- No manuscrito submetido, não deverão conter os dados de autoria e afiliação, para atender à avaliação às cegas.

3. Estrutura do manuscrito

- Os subtítulos que identificam cada item do manuscrito deverão ser escritos em negrito com a 1ª letra da primeira palavra em maiúscula.
- Não serão aceitas notas de rodapé.
- Siglas devem ser escritas por extenso, quando aparecem a primeira vez, no resumo, no abstract e no restante do manuscrito.

4. Título

- Deverá ser apresentado no idioma do manuscrito (português, inglês ou espanhol) e em inglês.
- Deverá estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o escopo da Revista.
- Deverá ser escrito com o máximo de 120 caracteres, incluindo espaços.
- Somente a 1ª letra da primeira palavra do título deverá ser escrita em maiúscula.
- A versão do título em inglês deverá conter as mesmas características da apresentação do título original.

5. Resumo e abstract

- Só não se aplica a resenhas e cartas.
- Apresentação concisa dos pontos relevantes do trabalho em um único parágrafo, expondo metodologia, resultados e conclusão.
- Deverá conter o máximo 200 palavras.
- Os resumos no idioma original do manuscrito deverão ser inseridos apenas no formulário de submissão.
- Terminada a inserção do resumo no formulário, o responsável pela submissão deverá alterar o idioma do formulário e preencher os campos traduzidos.
- No abstract, evitar traduções literais. Quando não houver domínio do idioma, consultar pessoas qualificadas.

6. Itens em Artigos e Comunicação Breve

- Os manuscritos de artigo e de comunicação breve, em caráter de apresentação de resultado de pesquisa, devem apresentar os itens de Introdução, de Materiais e Métodos, de Resultados e/ou Discussão e de Conclusão.
- A introdução deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Deverá estar claro o referencial teórico adotado no texto. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências às publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas.
- No item Materiais e Métodos, a descrição deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho.
- Os Resultados deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes, deverão ser submetidos a uma análise estatística.
- A Discussão deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Resultados e Discussão poderão ser apresentados num único item.
- A conclusão deverá ser destinada ao desfecho do raciocínio do autor, ressaltando as consequências de seu argumento e as principais contribuições da pesquisa.

7. Figuras/Tabelas

- As figuras, tabelas, quadros e figuras ilustrativas (gráficos, fotografias, desenhos, mapas, estruturas químicas), deverão ser citados no texto, indicados em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, em negrito e entre parênteses, como exemplo (**TABELA 1, FIGURA 1...**).
- As tabelas, quadros e figuras deverão ser inseridas pelos próprios autores nos locais adequados, tão logo após a citação, e não no final do manuscrito.
- As **legendas** deverão ser informadas **acima das tabelas, quadros e figuras**.
- As informações inseridas nas tabelas e quadros deverão ser apresentadas com letra tamanho 10 e espaço simples.
- As tabelas não poderão conter linhas verticais nas laterais.
- Se os dados das tabelas, quadros e figuras não forem originais deverá ser informada a fonte sempre **abaixo**, tamanho 10, espaço simples.
- Os itens que compõem as figuras deverão estar legíveis e em boa resolução gráfica.
- Fotos com pessoas ou marcas identificáveis ou em lugares não públicos deverão ter autorização do uso de imagem.

8. Agradecimentos

- Este item é opcional e deverá vir antes das Referências.

9. Falas de sujeitos

- Deverão estar em itálico, tamanho 10, entre aspas, na sequência do texto. A fala não poderá estar identificada e sim codificada, entre parênteses, sem itálico.

10. Citações

- Todas as citações deverão estar referenciadas no texto.
- Deverão seguir o estilo Vancouver.
- Deverão ser identificadas por números em sequência de citação e entre parênteses.
- Em citações múltiplas, os respectivos números deverão ser separados por vírgula, no caso de mais de duas citações sequenciais.
- No texto, a citação deverá ser inserida no parágrafo entre aspas.
- Com mais de três linhas deverá aparecer em parágrafo independente com recuo de margem de 4 cm à esquerda, fonte 10, espaço 1, com ou sem aspas.

11. Referências estilo Medline e PubMed

- As referências citadas no texto deverão ser listadas ao final do artigo em ordem alfabética e alinhadas à margem esquerda do texto.

- Para instruções, consultar PATRIAS K, WENDLING D (Tech. Ed.). *Citing Medicine. The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers*. 2007. 2nd ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine no link <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>.
- Destacar em negrito: o título de livro, o nome da revista/periódico em artigo e o número em legislação.
- Todas as referências deverão ser apresentadas de modo correto e completo.
- A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).
- No caso de uso de software de gerenciamento de referências bibliográficas (EndNote, Zotero ou outros), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.
- As referências deverão ser acompanhadas de hyperlink. Consultar o próximo item.

12. Processo de Submissão

12.1 – Passo 1. Iniciar Submissão

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

12.1 – Passo 2. Transferência do Manuscrito

- O autor deverá selecionar o arquivo e clicar sobre o botão **TRANSFERIR**.
- Em seguida, quando o manuscrito aparecer sob o título “Arquivo submetido”, o autor poderá clicar sobre **SALVAR E CONTINUAR**.

12.3 – Passo 3. Inclusão de Metadados

12.3.1 - Autores e afiliação

- Os dados de todos os autores deverão ser preenchidos **somente** no formulário de metadados da submissão, presente no passo 3 do processo de submissão do site da Revista Fitos (www.revistafitos.far.fiocruz.br), sendo dados obrigatórios: nome e sobrenome por extenso e e-mail.
- Preenchimento dos dados complementares dos autores: obrigatoriamente, número do ORCID ou ResearchID ou perfil no Google Acadêmico; e opcionalmente, Link do CV Lattes, Link do repositório Institucional, Link do site ou blog do grupo de pesquisa, Link do site do autor.
- Os demais autores deverão ser incluídos no mesmo formulário (Clicar no botão “incluir autor”)
- A ordem dos autores no formulário deverá corresponder à ordem de autoria do trabalho.
- As afiliações devem ser incluídas em hierarquias institucionais.
- Não colocar títulos e funções junto às afiliações.
- Em caso de duplo vínculo do autor, colocar somente o vínculo no qual a pesquisa foi desenvolvida.

- Em caso de cooperação, poderá colocar as duas instituições. Ressalta-se que a primeira deverá ser a de maior vínculo.
- Terminado o cadastramento de todos os autores, o responsável pela submissão deverá alterar o idioma do formulário e preencher os campos traduzidos.

12.3.2 - Título

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

12.3.3 - Resumo e abstract

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

12.3.4 - Indexação:

- **Área e subárea do Conhecimento:** o autor deverá informar a que área pertence seu manuscrito: **Agroecologia, Botânica, Ciências Farmacêuticas** (Farmácia; Farmacotecnica; 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 e Toxicologia**.
- **Palavras-chave:** Inserir de quatro (4) a oito (8) palavras-chave que representem o conteúdo do manuscrito e facilite a recuperação da informação. As palavras-chave deverão ser escritas em

português ou espanhol e inglês, fazendo a alteração de idioma do formulário, com a primeira letra em maiúscula e separadas por ponto.

12.4 – Passo 4. Transferência de Documentos Suplementares

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

12.5 – Passo 5. Confirmação da Submissão

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

Exemplos de referências

Artigo de Periódico

Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Rodrigues E, Tabach R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemao, Anacardiaceae (aroeira-do-deserto). **Rev Bras Farmacogn**. 2010; 20 (5): 140-146. ISSN: 1981-528X.

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; 73:1006-12.

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

Artigo de periódico eletrônico

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

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

Artigo de jornal

Santos J. Alves dos. 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/Monografias

Autor. Título e subtítulo da tese. 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. Mestrado [Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular] - Instituto Oswaldo Cruz.

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

Trabalho publicado em anais de eventos científicos

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

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

Trabalhos aceitos para publicação (no prelo)

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

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

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

Patente

Autor(s), 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.

6. Inserção de hiperlink

Cada referência bibliográfica deverá vir acompanhada dos hyperlinks das publicações ou citações de páginas da web. O grupo de link aceito é CrossRef, PubMed e Link, a ser apresentado nesta ordem, quando houver e com os termos entre colchetes.

Inserindo hyperlink [CrossRef]

Caso a referência citada possua o número DOI (Digital Object Identifier ou Identificador de Objeto Digital) o seu endereço terá o formato <http://dx.doi.org/númeroDOI>.

Souza MVN, Vasconcelos TA. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. UFF, **Quim Nova**. 2005; 28 (4): 28-678. [CrossRef]

No exemplo acima, a referência possui número DOI igual a 10.1590/S0100-40422005000400022.

Passo a passo: selecione apenas a palavra CrossRef (não inclua os colchetes), pressione Ctrl+K (MSWord para Windows) ou Command+K (MSWord para Mac OS) e cole o endereço <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000400022>. Por fim, a referência terá o seguinte formato:

Souza MVN, Vasconcelos TA. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. UFF, **Quim Nova**. 2005; 28 (4): 28-678. [\[CrossRef\]](#)

Inserindo hyperlink [PubMed]

Caso a referência possua, além do DOI, o número PubMed, este deve ter o formato: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/númeroPubMed>. O link PubMed pode ser obtido através do sítio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Orlikova B, Menezes JCJMDS, JI S, Kamat SP, Cavaleiro JAS, Diederich M. Methylenedioxy flavonoids: assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **Eur J Med Chem.** Sep 12; 84:173-80. 2014. [PubMed]

Passo a passo: selecione apenas a palavra PubMed (não incluir os colchetes), pressione Ctrl+K (MSWord para Windows) ou Command+K (MSWord para Mac OS) e cole o endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25016375>. Adicionalmente, esta referência também possui DOI, que é igual a 10.1016/j.ejmech.2014.07.003. A referência terá o seguinte formato:

Orlikova B, Menezes JCJMDS, JI S, Kamat SP, Cavaleiro JAS, Diederich, M. Methylenedioxy flavonoids: assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **Eur J Med Chem.** Sep 12; 84:173-80. 2014. [CrossRef] [PubMed]

Inserindo hyperlinks [Link]

As referências que não possuírem [CrossRef] nem [PubMed] e estiverem disponíveis online, coloque a expressão disponível em e o endereço do artigo no hyperlink da palavra [Link]. Ao selecionar não inclua os colchetes.

dos Santos SA, de Carvalho MG, Braz-Filho R. Produtos de Oxidação do Sesquiterpeno Laevigatina. Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Hidrogênio e Carbono-13. **Quim Nova.** 1995; 18(6): 525-528. [Link]

Antes de submeter o manuscrito é importante testar todos os hiperlinks das referências; passando o mouse por cima dos hiperlinks verifique se os endereços informados estão corretos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

