

Raquel Elisa da Silva López  
Leonardo Lucchetti Caetano da Silva  
*organizadores*

---

# SABERES, CIÊNCIAS *e* PLANTAS MEDICINAIS

---

*uma abordagem  
multidisciplinar*



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz







**A**s plantas medicinais têm suscitado interesse tanto na sociedade quanto na comunidade científica ao longo de séculos. Para muitas comunidades, o conhecimento acerca dessas plantas constitui a única ferramenta terapêutica disponível. Em âmbito nacional, apresentam-se como uma oportunidade promissora para a geração de inovações fundamentadas na integração entre saúde e ambiente que podem impulsionar o desenvolvimento social e econômico. Desse modo, desempenham um papel estratégico essencial para o complexo econômico e industrial da saúde, contribuindo para o fortalecimento da nossa indústria farmacêutica.

Entretanto, a conversão dos recursos provenientes da biodiversidade em soluções inovadoras e sustentáveis, capazes de expandir o conjunto de opções terapêuticas disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), ainda não se concretizou plenamente no Brasil. A discrepância entre a expectativa da nossa potencialidade e a realidade do nosso efetivo desempenho é uma questão que permanece em aberto e é particularmente relevante e contraditória em um país que tem abundância em riqueza tanto natural quanto humana.

Considerando essas premissas, nesta obra organizada por Raquel e Leonardo, exploram-se, de maneira abrangente, os



principais aspectos relacionados à pesquisa, desenvolvimento, inovação e produção em plantas medicinais. A sincronia com a revisão da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos realizada pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) adiciona um componente dinâmico, tornando-a uma referência oportuna para os interessados em compreender as iniciativas nesse campo. Dessa forma, este volume traz contribuições efetivas que não apenas enriquecem o conhecimento existente, mas também se integram ativamente aos esforços mais amplos para aprimorar a utilização e a promoção das plantas medicinais no contexto da saúde pública e da pesquisa científica.

*Saberes, Ciências e Plantas Medicinais: uma abordagem multidisciplinar* é uma compilação lógica, acessível e coesa dos diferentes saberes associados às plantas medicinais (tradicional e científico), organizados e sistematizados por métodos racionais (ciência), em diferentes áreas do conhecimento (multidisciplinar), que amplia e atualiza a compreensão sobre o tema. Trata-se de um recurso precioso, ancorado em bases sólidas, e adequado a um público diversificado, que inclui leigos, profissionais do setor, pesquisadores e estudantes, tanto de graduação quanto de pós-graduação.

*Jislaine Guilhermino*

Diretora da Fiocruz Mato Grosso do Sul







**SABERES,  
CIÊNCIAS  
*e*  
PLANTAS  
MEDICINAIS**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

*Presidente*

*Mario Moreira*

*Diretor Executivo*

*Juliano Lima*

*Diretora Executiva Adjunta*

*Priscila Ferraz*

*Vice-Presidente de Ambiente, Atenção e Promoção da Saúde*

*Hermano Albuquerque de Castro*

*Vice-Presidente de Educação, Informação e Comunicação*

*Cristiani Vieira Machado*

*Vice-Presidente de Pesquisa e Coleções Biológicas*

*Maria de Lourdes Aguiar Oliveira*

*Vice-Presidente de Produção e Inovação em Saúde*

*Marco Aurelio Krieger*



## INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS (FARMANGUINHOS)

*Diretor*

*Jorge Souza Mendonça*

*Assessora da Direção*

*Vânia Buchmuller*

*Vice-Diretora de Gestão Institucional*

*Sílvia Santos*

*Vice-Diretora de Educação, Pesquisa e Inovação*

*Nubia Boechat*

*Vice-Diretor de Gestão da Qualidade*

*Rodrigo Fonseca*

*Vice-Diretora de Operações e Produção*

*Elda Falqueto*

*Vice-Diretor de Gestão do Trabalho*

*André Cordeiro*

*Coordenadora de Desenvolvimento Tecnológico*

*Alessandra Esteves*

Raquel Elisa da Silva López  
Leonardo Lucchetti Caetano da Silva  
*organizadores*

---

**SABERES,  
CIÊNCIAS  
*e*  
PLANTAS  
MEDICINAIS**

---

*uma abordagem  
multidisciplinar*



Copyright © 2024 dos autores  
Todos os direitos desta edição reservados à  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ / FARMANGUINHOS

Os organizadores e Farmanguinhos agradecem o apoio financeiro da Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (Abifina), da Nortec Química, do Cristália, da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde (Fiotec) e da Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde (VPPIS/Fiocruz).

Revisão  
*Myllena Paiva*

Normalização de referências  
*Clarissa Bravo*

Capa, projeto gráfico e editoração  
*Paulo Vermelho*

Produção editorial  
*Phelipe Gasiglia*

Apoio editorial  
*Editores Fiocruz*

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

---

S115s Saberes, Ciências e Plantas Mediciniais: uma abordagem  
multidisciplinar / organizado por Raquel Elisa da Silva López e  
Leonardo Lucchetti Caetano da Silva. — Rio de Janeiro, RJ:  
Farmanguinhos/Fiocruz, 2024.  
486 p. : il. ; tab.

ISBN: 978-65-980644-3-3  
Inclui Bibliografia.

1. Plantas Mediciniais – pesquisa. 2. Plantas Mediciniais – desenvolvimento.  
3. Plantas Mediciniais – análise. 4. Plantas Mediciniais – cultivo. 5. Plantas Mediciniais –  
produção Fitoterápicos. 6. Medicamento Fitoterápico. I. López, Raquel Elisa da Silva.  
(Org.). II. Silva, Leonardo Lucchetti Caetano da (Org.). III. Título.

CDD- 23.ed. – 615.321

Glauce de Oliveira Pereira – Bibliotecária CRB 7/5642



Av. Comandante Guarany, 447  
Jacarepaguá  
22775-903 – Rio de Janeiro, RJ  
(21) 3348-5050  
comunicacao.far@fiocruz.br

Apoio:





Dedicado à memória de  
**Benjamin Gilbert**  
(★ 1929 – † 2024)





## Autores

Ana Joffily

Bióloga, doutora em botânica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professora associada do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense.

André Mesquita Marques

Farmacêutico, doutor em ciências pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; tecnólogo em pesquisa do Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Andrea Bezerra da Nobrega

Farmacêutica e química, doutora em produtos para saúde pela Universidade Federal Fluminense, com pós-doutorado em inovação farmacêutica pela Universidade Federal de Goiás; tecnóloga em saúde pública do Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Anna Carina Antunes e Defaveri

Bióloga, doutora em biotecnologia vegetal pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professora visitante da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.



Carla Junqueira Moragas Tellis

Farmacêutica, doutora em química de produtos naturais pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; tecnóloga em saúde pública do Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Cassia Sakuragui

Bióloga, doutora em ciências biológicas (botânica) pela Universidade de São Paulo, com pós-doutorado pelo Royal Botanic Gardens, Kew, Inglaterra; professora associada do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Christina Gaspar Villela

Bióloga, doutora em ciências pela Fundação Oswaldo Cruz; professora do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal Fluminense.

Danilo Ribeiro de Oliveira

Farmacêutico, doutor em química de produtos naturais pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professor associado do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Deborah Quintanilha Falcão

Farmacêutica, doutora em química de produtos naturais pela Universidade Federal do Rio de Janeiro e *sciences chimiques et biologiques pour la santé* pela Université de Montpellier I, França, com pós-doutorado pela Fundação Oswaldo Cruz e pela Université de Montréal, Canadá; professora associada licenciada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

Dulcinéia Furtado Teixeira

Farmacêutica, doutora em vigilância sanitária pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz; tecnóloga em saúde pública do Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Eliana Rodrigues

Bióloga, doutora em ciências pela Escola Paulista de Medicina, com pós-doutorado pela Escola Paulista de Medicina; professora associada do Departamento de Ciências Ambientais da Universidade Federal de São Paulo.

Emeli Moura de Araújo

Farmacêutica industrial e esteta, doutora em ciências farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professora adjunta do Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

Erika Martins de Carvalho

Química, doutora em química pelo Instituto Militar de Engenharia; tecnóloga em saúde pública da Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

Fernanda Moreira do Amaral

Bióloga, mestre e doutoranda em ciências biológicas (botânica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Francisco Prosdócimi

Biólogo, doutor em bioinformática pela Universidade Federal de Minas Gerais; professor associado do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Frederico Silva Castelo Branco

Farmacêutico, doutor em química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; tecnólogo em pesquisa do Departamento de Síntese Orgânica de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Ítalo Mario Cesari

Biólogo, doutor em ciências biológicas pela Università degli Studi di Pavia, Itália, com pós-doutorado em ciências pela Università degli Studi di Pavia e pelo Salk Institute for Biological Studies, nos Estados Unidos.

Jeferson Adriano e Silva Assunção

Biólogo, mestre em ciência e tecnologia farmacêutica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, doutorando em pesquisa translacional em fármacos e medicamentos por Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz; professor do curso de extensão de cultivo de plantas medicinais do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

João Carlos da Silva

Pedagogo, mestre em avaliação pela Fundação Cesgranrio, doutorando em ciências da educação da Universidad Nacional de La Planta, Paraguai; coordenador do Centro de Responsabilidade Socioambiental do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Joseli Rocha Nogueira

Bióloga, doutora em saúde pública pela Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz (Ensp/Fiocruz); tecnologista em saúde pública da Ensp/Fiocruz.

July Andrea Hernández Muñoz

Química, doutora em ciências pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Leonardo Lucchetti Caetano da Silva (organizador)

Farmacêutico, doutor em química de produtos naturais pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; tecnologista em saúde pública do Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Luiz Gustavo Carneiro-Martins

Biólogo, especialista em biologia vegetal pela Faculdade Única de Ipatinga, mestrando em biologia vegetal pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro; técnico e docente do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Maria Carolina Anholeti

Farmacêutica industrial, doutora em química de produtos naturais pelo Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro; professora adjunta do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Maria Raquel Figueiredo

Química, doutora em química orgânica pela Universidade de São Paulo, com pós-doutorado pela Université de Lausanne, Suíça; pesquisadora titular em saúde pública de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Marisa Fernandes Mendes

Engenheira química, doutora em engenharia química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professora associada IV da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Mêriane Lourdes de Paiva Brandão

Farmacêutica industrial e esteta, mestre em ciências farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, doutoranda em ciências farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás; farmacêutica responsável e proprietária da empresa Arte Farmacêutica – Farmácia de Manipulação Ltda.

Nina Cláudia Barboza da Silva

Bióloga, doutora em biotecnologia vegetal pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, com pós-doutorado pelo Jardim Botânico do Rio de Janeiro; professora associada III da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Nubia Boechat

Farmacêutica, doutora em química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; tecnóloga em saúde pública de Farmanguinhos no Departamento de Síntese Orgânica e vice-diretora de Ensino, Pesquisa e Inovação de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Priscila da Nobrega Rito

Farmacêutica, doutora em vigilância sanitária pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); tecnóloga em saúde pública da Fiocruz; docente do Programa de Pós-Graduação Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica de Farmanguinhos da Fiocruz.

Raquel Elisa da Silva López (organizadora)

Biomédica, doutora em bioquímica pela Universidade do Rio de Janeiro, com pós-doutorado pelo Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); pesquisadora em saúde pública do Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos da Fiocruz.

Samanta Cardozo Mourão

Farmacêutica, doutora em ciências farmacêuticas pela Universidade de São Paulo; professora associada do Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues

Bióloga, doutora em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), com pós-doutorado pela Harvard Medical School; tecnóloga em saúde pública de Farmanguinhos da Fiocruz.

Selma Ribeiro de Paiva

Bióloga, doutora em biotecnologia vegetal pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professora titular do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense e coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.



Sylvia Rivera Alves Vieira

Farmacêutica, mestre em gestão, pesquisa e desenvolvimento na indústria farmacêutica por Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Ulisses Carvalho de Souza

Engenheiro agrônomo; responsável pelo Centro de Responsabilidade Socioambiental do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro e consultor e gerente operacional das ações socioambientais e de extensão da Marinha do Brasil.

Valério Francisco Morelli Amaral

Engenheiro agrônomo, mestre em ciências ambientais e florestais pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; tecnologista em desenvolvimento sênior de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz.

Ygor Jessé Ramos

Farmacêutico, doutor em biologia vegetal pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro; professor na Universidade Castelo Branco.

Wanise Borges Gouvea Barroso

Engenheira química, doutora em ciências da informação e da comunicação pela Université de Toulon, na França; pesquisadora titular em saúde pública da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e vice-diretora de Ensino, Pesquisa e Inovação do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fiocruz.

# Sumário

Prefácio, 17

Apresentação, 19

- 1 Um Breve Histórico sobre as Plantas Medicinais no Brasil, 29  
*Raquel Elisa da Silva López e Leonardo Lucchetti Caetano da Silva*
- 2 Cultivo e Beneficiamento de Plantas Medicinais para a Produção de Insumos Ativos Vegetais, 43  
*Valério Francisco Morelli Amaral, Jeferson Adriano e Silva Assunção, Danilo Ribeiro de Oliveira, Nina Cláudia Barboza da Silva, Ygor Jessé Ramos, Ulisses Carvalho de Souza, Luiz Gustavo Carneiro-Martins, Anna Carina Antunes e Defaveri e João Carlos da Silva*
- 3 Beneficiamento e Preparo de Extratos Vegetais: variabilidade e sazonalidade de plantas medicinais, 73  
*Dulcinéia Furtado Teixeira, Andrea Bezerra da Nobrega, Marisa Fernandes Mendes e Mêriane Lourdes de Paiva Brandão*
- 4 Avaliação da Autenticidade de Drogas Vegetais Baseada na Análise Morfológica Macro e Microscópica, 95  
*Fernanda Moreira do Amaral, Selma Ribeiro de Paiva e Ana Joffily*
- 5 Autenticação Genética de Plantas Medicinais, 113  
*Cassia Sakuragai, Francisco Prosdócimi e Ítalo Mario Cesari*

- 6 A Contribuição da Etnofarmacologia no Estudo de Produtos Naturais, 135  
*Danilo Ribeiro de Oliveira e Eliana Rodrigues*
- 7 Busca Racional de Metabólitos Secundários Ativos: quimiosistemática, 169  
*André Mesquita Marques e Maria Raquel Figueiredo*
- 8 A Célula Vegetal e seu Metabolismo, 193  
*Raquel Elisa da Silva López*
- 9 Isolamento e Caracterização dos Principais Metabólitos Primários Ativos: proteínas vegetais, 227  
*Raquel Elisa da Silva López*
- 10 Isolamento, Purificação e Caracterização de Metabólitos Secundários Vegetais, 255  
*Dulcinéia Furtado Teixeira, André Mesquita Marques, Leonardo Lucchetti Caetano da Silva e Carla Junqueira Moragas Tellis*
- 11 Métodos e Processos para Estudos em Metabolômica de Plantas Medicinais: aplicações da ressonância magnética nuclear e da espectrometria de massa, 291  
*Erika Martins de Carvalho, Leonardo Lucchetti Caetano da Silva e July Andrea Hernández Muñoz*
- 12 A Química Medicinal e a Síntese Orgânica de Fármacos de Origem Vegetal, 325  
*Frederico Silva Castelo Branco e Nubia Boechat*
- 13 Produção Industrial de Medicamentos Fitoterápicos, 355  
*Emeli Moura de Araújo, Andrea Bezerra da Nobrega, Samanta Cardozo Mourão, Maria Carolina Anholeti, Deborah Quintanilha Falcão e Mêriane Lourdes de Paiva Brandão*

- 14 Controle Físico-Químico e Microbiológico da Qualidade de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, 401  
*Leonardo Lucchetti Caetano da Silva e Joseli Rocha Nogueira*
- 15 Estudos Farmacológicos Não Clínicos e Clínicos com Plantas Medicinais, 431  
*Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues, Christina Gaspar Villela e Raquel Elisa da Silva López*
- 16 Proteção do Conhecimento Tradicional no Brasil e a Experiência das Bases de Dados da Índia e da China, 465  
*Sylvia Rivera Alves Vieira, Priscila da Nobrega Rito e Wanise Borges Gouvea Barroso*





## | Prefácio

O Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) conta com alguns departamentos na sua Vice-Diretoria de Educação, Pesquisa e Inovação (VDEPI). Dentre eles, destaco o Departamento de Produtos Naturais, que tem como área de excelência a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos e medicamentos a partir da biodiversidade brasileira. Farmanguinhos surgiu em meados dos anos 70 para atender à demanda do Ministério da Saúde pelo uso racional de plantas medicinais por comunidades rurais. Nos seus laboratórios passaram nomes importantes que colaboraram para consolidar a pesquisa em plantas medicinais no Brasil. Esses mesmos profissionais incumbiram-se da capacitação de outros cientistas que, hoje, continuam produzindo importantes pesquisas em laboratórios de diversas instituições espalhados pelo país e pelo mundo. Com base em suas experiências em produtos naturais, alguns deles reuniram seus esforços para escrever este livro, que certamente contribuirá para a compreensão da cadeia de produção de fitoterápicos ou de fármacos oriundos da nossa biodiversidade em especial.

Entre as diversas contribuições já realizadas, em 2017 o departamento organizou o curso temático sobre cadeia produtiva de plantas medicinais dentro da II Escola de Inverno de Farmanguinhos e teve uma surpreendente procura entre estudantes de graduação e pós-graduação de instituições públicas e privadas e, também, de profissionais de dentro e de fora da Fiocruz, com repercussão muito positiva. No curso, foram abordados aspectos históricos das plantas medicinais no Brasil, as etapas e as sequências da pesquisa e da

produção de plantas medicinais, de seus derivados e das substâncias isoladas, no contexto da ciência, tecnologia e inovação.

Vários pedidos de novas edições deste curso foram feitos e, com isso, veio a proposta de registrar seu conteúdo no formato de um livro. O material que o leitor tem em mãos foi ampliado para que pudessem ser abordados mais assuntos e aspectos que não foram contemplados no curso e, por isso, além dos pesquisadores da instituição, outros especialistas foram convidados a participar deste trabalho.

Assim que eu fui contatado para apoiar a publicação desta obra, de imediato abracei a ideia por entender a relevância da proposta e da contribuição que ela daria para esse segmento da ciência no Brasil. Da mesma forma, empresas congêneres e parceiras também consideraram a proposta bastante relevante e concordaram em apoiar esta empreitada. Sem o apoio delas, a concretização deste livro teria sido muito mais difícil. Dessa forma, registro aqui meus agradecimentos pelo apoio de todos os parceiros.

Todos os profissionais envolvidos entendem que esta obra, mesmo sem ter o objetivo de ser didático, apresenta ao leitor de uma forma relativamente simples o tema e as disciplinas que compõem a cadeia produtiva em plantas medicinais. Os autores oferecem importantes aportes a respeito da produção de plantas medicinais, da etnobotânica, da quimiosistemática e do metabolismo de plantas. Eles abordam, também, o preparo e o beneficiamento dos extratos; a autenticação morfológica e genética das espécies vegetais; os procedimentos gerais e as técnicas envolvidas no isolamento e na caracterização de metabólitos e suas transformações químicas; a química medicinal, que abre possibilidades de desenvolvimento de novos análogos de fármacos a partir da biodiversidade; a farmacotécnica em escalas laboratorial e industrial; o controle da qualidade dos produtos e os estudos não clínicos e clínicos sistematizados; finalizando com a abordagem das formas de proteção do conhecimento tradicional.

Com este livro em suas mãos, Farmanguinhos cumpre sua missão de “promover a saúde pública por meio da oferta de soluções integradas e sustentáveis, gerando e difundindo conhecimentos, inovando e fornecendo medicamentos”, propiciando, assim, o acesso a terapias inovadoras no Sistema Único de Saúde (SUS) e contribuindo com o desenvolvimento da ciência, tecnologia e inovação. Nosso DNA é o SUS. Desejo uma boa leitura.

*Jorge Souza Mendonça*

Diretor do Instituto de Tecnologia em Fármacos  
(Farmanguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz

## | Apresentação

A busca de melhores condições de vida acompanha a humanidade desde sua origem, incluindo a cura para os diversos males. Nesse contexto, a natureza que cercava o homem e, principalmente, as plantas tiveram um papel fundamental. Elas faziam parte de diversas preparações, descobertas por tentativa e erro, e o conhecimento era passado aos descendentes de geração a geração. Os vegetais, além do seu papel nutricional, ajudavam o homem no contato com seus deuses, na crença da aquisição de força, nas curas das doenças, na concepção de sua prole e na construção de suas moradias. Cada sociedade utilizava recursos naturais de que dispunha e, à medida que o homem se espalhava pelo planeta, por migrações dos nômades e, depois, pelas navegações, descobriam-se novas espécies vegetais que apresentavam novos ou maiores poderes do que os conhecidos (Saad, 2014).

Em tempos mais recentes, o conhecimento sobre as plantas passou a ser mais organizado, e foram desenvolvidas metodologias de cultivo, identificação e beneficiamento. As primeiras coleções de plantas medicinais, e sua organização em *famílias*, surgiram cerca de 3 mil anos a.C., com os sumérios e, desde então, o número de coleções cresceu e o conhecimento sobre as plantas medicinais veio se consolidando (Neuberger, 1970). Em consequência do desenvolvimento da síntese química em meados do século XX, o papel terapêutico das plantas medicinais foi negligenciado. Contudo, elas sempre foram utilizadas entre as populações menos favorecidas, e atualmente seus usos têm ganhado protagonismo (Alves, 2013). O desenvolvimento farmacêutico no mundo todo aconteceu a partir da manipulação dos produtos naturais de



plantas medicinais, ou seja, a indústria farmacêutica que conhecemos hoje nasceu do conhecimento das plantas medicinais (Viegas *et al.*, 2006). Além disso, muitos medicamentos sintéticos que encontramos nas prateleiras de drogarias e farmácias foram inspirados em metabólitos vegetais. Em outros casos, podem apresentar fármacos obtidos por semissínteses que partem de um precursor obtido de fonte natural (Nicolaou, 2014).

No Brasil, como pode ser visto no primeiro capítulo desta coletânea, o grande impulso para organizar o conhecimento relativo às plantas medicinais aconteceu com a chegada da família imperial portuguesa e os primeiros cientistas da comitiva. As informações fornecidas pelas populações locais, somadas às observações dos pesquisadores da época, fundaram as bases da nossa literatura específica da área (Alves, 2005).

Ao longo das últimas décadas, obras sobre botânica, atividade terapêutica e modos de preparo, consumo e armazenamento foram produzidas. Surgiram, ainda, as publicações sobre a química das plantas medicinais. À medida que tais publicações tornaram-se referências, a regulamentação legal começou a se consolidar (Bruhn & Holmstedt, 1981).

O livro *Saberes, Ciências e Plantas Medicinais: uma abordagem multidisciplinar* é composto de textos sequenciais que abrangem os conhecimentos científicos e tradicionais sobre as plantas medicinais com fins terapêuticos, bem como seus derivados, os fitofármacos e os fitoterápicos. Seus capítulos foram escritos por profissionais especialistas de diferentes áreas do conhecimento, com distintas formações acadêmicas, como agrônomos, biólogos, biomédicos, bioquímicos, botânicos, engenheiros químicos, farmacêuticos, químicos e microbiologistas, que contribuíram com um olhar particular sobre o tema de plantas medicinais e, portanto, oferecem uma abordagem multidisciplinar.

Para um melhor entendimento do assunto, as ciências farmacêuticas definem que todos os medicamentos têm, como ativo, pelo menos um fármaco. Assim, o fármaco é a substância que apresenta a ação terapêutica comprovada, e o medicamento é o produto que o contém como ingrediente principal, acrescido de excipientes e adjuvantes de formulação. Contudo, quando o medicamento obtido de fontes vegetais é uma substância ativa purificada, ele é denominado de fitofármaco (Brasil, 2018). Por sua vez, quando o ativo é composto de mais de uma substância, ele é chamado de fitocomplexo. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 26/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) conceitua um fitoterápico como o produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, excetuando as substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, podendo ser simples (quando o ativo é proveniente de uma única espécie) ou composto (quando se usa mais

de uma fonte natural para sua produção). Esse conceito engloba, também, os medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2014).

Os 16 capítulos que compõem este livro abordam assuntos relacionados ao desenvolvimento do tema principal da obra, que são os diferentes conhecimentos que envolvem as plantas medicinais. Eles foram organizados de maneira que o leitor tenha uma visão ampla do processo de desenvolvimento dos insumos vegetais a partir das plantas medicinais, e que a assimilação deste conhecimento seja fácil, acessível, agradável e didática. Embora não tenhamos a pretensão de que esta obra seja um livro didático, ela pode constituir um importante recurso para o aprendizado do tema, visto que reúne assuntos de grande interesse relacionados às plantas medicinais. Os conhecimentos envolvidos na pesquisa de plantas medicinais e na produção, caracterização, controle e emprego de ativos vegetais estão apresentados num encadeamento lógico que permitiu a organização dos capítulos. Dessa forma, o histórico das pesquisas em plantas medicinais no Brasil foi o ponto de largada.

Antes mesmo de os portugueses chegarem e, com eles, botânicos e naturalistas de outras nações, o consumo de plantas medicinais já era a base dos tratamentos de doenças e de rituais indígenas. A vastidão, a exuberância e a diversidade botânica observadas no país de outrora fascinavam todos, e, ainda hoje, mesmo experimentando a devastação de matas nativas, nossa flora tem a maior biodiversidade do planeta. Dela, surgiram diversos estudos, capitaneados por cientistas brasileiros e estrangeiros, que se distribuíram por várias áreas do conhecimento científico. No desenvolvimento desta coletânea, abordamos os aspectos técnicos de plantio, coleta, produção de extratos, identificação vegetal morfológica e genética; discorremos sobre a célula vegetal e seu metabolismo responsável pela produção de moléculas de interesse farmacológico; comentamos sobre as técnicas e tecnologias para a obtenção, caracterização destas moléculas de interesse e das formulações farmacêuticas com tais moléculas e suas vias de administração; discutimos o controle da qualidade para o desenvolvimento de produtos medicinais naturais e aspectos referentes aos principais estudos pré-clínicos e clínicos; e encerramos o livro com a proteção patentária das invenções relacionadas com as plantas medicinais.

A observação dos efeitos terapêuticos das preparações vegetais foi a base para a organização dos primeiros conhecimentos sobre as plantas medicinais. Eles eram adquiridos e transmitidos de forma oral e passaram a ser registrados, dando assim origem às primeiras compilações, que se tornaram a base da etnofarmacologia (Calixto, 2005). À medida que o conhecimento tradicional foi sendo acompanhado, confrontado e checado com dados científicos obtidos da química, começou a ser desenhada a quimiosistemática, uma ferramenta

preditiva que associa grupos botânicos à produção de determinadas classes de metabólitos secundários que, por sua vez, foram sendo associados a determinadas atividades biológicas (Gottlieb, 1982). Dessa forma, a busca racional por princípios ativos vegetais ganhou forma e método.

Os parâmetros de cultivo, que dependem da época do ano, da qualidade do solo, da presença ou ausência de outras plantas e/ou insetos, da umidade relativa do ar e da pluviosidade local, são todos afetados durante o crescimento das espécies medicinais. A parte da planta que apresenta a atividade terapêutica desejada, ou seja, a droga vegetal, pode ou não ser submetida à extração. Em caso negativo, a planta é seca ou não, particionada (rasurada ou não), vendida em embalagens fechadas ou a granel e destinada ao preparo caseiro, geralmente por infusão ou decocção. Essa etapa extrativa, quando realizada em escala industrial, gera insumos que são disponibilizados como os próprios extratos fluidos – em mistura de água e álcool etílico – ou de forma seca, para serem solubilizados pelo consumidor ou fazerem parte de alguma formulação farmacêutica. Nesses casos, temos as diversas formas que encontramos no mercado, como comprimidos, cápsulas e drágeas.

O conhecimento da química da planta, influenciada por fatores genéticos e ambientais, é crucial para que se atinja a estabilidade do insumo farmacêutico ativo vegetal. Sem ela, o produto torna-se passível de, além de não exibir seus efeitos farmacológicos de modo satisfatório, trazer alguns riscos ao seu consumo humano ou animal.

A qualidade de um produto à base de plantas requer, além de cultivo, beneficiamento e formulação adequados, que a identificação do seu ingrediente ativo seja inequívoca. Para isso, algumas abordagens podem ser realizadas. A primeira, e mais evidente, é a autenticação botânica. Em diversos casos, tal inspeção consegue prevenir fraudes, que podem ocorrer de forma intencional ou não. Quanto maior for o estado de divisão de uma planta, menos visíveis tornam-se suas peculiaridades e características. As análises macro e microanatômicas são o primeiro passo para garantir a qualidade do insumo (Zhao *et al.*, 2006). Em adição à botânica, quando a inspeção visual não é conclusiva, a genética é uma garantia na autenticação do material vegetal. Por mais semelhantes que duas espécies possam ser, elas não carregam o mesmo material genético. Dessa forma, a identificação de uma espécie torna-se inequívoca (Hao & Xiao, 2015). Esse tipo de análise ainda não é rotina, pois existem poucos bancos de dados de sequências genéticas de plantas medicinais, além dos elevados custos operacionais. Mesmo que a espécie seja a correta, caracterizada através de sua anatomia e/ou de seu genoma, as condições ambientais são capazes de influenciar seu fenótipo. Determinada planta pode apresentar

insumos derivados ativos quando colhida em certa época do ano, ou em coordenadas geográficas específicas.

O estudo da célula vegetal, sua composição e o seu metabolismo são as bases para o entendimento da obtenção dos seus metabólitos primários e secundários, através de técnicas, métodos e processos analíticos, que incluem desde o fracionamento dos extratos até o isolamento e a caracterização de substâncias puras. Muitos desses procedimentos são empregados, também, no controle físico-químico da qualidade do insumo vegetal e de seus produtos derivados. A identificação e a indicação do correto teor do/s ativo/s na formulação, cuja composição é minuciosamente testada e cuja produção é rigorosamente controlada, são itens inegociáveis para produtos destinados à saúde. Os produtos à base de plantas, por sua vez, também devem atender aos critérios rígidos de qualidade observados desde o início do cultivo.

Uma vez que a identidade química é conhecida, as pesquisas sobre a atividade biológica podem ser mais específicas, objetivas e mais bem endereçadas. Após o cumprimento dos requisitos que levam ao maior conhecimento possível sobre a matriz vegetal e o fitoterápico dela gerado, testes de formulação e estudos pré-clínicos podem ter sua autorização solicitada à autoridade sanitária, a Anvisa. O conjunto de normas e regulamentos sanitários, em constante atualização e em consonância com a legislação de diversos outros países, conduz à geração de produtos seguros, com qualidade e eficácia. Finalmente, a proteção patentária dos medicamentos desenvolvidos à base de plantas medicinais no Brasil gera autonomia e recursos ao país.

As áreas científicas mais relacionadas aos capítulos deste livro são aquelas que abordam: *agronomia e afins*, que explicam os fundamentos e as boas práticas para o cultivo e obtenção de plantas de interesse econômico; *biologia celular*, que descreve as organelas das células vegetais e suas funções nas plantas; *bioquímica*, com a apresentação do metabolismo vegetal e suas moléculas; *botânica*, com as descrições macro e microscópicas dos vegetais, além da organização taxonômica; *genética*, com a apresentação da teoria e de técnicas de análise genômica para a identificação de organismos; *farmacognosia*, uma disciplina de graduação específica dos cursos de farmácia, que aborda o trabalho com plantas medicinais, desde a prospecção de espécies de interesse e sua caracterização, passando pela biossíntese de produtos naturais, seu isolamento e purificação, até os testes de identificação e pureza de matrizes e substâncias; *farmacotécnica*, outra disciplina exclusiva dos cursos de farmácia, que demonstra os processos de preparação de formas farmacêuticas a partir de insumos ativos; *química orgânica*, que apresenta as rotas de síntese de moléculas em geral, das quais algumas são farmacologicamente ativas; *química analítica*, que mostra as ferramentas para a determinação

qualitativa e quantitativa de moléculas em amostras e que serve como um dos pilares para o controle físico-químico da qualidade; *microbiologia*, a área da ciência que trata dos micro-organismos, sua ocorrência e seus riscos; *farmacologia*, que demonstra os efeitos das substâncias ativas no organismo.

Todas essas áreas da ciência são contempladas em livros didáticos e, à exceção da farmacognosia, não abordam plantas medicinais especificamente. O tema é recorrente, porém não necessariamente apresenta-se como o principal. Adicionalmente, existem outros temas relevantes para o interessado em plantas medicinais e correlatos, como a regulamentação sanitária e as questões de propriedade intelectual.

Com esta obra, pretendemos, de forma organizada, coerente, sequencial e lógica, oferecer ao leitor uma coletânea sobre plantas medicinais capaz de alcançar públicos com formações e interesses variados. Para os mais interessados, as referências ao fim de cada capítulo indicam onde o leitor pode aprofundar mais determinado tema.

Em busca de modos de vida mais *naturais*, associados a melhores condições de saúde e até mesmo respeito e cuidado ao meio ambiente, é bastante comum e até óbvio que as plantas passem a ter mais protagonismo em vários aspectos do cotidiano. Elas sempre estiveram presentes em produtos do dia a dia, agregando valor às marcas que as contêm. Entre estes, estão os cosméticos, domissanitários e demais produtos de higiene. Neste livro, é dado destaque aos medicamentos à base de plantas medicinais.

Além das questões que envolvem sustentabilidade, ecologia e *marketing*, há outros aspectos que atraem os olhares da ciência na direção dos insumos vegetais farmacologicamente ativos. Um deles, de especial interesse, tem relação com o tratamento de doenças complexas. Extratos vegetais, muitas vezes, podem exibir atividades biológicas mais pronunciadas que seus constituintes isolados. O sinergismo entre as diversas moléculas de um extrato, de diferentes classes químicas e origens biossintéticas envolve, geralmente, a ação sobre múltiplos alvos terapêuticos. Isso, normalmente, não ocorre quando o medicamento, de origem natural ou sintética, é composto de um ou dois ingredientes ativos. A sinergia entre medicamentos tem sido explorada nos últimos anos para o tratamento de diversas doenças, sobretudo o câncer e a aids. A combinação de ingredientes ativos é particularmente promissora no tratamento de doenças de maior complexidade, pois permite a atuação simultânea sobre diversos alvos, garantindo maior eficácia e menor chance de resistência aos fármacos empregados (Casanova & Costa, 2017).

Algumas iniciativas para a criação e a aplicação de normas que determinem e permitam aferir a segurança e a eficácia são dignas de nota para

as plantas medicinais. Uma delas é a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Sistema Único de Saúde (SUS). Ela engloba, entre outras práticas, as plantas medicinais, a fitoterapia e a medicina tradicional chinesa (que tem nas plantas medicinais seu principal recurso). O primeiro objetivo dessa política foi incorporar e implementar as ações no âmbito do SUS, na perspectiva da prevenção de agravos e da promoção e recuperação da saúde, com ênfase na atenção básica, voltada para o cuidado continuado, humanizado e integral em saúde. Nesse sentido, as plantas medicinais, que sempre foram um recurso reconhecido pela população em geral, assumem papel de destaque. Esse papel de destaque pode ser também confirmado pela segunda iniciativa: a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (ReniSUS), criada em 2009, para difundir o uso de plantas medicinais dentro do SUS. Essa relação é composta de 71 espécies de interesse terapêutico e tem como objetivo, no sentido de referendar as plantas como auxiliares no tratamento de diversas doenças, promover o desenvolvimento de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) sobre as espécies nela inscritas para a comprovação de eficácia e segurança. As plantas validadas integram a Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Renafito), que pretende garantir subsídios científicos para a prescrição de fitoterápicos no âmbito dos serviços de saúde pública.

A Política Nacional de Assistência Farmacêutica do SUS contempla também as Farmácias Vivas. Elas se apresentam como um modelo adotado por diversos programas de fitoterapia em todo o país que foi, finalmente, formalizado em 2010 pelo Ministério da Saúde. Nesse modelo estão compreendidas todas as etapas de cultivo, coleta, processamento, armazenamento de plantas medicinais, manipulação e dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos. Essas e outras iniciativas, tornadas políticas ou não, fazem parte de algumas ações e as estimularam; entre tais ações estão a atualização da normatização sanitária pela Anvisa, a criação de fomentos para pesquisas na área de plantas medicinais e fitoterápicos e a elaboração de cursos de diversos níveis de formação espalhados pelo país.

Todo livro tem, como intenção, transmitir ao leitor uma experiência nova, única e, talvez, diferente daquelas vivenciadas em leituras prévias. O mercado brasileiro é abundante em livros sobre plantas medicinais. Alguns são abrangentes, cobrindo as espécies mais conhecidas distribuídas pelos diversos biomas brasileiros, e costumam conter os nomes científicos, as sinonímias populares (que variam entre as regiões), as partes utilizadas e suas propriedades. Outros, no entanto, aprofundam seus conteúdos sobre plantas medicinais trazendo mais dados botânicos, às vezes algumas informações sobre

composição química e, mais raramente, sobre atividade biológica com base científica. Os livros em que se trata mais profunda e especificamente do tema principal são os de farmacognosia, com descrições e análises morfológicas de drogas vegetais, formas de processamento primário e extração de ativos, fracionamento, isolamento e caracterização de metabólitos secundários e as vias pelas quais as plantas os produzem. São livros científicos, destinados à formação de profissionais.

Como não poderiam ser esquecidas, existem ainda as farmacopeias, os códigos oficiais que normatizam a qualidade de insumos e produtos farmacêuticos. Nelas, constam os índices de qualidade, características gerais de identificação e métodos de determinação de ativos biológicos. Esses compêndios são usados como referências sanitárias dos países, mesmo que nem todos eles contem com as suas próprias farmacopeias. Nesses casos, as nações que não têm seus próprios códigos costumam adotar os de outros países. A *Farmacopeia Brasileira*, hoje em sua sexta edição, é disponibilizada gratuitamente para consulta e *download*.

Finalmente, a proposta do presente livro é apresentar ao leitor a *cadeia produtiva de plantas medicinais* de forma atualizada nos saberes e ciências envolvidas. Consideramos, durante sua produção, que ele fosse capaz de atrair desde leigos interessados no assunto até profissionais cujas áreas de atuação sejam afins aos temas abordados e, também, estudantes de cursos de graduação e pós-graduação, que possam ver neste livro uma fonte organizada e abrangente de informações e referências. Embora tenha sido usada uma linguagem, por vezes, mais acessível, simples e direta, foi também utilizada a correta linguagem técnica e científica quando necessário. Quanto melhor for a comunicação, maior será a adesão à leitura e mais efetivamente sua ideia será transmitida e sedimentada no leitor. Esperamos despertar no público o interesse no tema, e aqueles que já o tenham esperamos estimular a procurar informações com bases sólidas.

*Raquel Elisa da Silva López*  
*Leonardo Lucchetti Caetano da Silva*



## REFERÊNCIAS

- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. *Revista Virtual de Química*, 5: 450-513, 2013.
- ALVES, L. F. Laboratório Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras. *Revista Fitos*, 1: 30-40, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <<https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf)>. Acesso em: 1 fev. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Práticas Integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. (Cadernos de Atenção Básica, n. 31). Disponível em: <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/praticas\\_integrativas\\_complementares\\_plantas\\_medicinais\\_cab31.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf)>. Acesso em: 1 fev. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 26, 13 maio 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Consolidado de Normas de Registro e Notificação de Fitoterápicos*. Brasília: Ministério da Saúde, Anvisa, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia brasileira, 21 set. 2020. Disponível em: [www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira)>. Acesso em: 1 fev. 2023.
- BRUHN, J. G. & HOLMSTEDT B. Ethnopharmacology: objectives, principles, and perspectives. In: BEALE, J. L. & REINHARD, E. (Ed.). *Natural Products as Medicinal Agents*. Stuttgart: Hippokrates, 1981.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 131-134.2005.
- CASANOVA, L. M. & COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. *Revista Virtual de Química*, 9 (2): 575-595, 2017.
- GOTTLIEB, O. R. *Micromolecular Evolution Systematics and Ecology: an essay into a novel botanical discipline*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1982
- HAO, D. C. & XIAO, P. G. Genomics and evolution in traditional medicinal plants: road to a healthier life. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 11: 197-212, 2015.
- NEUBERGER, M. *History of Medicine*. London: Oxford University Press, 1970.
- NICOLAOU, K. C. Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. *Proceedings of the Royal Society A*, 470: 20130690, 2014.
- PETROVSKA B. B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogogia Reviews*, 6: 1-5, 2012.

SAAD, B. Greco-arab and islamic herbal medicine: a review. *European Journal of Medicinal Plants*, 4: 249-258, 2014.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S. & BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a Química Medicinal. *Química Nova*, 29: 326-337, 2006.

ZHAO, Z. *et al.* Authentication is fundamental for standardization of Chinese medicines. *Planta Medica*, 72: 865-874, 2006.



# 1

## Um Breve Histórico sobre as Plantas Medicinais no Brasil

*Raquel Elisa da Silva López  
e Leonardo Lucchetti Caetano da Silva*

**A**s plantas participam da vida dos seres humanos desde os tempos mais remotos da nossa história e, de acordo com a tradição, têm propriedades lendárias e mágicas (Santos, 2013). O Brasil, com seus 8,5 milhões km<sup>2</sup>, ocupa várias zonas climáticas. Tal extensão territorial e posição geográfica favorecem a riqueza de sua flora: cerca de 22% da flora mundial concentra-se em nosso território e, dentro desse percentual, quase a metade (46%) corresponde a plantas endêmicas ou nativas. São reconhecidas cerca de 50 mil espécies, 4.600 de algas, 1.600 de briófitas, 1.300 de pteridófitas, 30 de gimnospermas e 33 mil de angiospermas. O bioma mais diverso é a Mata Atlântica, com cerca de 19.400 espécies conhecidas, seguido da Amazônia (13.400), Cerrado (12.700), Caatinga (5.300), Pampa (2.000) e Pantanal (1.300), sem mencionar as espécies vegetais nativas ainda não catalogadas e devidamente estudadas (Zappi *et al.*, 2015). O interesse sobre a flora do Brasil remonta ao século XVI com a chegada dos jesuítas. Desde então, inúmeros botânicos europeus visitaram o país do século XVII até o fim do século XIX e quase todas as coleções feitas foram depositadas em herbários europeus. Carl Friedrich Philipp von Martius editou a *Flora Brasiliensis* juntamente com Endlicher, Eichler e Urban, de 1840 até 1906, e incluiu 22.767 espécies de plantas, das quais 5.939 eram novas para a ciência. Estudos taxonômicos e florísticos no Brasil começaram em 1808, com a criação do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e

somente a partir de 1970 é que a botânica taxonômica se estabeleceu definitivamente no Brasil. Embora o país tenha grande riqueza de plantas medicinais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) costuma validar preferencialmente as plantas da comunidade europeia (Abreu, 2007). Antes de 1920, a Casa Granado comercializava mais de duzentas espécies em forma de extratos com bula e guia médico, e elas constituíram a maior parte da primeira edição da *Farmacopeia Brasileira* (1926) (Casa Granado, 2022).

## Os Primeiros Relatos sobre a Botânica no Brasil

A primeira descrição da flora brasileira foi a carta do escrivão Pero Vaz de Caminha, da frota de Pedro Álvares Cabral, ao rei dom Manuel, que governou Portugal entre 1495 e 1521, período áureo das descobertas marítimas. A carta, em decorrência da chegada dos portugueses ao Brasil em 22 de abril 1500, informa que as plantas foram vistas antes que a própria terra, os chamados “sinais de terra”, que era “muito povoada de árvores (...) que os mareantes chamam botelho e outras que também chamam de rabo-de-asno”. Esta descreve, entre outros aspectos, plantas ou associações vegetais, por meio dos termos associados tanto a plantas identificáveis quanto a não identificáveis. Entre as identificáveis, cinco eram exóticas, como figo (*Ficus carica* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), castanheiro (*Castanea vesca* Gaertn.), arroz (*Oryza sativa* L.) e uva (*Vitis vinifera* L.), e outras 16 eram nativas, como o palmito (*Euterpe edulis* Mart.), arcos-pretos (*Astrocaryum airi* Mart.), palmas (*Attalea funifera* Mart.), urucum (*Bixa orellana* L.), cabaça (*Lagenaria vulgaris* L.), fetos (*Alsophylla* spp.), inhame (*Manihot* spp.), cana (*Gynerium sagittatum* Beauv.), rabo-de-asno (*Halodule wrightii* Asch.) e jenipapeiro (*Genipa americana* L.). Caminha descreveu, inclusive, que o pigmento das sementes de urucum e do jenipapeiro eram usados pelos indígenas para pintar os corpos de vermelho e preto. Contudo, como ele permaneceu pouco tempo no Brasil, não chegou a conhecer o uso medicinal de plantas nativas, mas sua carta é considerada como “o venerável documento” e “a certidão de nascimento do Brasil”. Ela é o documento mais completo e extenso e, junto com a “Carta de mestre João” e a “Relação do Piloto Anônimo”, integra os três testemunhos diretos do Descobrimento do Brasil. A “Carta de mestre João” não faz nenhuma menção às plantas, mas na “Relação do Piloto Anônimo” descreve-se, em seu capítulo I, que “chegaram à terra para verem que terra era, a qual acharam terra muito abundante em árvores e gentes” e, no capítulo III, que “compraram papagaios e uma raiz chamada inhame, que é o seu pão que comem os árabes” (Filgueiras & Peixoto, 2002).

Após a chegada ao Brasil, Portugal adotou uma política de isolamento proibindo a entrada de qualquer estrangeiro em seu território, pois identificou que a nova colônia tinha muitas riquezas naturais de grande interesse para os europeus. Além disso, por conta da vasta extensão territorial das novas terras, eram muitas as dificuldades em defendê-la dos invasores. Assim, desde a *descoberta* até o início do século XIX, os estudos sobre a fauna, a flora e os recursos minerais do Brasil foram realizados apenas pelos portugueses ou por pessoal designado por eles (Gurgel, 2010).

## Os Usos de Plantas Medicinais no Brasil pelos Indígenas e Jesuítas

Depois de Pero Vaz de Caminha, os jesuítas descreveram novas plantas medicinais e seus usos por meio do intercâmbio com as culturas indígenas. Esses religiosos foram mandados para a nova colônia, pela Companhia de Jesus, idealizada e fundada em 1540 por Inácio de Loyola (Gandavo, 1858). O primeiro governador-geral do Brasil, Tomé de Souza, trouxe para o Brasil alguns jesuítas em 1549 liderados por Manuel da Nóbrega, e, em 1553, chegou o padre José de Anchieta. Eles tinham a tarefa de estreitar os laços entre a Igreja e os indígenas nativos, cabendo aos jesuítas a tarefa missionária e educacional nas terras colonizadas. Suas ações na área da saúde integraram essas missões, tratando de doenças e epidemias, fundando hospitais, estudando as plantas curativas da região e mantendo as boticas e enfermarias em seus colégios no Brasil. Nesse século (XVI), padre Anchieta aproximou as duas culturas de modo que os conhecimentos eram intercambiados e os indígenas repassavam sua farmacopeia e os métodos de cura naturais. Os jesuítas aprenderam o poder do guaraná (*Paullinia cupana*) para o tratamento da disenteria e de outros males intestinais. A aplicação de andiroba (*Carapa guianensis*) ajudava na assepsia e na cicatrização de feridas. A jurubeba (*Solanum paniculatum*) e o maracujá (*Passiflora edulis*) abrandavam as febres da população. Os saberes eram registrados e enviados para a Coroa portuguesa. Os indígenas tratavam suas doenças fazendo uso das plantas medicinais e magia ritual, muito antes da chegada dos colonizadores europeus. Eles transmitiam oralmente esse conhecimento para as gerações seguintes. Nas cartas e crônicas, os jesuítas discorriam sobre a natureza da colônia e descreviam as ervas e plantas medicinais, sendo considerados os primeiros escritos sobre a farmacopeia brasileira (Santos, 2013).

Os medicamentos trazidos da Europa para a colônia não eram eficientes para tratar as doenças endêmicas do Brasil e muitas vezes chegavam deteriorados,

pelo grande tempo de viagem e pelas condições climáticas da colônia. Logo, a cura de novas doenças e a distância da metrópole exigiam a busca por novos medicamentos. Os indígenas brasileiros utilizavam mais de três mil plantas medicinais, enquanto a farmácia “dos brancos” possuía pouco mais de quarenta remédios diferentes (Calainho, 2005; Teixeira, 2011).

Os indígenas brasileiros desenvolveram o conhecimento terapêutico das plantas e passaram para os jesuítas a melhor forma de utilizá-las. O pajé, apropriando-se do conhecimento sobre ervas e raízes acumulado pelo seu povo no decorrer de gerações, fundia tais saberes com as virtudes sobrenaturais que interagem espiritualmente em favor dos seus aldeões. Para eles, as doenças eram o resultado da maldade dos maus espíritos, e não existia fronteira definida entre os mundos físico e espiritual. Tal percepção não era exclusiva dos indígenas. Os cristãos, do início do século XVI, também nutriam uma ligação entre os mundos físico e espiritual, real e imaginário; eles entendiam que as doenças estavam associadas à opressão espiritual dos demônios e maus espíritos, e, assim como os indígenas, que usavam vegetais e ritos, combinavam rezas e orações com o uso das plantas na cura das enfermidades. Outros métodos de tratamento que combinavam os remédios obtidos das plantas, pedras ou excrementos eram frequentemente acompanhados por rituais e orações para o sucesso do tratamento. Missas eram celebradas e fogueiras com plantas aromáticas acesas para afastar o mau agouro das moléstias que assolavam as vilas. Nas casas e nas ruas, faziam defumações com plantas, e, dentre as ervas queimadas, destacam-se o cedro, a artemísia, a losna e o alecrim. Um método comum para combater as enfermidades foi a *doutrina dos sinais*, aprendida com os indígenas, que consistia em reconhecer pelo formato e pela cor das plantas quais doenças poderiam ser tratadas por determinados vegetais: plantas cujas folhas tivessem forma de coração, por exemplo, estariam indicadas para as doenças cardíacas; as plantas amarelas serviam para o fígado; as vermelhas, para as disfunções sanguíneas e assim sucessivamente. Nesse método de cura, estabelecia-se a analogia entre as características físicas do vegetal e o órgão ou parte do corpo humano que, alterado em suas funções, deveria receber o tratamento (Santos, 2009).

Os indígenas brasileiros conheciam quase todos os produtos vegetais: leites, gomas, resinas, sumos e extratos. Da província do Pará, a mais rica de todas em plantas comestíveis, especiarias e ervas medicinais, vêm alguns exemplos: leite de curupitã (*Sapium aucuparium*), para dores de peito e hérnias; infusão de folhas de ipadu (*Erythroxylum cataractarum*), para dores no estômago; raiz de marupá-mirim (*Simarouba amara* Aubl.), contra diarreia; marapuana

(*Ptychopetalum olacoides*), remédio tônico, fortificante e afrodisíaco; andorinha (*Euphorbia hirta*), em banhos, para os casos de hemorroidas; raiz de jatobá (*Hymenaea courbaril*) ou de marupá (*Simarouba amara*) como remédio catártico; pacova-catinga ou babosa-de-pau (*Philodendron martianum*), nos ataques de sangue; o leite de amapá (*Parabancornia fasciculata*) para dores articulares; contra as dores reumáticas, a folha de caroba (*Jacaranda puberula*) ou de camará (*Lantana camara*); a polpa do avencão (*Adiantum capillus-veneris*) como remédio peitoral; a folha da aninga (*Montrichardia linifera*), usada sobre feridas; cinza de galhos de jaramacaru (*Cereus jamacaru*) para dissipar as cataratas dos olhos; leite de mururé (*Brosimum acutifolium* Huber), para tratar os males venéreos; caapitiú (*Siparuna guianensis* e *S. mollicoma*), casca anti-febril; leite de maçaranduba (*Manilkara huberi*) para o peito; leite de anani (*Symphonia globulifera*), para as fraturas; leite de pepino-do-mato (*Ambelania acida*), para dores nervosas; leite de siringa (*Syringa* sp.), para luxações; leite de sacuuba (*Himatanthus articulatus*), para inchação; leite de jasmim-do-mato (*Rudgea blanchetiana*), para obstruções; leite de ucuuba (*Virola surinamensis*), para as feridas da boca; raiz de patauí (*Oenocarpus bataua*), para dissolver as congestões hepáticas (Abreu, 2007).

A constante busca da magia, a crença em poderes sobrenaturais, o uso de ervas e raízes e métodos existentes entre as várias partes do mundo uniam as duas tradições que permaneceram juntas durante todo o período colonial. A cachaça e a pólvora subsidiaram algumas receitas terapêuticas dos desbravadores dos sertões e matas brasileiros, pois só dispunham dos poucos elementos que carregavam na bagagem. A cachaça era usada no combate ao veneno de répteis peçonhentos; a aguardente com sal era também usada para mordeduras de cobra; e o caldo de fumo, junto com a unção da pele com bolas de cera, era utilizado contra picadas de mosquitos, pernalongos e borrachudos, abundantes nas regiões. As bebidas fermentadas, como o vinho em Portugal e a aguardente de cana no Brasil, nos séculos XVI, XVII e XVIII, eram usadas como panaceia, um catalisador de ervas e plantas medicinais, conhecidas no Brasil como garrafadas. Fórmulas excêntricas foram criadas sem comprovação sobre sua eficiência e conquistaram grande prestígio pelo julgamento que as pessoas faziam das receitas. Um exemplo é o saca-trapo, composto de pólvora, cachaça, pimenta-da-terra, fumo e suco de limão que, depois de misturados, deveriam ser administrados pelo reto (Miranda, 2017).

A atividade missionária dos jesuítas foi iniciada em Salvador, Bahia, e se estendeu, no século XVI, ainda no Nordeste, para Pernambuco, e no Sudeste, para São Vicente, litoral de São Paulo. Nesse período, destaca-se o trabalho do frei franciscano Vicente do Salvador (1564-1635), baiano que estudou



no colégio dos jesuítas em Salvador e direito e teologia na Universidade de Coimbra. Ele publicou a *História do Brasil*, em que traça um amplo panorama do território, flora e fauna, clima e geografia nativos e seus usos e costumes, que inclui o emprego de plantas como remédios (Lins, 2011). No século XVII, os missionários se expandiram para o Norte até o Maranhão e o Pará, concorrendo com religiosos de outras ordens. Cabe destacar a *História dos Animais e Árvores do Maranhão*, do franciscano Frei Cristóvão de Lisboa (1583-1652), obra escrita entre 1624-1627, e que integrou um projeto mais ambicioso de história natural e moral do Maranhão (Lisboa, 2000). Na primeira metade do século XVIII, os jesuítas haviam se expandido por toda a bacia amazônica até a atual fronteira ocidental do Brasil. Atendendo ao apelo de amor e caridade ao próximo, os jesuítas acabaram não só desempenhando o papel de catequistas, mas incorporando um caráter assistencialista aos cuidados com os enfermos e à manutenção da saúde dos indígenas. Os serviços de saúde da Companhia de Jesus no Brasil constituíam dois ofícios básicos: os que cuidavam e tratavam os doentes e os que manipulavam receitas de remédios e garrafadas com produtos naturais. Os colégios da ordem tinham verdadeiros laboratórios para manipulação de receitas fitoterápicas. No entanto, o franciscano brasileiro José Mariano da Conceição Vellozo, o frei Vellozo (1742-1811), foi considerado o pai da botânica brasileira. Ele escreveu *Florae Fluminensis*, uma obra com 14 volumes, fruto de suas expedições pela Mata Atlântica da capitania do Rio de Janeiro. Ela contém a descrição de 1.639 espécies de plantas com seus nomes indígenas e usos medicinais (Calainho, 2005).

As boticas dos jesuítas, diferentes de outras, eram dependências especiais dos colégios dos jesuítas, anexas às enfermarias. Elas se tornaram referências nas aldeias e vilas em épocas de epidemias ou calamidade pública que afetassem quaisquer integrantes da aldeia: portugueses, colonos, mestiços e indígenas. Fora dos colégios, as boticas só foram autorizadas, como comércio, em 1640. A partir daquele ano, elas se multiplicaram e eram dirigidas por boticários aprovados em Coimbra pelo físico-mor, ou pelo delegado comissário na capital do Brasil, Salvador. Com o passar do tempo, as farmacopeias das boticas dos jesuítas foram ganhando relevância, alcançando grande renome e prestígio, e eram consideradas as melhores de seu tempo, em qualquer parte onde estivessem. A do Colégio do Pará (1760), além de vinte tomos de medicina, continha todo um aparato técnico para a confecção dos medicamentos, como recipientes diversos, estantes com mais de quatrocentos remédios, fornalhas, alambiques, almofarizes, armários, frascos e potes de várias cores e tamanhos, balanças, pesos, tachos de cobre, de barro, bacias, prensas (Teixeira, 2011).

Na Europa dos séculos XVII e XVIII, as *triagas* estavam muito em moda e eram garrafadas feitas de serpentes mortas, que se acreditava, à época, serem muito eficientes no combate às pestilências. Seu preparo acontecia em rituais envoltos na fé e religiosidade, nos quais se misturava a bebida fermentada com o animal peçonhento. Em meados do século XVIII, a botica do Colégio de Jesus da Bahia desenvolveu uma preparação denominada de *Triaga Brasileira*, que foi capaz de se estabelecer entre mais de duzentas fórmulas da “Collecção de Receitas” da *Farmacopeia Brasileira* da época. Diferente da Triaga Europeia, a brasileira era feita apenas com ervas, plantas, raízes e frutos do Brasil e alguns poucos da colônia. No entanto, não foi desprezada ou inferiorizada ao ser comparada por brasileiros e estrangeiros. A *Triaga Brasileira* era um medicamento polivalente que curava várias doenças e é considerada o primeiro fármaco brasileiro. Ela era preparada com 21 raízes, extratos, gomas e substâncias químicas (óleos e sais) e era indicada para o tratamento de mordedura de qualquer espécie de cobra, qualquer dor interna, hemorragia, epilepsia, apoplexia, melancolia, febres malignas, bexigas, sarampo, histerias, doenças da madre. Era de uso adulto e pediátrico, pois servia também para crianças com cólica, febre e verminoses. Entre os 27 produtos vegetais, quase todos eram originários ou cultivados na América portuguesa, menos as raízes de ácoro, de aristoloquia-redonda, de junca e de malvaíscio, vindas de Portugal. Muitos ingredientes, como jaborandi e cipó-de-cobra, eram encontrados no colégio da Bahia (Maia, 2012).

## Naturalistas e Viajantes: estudos das plantas medicinais brasileiras

Com a vinda de Tomé de Sousa ao Brasil (1549) trazendo Manuel de Nóbrega e outros jesuítas como o padre Anchieta (1553), chegou também ao Brasil o primeiro historiador português, Pero de Magalhães Gandavo, que escreveu o *Tratado da Província do Brasil* e o *Tratado da Terra do Brasil*, reunidos em *História da Província Santa Cruz a que vulgarmente chamamos Brasil*, com atenção às plantas da colônia (Gandavo, 1858).

O naturalista mais importante que esteve no Brasil no século XVI foi Gabriel Soares de Sousa, que ficou aqui de 1567 até 1578 e que apresenta, no seu *Tratado Descritivo do Brasil* (pronto em 1587 e publicado em 1825), mais informações sobre plantas medicinais nativas como abacaxi (*Ananas comosus*), canafistula (*Cassia ferruginea*), estramônio (*Datura stramonium*), jenipapo (*Genipa americana*), maracujá (*Passiflora* sp.), pariparoba (*Piper umbellatum* ou *Pothomorphe umbellatum*) e almecega (*Protium* spp.) (Alves & Ming, 2015).

Outros viajantes e naturalistas vieram depois ao Brasil para retratar o país, contudo o início da documentação sistemática da fitoterapia com plantas nativas aconteceu no Recife com a vinda do médico holandês Willem Pies (Guilielmi Pisonis, em latim, ou Piso) sob a administração de Maurício de Nassau. O modo como os indígenas utilizavam a flora para a manutenção da saúde chamou sua atenção, pois além de observar as práticas indígenas de empregar as plantas no tratamento das doenças, submetia tais observações à experiência, testando receitas e vegetais utilizados pelos nativos. Nassau trouxe outros cientistas, artistas e artesãos para Recife, inclusive, o naturalista alemão Georg Marcgrav. Ele e Piso editaram a *Historia Naturalis Brasiliae* em duas partes: *De Medicina Brasiliensis*, com quatro volumes, escritos por Piso, e *Historiae rerum naturalium Brasiliae*, em oito volumes, escritos por Marcgrav. No segundo volume da primeira parte, Piso trata das doenças da colônia, no terceiro aborda venenos e antídotos e no quarto volume, “*De Facultatibus Simplicium*”, um guia médico, descreve uma centena de plantas e suas aplicações medicinais, desde copaíba (*Copaifera* spp.) até janiparandiba (provavelmente *Gustavia brasiliensis*). Com a expulsão dos holandeses, o Brasil voltou a fechar-se para qualquer viajante estrangeiro. O médico português João Ferreyra da Rosa, que foi à Pernambuco tratar de uma epidemia – possivelmente febre amarela – publicou o *Tratado Único da Constituição Pestilencial de Pernambuco* em 1694. Ele descreveu muitas plantas medicinais, a maioria da Europa, pois os médicos portugueses desprezavam as indígenas. No entanto, quando os suprimentos das plantas europeias escassearam, Ferreyra da Rosa passou a usar plantas nativas como copaíba, macela (*Egletes viscosa*), maracujá-mirim (*Passiflora edulis*), aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*), angelicó (*Aristolochia trilobata*), entre outras (Alves, 2010).

Mais de um século depois da saída de Piso do Brasil, o baiano Alexandre Rodrigues Ferreira (1756-1815) destacou-se como renomado naturalista. Ele foi incumbido pelo ministro da Marinha e Negócios Ultramarinos de Portugal e orientado por Domenico Agostino Vandelli, médico e naturalista italiano, a estudar a natureza e os costumes do povo brasileiro por meio de expedições científicas nas capitanias do Grão-Pará, Rio Negro e Cuiabá numa viagem que durou dez anos. Seus relatos e coleções foram entregues ao Museu da Ajuda em Lisboa e estão reunidos no livro *Viagem Filosófica* (Alves, 2013). Vandelli criou e fundou a Academia de Ciências de Lisboa e o Jardim Botânico da Ajuda para dom João VI. Em 1779, ele virou conselheiro do rei e influenciou-o na fundação do Jardim Botânico do Rio de Janeiro em 13 de junho de 1808, na vinda da família real para o Brasil. Vandelli foi influenciado pelos trabalhos do sueco Carl Linnaeus (Lineu), que estabeleceu as bases para classificação das

espécies e pelos pensadores iluministas da Europa. Ele introduziu a ideia de que as expedições não tinham caráter de exploração predatória, mas científicas, contradizendo a mentalidade da época (Silva & Santos, 2011).

Expedições e missões naturalistas da França (1816-1822), lideradas por Auguste de Saint-Hilaire, e austríacas (1817-1822), lideradas pelos alemães Carl Frederich Philipp von Martius, Johann von Spix e Johann Emanuel Pohl e pelo austríaco Johann Christian Mikan, vieram ao país estudar as plantas medicinais e seu poder curativo. Eles publicaram muitas obras, porém as mais significativas são *Viagem ao Brasil*, *Flora Brasílis*, *Sistema de Matéria Médica Vegetal* e *Natureza, Medicina, Doenças e Remédios dos Índios Brasileiros*, de von Martius (von Martius, 1844).

Após a independência, em 1822, a imperatriz Leopoldina, nascida na Áustria, encorajou naturalistas europeus a virem ao Brasil, como o russo Grigori Langsdorff (1822-1826), os ingleses George Gardner (1836-1841), Alfred Russel Wallace (1848-1849) e Henry Walter Bates (1848-1859) e o alemão Theodoro Peckolt (1847-1912). Os cientistas percorreram diversos estados e estudaram mais de quarenta mil plantas, animais e minerais, sendo as obras mais importantes sobre o uso de plantas *Análise da Matéria Médica e História das Plantas Medicinais e Úteis do Brasil*, de Peckolt (Brandão *et al.*, 2009).

## A Fitoterapia nos Séculos XIX e XX

Em 1870, a Casa Granado foi fundada pelo português José Coxito Granado no centro do Rio de Janeiro e, em seus primórdios, a *pharmácia* manipulava produtos com extratos vegetais de plantas brasileiras (todos com bulas e guias médicos), cultivadas no seu sítio em Teresópolis, no Rio de Janeiro. Além desses medicamentos, ele importava produtos europeus e adaptava suas fórmulas para os padrões e as necessidades da população. A qualidade e eficácia desses produtos tornaram a farmácia uma das fornecedoras oficiais da Corte, e dom Pedro II, em 1880, conferiu à Granado o título de Farmácia Oficial da família imperial brasileira (Casa Granado, 2022). Em 1923, Rodolpho Albino Dias da Silva, diretor técnico da Casa Granado, fez um levantamento das plantas medicinais do país e compilou a primeira *Farmacopeia Brasileira* em 1926, oficializada no Brasil em 1929 (Carvalho *et al.*, 2018). Em 1925 ele também fundou a *Revista Brasileira de Medicina e Pharmácia*, editada pela Casa Granado (Alves, 2005).

O médico mineiro José Ribeiro Monteiro da Silva (1863-1956) afirmava que as plantas medicinais eram uma forma de medicina alternativa

acessível à maioria da população humilde do país. Por isso, em 1912, ele criou e fundou a empresa Laboratório da Flora Medicinal no centro do Rio de Janeiro, um marco na indústria dos fitoterápicos no Brasil. Durante esse período, o comércio de plantas medicinais brasileiras foi expandido em cem vezes (Moisés, 2002). Os primeiros produtos registrados pela Flora Medicinal foram a Agoniada (depois consagrada como Haguniada, registrada em 1918), Carpasina (1923), Piper (1923), Rheumoflora (1924), Myristica (depois Asthmoflora, 1924), chá Porana (1923), chá Romano (1926), chá Paulista (1923), Kókolos (1923), Desmodium (1926), Verbena (1923), Eczoflora (1237), Suma Rosa (1918), Seiva Jatobá (1918), Abóbora D’Anta (1923), Passiflora (1924), Lungaciba (1926) e Mikania (1928). Parte da matéria-prima utilizada no laboratório vinha de suas fazendas em Mimoso do Sul, no Espírito Santo, que também fornecia plantas *in natura* para outros laboratórios, farmácias e boticas. Durante as décadas de 30 e 40, a Flora Medicinal foi um dos maiores laboratórios farmacêuticos do Brasil, com representantes em vários estados do país e em outros países, como Portugal e Argentina. Além disso, enviava regularmente remessas de fitoterápicos e plantas para os Estados Unidos, China, Paraguai, Holanda e Inglaterra. O laboratório não se limitava à produção de fitoterápicos. Em 1934, foi lançada a *Revista da Flora Medicinal*. Contudo, em 1936, após o falecimento de José Ribeiro, a empresa entrou em gradual declínio. Em 1999, a Natura Cosméticos S.A. adquiriu o laboratório da Flora Medicinal, e, no fim do ano 2000, foram relançados cerca de cinquenta produtos tradicionais da Flora Medicinal, e desde então empresa tem crescido (Alves, 2010; Alves & Ming, 2015).

## História da *Farmacopeia Brasileira*

A *Farmacopeia Brasileira*, intitulada muitas vezes de “Farmacopeia Verde”, foi oficializada em 1922. Nela constam cerca de 183 espécies de plantas medicinais brasileiras, com as descrições macro e microscópicas das drogas, uma vanguarda quando comparada a outras farmacopeias da mesma época. Marcos anteriores, como o *Formulário ou Guia Médico* (1841) e o *Dicionário de Medicina Popular e das Ciências Acessórias*, do doutor Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, já apresentavam a descrição das doenças, sintomas e tratamento, as receitas, as plantas medicinais, as alimentícias, as águas minerais do Brasil, Portugal e de outros países. Rodolpho Albino Dias da Silva, químico do Laboratório Nacional de Análises e professor de farmácia no Rio de Janeiro, mencionado anteriormente, trabalhou por mais de dez anos no projeto do

Código Farmacêutico Brasileiro e concluiu-o em 1924. Apresentou seu projeto da *Farmacopeia Brasileira* ao doutor Carlos Chagas, diretor-geral do Departamento Nacional de Saúde Pública (Silva, 1926; Matta, 2003).

Na obra, lançada em 1926, aparecem 39 espécies de plantas medicinais. No entanto, somente sete dessas espécies de plantas medicinais constam da atual Relação Nacional de Plantas Medicinais (ReniSUS), quatro, do Formulário Nacional e oito, da sexta edição da *Farmacopeia Brasileira*, atualmente em vigor (Brasil, 2019). Na segunda edição da *Farmacopeia Brasileira*, em 1959, ocorreu a exclusão de diversas plantas medicinais, atribuída à “nulidade de ação terapêutica de muitas drogas e medicamentos e ao desuso de algumas plantas”. Além disso, o ano 1959 foi o auge do desenvolvimento da indústria de medicamentos sintéticos e dos antibióticos. A decisão da exclusão de espécies vai na contramão dos dois países com um tamanho territorial e uma riqueza florística comparáveis aos do Brasil: China e Índia. O governo chinês anunciou, em 2016, a integração da medicina tradicional chinesa ao sistema oficial e, na Índia, o ayurveda é reconhecido oficialmente, sendo ensinado em curso superior específico (Alves, 2005).

## Considerações Finais

A história das plantas medicinais no Brasil começa junto com as primeiras civilizações, que procuravam na natureza a cura para seus males, e com a colonização, que propiciou o início do intercâmbio entre espécies nativas e europeias. Dessa forma, com os cruzamentos e distribuição das espécies pelo território, observamos hoje as diferentes indicações terapêuticas para uma mesma planta, que é conhecida por diversos nomes populares. Ao mesmo tempo que isso pode levar aos insucessos terapêuticos, conta um pouco da nossa história como nação em constante desenvolvimento étnico e regional. Os inúmeros desencontros seculares entre sinónimas e supostas ações terapêuticas incentivaram pesquisas em diversas áreas do conhecimento, inicialmente por cientistas estrangeiros e, gradativamente, por grupos brasileiros. A biodiversidade vegetal dos biomas brasileiros é uma das maiores do mundo, contudo ela é extensivamente explorada por diversos setores da atividade econômica e considerada recurso renovável e eternamente sustentável, premissa que não é verdadeira. Com a extinção de uma espécie, parte da sua história morre de forma irrecuperável. Nesse sentido, uma nação que entende e protege seus recursos naturais mostra-se não apenas ecologicamente responsável, mas consciente de todo o potencial de que a natureza dispõe para tornar nossa existência no planeta possível.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. L. N. A Colônia enferma e a saúde dos povos: a medicina das 'luzes' e as informações sobre as enfermidades da América portuguesa. *História, Ciências, Saúde – Manuais*, v: 761-778, 2007.
- ALVES, L. F. Laboratório Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras. *Revista Fitos*, 1 (2), 2005.
- ALVES, L. F. *Plantas Medicinais e Fitoquímica no Brasil: Uma Visão Histórica*, 2010. Tese Doutorado, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- ALVES, L. F. & MING, L.C. Chemistry and pharmacology of some plants mentioned in the letter of Pero Vaz de Caminha. *Ethnobiology and Conservation*, 4:3: 1-15, 2015.
- BRANDÃO, M. G. L. *et al.* Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 19(2A): 478-497, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopéia Brasileira*. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/6\\_edicao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/6_edicao.pdf)>. Acesso em: 1 maio 2022.
- CALAINHO, D. B. Jesuítas e medicina no Brasil colonial. *Tempo*, 19: 61-75, 2005.
- CASA GRANADO. Granado Farmácias, a botica mais tradicional do Brasil. Disponível em: <[www.granado.com.br/nossa-historia](http://www.granado.com.br/nossa-historia)>. Acesso em: 1 maio 2022.
- FILGUEIRAS, T. S. & PEIXOTO, A. L. Flora e vegetação do Brasil na carta de Caminha. *Acta Botânica Brasilica*, 16: 263-272, 2002.
- GANDAVO, P. M. *História da Província Santa Cruz a que Vulgarmente Chamamos Brasil*. Lisboa: Typographia da Academia Real das Ciencias, 1858.
- GURGEL, C. *Doenças e Curas: o Brasil nos primeiros séculos*. São Paulo: Contexto, 2010.
- LINS, G. G. S. Á. Frei Vicente do Salvador, O. F. M.: um breve ensaio biobibliográfico e historiográfico. *Revista do Instituto Histórico e Geográfico Brasileiro*, 172: 147-173, 2011.
- LISBOA, F. C. *História dos Animais e Árvores do Maranhão*. Lisboa: Comissão Nacional para a Comemoração dos Descobrimentos Portugueses, 2000.
- MAIA, P. A. *Práticas Terapêuticas Jesuítas no Império Colonial Português: medicamentos e boticas no século XVIII*, 2012. Tese de Doutorado, São Paulo: Universidade de São Paulo.
- MATTA, A. *Flora Médica Brasiliense*. 3. ed. Manaus: Valer, 2003.
- MIRANDA, C. A. C. *A Arte de Cura nos Tempos da Colônia: limites e espaços da cura*. 3. ed. Recife: Editora UFPE, 2017.
- MOISÉS, C. F. *Flora Medicinal: uma história singular*. São Paulo: Natura, 2002.
- SANTOS, F. S. *As Plantas Brasileiras, os Jesuítas e os Indígenas do Brasil: história e ciência na Trianga Brasília (séc.XVII-XVIII)*. São Paulo: Casa do Novo Autor, 2009.
- SANTOS, F. S. Indígenas, jesuítas e a farmacopeia verde das terras brasileiras: os segredos da trianga brasileira. *Prometeica*, 8: 5-22, 2013.



SILVA, P. R. L. & SANTOS, C. F. M. Traduzindo o mundo natural dos domínios portugueses: Vandelli e as expedições filosóficas do século XVIII. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE HISTÓRIA – ANPUH, XXVI, 2011, São Paulo.

SILVA, R. A. D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Cia. Editora Nacional, 1926.

TEIXEIRA, A. S. *A Farmacopeia Jesuítica na América Portuguesa entre os Séculos XVII e XVIII*, 2011. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Instituto de Filosofia e Ciências Sociais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

VON MARTIUS, C. F. P. *Natureza, Doenças, Medicina e Remédios dos Índios Brasileiros (1844)*. Trad.: Pirajá da Silva. Rio de Janeiro: Companhia Editora Nacional, 1939.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R. & LEITMAN, P. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66: 1.085-1.113, 2015.





## 2

# Cultivo e Beneficiamento de Plantas Medicinais para a Produção de Insumos Ativos Vegetais

*Valério Francisco Morelli Amaral, Jeferson Adriano e Silva Assunção, Danilo Ribeiro de Oliveira, Nina Cláudia Barboza da Silva, Ygor Jessé Ramos, Ulisses Carvalho de Souza, Luiz Gustavo Carneiro-Martins, Anna Carina Antunes e Defaveri e João Carlos da Silva*

A necessidade de ter alimentação disponível durante todo o ano levou nossos ancestrais a aprenderem a gestão contínua dos recursos naturais e resultou no que hoje podemos chamar de cultivo para obtenção dos derivados vegetais (Fuller *et al.*, 2010). A seleção intencional das melhores espécies é denominada de domesticação de plantas, que é um processo coevolutivo por meio do qual os fenótipos são selecionados pela intervenção humana, resultando em mudanças nos genótipos das populações e tornando-as mais úteis ao homem e mais bem adaptadas à intervenção na paisagem. As diversas formas de cultivar plantas medicinais aconteceram paralelamente à história das civilizações e relacionam-se com os ciclos econômicos e as grandes revoluções agrárias.

A recente necessidade da regulação da produção de drogas vegetais levou ao desenvolvimento de novas tecnologias e normativas, que certificam as espécies vegetais e seus produtos. Dessa forma, neste capítulo apresentamos noções de cultivo de plantas medicinais, abordando as etapas do estabelecimento do cultivo, alguns métodos usados para a produção de plantas medicinais e um estudo de caso do modelo de produção de plantas medicinais da Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (PAF) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

## Cultivo de Plantas Medicinais

O cultivo é a primeira etapa do controle de qualidade do processo de produção de um fitoterápico, na qual os cuidados com aspectos genéticos, botânicos, de qualidade do solo, agrotecnológicos e sanitários serão determinantes no resultado do produto final.

### Obtenção e propagação do material vegetal

A primeira etapa da implantação de um cultivo de plantas medicinais é adquirir matéria-prima por meio de instituições que atuem no ramo das plantas medicinais, que podem ceder matrizes com identificação botânica, perfil genético, análise de compostos químicos e/ou estudos agronômicos já estabelecidos e validados cientificamente. Nessa etapa, devemos considerar as particularidades de cada espécie e da logística de organização do local onde será implantado o cultivo para selecionar as práticas e espécies mais adequadas.

A etapa seguinte é a propagação do material vegetal. A propagação sexuada ocorre a partir de sementes e necessita de floração, polinização e frutificação. Em alguns casos é necessário o beneficiamento dos frutos para que as sementes possam ser obtidas. Antes de armazenar as sementes, é preciso conhecer a tolerância ao dessecamento, para saber se é possível estocá-las, como e por quanto tempo. Nesse sentido, as sementes são classificadas em: ortodoxas, que mantêm sua viabilidade germinativa mesmo após armazenadas por um determinado período, tolerando bem o efeito da secagem, como a *Calendula officinalis* L.; e recalcitrantes, que não toleram desidratação e armazenamento por longos períodos, perdendo sua viabilidade com o tempo, como a *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek). Nessa situação as sementes devem ser semeadas para a preservação da espécie. A propagação assexuada, vegetativa ou clonal, por sua vez, é a multiplicação feita a partir de porções vegetativas das plantas escolhidas com base na sua capacidade de regeneração. Como consequência há pouca ou nenhuma variabilidade genética, e as características agronômicas da planta-mãe são mantidas nas mudas. Outros benefícios da propagação assexuada são a redução do período improdutivo, a uniformidade da produção e a possibilidade de multiplicar espécies independentemente de seu período ou capacidade de florir e frutificar. Como fator negativo, esse

tipo de propagação causa a diminuição da diversidade genética das espécies, uma vez que não há cruzamento das recombinações responsáveis pelo surgimento da variabilidade (Brasil, 2006a).

Os principais métodos de propagação assexuada são: divisão de touceiras e estolões, estaquia, alporquia, mergulhia, enxertia e micropropagação. As touceiras são brotações unidas à planta-mãe, enquanto os estolões são apêndices vegetativos emitidos pela planta-mãe com o objetivo de regenerar uma planta. Ambas as estruturas praticamente constituem uma nova planta e precisam recuperar-se do dano causado pelo processo de isolamento durante sua propagação. A estaquia usa diferentes segmentos vegetais (ramos, caules, rizomas e bulbos, raízes ou folhas), que são isolados da planta-mãe e estimulados a formar raízes e parte aérea, regenerando uma nova planta. A alporquia e a mergulhia baseiam-se no estímulo ao enraizamento seguinte à regeneração de parte aérea de um segmento da planta-mãe para produção de mudas. A diferença entre a alporquia e a mergulhia é que, na última, o ramo selecionado é parcialmente enterrado para promover o enraizamento, enquanto na alporquia o enraizamento ocorre após a cobertura parcial do ramo selecionado com solo ou substrato. Após o enraizamento a muda é separada da planta-mãe, logo a taxa de sobrevivência é mais elevada e, em contrapartida, a taxa de multiplicação é inferior à da estaquia. A enxertia ocorre a partir da união entre segmentos de duas plantas diferentes, formando uma nova planta que tem características de ambas as espécies: faz-se um corte no caule da planta para fornecer o sistema radicular, eliminando sua parte aérea – formando o cavalo ou porta-enxerto; na sequência, um segmento da planta selecionada para fornecer a parte aérea (cavaleiro ou enxerto) é conectado ao caule do porta-enxerto. Com o tempo, ocorre a união entre os tecidos e forma-se uma nova planta. Esse segmento selecionado para ser o enxerto poderá ser uma estaca ou uma gema: no caso de estaca, esta deve ser preparada para conectar-se perfeitamente ao porta-enxerto; sendo uma gema, a remoção da parte aérea do porta-enxerto poderá ser feita após a união com os tecidos do enxerto, e a enxertia será referida como borbulhia. Cada método descrito tem vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas antes de começar o cultivo das espécies medicinais (Quadro 1). Os métodos de propagação mais adequados estão descritos na literatura e facilita a escolha (Brasil, 2006b).

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens dos principais métodos de propagação de plantas medicinais

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Semeadura ou semeio	Único método em que há variabilidade genética; fácil armazenamento e transporte.	Características diferentes da planta-mãe; possibilidade de dormência; algumas sementes não toleram armazenamento; longo período improdutivo.
Divisão de touceiras, brotações ou estolões	Não há variabilidade genética; fácil separação de touceiras, rizomas e bulbos; maior taxa de sobrevivência das mudas.	Suscetíveis às mesmas doenças da planta-mãe; mudas de diferentes idades, não padronizadas.
Estaquia	Pouca variabilidade genética; propagação de plantas que não florescem e/ou frutificam; fácil execução; alta taxa de multiplicação; baixo custo; produção precoce.	Suscetíveis às mesmas doenças da planta-mãe; necessidade de construção de matrizeiro; dificuldade de armazenamento e transporte.
Alporquia	Não há variabilidade genética; maior taxa de sobrevivência das mudas.	Suscetíveis às mesmas doenças da planta-mãe; construção de matrizeiro; mão de obra especializada; baixa taxa de multiplicação.
Mergulhia	Não há variabilidade genética; possibilidade de propagar espécies que não sejam viáveis no método de estaquia; maior taxa de sobrevivência das mudas.	Suscetíveis às mesmas doenças da planta-mãe; construção de matrizeiro; mão de obra especializada; baixa taxa de multiplicação.
Micropropagação	Pouca variabilidade genética; elevada multiplicação; uniformização do desenvolvimento das mudas; produção precoce.	Possibilidade de surgimento de plantas anormais; alto custo de implantação e insumos; necessidade de mão de obra altamente especializada; necessidade de estabelecer o protocolo de produção de cada espécie.
Enxertia	Pouca variabilidade genética; opção de propagação para plantas que não florescem e/ou frutificam; resistência pelo porta-enxerto; produção precoce.	Suscetíveis às mesmas doenças da planta-mãe; necessita de mão de obra especializada; risco de rejeição em algumas espécies.

## Tratos culturais relacionados ao cultivo de plantas medicinais

Tratos culturais compreendem as diversas práticas referentes ao cultivo de plantas, tendo em vista que cada espécie necessita de diferentes técnicas de manejo do cultivo, solo, irrigação e controle fitossanitário, desde o plantio até a colheita. Para ter êxito e eficiência na produção e colheita, é importante observar e fazer o manejo diário do cultivo seguindo técnicas adequadas e considerando que cada localidade tem práticas próprias de sua história cultural que devem ser respeitadas, valorizadas e consideradas. Na agricultura ecológica, a transmissão de conhecimento sobre o cultivo de plantas medicinais ocorre em um ambiente familiar. Considerando as particularidades culturais do Brasil, vindas da grande diversidade de bioma e da sociobiodiversidade, são apresentadas a seguir as principais práticas para o cultivo de plantas medicinais (Ceolin *et al.*, 2011).

### *Manejo do solo*

O solo é formado pela degradação da rocha a partir da pedogênese, e a constituição do solo está relacionada com sua origem. No cultivo, o solo ou o substrato fornecerão macro e micronutrientes de que a planta precisa para se desenvolver. Logo, é importante conhecer a estrutura física e a composição deles, pois sua constituição promove mudanças no fornecimento de nutrientes, alterando o metabolismo da planta, uma vez que o solo fornece a água e o suporte físico para que o vegetal se sustente e se desenvolva em busca de luz. A análise laboratorial do solo possibilita que sejam feitas as devidas correções e adubação de acordo com as necessidades específicas das espécies cultivadas. O insumo mais usado para a correção do pH do solo é o calcário (de conchas ou dolomítico), enquanto a adubação pode ser feita de composto orgânico, vermicomposto (húmus de minhoca) ou esterco curtido. Eles disponibilizam nutrientes e condicionam o solo, melhorando suas qualidades físicas, químicas e biológicas (Galvão *et al.*, 2019).

### *Irrigação*

A escolha do tipo de irrigação de um determinado cultivo depende do estágio de desenvolvimento e da necessidade da espécie escolhida, características físicas do solo, topografia do local do cultivo, clima, disponibilidade e qualidade da água e até da quantidade de luminosidade do local do cultivo, sem esquecer que a irrigação pode lixiviar os nutrientes disponíveis do solo. Como regra geral, as plantas mais jovens e as recém-germinadas ou transplantadas dependem de um solo umidificado, sem água estagnada. Outra



preocupação associada à escolha do sistema de irrigação do cultivo é a eficiência de uso do recurso hídrico. Lima (2016) afirma que existem dois tipos de irrigação que, além de terem baixo custo, geram economia de água e energia: o gotejamento e a microaspersão. Na irrigação por gotejamento, a água cai pontualmente no solo por meio de gotas; na irrigação por microaspersão, a água é pressurizada por orifícios, resultando na fragmentação em gotículas lançadas ao ar atmosférico. A irrigação por aspersão, diferentemente da microaspersão, lança gotas mais grosseiras semelhantes à chuva. A aspersão pode ser dividida em sistemas fixos, semifixos ou portáteis de acordo com a mobilidade das linhas principais e laterais pela cultura. Os sistemas fixos mantêm imóveis tanto as linhas principais quanto as laterais. Nos sistemas semifixos, enteram-se as linhas principais, fixando-as e deixando as linhas laterais livres para que seja possível movê-las pela cultura. Os sistemas portáteis têm mobilidade nas linhas principais e laterais (Lima, 2016).

A escolha dos sistemas de irrigação deve considerar o porte da planta, seu hábito, o estágio de desenvolvimento (plântulas, indivíduos jovens, mudas maduras) e a etapa de cultivo (multiplicação de mudas, produção de biomassa etc.). Para plantas de noni (*Morinda citrifolia* L.) com idade de 75 dias observou-se que o sistema de irrigação por microaspersão proporcionou maior desenvolvimento vegetativo do que o sistema de irrigação por gotejamento, por exemplo. Também é importante definir o melhor regime hídrico adequado à cada espécie medicinal ou aquele que atenda às diferentes espécies cultivadas de modo consorciado (Vasconcelos *et al.*, 2014).

### *Controle fitossanitário*

As alterações na composição fitoquímica das plantas podem impactar no seu desenvolvimento. Os agrotóxicos alteram vias metabólicas responsáveis pela produção de seus metabólitos. Portanto, é proibido o uso dos agrotóxicos como prevenção ou combate de pragas e doenças no cultivo de plantas medicinais (WHO, 2003; Corrêa-Júnior, 2013). Existem técnicas alternativas que minimizam ou anulam a incidência de pragas e doenças, como evitar o plantio em monocultura, preferir o plantio consorciado de plantas repelentes ou utilizar extratos vegetais como os produzidos por: anis (*Pimpinella anisum* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.), catinga-de-mulata (*Tanacetum vulgare* L.), alho (*Allium sativum* L.), arruda (*Ruta graveolens* L.), poejo (*Mentha pulegium* L.), alecrim (*Salvia rosmarinus* S.), Sálvia (*Salvia officinalis* S.). Em plantio consorciado, é importante planejar quais espécies serão plantadas para que não haja competição por nutrientes ou até mesmo a alelopatia (inibição da germinação e/ou crescimento de outro vegetal). Vale ressaltar que o aglomeramento

de espécies pode atrair pragas e doenças, por isso é crucial ter as informações de espaçamento de cada espécie a ser cultivada (Rockenbach *et al.*, 2018).

### *Manejo do cultivo*

No cultivo de plantas medicinais deve-se utilizar as melhores e mais adequadas técnicas, com menor impacto ambiental, preservando o solo, a água, e prevenir ataques de pragas e doenças, mantendo o equilíbrio ecológico, que são conjuntamente denominadas de boas práticas agrícolas (BPA). Num esforço de estimular a implementação de cultivos sustentáveis ambiental, social e economicamente, diversas instituições publicaram documentos com os princípios e diretrizes para as BPA na produção de plantas medicinais, entre eles: *Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares*, publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (Brasil, 2019); publicação homônima editada pelo Instituto Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater); *Cultivo, Uso e Manipulação de Plantas Medicinais e Orientações Técnicas para o Cultivo de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares*, ambas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Rodrigues, 2004); *Cultivo de Plantas Medicinais: guia prático*, publicado pelo Governo do Estado do Rio de Janeiro (Azevedo & Moura, 2010); e *Manual de Cultivo de Plantas Medicinais*, publicado pela Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro (2011). Dentre as BPA, destacam-se técnicas de rotação de culturas, cobertura vegetal, plantio em curvas de nível, plantio consorciado e adubação.

Ao fim de um cultivo, é necessário sempre fazer a rotação de culturas, que é definida como uma variação planejada de diferentes culturas na mesma área sem repetir as espécies vegetais em um intervalo de tempo inferior a um ano. Essa prática oferece benefícios para as plantas e solo, como aumento do teor de matéria orgânica, melhoria e manutenção da fertilidade do solo, estruturação e descompactação do solo e diminuição da incidência de pragas e doenças. O controle de plantas espontâneas é feito manualmente com ferramentas de capina, como sachos, enxadas, enxadões, vassouras de aço e ancinhos. A redução do crescimento das espécies espontâneas pode ser feita com o uso de cobertura verde ou cobertura morta (folhas, apra de grama e/ou galhos triturados secos), que mantém a umidade do solo, evita muita radiação solar direta, minimiza o impacto das chuvas e adiciona mais matéria orgânica ao ambiente pela sua decomposição (Rodrigues, 2004).

A poda de manutenção é vital no cultivo de algumas plantas medicinais; para as espécies perenes ela é tão importante quanto o controle das plantas espontâneas, uma vez que ajuda no arejamento do vegetal e permite a formação

de novos brotos. Por sua vez, para as de ciclo curto, a poda equivale à colheita para processamento da matéria-prima vegetal (Carvalho, 2015).

## Tipos de Cultivo

Os principais aspectos do cultivo de plantas medicinais são representados neste capítulo pelo cultivo orgânico e hidropônico e pelo cultivo *indoor* e *in vitro*, respectivamente. O cultivo em ambiente aberto designa cultivos realizados em locais nos quais as plantas ficam expostas às condições naturais, principalmente luminosidade e temperatura. Por sua vez, o cultivo em ambiente fechado permite o controle de fatores externos, como intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura e disponibilidade de nutrientes.

### Cultivo em ambiente aberto

O cultivo em ambiente aberto nas nossas condições tropicais representa um menor custo de produção devido aos nossos atributos ambientais, mas, ao mesmo tempo, maiores riscos de contaminação de natureza física, química e microbiológica.

#### *Cultivo orgânico*

A produção orgânica é aquela que favorece o equilíbrio entre o solo, as condições climáticas e a planta, empregando tecnologias alternativas que aproveitam as potencialidades da natureza, dispensando o uso de fertilizantes ou agrotóxicos e considerando a qualidade de vida. Para isso, o cultivo orgânico congrega técnicas de rotação de culturas, plantio consorciado (especialmente para as duas espécies companheiras, cuja proximidade beneficia ambas); reaproveitamento de rejeitos; utilização de espécies espontâneas e pragas no diagnóstico das condições edáficas e de deficiências nutricionais, respectivamente; e o uso de técnicas mecânicas, extratos de origem vegetal, plantas repelentes e agentes biológicos como práticas de manutenção da sanidade vegetal. Preconiza ainda o uso de diferentes fontes de nutrientes como a adubação verde, promovida por espécies que elevam o teor de nutrientes do solo e melhoram suas condições físicas, e o uso de biofertilizante, composto e vermicomposto produzidos a partir de subprodutos agrícolas (espécies vegetais e esterco). As mesmas considerações dos tratamentos culturais também são válidas e aplicáveis à produção orgânica de plantas medicinais.

De acordo com a lei n. 10.831, de 23 de dezembro de 2003,

considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente.

A afinidade de conceitos da produção orgânica com outras formas de produção, em concordância com a lei mencionada, não apresenta total aderência. O conceito de sistema orgânico engloba o sistema ecológico, biodinâmico, natural, regenerativo, biológico, agroecológico, permacultura e os demais que adotem técnicas de manejo similares. Atualmente um produto orgânico é proveniente de sistema de produção que segue as diretrizes estabelecidas pelas normas da produção orgânica. No cultivo orgânico é vedado o uso de: organismos geneticamente modificados, agrotóxicos sintéticos no tratamento e armazenamento de sementes e mudas; irradiações ionizantes; e insumos com propriedades mutagênicas ou carcinogênicas. Produtores dispostos a migrar do sistema convencional de produção – que permite a utilização de fertilizantes sintéticos e herbicidas – para o sistema orgânico devem respeitar um período de conversão de 12 a 18 meses de manejo orgânico na produção de culturas anuais ou pastagens perenes, respectivamente (Mapa, 2019).

Com o intuito de veicular, amplamente e em linguagem acessível ao produtor, a informação técnica, cientificamente validada e conforme à legislação brasileira de produção orgânica, o Mapa disponibiliza arquivos intitulados “fichas agroecológicas” nas temáticas: fertilidade do solo e nutrição de plantas; sanidade vegetal; práticas conservacionistas; e produção vegetal. Nessas fichas constam informações sobre quais insumos podem ser usados e a forma correta de fazê-lo. Além disso, o Mapa compilou os decretos, instruções normativas e portarias que regem a produção de orgânicos no país.

Os sistemas orgânicos contribuem para a produção de plantas medicinais, pois preconizam o emprego sustentável dos recursos naturais e socioeconômicos. Isso está em sintonia com políticas públicas brasileiras sobre o uso estratégico de plantas medicinais na Atenção Básica à Saúde e justifica

a indicação dessa forma de cultivo no provimento de plantas medicinais aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (Mapa, 2019).

Nessa abordagem, o Brasil segue a tendência internacional de recomendar a produção de plantas medicinais por meio de sistemas orgânicos pois o estímulo ou determinação desse sistema de produção consta em publicações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Agência Europeia de Medicamentos (AEM). Recomendação semelhante é encontrada nas diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e nos manuais e guias que compilam BPA na produção de plantas medicinais (Brasil, 2009).

Por meio do cultivo orgânico é possível obter uma maximização na produção de biomassa e de metabólitos de interesse, tornando-o muito interessante do ponto de vista produtivo, econômico, ambiental e social. A adubação feita com composto orgânico aumentou a produção de metabólitos do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC., espécie medicinal popularmente conhecida como alecrim-do-campo (Santos *et al.*, 2012). O composto foi produzido a partir de resíduos de matéria orgânica vegetal e animal depositados em uma pilha com aproximadamente 5 m<sup>3</sup>. Após noventa dias de compostagem, foi feita análise química, na qual se avaliou o teor de matéria orgânica, nutrientes e pH. Resultados semelhantes obtiveram Santos e colaboradores (2009), que observaram que o uso de esterco bovino aumentou tanto o desenvolvimento quanto o rendimento de óleo essencial de erva-cidreira verdadeira (*Melissa officinalis* L.). Lemos e colaboradores (2013) compararam altura, perfilhamento, teor e rendimento de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. cultivado em sistemas orgânico e convencional e obtiveram melhores resultados em cultivo orgânico.

A viabilidade econômica do cultivo orgânico da *Aloe vera* (L.) Burm.f. (babosa) para o produtor rural, principalmente para a agricultura familiar, foi investigada por Bach e Lopes (2007). Eles avaliaram o custo de produção de 1 ha de babosa desde a obtenção das mudas até o produto final, um suco. Na área foram plantadas 20 mil mudas enfileiradas, com espaçamento de 0,6 m x 0,6 m e 1,3 m entre as fileiras, arranjo por meio do qual se previu produzir anualmente 300 mil folhas (o que equivale a cerca de 90.000 kg) e 30.000 L de suco. Considerando os cálculos do custo de produção, a atividade foi economicamente viável, com lucro de cerca de 20% em um ano (Bach & Lopes, 2007).

Litskas e colaboradores (2019) compararam o desenvolvimento de quatro espécies medicinais e aromáticas cultivadas de forma convencional e orgânica em cinquenta áreas produtivas no Chipre. As espécies estudadas foram alecrim

(*Salvia rosmarinus* Schleid.), hortelã (*Mentha spicata* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e rosa damascena (*Rosa x damascena* Mill.), e a comparação foi feita em termos de balanço energético, pegada de carbono e de água entre 2014-2017. O cultivo orgânico foi globalmente mais eficiente.

Apesar dos benefícios da produção de plantas medicinais em sistema orgânico, podem ser atribuídas desvantagens, como menor escala de produção em comparação com o cultivo convencional, maior necessidade de mão de obra e maiores custos do processo de certificação. Contudo, a principal desvantagem desse sistema é a necessidade de estudos para estabelecer os protocolos específicos para cada tipo de cultivo, sem deixar de considerar as particularidades sociais e ambientais de clima, solo, disponibilidade e qualidade da água para irrigação da localidade onde ele será implementado, e a diversificação de fontes de matéria orgânica para a produção dos adubos, para que possa ser economicamente mais vantajosa para o produtor.

#### *Cultivo agroecológico*

O êxito na produção agrícola de plantas medicinais é avaliado pela otimização da biomassa produzida por unidade de área e pela biossíntese e concentração de substâncias que apresentam atividade biológica, os princípios ativos. Portanto, para assegurar a qualidade de uma planta medicinal, é necessário que a produtividade e o porte e a exuberância dos seus órgãos sejam avaliadas juntamente com a produção de seus princípios ativos. Entretanto, a caracterização química geralmente não é viável rotineiramente para o produtor rural, pois representa um grande impacto no custo total da produção. Assim, a produção deve ser feita a partir de protocolos que garantam maior produtividade de biomassa e o acúmulo das substâncias de interesse terapêutico.

Nesse cenário, a agroecologia representa a possibilidade da geração de um conjunto de ações e métodos de viabilidade técnica e financeira na produção agrícola de plantas medicinais para qualquer produtor. Ao levar em consideração os inúmeros fatores ambientais e antrópicos que influenciam o metabolismo secundário das plantas e a síntese de substâncias ativas de interesse farmacêutico, a produção agrícola de uma planta medicinal pode ter muitos fatores que interferem no seu perfil químico. A agroecologia é o estudo interativo trans e interdisciplinar do agroecossistema baseado no conhecimento científico e tradicional. Esse sistema ecológico, de estrutura dinâmica complexa, pode ser modificado pelo homem com o propósito de otimizar uma produção agrícola construída por meio de processos socioeconômicos e ecológicos. Tais características da agroecologia estão totalmente em sintonia com a produção de plantas medicinais, considerando as elevadas diversidades ambiental e biológica

dos diferentes biomas do Brasil, sendo fundamental para o desenvolvimento de um processo participativo de transição do agroecossistema. Pratica-se uma agricultura de base ecológica, que reduz os impactos e desequilíbrios (ambiental e antrópico) gerados pelo cultivo de espécies medicinais. Além disso, um modelo agroecológico bem dimensionado e ajustado garante a qualidade química e biológica do material vegetal para a produção de fitoterápicos.

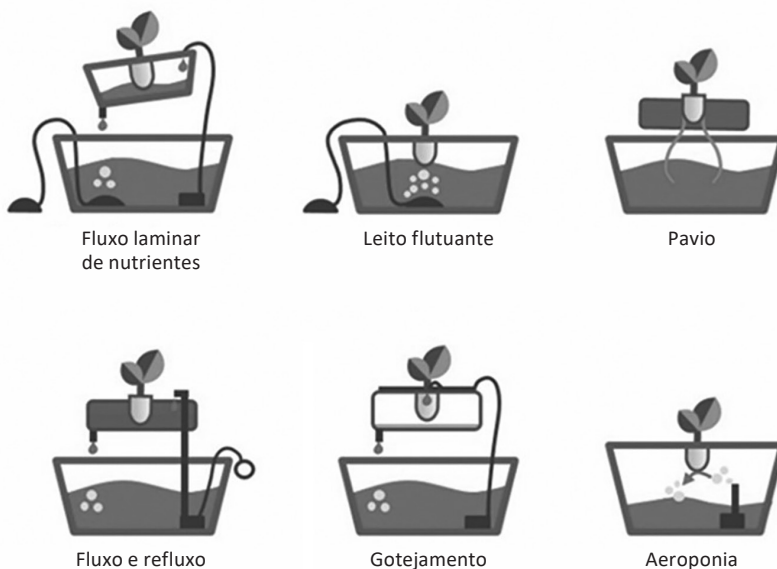
Entre os aspectos positivos da agroecologia no cultivo de plantas medicinais está levar em conta todos os níveis de diversidade: espécies medicinais com potencial terapêutico e com elevada diversidade genética (cultivadas pela agricultura tradicional e/ou familiar) podem apresentar características químicas mais direcionadas para a produção de fitoterápicos do que uma espécie que já tenha passado por algum processo de seleção genética. A diversidade de substâncias pode ser maior em espécies que ainda não foram cultivadas intensivamente. Logo, a abordagem agroecológica é a mais adequada para o aumento de escala da produção, pois todo o processo de desenvolvimento e validação do cultivo será realizado nos ecossistemas em que ela ocorre naturalmente e irá garantir a máxima expressão do potencial terapêutico da espécie medicinal e, possivelmente, um custo de produção inferior ao da agricultura industrial praticada na atualidade.

#### *Cultivo hidropônico*

O termo hidroponia tem origem no grego, *hydro* = água e *pónos* = trabalho, e é uma técnica agrícola de cultivo na qual a planta é cultivada numa solução com os nutrientes essenciais para o crescimento. Ela foi usada pela primeira vez no Neolítico por habitantes da Mesopotâmia, os sumérios. Em 1929, o pesquisador William Frederick Gericke, da Universidade da Califórnia, desenvolveu um sistema sem uso de solo para cultivos de plantas alimentares. No Brasil, o cultivo hidropônico foi introduzido por Shigeru Ueda e Takanori Sekine na década de 1980 (Douglas, 2001).

O cultivo hidropônico pode ser implementado por duas formas de sistema: aberto ou dinâmico, que tem circulação da solução nutritiva; e fechado ou estático, no qual não há circulação. Na Figura 1, ilustramos o funcionamento dos sistemas de hidroponia mais utilizados.

Figura 1 – Esquema representando os principais sistemas de produção de plantas através do cultivo hidropônico



Fonte: adaptado do portfólio da empresa No Soil Solutions.

A hidroponia oferece vantagens, como o crescimento mais rápido em relação ao cultivo em solo, menor influência dos fatores abióticos, produção fora do período de safra e rápido retorno econômico. Contudo, existem algumas limitações, como o custo inicial elevado, possibilidade de balanço inadequado da solução nutritiva, acarretando, assim, baixo desenvolvimento das plantas, custo elevado da manutenção dos equipamentos e necessidade de fornecimento de luz artificial e energia para o sistema.

O cultivo hidropônico de espécies medicinais e aromáticas constitui um novo emprego dessa tecnologia, que proporciona aumento de qualidade e rendimento extrativo de metabólitos secundários. Ela tem grande vantagem em comparação ao cultivo em solo, em razão da variabilidade anual que este ocasiona, pois proporciona maior controle de biomassa alcançada, produção em escala comercial e facilidade de produção de drogas vegetais na qual a parte de interesse são as raízes. Diversas espécies medicinais têm protocolos bem conhecidos de produção por hidroponia como: equinácea – *Echinacea purpurea* (L.) Moench.; manjerição – *Ocimum basilicum* L.; babosa – *A. vera* (L.) Burm.f.; artemisia – *Artemisia vulgaris* L.; e valeriana – *Valeriana officinalis* L.



## Cultivo em ambiente fechado

O cultivo em ambiente fechado contribui para um maior controle das variáveis ambientais, mas gera um incremento significativo no custo operacional de produção das plantas medicinais.

### Cultivo *indoor*

O cultivo em ambientes fechados surgiu das experimentações propostas pelo botânico Liberty Hyde Bailey em 1893. Ele usou lâmpadas de vapor metálico e sódio para investigar os efeitos da luminosidade sobre a fase de desenvolvimento vegetativo. Na década de 1920, W.W. Garner e H. A. Allard, pesquisando sobre o cultivo de tabaco, descobriram a relação entre florescimento e fotoperíodo e tempo e intensidade luminosa para o desenvolvimento vegetativo. O cultivo *indoor* de *Cannabis* veio da necessidade de obter um cultivo de forma ilegal. Diante das pesquisas e legislações vigentes, o cultivo em escala industrial (larga escala) ganhou em segurança, maior controle sobre o processamento e rendimento, maior eficiência no controle de pragas e doenças, tornando até trinta vezes mais produtivo do que o cultivo *outdoor*.

### Cultivo *in vitro*

O cultivo de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas em que uma parte vegetal isolada (explante) é cultivada de maneira asséptica em um meio com composição definida e mantida sob condições controladas de luz e temperatura. Esses explantes desenvolvem-se em frascos de vidro, contendo nutrientes para o seu desenvolvimento, originando o termo *in vitro*. Entre as diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, a propagação *in vitro*, ou micropropagação, é a mais usada e a que mais tem contribuído para a produção de mudas com qualidade superior, selecionadas de matrizes com características importantes, tais como elevada concentração de substâncias bioativas.

As definições de micropropagação são muitas. Rout e colaboradores (2001: 222) definiu como “o isolamento e cultivo de meristemas organizados, tais como ápices caulinares e radiculares e gemas laterais, para estimular o desenvolvimento completo de uma planta”. Para Torres, Caldas e Buso (1998: 14), é “a propagação vegetativa *in vitro* de explantes vegetais”. Eles diferenciam a micropropagação de três maneiras, de acordo com a fonte do explante e sua forma de manipulação: por meio de gemas axilares; por indução de gemas adventícias; e via embriogênese somática.

Atualmente várias técnicas de cultura *in vitro* têm sido aplicadas para obtenção de compostos com atividade biológica, por meio da propagação das plantas medicinais, ou para obtenção de linhagens celulares que produzem bioativos. Tais alternativas têm como objetivo melhorar a qualidade da matéria-prima vegetal e promover o uso sustentável das plantas medicinais, facilitando a produção em escala industrial de fitoterápicos. A micropropagação comercial de plantas medicinais, com venda ou distribuição de mudas e matrizes oriundas da cultura *in vitro*, encontra-se limitada a poucas espécies como: ruibarbo – *Rheum rhabarbarum* L.; *Cimicifuga* spp.; *Aloe* spp.; gengibre – *Zenziber officinale*; e estêvia – *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, que é a espécie medicinal mais encontrada no portfólio de biofábricas pelo mundo.

## Estudos de Casos

A metodologia de produção de plantas medicinais pode variar conforme o objetivo do produto final. A seguir é apresentado um estudo de caso da PAF, no qual se descrevem as etapas da cadeia de produção da matéria-prima vegetal que garantem a qualidade do insumo vegetal.

A produção de plantas medicinais a partir da visão agroecológica: o modelo da PAF

A otimização da produção de plantas medicinais é um processo participativo de construção do conhecimento, em que as informações são agregadas à experiência dos produtores para conduzir o processo de pesquisa e desenvolvimento de protocolos de cultivo. Além disso, é necessário ter uma visão geral de todo o agroecossistema, conhecendo as variáveis bióticas e abióticas para prevenir-se das perturbações naturais ou antrópicas e promover a manutenção do equilíbrio ecológico. Nesse sentido, a agroecologia vai além do aumento da produtividade ou maximização da produção por unidade de área. Ela permite um estudo profundo de construção de sistemas sustentáveis, considerando os pontos de vista energético e financeiro, para que o produto gerado tenha um diferencial de qualidade química ou biológica. Quando a produção das plantas medicinais objetiva fornecer matéria-prima vegetal para a produção de fitoterápicos, o controle da qualidade, a segurança no uso de insumos e o registro de todas as informações do processo

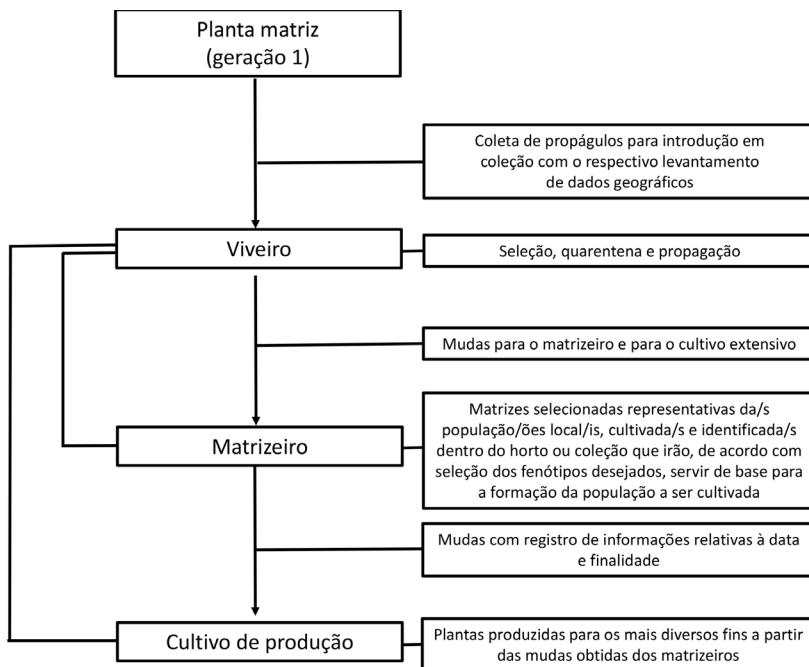
são fundamentais para a qualificação da matriz e a confiabilidade dos fitoterápicos produzidos.

A PAF, um setor do Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde (CIBS) do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz, adotou um modelo agroecológico comprometido com o desenvolvimento de protocolos de cultivo na cadeia produtiva ancorada nos biomas brasileiros. As espécies em seus ecossistemas têm metabolismo moldado aos estresses ambientais locais que, em teoria, representa maior potencial de expressão de sua metabolômica.

O desenvolvimento por biomas leva em consideração as características particulares de cada um deles. Na prática, isso representa que, ao planejar as ações de cultivo de uma espécie medicinal do Cerrado, por exemplo, deve-se identificar em qual dos ecossistemas (cerradão, campo limpo, campo sujo e outros) a espécie está mais adaptada e, após uma análise do ambiente, definir o melhor modelo de produção. O modelo de produção da PAF (Figura 2) é considerado modelo de coleção viva para a produção em grande escala, tem fases distintas e garante a guarda e o acesso a todas as informações que são registradas desde a planta de origem até o lote processado e manipulado.

Esse esquema de produção facilita a rastreabilidade de todo o processo de padronização da matéria-prima. Essa capacidade é desejada tanto para pesquisa e desenvolvimento (P&D) quanto para a produção da matéria-prima vegetal para fins terapêuticos. Num processo de P&D de um produto inovador, o esquema permite identificar a espécie, a população de plantas e as características ambientais que conferem o perfil fitoquímico para fins farmacêuticos. Na fase de produção extensiva, possibilita iniciar o processo de cultivo em outras localidades, garantindo a padronização do material genético, o que evita as variações químicas indesejáveis.

Figura 2 – Modelo de produção de plantas medicinais da PAF



Com exceção da planta matriz (geração 1), que pode estar localizada em uma área preservada e protegida, todo o restante do processo de produção de plantas medicinais deve, obrigatoriamente, ser desenvolvido numa mesma área. O viveiro, o matrizeiro e a área de produção devem estar localizados numa mesma unidade produtiva. Esse arranjo reduz custos de transportes e facilita o cálculo de estimativas de produtividade. Na Figura 2, as matrizes da propagação da matriz (geração 1) podem ser cultivadas em canteiros, adotando o mesmo espaçamento e manejo aplicados posteriormente na produção extensiva. Assim, é possível estimar com precisão a produtividade e/ou resposta às intempéries e danos causados por insetos ou micro-organismos. Essa unidade de produção, composta de viveiro, matrizeiro e área de produção extensiva numa mesma zona, facilita o controle da qualidade da matéria-prima vegetal e garante a autonomia do produtor agrícola em relação à obtenção de material propagativo. Para isso, requer treinamento e capacitação individual para as diferentes tarefas, tendo em vista a otimização do processo de produção em cada fase do cultivo de plantas medicinais, que leva, como resultado, ao aumento da qualidade do material produzido e à redução no custo de produção.

## Variabilidade e sazonalidade de produtos naturais: sincronização com o manejo produtivo

A influência dos fatores ambientais na biossíntese de substâncias ativas do metabolismo secundário está caracterizada para as mais diversas classes químicas. As variações sazonais que levam a alterações na produção destes metabólitos devem ser conhecidas pelo produtor para haver a possibilidade de sincronização com a colheita. A sincronização permite que, no momento que é colhida, a espécie medicinal tenha acumulado a maior concentração das substâncias de interesse terapêutico. Investigações de um longo período permitem promover alterações no manejo que resultem na otimização da produção da biomassa e dos princípios ativos de interesse.

Muitas espécies são estimuladas a florescer a partir da redução diária de horas de luz. Algumas, por exemplo, podem apresentar abscisão das suas folhas na época que antecede a floração. Nesse caso específico, a espécie pode apresentar a maior produtividade das substâncias terapêuticas, mas apresentar perdas significativas de biomassa pela queda das folhas, que exigem um manejo específico para a condução de cada espécie. Assim, seria necessário fazer podas para retardar o florescimento nos meses com dias mais curtos, o que permitiria a colheita mesmo sem florescimento e sem perda de rendimento foliar.

As espécies tradicionalmente conhecidas como medicinais apresentam uma elevada diversidade ecológica, origens geográficas, portes, estratégias de crescimento/desenvolvimento, e, portanto, a busca de um manejo que consiga otimizar a produção de biomassa e o acúmulo de substâncias bioativas deve ser específica para cada espécie ou grupo de espécies.

## Matrizeiro e viveiro

O matrizeiro é a área da coleção ou horto de espécies medicinais onde plantas selecionadas são cultivadas para fornecer propágulos que produzam mudas em área de viveiro. A seleção e o manejo das plantas matrizes promovem a padronização das mudas, com o objetivo de garantir a baixa variação das características biométricas e fitoquímicas das espécies medicinais nos sucessivos cultivos subsequentes.

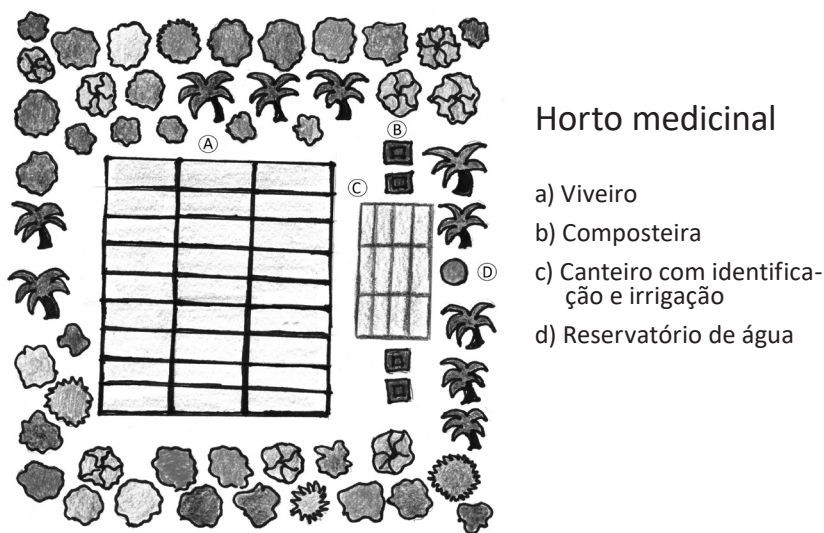
Na seleção das plantas matrizes, avaliam-se espécimes para a escolha daqueles que reúnam as características morfológicas e fitoquímicas mais desejáveis para a produção da matéria-prima de um fitoterápico. Elas irão compor uma coleção de plantas medicinais ou horto, e são avaliadas entre indivíduos

de diferentes populações para obter plantas com os melhores resultados na produção de biomassa e concentração da substância de interesse. Uma vez selecionadas as matrizes de geração 1 e as subsequentes, o trabalho de propagação deve ser feito num viveiro de mudas para isolar, por quarentena, o crescimento das mudas num ambiente de microclima adequado e a produção padronizada de mudas que atenda à demanda da unidade.

### Organização do matrizeiro

A unidade de produção de plantas medicinais é composta de matrizeiro associado a um viveiro (Figura 3) e uma área de produção extensiva. Toda espécie selecionada para iniciar a formação de grupo de plantas matrizes deve ter a geolocalização registrada (coordenadas geográficas) da planta ou plantas que constituirão a geração 1, assim como devem ser conhecidas todas as informações relativas à posição topográfica, solo, microclima, formação vegetal a que pertence e as suas características biométricas (altura, peso médio do órgão de interesse, produtividade estimada por indivíduo etc.). Após a identificação dos fenótipos mais adequados para a produção de um fitoterápico de qualidade, o próximo passo é a seleção do número de indivíduos para compor o banco de matrizes da espécie.

Figura 3 – Desenho esquemático da área de propagação de plantas medicinais



Desenho Raquel Elisa da Silva López.

Cada espécie terá um número variável de matrizes que será dependente da capacidade produtiva de propágulos e do seu porte. As espécies que têm alto rendimento na produção de sementes ou propágulos vegetativos e porte arbustivo a arbóreo necessitam de menor número matrizes quando comparados àquelas que têm baixo rendimento e são herbáceas de pequeno porte.

A propagação das espécies medicinais, desde a geração 1 das matrizes até as mudas que entrarão no sistema produtivo, deve ser realizada preferencialmente de forma vegetativa para aumentar as chances de transferência e homogeneização do material genético. O método de propagação vegetativo a ser adotado pode ser o de estaquia, borbulhia, mergulhia, alporquia e divisão de touceiras.

O arranjo das espécies selecionadas nos canteiros deve obedecer a um gradiente crescente de porte ou tamanho, onde as espécies de menor porte ficam nos canteiros na posição leste do horto; as espécies de porte médio ou arbustivo, na posição intermediária; e as de maior porte ou arbóreo devem ficar nos canteiros na posição oeste do matrizeiro. O matrizeiro associado a um viveiro de mudas permite que todas as atividades ligadas à propagação das plantas matrizes possam ser desenvolvidas num mesmo espaço físico, contribuindo para a agilidade da produção e a redução de custo operacional.

A organização da área de propagação deve apresentar canteiros de 3 m a 6 m de comprimento por 1 m a 2 m de largura e 30 cm de altura do solo e quebra dos torrões até 30 cm de profundidade abaixo do nível do solo. O solo deverá estar protegido, de forma permanente, com cobertura morta e, no limite com a rua principal do matrizeiro, deverá ser fixada uma placa na qual estará informado o nome científico completo, família botânica e nome vulgar da espécie.

A organização da área de propagação deverá contar com sistema de irrigação por microaspersão (para espécies com mais de dez matrizes) e gotejamento (para espécies com até dez matrizes), incluindo filtros de linha, sistema de pressurização (elétrico, mecânico como carneiro hidráulico ou por gravidade), linhas de distribuição e emissores.

O matrizeiro deve dispor de áreas de produção de compostagem para atender a demanda de adubação recomendada para cada canteiro/ano com materiais triturados (até 3 cm de diâmetro), cuja mistura tenha a relação carbono/nitrogênio igual a 30 (C/N=30) e reservatório de água que permita a distribuição por gravidade para os canteiros. A instalação de caixa d'água deve ter elevação mínima de 5 m em relação à área a ser irrigada para gerar um gradiente de altitude.

### *Organização do viveiro*

O viveiro de mudas é o ambiente onde todo o processo de propagação é realizado, ou seja, é um ambiente de reprodução do material genético e crescimento inicial das mudas. O viveiro de produção de plantas medicinais deve ser organizado para permitir a propagação de espécies botânicas que tenham diferentes exigências ecológicas, com diferentes portes, tamanhos e arquiteturas. Sua estrutura física tem que impedir a entrada e o contato com qualquer agente fitopatogênico, por isso deve ter uma base de alvenaria, uma estrutura metálica de sustentação da tela de sombreamento e uma tela de sombrite que reduza a luminosidade interna em 50%, única entrada/saída, e em frente a ela deve ser instalado um pedilúvio com o objetivo de desinfetar o solado dos calçados de quem entrar no viveiro.

A produção de mudas de todas as espécies medicinais requer que o viveiro tenha bancadas para as diferentes embalagens de produção de mudas. Dependendo do porte e da duração do ciclo das espécies medicinais escolhidas, o viveiro ainda deve contar com bancadas adequadas para a colocação de qualquer embalagem para crescimento das mudas. Dessa forma, ele deve dispor de espaço para colocação de bandejas com tubetes e bancadas para sacos e um sistema de irrigação, preferencialmente, por nebulização, pois oferece às mudas menor risco de dano físico causado pelo impacto da água.

### *Cultivo*

O local escolhido para o cultivo das plantas medicinais deve ter as condições edáficas e de microclima adequadas para seu crescimento e desenvolvimento. Nesse sentido, o levantamento das características ambientais no momento da coleta da planta matriz geração 1, na introdução da espécie no matrizeiro, é fundamental para a escolha do local onde o cultivo será realizado. Ele deve ter topografia apropriada para execução das práticas agrícolas, pontos de captação de água e cercamento para evitar entrada de animais domésticos e selvagens.

### *Manejo do solo*

A estratégia para a melhoria e manutenção das características físicas, químicas e biológicas do solo para uso agrícola sem comprometimento da produção e/ou geração de impactos negativos para o ambiente é apoiada em práticas como: uso de cobertura morta sobre solo cultivado ou em pousio pelo uso de material triturado e seco proveniente de podas ou coletas realizadas; uso de composto agrícola nas covas ou linhas de plantio; adubação verde com o plantio e incorporação no



solo de leguminosas como feijão-de-porco – *Canavalia ensiformis* (L.) DC. – ou crotalaria (*Crotalaria spectabilis* Roth); e adubação com fosfato natural de rocha nas linhas ou covas de plantio.

#### *Desenho do agroecossistema*

O arranjo espacial das mudas no campo ou o desenho do agroecossistema deve ser planejado antes do plantio para permitir a interação das espécies, garantir a qualidade da matéria-prima vegetal e obter um sistema de produção equilibrado e resiliente. No planejamento de um agroecossistema de plantas medicinais para fornecer ao mercado consumidor, é comum que o produtor agrícola opte por policultivos. Estes diluem a magnitude dos impactos financeiros provocados por riscos de quebra de produtividade e garantem um número maior de fontes de receitas ao longo de todo o ano. O policultivo requer uma análise inicial quanto ao provável resultado da interação das espécies selecionadas no ambiente de cultivo. O comportamento da espécie cultivada de forma isolada pode ser diferente do da cultivada com outras espécies, independentemente da frequência ou forma de consórcio.

De uma forma geral, os resultados esperados num sistema de policultivos de plantas medicinais dependem das características intrínsecas de cada espécie cultivada e dos microambientes formados a partir da arquitetura e ciclo de crescimento de cada espécie. Portanto, os critérios de escolha para a localização, arranjo e a densidade de plantio de cada espécie dentro do agroecossistema dependem, basicamente, de três fatores: exigências ecológicas e comportamento relacionado ao seu grupo ecológico; efeitos alelopáticos; e quantidade de material seco a ser produzida. Com tais informações, o arranjo das espécies no campo será feito de modo a colocar mais próximas as espécies que irão produzir efeitos benéficos no crescimento de outras. Plantas de crescimento rápido e arquitetura que promova sombreamento proporcional ao diâmetro de sua parte aérea serão cultivadas próximas a espécies medicinais que tenham exigência em baixa a média luminosidade, por exemplo.

Na fase de planejamento do arranjo espacial do agroecossistema, a confecção de um croqui de localização das espécies e as informações quanto aos seus portes e as exigências ecológicas de cada uma facilita o planejamento de policultivos. Num croqui é possível reconhecer o mosaico de espécies que constituirá o agroecossistema. Esse mosaico, pensado e planejado, facilita o trabalho de plantio das mudas no campo e permite a discussão dos possíveis efeitos da interação de espécies diferentes.

O cultivo deve obedecer a um zoneamento determinado pelo porte, duração do ciclo de vida da espécie (anual, bianual, semiperene ou perene).

A posição das espécies deve estar em consonância com suas exigências ecológicas para que o arranjo permita que plantas exigentes de luz plena não tenham ao seu lado espécies que promovem um sombreamento que limite o seu crescimento. A área de cultivo deve ser subdividida por faixas de vegetação arbórea nativa com espécies que tenham arquitetura de copa para servir de barreira física a ventos e que, também, sejam atrativas para as aves da fauna, permitindo a instalação de ninhos. Idealmente, a espécie deve apresentar frutos vermelhos, uma vez que os pássaros são atraídos por essa cor. A atração de aves por esses cordões de vegetação arbórea nativa instalados no interior da área de cultivo podem colaborar significativamente para o controle natural de insetos com potencial de provocar danos às espécies medicinais.

#### *Densidade de plantio*

O número de plantas por área ou densidade de plantio adotada pelo produtor rural será determinante para o equilíbrio ecológico do agroecossistema e para a viabilidade financeira do cultivo. A adoção de um número elevado de plantas por área resulta na formação de um microclima distinto no interior da área de cultivo, facilitando, dessa forma, o surgimento de alguns microrganismos fitopatogênicos. Todavia, se for adotado um número baixo de plantas por unidade de área, a produtividade sofrerá uma redução que pode não compensar financeiramente o cultivo da espécie.

A escolha pelos espaçamentos entre plantas na linha e entre linhas de plantio deverá ser adotada de acordo com dados na literatura ou ensaios com números significativos de mudas, variando os valores de espaçamento dentro da linha e entre as linhas de plantio. Esses ensaios podem ser realizados em uma área próxima à área de cultivo extensivo usando um número variável de espaçamentos. Nesses ensaios são avaliados a produtividade de biomassa por ano, o número máximo de cortes ou coletas e a resposta de produção de biomassa por meio desses cortes ou coletas. A caracterização fitoquímica desse material reflete a influência do manejo na produção das substâncias de interesse.

#### *Manejo de insetos e micro-organismos fitopatogênicos*

Mesmo com a estratégia preventiva de aumento de diversidade no ecossistema, no momento que a densidade de uma espécie aumenta, é possível que exista algum inseto ou micro-organismo cuja dieta ou ciclo de vida esteja intimamente ligado à planta. Na interação entre esses organismos e a planta, deve-se avaliar se ela está sendo negativa para as plantas e quantificar o percentual de dano. Se houver dano, medidas de controle que sejam eficazes, seletivas

e de baixo impacto para o ambiente devem ser adotadas para prevenção ou correção. As medidas preventivas são tomadas antes do reconhecimento do dano e podem ser a proteção física ao solo, as faixas de refúgio de vida silvestre entre as áreas de cultivo, a estratificação e diversidade de espécies dentro da área de cultivo, redução da densidade de plantio recomendada pela literatura e o uso de fertilizantes naturais de baixa solubilidade, entre outras. Por sua vez, as medidas corretivas de controle devem ser adotadas a partir da correta identificação do agente causador do dano (inseto ou micro-organismo).

A partir da identificação do agente causal, o controle químico é adotado como primeira opção através de uso de extratos ou caldas produzidas com espécies botânicas com comprovada ação de controle. Nessa categoria temos espécies já consagradas na literatura como o neem (*Azadirachta indica*), alho (*A. sativum* L.), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), cravo-de-defunto (*Tagetes minuta*), camomila (*Matricaria recutita*), arruda (*R. graveolens* L.), araticum (*Annona coriacea*) e manjerição (*O. basilicum* L.), que são pulverizadas sobre as espécies ou colocadas em armadilhas atrativas distribuídas na área de cultivo.

#### *Manejo da água de irrigação*

O objetivo da produção de plantas medicinais é obter a maior produtividade de biomassa e de substâncias bioativas com os menores impactos ambientais, e o uso da água por sistemas de irrigação é uma estratégia que deve ser considerada. O seu uso deve ser racional e ter resultado positivo na produção de biomassa/substâncias bioativas, logo é necessário que o dimensionamento do sistema leve em consideração as exigências hídricas de cada espécie e permita a variação da quantidade de água conforme o local de aplicação. Um sistema com essas características permite uma rotação de espécies de ciclo curto sem comprometimento da funcionalidade do sistema de irrigação.

Os sistemas de irrigação devem ser, de preferência, o de aplicação localizada. O gotejamento ou microaspersão são os mais eficientes para disponibilizar a quantidade a água exigida pela espécie, principalmente quando associados à proteção do solo por meio de cobertura morta. A aplicação da quantidade ideal de água sem variações garante o funcionamento do metabolismo e a otimização da produção. Independentemente da fonte de abastecimento do sistema de irrigação, é importante analisar as características físico-químicas e microbiológicas da água para monitorar os riscos de contaminação do material cultivado.

## Colheita

O melhor momento de colheita é quando o maior índice de produtividade de biomassa coincidir com o maior acúmulo da/s substância/s de interesse. O tempo e época são determinados após ensaios que quantificam o comportamento biológico e químico da planta e ele é diferente para cada espécie, além de poder variar dentro da própria espécie de acordo com a região do país em que está sendo realizado o cultivo.

Devido à grande diversidade de plantas no agroecossistema com relação a portes, épocas de colheita e órgãos coletados, a colheita manual é a mais indicada, apesar do custo. Ela exige treinamento do pessoal para que haja a melhor seleção e classificação do material colhido. A seleção, ainda no campo, evita que o material fora do padrão de qualidade da espécie seja encaminhado ao seu beneficiamento.

Fatores como tempo, pessoal capacitado e época do ano definidos são fundamentais para a colheita. Os envolvidos na colheita devem: realizá-la sempre nas primeiras horas da manhã para evitar que a temperatura mais elevada ao longo do dia promova perdas ou deterioração da biomassa ou das substâncias bioativas; fazer uso de luvas para a realização do serviço, impedindo, assim, a contaminação pelo manuseio; iniciar o processo de seleção ainda no campo, evitando a colheita de materiais estranhos e órgãos fora do padrão de qualidade da espécie; confirmar a colheita com o mínimo de 24 h após a última chuva, evitando envio de material excessivamente úmido para a secagem; e promover o rápido transporte do material colhido para os setores de pós-colheita ou beneficiamento, evitando, dessa forma, a degradação do material.

A qualidade das plantas medicinais é determinada pela concentração ideal das substâncias ativas responsáveis pelas atividades farmacológicas e pela ausência de contaminantes orgânicos e inorgânicos. Sua otimização é alcançada quando todas as etapas do processo de produção, desde a obtenção de material propagativo de qualidade, colheita correta (órgão, idade, período) até as etapas de pós-colheita, como seleção e limpeza, secagem, embalagem e armazenamento, são realizadas com o cuidado e a segurança recomendados. Entre as causas de má qualidade da matéria-prima destacam-se a contaminação biológica (fungos, bactérias) e a física (solo, material estranho), associadas à falta de práticas agrícolas seguras, transporte e embalagens inadequadas. Além desses problemas, os teores variáveis do princípio ativo confundem-se com a falsificação por meio da mistura com outros órgãos das plantas e mesmo com outras espécies. Imediatamente após a colheita, o material é encaminhado para o tratamento primário, para garantir suas características químicas e

farmacológicas, contudo pode ocorrer alguma degradação enzimática, levando a alguma perda dos princípios ativos. Antes da secagem, deve-se evitar lavar as plantas e não deixar sob a incidência direta de luz solar e realizar a seleção e a limpeza, visando eliminar possíveis impurezas como terra, pedras, outras plantas etc. As plantas colhidas inteiras devem ter suas partes (folhas, flores, caules, raízes, sementes e frutos) secas em separado e conservadas posteriormente em recipientes individuais.

### Preparo ou tratamento das drogas vegetais

As etapas do processamento primário (secagem e moagem) são fundamentais para a qualidade da droga vegetal. O material seco e moído de forma correta contribui para a qualidade do insumo vegetal.

#### *Secagem*

A secagem é o tratamento mais comum, e seus objetivos são: eliminar água do órgão vegetal, diminuir o volume da droga e impedir reações de hidrólise. A conservação pós-colheita por secagem justifica-se pelo fato de que os micro-organismos, as enzimas e todo o mecanismo metabólico necessitam de água para suas atividades. Com a redução da água, a velocidade das reações químicas e o crescimento de micro-organismos também diminuirão. A *Farmacopeia Brasileira* preconiza valores mínimos e máximos aceitáveis de umidade para os órgãos vegetais. Contudo, ativos vegetais de natureza proteica e polipeptídica são obtidos de plantas frescas.

A grande vantagem da secagem, quando comparada com outros métodos de preservação, tais como refrigeração, irradiação e tratamentos químicos, é seu baixo custo e simplicidade da operação. A secagem de plantas medicinais é realizada de forma natural ou artificial. A natural pode ser realizada à sombra ou sob a luz solar; porém para as plantas medicinais aromáticas, a secagem ao sol causará a fotodecomposição, o que aumenta a velocidade de degradação das substâncias ativas e alterações de odor, cor e sabor. A secagem com ar aquecido e baixa umidade relativa é a mais utilizada. O aquecimento do ar pode ser realizado em secadores ou estufas. O tempo de secagem nesses equipamentos é de poucas horas e dá origem a um material de melhor qualidade, sendo recomendado para cultivos em grande escala. Os limites de temperatura do ar de secagem são determinados em função da sensibilidade dos princípios ativos nas plantas e das estruturas armazenadoras. Os modelos de secadores mais usados são os de bandejas, de túnel e com fita transportadora.

A velocidade e a temperatura do ar exercem influência na quantidade e na qualidade dos princípios ativos das plantas medicinais, aromáticas e condimentares. A temperatura de secagem influi na remoção da água, que pode carrear substâncias voláteis, os óleos essenciais (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides). Assim, espera-se que uma faixa de temperatura de secagem propicie menores perdas de óleo essencial, por exemplo, no processo de secagem de plantas medicinais que apresentem substâncias aromáticas. Em vários estudos foi demonstrado que temperaturas entre 45 °C e 60 °C são as mais adequadas para a maioria das plantas medicinais. A definição da temperatura adequada depende da volatilidade ou da temperatura crítica de evaporação das moléculas presentes.

#### *Estabilização e conservação*

A manutenção das características químicas dos princípios ativos por inativação das enzimas presentes, fazendo com que o vegetal tenha praticamente a mesma composição química de quando estava vivo, é uma etapa fundamental. Um dos processos da estabilização é o uso de autoclave com temperatura entre 60 °C e 110 °C e pressão controladas, seguido por vapores de etanol e radiação  $\beta$  ou ultravioleta. As plantas podem ser submetidas ou não a altas temperaturas no vácuo antes de serem processadas.

A estocagem da droga vegetal deverá ser em embalagens a vácuo, em lugares isentos de umidade, luz direta e com temperatura controlada (5 °C a 15 °C). Não se deve colocar espécies diferentes no mesmo local para não ocorrer contaminação cruzada.

## Considerações Finais

O cultivo e o beneficiamento de plantas medicinais devem garantir que o processo de produção da matéria-prima e da droga vegetal esteja alinhado com a eficácia, a segurança e a qualidade dos produtos farmacêuticos derivados de espécies vegetais medicinais e baseiam-se em ações que permitam a rastreabilidade do processo. Para isso é fundamental padronizar, por meio de procedimentos operacionais padrão, todas as fases, desde a propagação das mudas até a moagem e o armazenamento do material vegetal.

A produção de espécies vegetais com elevada diversidade de arquitetura, ciclos de vida, exigências nutricionais e climáticas e substâncias bioativas pertencentes a diferentes rotas metabólicas já pode ser considerada naturalmente uma grande variedade de fontes de variação a serem identificadas e trabalhadas.

Portanto, independentemente do modelo adotado pelo produtor ou gestor responsável, deve-se ter em mente que a produção e beneficiamento de plantas medicinais são determinantes para a qualidade do fitoterápico. E, para isso, a interdisciplinaridade e o fluxo matricial de discussões, análises e decisões devem ser constantes do processo.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, C. D. & MOURA, M. A. *Cultivo de Plantas Medicinais: guia prático*. Niterói: Programa Rio Rural, Governo do Estado do Rio de Janeiro, 2010.
- BACH, D. B. & LOPES, M. A. Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (*Aloe vera* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, 31(4): 1.136-1.144, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares*. Brasília: Mapa, 2006a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006c.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2018*. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Orgânicos. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos)>. Acesso em: 24 jul. 2019.
- CARVALHO, L. M. *Circular Técnica 70: orientações técnicas para o cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares*. Aracaju: Emprapa Tabuleiros Costeiros, 2015.
- CEOLIN, T. *et al.* Medicinal plants: knowledge transmission in families of ecological farmers in souther Rio Grande do Sul. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 45(1): 47-54, 2011.
- DOUGLAS, J. S. *Hidroponia: cultura sem terra*. Barueri: NBL, 2001.
- EMBRAPA SOJA. *Tecnologias de Produção de Soja - Paraná - 2001/2002*. Londrina: Embrapa Londrina, 2001.
- FULLER, D. Q.; ALLABY, R. G. & STEVENS, C. Domestication as innovation: the entanglement of techniques, technology and chance in the domestication of cereal crops. *World Archaeology*, 42, 2010.
- GALVÃO, J. R. *et al.* Óleo essencial e teores de nutrientes da priproica em resposta à adubação orgânica e à calagem. *Revista Agrogeoambiental*, 11(1), 2019.

- LEMOS, G. V. S. *et al.* Controle de plantas invasoras em cultivo orgânico e convencional de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(3): 405-414, 2013.
- LIMA, L. P. F. *A Física da Irrigação*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2016.
- LITSKAS, V. *et al.* Water-energy-food nexus: a case study on medicinal and aromatic plants. *Journal of Cleaner Production*, 233: 1.334-1.343, 2019.
- RIO DE JANEIRO. Secretaria Municipal de Saúde. *Defesa Civil. Manual de Cultivo de Plantas Mediciniais*. Rio de Janeiro: Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil, 2011.
- ROCKENBACH, A. P. *et al.* Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 17(1): 59-70, 2018.
- RODRIGUES, V. G. S. *Cultivo, Uso e Manipulação de Plantas Mediciniais*. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004.
- ROUT, G. R. *et al.* *In vitro* micropropagation of *Lawsonia inermis* (Lythraceae). *Revista de Biología Tropical*, 49(3-4): 957-963, 2001.
- SANTOS, M. F. *et al.* Esterco bovino e biofertilizante no cultivo de erva-cidreira-verdadeira (*Melissa officinalis* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11(4): 355-359, 2009.
- SANTOS, R. F. *et al.* Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. Em função da adubação orgânica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14: 224-234, 2012.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. & BUSRO, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 2v. Brasília: Embrapa, 1998.
- VASCONCELOS, R. S.; MIRANDA, F. R. & SOUSA, J. A. Desenvolvimento vegetativo do noni (*Morinda citrifolia* L.) sob diferentes sistemas e lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(2), supl. I: 388-397, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants*. Geneva: WHO, 2003.







# 3

## Beneficiamento e Preparo de Extratos Vegetais: variabilidade e sazonalidade de plantas medicinais

*Dulcinéia Furtado Teixeira, Andrea Bezerra da Nobrega,  
Marisa Fernandes Mendes e Mériane Lourdes de Paiva Brandão*

A extração de um material bruto vegetal é a primeira etapa para obter informações sobre a composição química de uma planta. Por meio dela as substâncias são retiradas da matriz vegetal e podem ser determinadas suas estruturas químicas e proporções, sendo crucial para a obtenção quantitativa do insumo farmacêutico ativo vegetal (Ifav) e para o estabelecimento dos protocolos de testes de atividade, de controle da qualidade e da produção industrial. A padronização da extração promove mais segurança na produção, em virtude do grau de previsibilidade que a metodologia utilizada oferece.

Os produtos para a saúde que contêm plantas medicinais como ingrediente ativo são disponibilizados, em sua grande maioria, em duas formas: plantas secas, rasuradas, prontas para o consumo após infusão ou decocção; ou extratos. Estes, por sua vez, estão disponíveis para consumo em estados líquido – consumido diretamente em porções que, segundo a bula, conttenham a quantidade ideal de ativos capazes de promover o efeito farmacológico desejado – ou sólido. Neste estado, eles são apresentados como pó e são comercializados como cápsulas, comprimidos ou drágeas. Há, ainda, aqueles extratos elaborados em suas formas semissólidas e disponibilizados como géis, pomadas ou emulsões e usados topicamente. Neste capítulo,

apresentam-se as formas de obtenção de extratos mais comuns em laboratórios de pesquisa e a produção de derivados vegetais, mostrando suas vantagens, desvantagens e aplicações.

## Considerações Gerais

Além da correta identificação botânica e da ausência de contaminantes, um aspecto que atesta a qualidade das plantas medicinais é a concentração ideal das substâncias ativas, responsáveis pelas atividades farmacológicas. A otimização de sua obtenção é facilitada quando todas as etapas do processo de produção, desde a aquisição de material propagativo de qualidade, a colheita correta (órgão, idade, período) e suas etapas subsequentes, como seleção e limpeza, secagem, embalagem e armazenamento, são realizadas de acordo com protocolos previamente estudados e padronizados. Dentre as causas de má qualidade da matéria-prima vegetal, destacam-se as contaminações biológica (fungos, bactérias) e física (solo, material estranho), associadas à falta de práticas agrícolas seguras, ao processo de secagem incorreto e ao transporte e embalagens inadequados. Além desses problemas, os teores variáveis do/s princípio/s ativo/s confundem-se com a falsificação por meio da mistura com outros órgãos das plantas e mesmo com outras espécies. Imediatamente após a colheita, o material deve ser encaminhado para o tratamento primário, garantindo, assim, a permanência das características químicas e farmacológicas da espécie trabalhada, pois, independentemente do órgão utilizado, haverá um elevado teor de umidade e substratos que concorrem para que a ação de enzimas não seja inibida, o que pode levar à degradação prematura dos princípios ativos. Mesmo que sejam utilizados métodos de alta eficiência, seu sucesso está diretamente relacionado com a qualidade da matéria-prima (Castro-López *et al.*, 2016).

A extração é um processo por meio do qual se obtêm as substâncias de maior interesse a partir dos órgãos da planta e cuja metodologia varia de acordo com a natureza e do teor dos constituintes presentes na matriz vegetal. Dependendo da hidro ou lipoflicidade do solvente, a gama dos constituintes extraídos pode variar consideravelmente. Alguns fatores têm forte influência nessa operação, como as características físicas do vegetal, a parte da droga utilizada, o tamanho da partícula, a afinidade do solvente pelas substâncias de interesse, o grau de secagem da amostra vegetal e o processo extrativo utilizado. A padronização do processo extrativo está diretamente relacionada com a qualidade, eficácia e a segurança do fitoterápico. Fatores como a técnica

de extração e o grau de divisão do material vegetal tornam-se fundamentais, visto que influenciam na eficiência do processo de produção final de um fitoterápico (Karabegović *et al.*, 2014).

O tamanho da partícula da matéria-prima vegetal tem influência direta na eficiência da extração, que, por sua vez, relaciona-se com a estrutura histológica do vegetal. Se ela é bem compactada, como nos caules e raízes, o solvente terá maior resistência para penetrar e difundir-se pelos tecidos. Por essa razão, órgãos assim devem ser reduzidos; folhas e flores, por terem estrutura mais delicada, não necessitam ser levadas a pedaços tão pequenos. Como o poder de penetração dos solventes depende da consistência dos tecidos que formam o material a ser extraído, é necessário considerar que, quanto mais rígido o material, menor deve ser a sua granulometria. Quando o grau de tenuidade do pó aumenta, a superfície de contato com o solvente também aumenta, o que favorece a velocidade de difusão das substâncias carregadas. Entretanto, uma excessiva diminuição do tamanho das partículas resulta em mais dificuldade para a passagem do solvente através da droga pulverizada, pois a formação de aglomerados aumenta e o espaço intersticial diminui, levando, muitas vezes, ao aumento do tempo necessário para o processo (Simões *et al.*, 2017).

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível para que se possa extrair apenas as substâncias desejadas ou, então, obtê-las na maior proporção possível, e ser capaz de dissolver e carrear os princípios ativos de importância farmacológica – ou seja, deve ser seletivo para a/s classe/s química/s de interesse e, mais precisamente, para as moléculas-alvo. Como a seletividade depende da afinidade do solvente pelas substâncias de interesse, é necessário o conhecimento do grau de hidro ou lipofilicidade da mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para determinada extração. Em fitoquímica, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, é comum realizar sucessivas extrações do material vegetal com solventes de polaridade crescente, o que resulta em uma extração fracionada. A preparação de extratos para uso farmacêutico geralmente envolve a utilização de solventes, como a água e o álcool etílico, auxiliados por glicerina e propilenoglicol. Outros podem ser utilizados com o objetivo de melhorar a seletividade da/s substância/s de interesse, principalmente durante o desenvolvimento, para identificação e isolamento de substâncias. Caso esses solventes sejam utilizados também no processo de obtenção de extratos para serem utilizados na produção de medicamentos, faz-se necessária a realização de testes de avaliação de resíduos de solvente, bem como a toxicidade do extrato obtido para garantir a segurança e eficácia do produto (Chemat *et al.*, 2012). No Quadro 1, a seguir, resumizam-se os principais solventes utilizados nas

rotinas fitoquímicas e as classes de metabólitos secundários de ocorrência mais comum nas espécies vegetais medicinais.

A extração de substâncias pode ser também influenciada pelo pH do líquido extrator. Um caso típico em que o pH é determinante é a obtenção da maioria dos alcaloides, cuja natureza básica faz com que soluções ácidas sejam mais indicadas (Russo *et al.*, 2013).

Quadro 1 – Exemplos de solventes em ordem crescente de polaridade e principais substâncias extraídas

Solvente	Tipos de substâncias extraídas
Éter de petróleo, n-hexano	lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas
Tolueno, cloreto de metileno, clorofórmio	alcaloides, antraquinonas, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos
Acetato de etila, butanol-1	flavonoides, cumarinas
Álcoois etílico e metílico	heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas, água	saponinas, taninos
Água acidificada	alcaloides
Água alcalinizada	saponinas

Os fatores relacionados aos métodos de extração dizem respeito à agitação, temperatura, pressão e ao tempo necessário para executá-los. A agitação pode abreviar a duração do processo extrativo, pois ela facilita o contato da droga com o solvente. Quanto maior o tempo em que a droga vegetal estiver em contato com o solvente, melhor será o rendimento da extração, pois ocorrerá um maior fluxo de difusão do solvente através da parede celular da droga vegetal, contribuindo para equilibrar a concentração de substâncias dentro e fora dos tecidos. O tempo de contato é de extrema importância, pois substâncias de interesse podem estar localizadas em regiões de difícil permeabilidade do solvente. O tempo de contato entre droga vegetal e solvente também poderá acarretar saturação do meio, bem como a degradação do extrato por meio de processos como hidrólise ou fermentações (Borella *et al.*, 2012).

As temperaturas elevadas podem facilitar a extração de substâncias orgânicas naturais pela diminuição da viscosidade do solvente e aumento da

velocidade de difusão, mas devem ser controladas para que não degradem as substâncias termolábeis ou levem à perda dos voláteis. Um efeito negativo do aumento da temperatura é o aumento da velocidade de reações como hidrólises, oxidações e decomposições, que interferem na estabilidade do extrato obtido (Naviglio & Ferrara, 2008; Pin *et al.*, 2011).

O tempo de extração varia em função da rigidez dos tecidos do material vegetal, de seu estado de divisão, da natureza das substâncias a extrair, do solvente e do emprego ou não de temperatura e/ou agitação. Como a composição química das plantas é extremamente complexa, diversas substâncias são extraídas concomitantemente. Dessa forma, informações sobre a natureza química daquilo que se deseja extrair devem ser sempre consideradas previamente (Borges *et al.*, 2012).

## Processos de Extração

A escolha do método de extração deve considerar alguns fatores importantes como sua eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas e a disponibilidade dos solventes e equipamentos a serem utilizados. Os métodos mais comumente utilizados a frio são a turbolização ou turboextração, a maceração e a percolação. Os métodos a quente dividem-se em sistemas abertos (como infusão e decocção) ou fechados, como arraste por vapor de água em aparelhos de Soxhlet e Clevenger. Há ainda outros tipos, como por micro-ondas, ultrassom, por fluido supercrítico (EFS) e microextração em fase sólida (SPME) (Bi *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2016).

### Métodos de extração a frio

Entre as técnicas mais utilizadas para a obtenção de extratos de plantas medicinais, estão os métodos a frio, que, por não utilizarem calor, garantem a estabilidade química do extrato obtido. As mais importantes são maceração, percolação e turboextração.

#### *Maceração*

Na maceração, a extração da matéria-prima deve ser realizada em recipiente fechado, à temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ou não e com ou sem renovação do líquido extrator. Quando realizada sem renovação, não conduz ao esgotamento da

matéria-prima vegetal, devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio por difusão entre o solvente e o interior da célula (Naviglio & Ferrara, 2008).

As drogas vegetais mais indicadas para serem extraídas por maceração são as que não tenham altas proporções de gomas, mucilagens ou resinas. Quanto aos solventes voláteis, seus coeficientes de expansão cúbica fazem com que suas concentrações não possam ser precisamente determinadas, pois a proporção de líquido para a massa da droga poderá variar de forma não controlada. Além disso, a inflamabilidade torna a operação mais arriscada. O emprego de água ou de misturas hidroalcoólicas com menos de 20% de álcool também não é recomendado, pois proporciona condições favoráveis à proliferação microbiana (Linhares *et al.*, 2010).

### *Percolação*

No processo de percolação, o solvente passa através de uma camada do material a ser extraído até o seu completo esgotamento, levando a uma extração exaustiva da droga, sempre com o solvente renovado. A droga vegetal moída é colocada em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador), de vidro ou metal, através do qual é feito passar o líquido extrator sob pressão atmosférica ou controlada. É uma operação dinâmica, indicada para a extração de substâncias presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis. Esse procedimento pode ser dividido em dois tipos: simples ou fracionada (Handa *et al.*, 2008).

Na percolação simples, a primeira etapa é a do intumescimento da droga com o líquido extrator. Em seguida, procede-se ao empacotamento da mistura droga-solvente no percolador, sem compactação excessiva e de forma mais homogênea possível. Somente então é que ocorre o procedimento extrativo a partir do escoamento do extrato.

A opção fracionada implica a separação das duas ou três primeiras frações do percolado, que deverá conter a maior proporção das substâncias extraíveis. As frações seguintes apresentarão maior grau de diluição.

A principal desvantagem dessa técnica é a quantidade de líquido extrator requerida para esgotar a droga vegetal. Para contornar esse inconveniente, pode-se usar percoladores em série, método no qual frações mais diluídas de um percolador passam a alimentar o seguinte, tornando-o mais eficiente. Comparativamente à maceração, no entanto, o tempo de contato da droga com o líquido extrator é menor, e, assim, estruturas químicas mais sensíveis podem ser mais preservadas (Handa *et al.*, 2008).

### *Turboextração*

Na turboextração, ocorre a redução drástica do tamanho das partículas e o consequente rompimento das células, favorecendo a rápida dissolução das substâncias e levando a tempos de extração da ordem de minutos e ao quase esgotamento da droga. Tem como principais desvantagens a difícil separação do extrato por métodos triviais de filtração, a geração de calor (restringindo, assim, o uso de solventes voláteis e a extração de substâncias termolábeis) e a limitação técnica quando se trata de materiais de elevada dureza, como caules e raízes (Serrano *et al.*, 2013).

### Métodos de extração a quente

Os procedimentos de extração a quente são realizados em sistemas abertos, como, por exemplo, infusão, digestão e decocção; ou fechados, como extração por refluxo e em aparelho de Soxhlet (Handa *et al.*, 2008).

#### *Infusão*

Na infusão, ocorre a permanência, durante certo tempo, do material vegetal em água fervente num recipiente tampado e aplica-se a partes de vegetais de estrutura mole, como flores, folhas e frutos, que devem ser cortadas para que sejam mais facilmente permeadas pela água. Essa técnica extrativa é muito utilizada popularmente para o preparo de chás, e é uma operação simples, fácil e de baixo custo. A infusão é considerada não exaustiva, pois, após o tempo de contato determinado entre a matéria-prima vegetal e a água, a extração é finalizada antes do esgotamento das substâncias ativas dentro das células vegetais.

#### *Decocção*

A decocção, um modo de extração aberto, consiste em manter o material vegetal em contato, durante certo tempo, com água em ebulição. Seu emprego é restrito, pois muitas substâncias ativas são alteradas pelo aquecimento prolongado. Deve ser empregado em materiais vegetais duros de natureza lenhosa, frutos secos e raízes.

#### *Extração sob refluxo*

A extração sob refluxo é uma técnica que consiste em submeter o material vegetal à extração com um solvente em ebulição em aparelho acoplado a



um condensador, de forma que o solvente evaporado durante o processo seja recuperado e retorne ao conjunto (Figura 1). Apesar de altamente eficiente por empregar quantidade reduzida de solvente, devem ser tomadas precauções com a temperatura. Esse método não pode ser utilizado com substâncias termolábeis, pois o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante o processo e, em alguns casos, pode levar a degradações (Handa *et al.*, 2008).

Figura 1 – Extração de folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral por refluxo

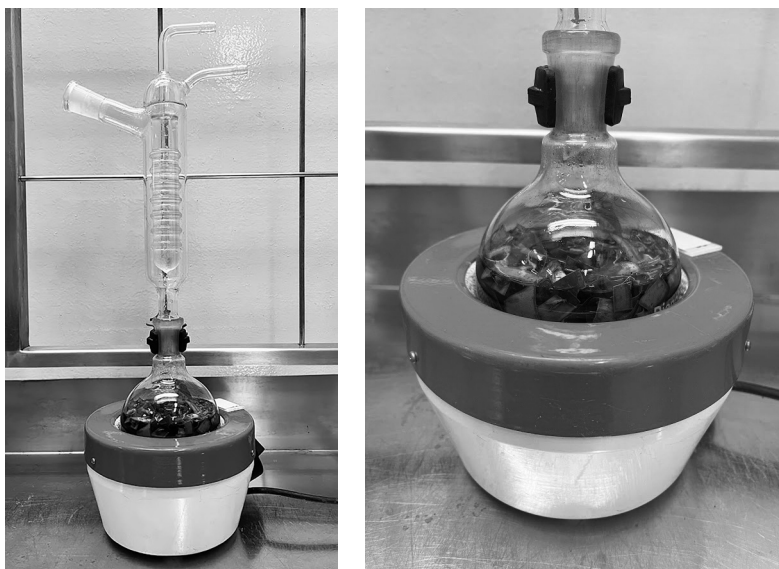


Foto Vagner Pereira da Silva.

#### *Extração utilizando aparelho de Soxhlet*

A extração com aparelho Soxhlet é outro método muito utilizado, no qual a droga vegetal é colocada em um cartucho permeável, e, sobre ele, o solvente quente evaporado de um balão goteja continuamente após sua condensação (Figura 2). Sua principal aplicação é na extração de sólidos com solventes voláteis. Tem como vantagem o uso de pouco solvente e apresenta alto grau de repetitividade e reprodutibilidade (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

Figura 2 – Extração de folhas de *Arrabidaea chica* (Bonpl.) Verl. utilizando aparelho de Soxhlet



Detalhe do cartucho e do sifonamento do solvente extrator.

Foto Vagner Pereira da Silva.

## Extração de Constituintes Voláteis

Os óleos voláteis são obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste de vapor d'água, bem como por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. Por geralmente terem aromas intensos, são também chamados de essências. A solubilidade em solventes orgânicos lipofílicos, como o éter, faz com que recebam também o nome de óleos etéreos ou, em latim, *aetheroleum* (Baser & Buchbauer, 2010). Eles são utilizados em aplicações bactericidas, fungicidas, inseticidas, medicinais e cosméticas e, mais especialmente nos dias de hoje, nas indústrias de cosméticos, de alimentos, sanitárias e ligadas à agricultura. Os óleos contêm uma variedade de moléculas voláteis, como terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), derivados fenólicos (fenilpropanoides) e substâncias alifáticas (Wasserscheid & Wasserscheid, 2010).

As suas aplicações dependem de suas diferentes propriedades biológicas e apresentam-se como misturas complexas de numerosas moléculas, cuja

sinergia pode refletir em maior influência de uma ou outra molécula. Na literatura, a maioria dos óleos essenciais apresentam terpineol, eugenol, timol, carvacrol, carvona, geraniol, linalol, citronelol, nerol, limoneno e eucaliptol, entre os demais compostos (Azmir *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2010). Ao considerar essa sinergia, os métodos pelos quais os óleos essenciais são extraídos são de extrema importância para garantir sua composição e, conseqüentemente, sua qualidade e futura aplicação. Alguns aspectos são importantes para a qualidade do óleo, como o tempo, a temperatura e o tipo da extração, assim como o solvente e a razão solvente-carga. Um bom solvente deve ter baixa toxicidade, baixo ponto de ebulição, alta transferência de massa do soluto e não complexar ou dissociar o soluto, mantendo-o e conservando-o. A escolha de um bom solvente garante proporciona a qualidade organoléptica do óleo e o rendimento da extração, que é frequentemente baixo mesmo com o consumo de alta quantidade de solvente. Geralmente, essas extrações com solventes têm alto custo e são vantajosas quando aplicadas para a obtenção de produtos de alto valor agregado (Khan & Dwivedi, 2018; Silva *et al.*, 2016)

As principais técnicas utilizadas são as clássicas, como hidrodestilação (utilizando aparelho de Clevenger), *enfleurage*, prensagem e extração com solventes orgânicos, ou as mais modernas, como por fluidos supercríticos, assistida por micro-ondas, hidrodestilação com auxílio de micro-ondas e ultrassom, entre outras.

### Enfleurage

O charme especial da técnica *enfleurage* vem da Antiguidade, tendo sido criada pelos egípcios e aperfeiçoada no século XIX pelos franceses em Grasse, conhecida como a cidade do perfume. Atualmente, só é usada para plantas com baixos teores de óleos e de alto valor comercial como, por exemplo, lírios, jasmims e rosas. A técnica consiste na exposição das pétalas das flores por um tempo determinado a uma camada de gordura vegetal ultrapura até que ela fique saturada com o óleo da planta. Essa mistura é, então, lavada com álcool e filtrada para que se obtenha o óleo essencial. O álcool é destilado e, a partir daí, é obtido um óleo essencial 100% puro e natural. O *enfleurage* foi gradualmente substituído por processos industriais mais produtivos, baratos e de melhor rendimento, como a hidrodestilação (Stratakos & Koidis, 2016).

## Prensagem

A prensagem é um método utilizado para obtenção dos óleos voláteis de frutos cítricos. Os pericarpos são prensados e a camada que contém o óleo volátil é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada e clarificado. Esse processo é realizado pelas empresas produtoras de suco de frutas, e o Brasil é um dos principais fornecedores dos óleos essenciais de laranja, limão, lima e outros cítricos.

## Extração com solventes orgânicos

A extração com solventes orgânicos é utilizada para a obtenção de maior rendimento ou, então, para produtos que não possam ser extraídos por nenhum outro processo. As plantas são imersas em solvente lipofílico adequado, como éter etílico, n-hexano, éter de petróleo ou cloreto de metileno, puros ou em misturas de proporções diversas. O grande problema desse procedimento é a falta de seletividade química: diversos outros constituintes lipofílicos, além dos óleos essenciais, são também extraídos. Os óleos obtidos não são usados em aromaterapia, pois geralmente contêm vestígios do solvente. A extração por essa técnica pode, também, levar a alterações na composição química do produto. Um exemplo é o óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*): quando obtido por arraste a vapor, obtém-se um óleo essencial com 70-90% de eugenol e 5-12% de beta-cariofileno, monoterpene este não encontrado no produto obtido por extração com solvente (Handa *et al.*, 2008).

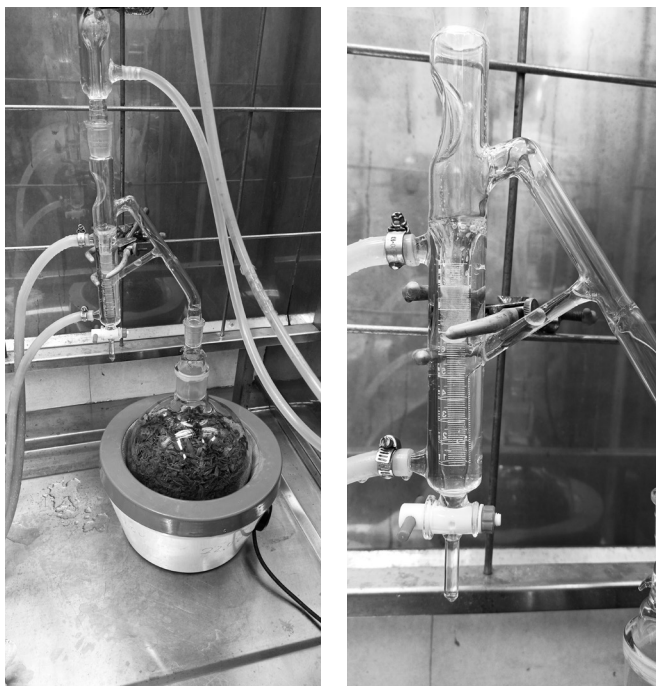
## Extração convencional

As técnicas tradicionais mais usadas para extração de óleos essenciais são a destilação por arraste a vapor e a hidrodestilação com o aparelho de Clevenger. Ambas possibilitam a obtenção de óleos livres de resíduos, pois o vapor gerado é condensado e separado. O termo destilação refere-se à separação de componentes de uma mistura devido à diferença das suas pressões de vapor. Toda substância volátil tem determinado ponto de ebulição e, também, um valor de pressão de vapor, que, por sua vez, depende da temperatura. Os constituintes da planta, em contato com a água quente, sofrem pressão das moléculas na fase de vapor e entram

em ebulição, sendo então condensados e separados da água (Cassel & Vargas, 2006).

O destilador de óleos essenciais do tipo Clevenger é o mais utilizado em pequena escala. Porém, tem limitações por ser construído em vidro e operar com pequenos volumes, inviabilizando a extração de quantidades maiores e por tempos mais longos. Nessa configuração, o óleo essencial é arrastado pelo vapor, condensado e depositado na parte graduada do aparelho de Clevenger, sendo recolhido sem necessitar da etapa complementar de separação em funil e ainda permitindo o refluxo do solvente. Nesse processo, podem ser visualizadas, no tubo separador do extrator, as formas líquidas do óleo e da água, que, por sua vez, retorna ao balão através do tubo de retorno, quando o óleo essencial é então recolhido (Figura 3). Esse ciclo repete-se continuamente até que o operador determine seu término (Cassel *et al.*, 2009).

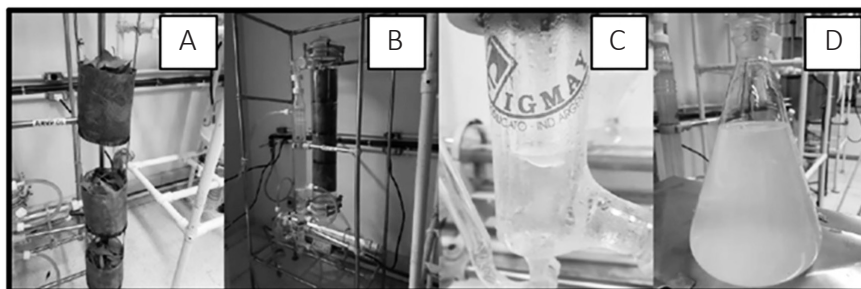
Figura 3 – Extração de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson em aparelho de Clevenger



Detalhe na coleta do óleo.  
Foto Vagner Pereira da Silva.

O método de extração por arraste a vapor é um dos mais antigos e empregados nos processos industriais devido à sua maior simplicidade e economia, pois possibilita o processamento de grandes quantidades de material vegetal de uma única vez. Essa técnica é mais barata quando comparada com os métodos mais avançados, como a extração com fluido supercrítico. O processo de destilação de óleos essenciais por arraste consiste em passar vapor de água por um vaso extrator, onde está o material vegetal. Os componentes voláteis, que têm uma pressão de vapor mais elevada que a da água, são arrastados em direção ao topo do vaso com o fluxo ascendente de vapor, seguindo em direção ao condensador. O material condensado, uma emulsão de água e óleo essencial, é conduzido ao vaso separador, também conhecido como vaso florentino, onde são separados em duas fases: a oleosa e a aquosa (Cassel & Vargas, 2006). Na Figura 4, pode-se ver a extração com cestos amarrados contendo a planta e por onde o vapor passa, arrastando o óleo essencial que será capturado pela torre de resfriamento.

Figura 4 – Etapas da obtenção do óleo essencial por arraste a vapor em escala piloto



A – folhas de *Ocimum gratissimum* L. distribuídas nos cestos do equipamento de arraste a vapor; B – equipamento em funcionamento; C – início da obtenção do óleo essencial; D – água de arraste.

Foto Andrea Bezerra da Nobrega.

Desde a década passada, tem-se buscado por processos que sejam mais eficientes, econômicos e viáveis do ponto de vista social e ambiental. Com a evolução dos métodos ao longo dos anos, têm surgido técnicas e métodos híbridos que associam as técnicas modernas às convencionais. De forma geral, a aplicação dos métodos varia de acordo com a localização do óleo na planta e da proposta de seu uso. Diante disso, o termo “química verde”, desde 1991, tem sido usado para designar a implementação de tecnologias químicas mais

sustentáveis. Atualmente, o termo “extração verde” tem sido introduzido para classificar as técnicas de extração baseadas na reutilização de subprodutos, uso de solventes alternativos, água ou água residual, líquidos iônicos, redução de operações unitárias e obtenção de extratos sem qualquer contaminação (Chemat *et al.*, 2012; Picot-Allain *et al.*, 2021). Com isso, o interesse nas “tecnologias verdes” tem aumentado devido à qualidade do produto final, possibilitada pela minimização do uso de solventes tóxicos, diminuindo os efeitos indesejáveis ao ambiente e aumentando a segurança no consumo. Por essas razões, modernas tecnologias de extração, que usam água, etanol e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como solventes, têm sido aplicadas para a extração de óleos essenciais, como a extração assistida por micro-ondas (MAE), por ultrassom (UAE) e tecnologias com altas pressões, como extração com fluido supercrítico e extração com água subcrítica (também conhecida como extração com água superaquecida) (Picot-Allain *et al.*, 2021).

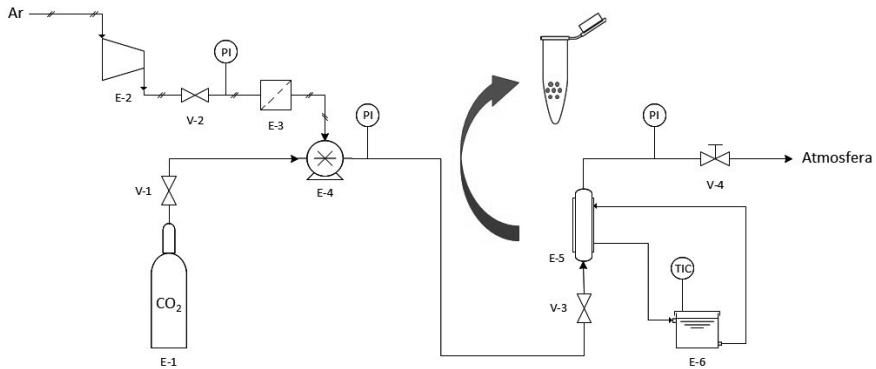
### Extração com fluidos supercríticos

A extração com fluido supercrítico mais utilizada é aquela na qual se faz uso do  $\text{CO}_2$  como solvente para a extração de diferentes óleos essenciais de plantas e raízes. O fluido tem temperatura e pressão críticas de 31,2 °C e 73 bar, respectivamente, e acima desses valores encontra-se no estado supercrítico. Assim, sua viscosidade torna-se similar à de um gás, facilitando a penetração na matriz vegetal, e sua capacidade de dissolução é similar à de um líquido. Essa condição de temperatura impede a degradação de compostos termolábeis e não altera sabores e aromas. Mais ainda, o  $\text{CO}_2$  é reconhecido como um solvente seguro, de baixo custo e não inflamável. O uso de altas pressões faz com que o processo tenha custos elevados, ao mesmo tempo que favorece o aumento do poder do solvente, pelo aumento da sua densidade, o que propicia a extração seletiva de determinados compostos. Após a extração, o solvente é separado do extrato por despressurização, não havendo a necessidade de implementação de uma nova etapa de separação, como normalmente ocorre quando a extração é realizada com solvente orgânico (Fornari *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016).

Um exemplo de fluxograma experimental é apresentado na Figura 5. Inicialmente, o material vegetal é inserido em D, que é mantido na temperatura desejada, com o uso do banho térmico, e o extrator é alimentado com  $\text{CO}_2$  pelo auxílio de uma bomba de alta pressão. Os experimentos podem ser conduzidos de forma estática ou dinâmica, estudando-se a cinética do processo.



Figura 5 – Exemplo de um fluxograma de processo de pré-tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico



E-1: cilindro de CO<sub>2</sub>; E-2: compressor de ar; E-3: filtro de ar; E-4: bomba de alta pressão; E-5: célula de alta pressão; E-6: banho de aquecimento; V-1, V-2, V-3: válvula gaveta; V-4: válvula micrométrica.

A quantidade de material vegetal a ser alimentado depende do volume do extrator, assim como a escolha da bomba de alta pressão a ser utilizada. A unidade básica é constituída desses equipamentos principais, podendo existir variações no que diz respeito ao uso de mais separadores, que são submetidos a diferentes condições de pressão, com o objetivo de fracionar diferentes classes de componentes químicos.

A extração não é somente usada em pesquisas laboratoriais, mas é utilizada em larga escala em muitas finalidades industriais. As aplicações mais desenvolvidas foram na área de alimentos (descafeinação de chás e cafés), como na extração de aromas, na fabricação de corantes naturais, de extratos vitamínicos, de lipídeos específicos e nutracêuticos, assim como na remoção de pesticidas. Também é aplicado em processos de remoção de solventes de produtos farmacêuticos.

Existem importantes trabalhos de revisão em que são citadas aplicações da extração de compostos bioativos de óleos essenciais de plantas. Em todos esses trabalhos, são avaliados alguns fatores que influenciam o rendimento da extração dos variados óleos essenciais, como temperatura, pressão, vazão de CO<sub>2</sub> e adição de cossolventes (Bernardo-Gil *et al.*, 2002).

Devido a esses fatores, diferentes classes de compostos são extraídas, como monoterpenos fenólicos, oxigenados e hidrocarbonetos monoterpênicos. Suas análises qualitativas e quantitativas também podem ser feitas por meio da



cromatografia com fluido supercrítico, que permite a separação da mistura multicomponente (Arranz *et al.*, 2014; Elgndi *et al.*, 2017).

Outro método é a extração com água subcrítica, também conhecida como extração com água quente pressurizada. Nesse caso, a água superaquecida é usada entre 100 e 375 °C sob alta pressão (> 20 bar). Nessas condições, a polaridade da água diminui, o que faz com que compostos apolares possam ser solubilizados e extraídos das plantas. Essa técnica é utilizada em laboratórios e em unidades em escala piloto, com o objetivo de produzir baixas quantidades de óleos essenciais. Em comparação com os métodos convencionais, essa técnica consome pouca energia e pouco tempo na extração, extrai um maior número de componentes e em maior quantidade, não causa degradação e reduz a poluição (Sánchez-Camargo *et al.*, 2017).

Recentemente, líquidos iônicos são também utilizados como solventes para a extração de óleos presentes em plantas. Líquidos iônicos são sais orgânicos no estado líquido e, apesar de serem viscosos, sua polaridade pode ser ajustada para uma ampla variação de compostos, e muitos deles podem ser destilados, de forma a recuperar os compostos de alto valor agregado. O método é similar ao que usa solventes orgânicos, porém a etapa de separação garante a total pureza do extrato (Santoyo *et al.*, 2014).

### Extração assistida por micro-ondas

Micro-ondas são ondas eletromagnéticas cuja frequência e comprimento de onda variam entre 300 MHz a 300 GHz e 1 a 0,001 m (1 mm), respectivamente, e encontram-se na região espectral entre ondas de rádio, televisão e raios X. Atuam nas moléculas por meio da rotação dipolar e condução iônica, que são responsáveis pelo aquecimento do material por meio da conversão da energia eletromagnética em calor e que podem penetrar biomateriais e interagir com moléculas polares, como a água nos biomateriais, para criar calor. Devido à sua alta seletividade, o aquecimento por micro-ondas é capaz de causar a expansão celular e o rompimento de suas paredes, provocando a liberação dos princípios ativos. Essa técnica apresenta várias vantagens se comparada às extrações tradicionais com solvente, como tempos de extração mais curtos, taxas de extração mais altas, custos mais baixos e menor quantidade de solventes (Abbas *et al.*, 2021; Chenni *et al.*, 2016). Além de ser utilizada, principalmente, para a extração de óleos essenciais, é usada na extração de diversas classes químicas, como polifenóis, flavonóis, antocianinas, pectinas e polissacarídeos (Liew *et al.*, 2016; Seixas *et al.*, 2014).

Essa técnica extrativa pode ser acoplada a métodos físicos, como a hidrodifusão com micro-ondas e gravidade, a extração com solvente assistida por micro-ondas, a hidrodestilação com micro-ondas, sob vácuo ou com micro-ondas e ar comprimido, entre outros (Rawson *et al.*, 2011).

### Extração com ultrassom

No processo extrativo com ultrassom, utilizam-se correntes de alta frequência (maiores que 20 kHz), que promovem a fragmentação das estruturas e membranas celulares do material vegetal, liberando com mais facilidade os constituintes químicos. Os dispositivos utilizados na extração assistida por ultrassom incluem um banho ultrassônico, usado principalmente para extrações em pequena escala, ou um sistema de sonicação do tipo sonda para extrações industriais em grande escala (Zu *et al.*, 2012). A eficiência de recuperação encontrada usando esta técnica costuma ser igual, ou melhor, do que a obtida na extração por solvente a quente.

As ondas ultrassônicas causam mudanças físicas e químicas pela variação de pressão no líquido, gerando cavitação e microfluxos, aquecimento e ruptura dos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás.

### Concentração e Secagem

Os extratos, após a filtração, podem ser concentrados e secos para a eliminação total ou parcial do solvente. Esse procedimento é importante para a eliminação de solventes tóxicos, quando estes são empregados, e para a obtenção de extrato seco para o preparo de diferentes formas farmacêuticas. Quando os extratos são aquosos, deve ser dada atenção especial à presença de água residual pela possibilidade do crescimento de micro-organismos. Os principais métodos de concentração e secagem são: evaporação a vácuo, quando o extrato é submetido a pressões reduzidas para a eliminação do solvente, e, eventualmente, em banho aquecido para facilitar sua remoção – esse processo é utilizado preferencialmente para solventes voláteis e para extratos que apresentem substâncias termolábeis; *spray-drying*, que consiste na secagem por meio da aspersão de gás quente, levando à obtenção de pós secos – é especialmente útil para extratos sensíveis à temperatura; e liofilização, técnica branda que permite a eliminação de água de extratos congelados mediante a aplicação de vácuo.

## Considerações Finais

A extração dos princípios ativos vegetais pode ser realizada por inúmeros métodos, e sua escolha dependerá de alguns aspectos a serem considerados, como as características químicas das substâncias de interesse, a capacidade instalada do laboratório/indústria e a atividade biológica desejada/observada.

Os produtos à base de plantas medicinais disponíveis no mercado são apresentados como droga seca para preparo de infusão, medicamentos sintéticos cujos insumos farmacêuticos ativos são moléculas naturais – obtidas por fontes naturais ou por processos sintéticos – ou, em sua grande maioria, como extratos brutos ou semipurificados, em suas formas líquida ou sólida. A etapa de extração, portanto, desempenha papel primordial na obtenção do medicamento. O procedimento deve ser padronizado, tanto quanto o cultivo do vegetal, para que as variações naturais e inerentes ao processo produtivo sejam minimizadas, concorrendo, dessa forma, para a segurança e a eficácia do medicamento. A efetividade da extração baseia-se na capacidade máxima de obtenção das substâncias que sejam relevantes para a ação do produto, preferencialmente evitando-se a presença daquelas que sejam potencialmente tóxicas. Isso inclui os solventes, substâncias líquidas responsáveis pela extração das moléculas do insumo. Nas etapas de pesquisa, o uso de solventes tóxicos é bastante comum, pois é interessante e desejável conhecer o mais possível a composição química da matriz vegetal. Do ponto de vista industrial, no entanto, o uso de tais solventes é proibido e há legislação específica sobre o assunto. A etapa extrativa deve ser eficiente, levando ao maior rendimento e considerando eventuais perdas ou transformações dos ativos, causadas, por exemplo, pelo tempo de exposição ao solvente (água, por exemplo, que pode levar a hidrólises), o tempo de extração e a temperatura aplicada. As diversas formas de extração apresentadas neste capítulo foram desenvolvidas e aprimoradas – e são também aplicadas – de acordo com a natureza das substâncias de interesse, a parte da planta utilizada, seu grau de divisão e seu rendimento. Sem o controle e a padronização dessa etapa inicial, a qualidade do produto fica comprometida por causa da não uniformização de lotes, discrepâncias nas análises realizadas na aferição da qualidade e possíveis inconsistências na ação farmacológica do produto.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted, microwave-assisted and Soxhlet extraction of bioactive compounds from *Lagenaria siceraria*: a comparative analysis *Bioresource Technology Reports*, 15: 1-8, 2021.
- ARRANZ, E. *et al.* Supercritical sage extracts as anti-inflammatory food ingredients. *Industrial Crops and Products*, 54: 159-166, 2014.
- AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117: 426-436, 2013.
- BASER, K. H. C. & BUCHBAUER, G. *Handbook of Essential Oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- BERNARDO-GIL, M. G.; RIBEIRO, M. A. & ESQUÍVEL, M. M. Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*, 73: 24-30, 2002.
- BI, W.; ZHOU, J. & ROW, K. H. Decaffeination of coffee bean waste by solid-liquid extraction. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28: 221-224, 2010.
- BORELLA, J. C. *et al.* Influência do processo extrativo nas características físicas e químicas dos extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, 9(2): 25-36, 2012.
- BORGES, M. E. *et al.* Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). Bioextraction methods. *Food Chemistry*, 132: 1.855-1.860, 2012.
- CASSEL, E. & VARGAS, R. M. F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55: 57-60, 2006.
- CASSEL, E. *et al.* Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Crops and Products*, 29: 171-176, 2009.
- CASTRO-LÓPEZ, C. *et al.* Phenolic compounds recovery from grapefruit and by products: an overview of extraction methods. In: MORATA, A. & LOIRA, I. *Grape and Wine Biotechnology*. London: IntechOpen, 2016.
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A. & CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 8.615-8.627, 2012.
- CHENNI, M. *et al.* Comparative study of essential oils extracted from microwave extraction. *Molecules*, 21: 113-129, 2016.
- COELHO, G. L.; MENDES, M. F. & PESSOA, F. L. P. Flavor extraction: headspace, SDE or SFE. In: HUI, Y. H. *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- ELGNDI, M. A. *et al.* Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 128: 128-137, 2017.
- FORNARI, T. *et al.* Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1.250: 34-48, 2012.

- HANDA, S. S. *et al.* *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: ICS Unido, 2008.
- KARABEGOVIĆ, I. T. *et al.* The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 54: 142-148, 2014.
- KHAN, M. F. & DWIVEDI, A. K. A review on techniques available for the extraction of essential oils from various plants. *International Research Journal of Engineering and Technology*, 5(5): 5-8, 2018.
- LINHARES, A. R. *et al.* Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: influence of temperature. *Journal of Food Engineering*, 97: 471-477, 2010.
- LIEW, S. Q. *et al.* Sequential ultrasound-microwave assisted acid extraction (UMAE) of pectin from pomelo peels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93: 426-435, 2016.
- LUQUE DE CASTRO, M. D. & PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1,217: 2.383-2.389, 2010.
- LUQUE DE CASTRO, P. M. *et al.* Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27: 510-518, 2017.
- NAVIGLIO, D. & FERRARA, L. *Técnicas Estrattive Solido-Líquido: teoria e pratica*. Roma: Aracne, 2008.
- OLIVEIRA, S. M. M. & JOSE, V. L. A. *Processos de extração de óleos essenciais*. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, 2007.
- OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(1): 230-239, 2016.
- PESSOA, F. L. P. *et al.* Extraction and distillation. In: HUI, Y. H. *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- PICOT-ALLAIN, C. *et al.* Conventional versus green extraction techniques – a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40: 144-156, 2021.
- PIN, K. Y. *et al.* Solidliquid extraction of betel leaves (*Piper betle* L.). *Journal of Food Process Engineering*, 34: 549-565, 2011.
- RAWSON, A. *et al.* Effect of thermal and non-thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: review of recent advances. *Food Research International*, 44(7): 1.875-1.887, 2011.
- RUSSO, A. *et al.* Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 42-47, 2013.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. *et al.* Bioactives obtained from plants, seaweeds, microalgae and food by-products using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 76: 27-51, 2017.
- SANTOYO, S. *et al.* Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from thyme species. *Industrial Crops and Products*, 52: 475-480, 2014.

- SEIXAS, F. L. *et al.* Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave induced heating. *Food Hydrocolloids*, 38: 186-192, 2014.
- SERRANO, A. B. *et al.* Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging *Fusarium* mycotoxins in pasta by LC-MS/MS. *Food Control*, 32(1): 105-114, 2013.
- SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. & DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76: 40-51, 2016.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- STRATAKOS, A. C. & KOIDIS, A. Methods for extracting essential oils. In: PREEDY, V. R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. San Diego: Academic Press, 2016.
- WASSERSCHIED, A. J. & WASSERSCHIED P. A brief review on essential oil extraction and equipment. *Chemical Technology*, 5(1): 19-24, 2010.
- ZU, G. *et al.* Ultrasound assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Molecular Science*, 13: 11.027-11.043, 2012.





## 4

# Avaliação da Autenticidade de Drogas Vegetais Baseada na Análise Morfológica Macro e Microscópica

*Fernanda Moreira do Amaral, Selma Ribeiro de Paiva e Ana Joffily*

A utilização de plantas como recurso terapêutico remonta à Antiguidade, e a expansão dessa prática pode ser, em parte, atribuída à crença de que medicamentos à base de espécies vegetais são, necessariamente, inócuos e mais seguros que os sintéticos (Capasso *et al.*, 2000). O fato de as plantas serem naturais não significa que seu uso para o cuidado com a saúde constitua uma prática isenta de limitações, pois muitas espécies causam efeitos tóxicos ou carecem de comprovação de eficácia e segurança (Veiga Jr., Pinto & Maciel, 2005).

Plantas que compartilham alta similaridade morfológica e/ou nome popular são passíveis de confusão e substituição no comércio, expondo ao risco a saúde do consumidor (Zhao *et al.*, 2006). Dessa forma, a avaliação da autenticidade de drogas vegetais, ou seja, a confirmação de sua identidade botânica, é fundamental para o acesso seguro aos chás medicinais, bem como para a produção de fitoterápicos (Amaral *et al.*, 2021). Nesse sentido, a vigente legislação relativa ao registro ou notificação desses produtos, conforme será pormenorizado mais adiante neste capítulo, estabelece a indispensabilidade da descrição detalhada de aspectos da morfologia externa e interna de plantas utilizadas como droga vegetal para a produção de chás ou como matéria-prima para a produção de fármacos (Brasil, 2014).

Decerto a análise morfológica contribui para a verificação da autenticidade de drogas vegetais, contudo o fato de esse produto ser frequentemente



dispensado em forma fragmentada (Figura 1) evidencia a importância da anatomia vegetal no âmbito do controle da qualidade, constituindo ferramenta profícua para a determinação da identidade botânica e, conseqüentemente, da verificação da ocorrência de adulterações, falsificações e contaminações.

## Adulteração, Falsificação e Contaminação

Em países como o Brasil, a ampla utilização de drogas vegetais e produtos delas derivados dá-se, principalmente, em razão da tradicionalidade de uso e da facilidade de obtenção em farmácias, ervanarias (Veiga Jr., Pinto & Maciel, 2005) e no comércio informal, como feiras. Apesar da existência de parâmetros já estabelecidos por agências reguladoras, verifica-se a ocorrência de fraudes e outros problemas de qualidade, como contaminações, podendo ocasionar a redução da eficácia e segurança de produtos vegetais. Aliadas à elevada rentabilidade comercial, são recorrentes a adulteração e a falsificação, de modo que a presença de rotulagem não garante a autenticidade (Veiga Jr., Pinto & Maciel, 2005). O acesso a produtos vegetais fora dos padrões de qualidade torna seu uso um risco e, ao mesmo tempo, um problema de saúde pública.

Figura 1 – Fragmentos foliares provenientes de amostra comercial de maracujá



A adulteração constitui, por definição, o ato de alterar e, ou, modificar as propriedades iniciais de algo, pela adição de elementos estranhos, inadequados ou inferiores (Zhang *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2013). Em amostras comerciais, é recorrente a adição de partes vegetais que não constituem a droga vegetal, como, por exemplo, fragmentos do caule quando a droga vegetal é a folha; trata-se de fraude, visando, na maioria das vezes, aumentar o peso total do produto (Zhang *et al.*, 2012). No caso de medicamentos fitoterápicos, inúmeros registros na literatura apontam para sua adulteração com medicamentos sintéticos, muitas vezes adicionados com o intuito de potencializar efeitos, resultando em reações adversas ou diminuição da eficácia devido à interação entre componentes. Em locais como a China, algumas misturas são permitidas e legalizadas, não incorrendo em adulteração (Zhang *et al.*, 2012).

A substituição intencional ou acidental de uma espécie vegetal por outra, ou seja, a falsificação, relaciona-se a causas variadas, como o compartilhamento de nomes populares por diferentes espécies, similaridades morfológicas, ausência de preconização, escassez de fornecedores e dificuldade na obtenção, devido à ocorrência em áreas restritas ou de proteção ambiental, sendo comumente substituídas por outras espécies ocorrentes na região (Prakash *et al.*, 2013). Como diferentes plantas normalmente têm ações divergentes, a falsificação pode resultar em ineficiência do tratamento terapêutico, ou ocasionar prejuízos à saúde do consumidor, caso a espécie substituída cause efeitos tóxicos.

Por sua vez, a contaminação é definida como a “introdução não desejada de impurezas de natureza química ou microbiológica, ou de matéria estranha, em matéria-prima, produto intermediário e/ou produto terminado durante as etapas de amostragem, pesagem, formulação, produção, (re)embalagem, armazenamento ou transporte”, nos termos da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) n. 658, de 30 de março de 2022, que dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos (Brasil, 2022a). O inadequado manejo dos produtos de origem vegetal nas diferentes etapas de produção, desde o cultivo até a comercialização como droga vegetal, é responsável pela ocorrência de contaminações (Bugno *et al.*, 2006), que evidenciam a ausência ou imperícia do controle da qualidade pelas empresas.

Durante o cultivo, por exemplo, podem ser incorporados resíduos de pesticidas, bem como metais pesados provenientes do solo e da água, sendo mercúrio, arsênico e chumbo os principais; na comercialização, podem-se verificar poeira e metais tóxicos oriundos das emissões veiculares (Zhang *et al.*, 2012). Enquanto o uso de pesticidas representa um problema de contaminação química, a não aplicação propicia o ataque de pragas agrícolas.

No processamento e armazenagem, negligências podem desencadear a proliferação de microrganismos, alterando propriedades do produto e, conseqüentemente, sua qualidade (Bugno *et al.*, 2006). Além disso, a contaminação microbiana representa um risco iminente de infecção, motivo pelo qual vários testes são preconizados na sexta edição da *Farmacopeia Brasileira* e alguns limites microbianos encontram-se estabelecidos para produtos vegetais, variando em função do tipo de preparação (Brasil, 2019a).

No caso de drogas vegetais, pode ocorrer também a chamada contaminação cruzada, definida pela RDC n. 658/2022 como “contaminação de determinada matéria-prima, produto intermediário, produto a granel ou produto terminado por outra matéria-prima, produto intermediário, produto a granel ou produto terminado durante as etapas de amostragem, pesagem, formulação, produção, (re)embalagem e armazenamento” (Brasil, 2022a). É insegura tal circunstância, visto que as plantas produzem uma diversidade de substâncias químicas e, por isso, são capazes de provocar, como qualquer medicamento, reações adversas, efeitos colaterais, interações com fármacos ou mesmo com aspectos do próprio paciente, como a sensibilidade a um determinado componente (Capasso *et al.*, 2000).

Em suma, adulterações, falsificações e contaminações interferem não apenas na qualidade do produto, mas também na saúde do consumidor. As plantas representam um recurso terapêutico com grandes potencialidades, mas deve ser garantida sua qualidade e, conseqüentemente, eficácia e segurança de uso. Apesar dos esforços das agências reguladoras no Brasil, a fiscalização dos produtos disponíveis no comércio ainda é incipiente, principalmente porque uma grande parcela do que é consumido provém do mercado informal e baseia-se no uso popular.

## Legislação

A falsificação e a adulteração de produtos destinados a fins terapêuticos ou medicinais, incluindo matérias-primas, medicamentos e insumos farmacêuticos, são contempladas no Código Penal, lei n. 2.848, de 7 de dezembro de 1940, em seu capítulo III, “Dos crimes contra a saúde pública” (Brasil, 1940). Incorre na pena de reclusão, de 10 a 15 anos, e multa, quem importa, vende, distribui ou entrega a consumo um produto “sem as características de identidade e qualidade admitidas para a sua comercialização”; se o crime for culposo, detenção, 1 a 3 anos, e multa. Para o invólucro ou recipiente de produtos terapêuticos ou medicinais com

falsa indicação, seja da presença de substância em quantidade menor que a mencionada, seja de uma substância que não se encontra em seu conteúdo, é prevista a pena de reclusão, de 1 a 5 anos, e multa. Dada a gravidade da violação do direito à saúde, previsto no art. 196 da Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 (Brasil, 1988), a adulteração e a falsificação de produtos destinados a fins terapêuticos ou medicinais são consideradas crimes hediondos (Brasil, 1990).

Com a finalidade de “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária”, a Anvisa foi criada pela lei n. 9.782, de 26 de janeiro de 1999, como instituição vinculada ao Ministério da Saúde (Brasil, 1999). Nesse sentido, a garantia e promoção da segurança, eficácia e qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos, bem como a regulamentação do seu cultivo, produção, distribuição e uso constituem diretrizes da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006 (Brasil, 2006).

As disposições sobre o registro ou notificação de fitoterápicos compõem a RDC n. 26, de 13 de maio de 2014 (Brasil, 2014), que entende “fitoterápico” como “produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico”. Podem ser dispensadas de registro, devendo ser notificadas na categoria de produto tradicional fitoterápico, as plantas medicinais na forma de droga vegetal, referidas como chás medicinais.

Nos termos da RDC, “droga vegetal” é “planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada”; “chá medicinal” é “droga vegetal com fins medicinais a ser preparada por meio de infusão, decocção ou maceração em água pelo consumidor”; e “notificação” é a “prévia comunicação à Anvisa informando que se pretende fabricar, importar e, ou, comercializar produtos tradicionais fitoterápicos” (Brasil, 2014).

De acordo com a RDC (Brasil, 2014), a notificação é permitida apenas aos chás medicinais listados no *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2021) e com monografia de controle da qualidade publicada na *Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2019b) ou em outra que seja reconhecida pela Anvisa. Além disso, é exigida a apresentação de um laudo de análise da droga vegetal para um lote, com informações de responsabilidade

do fabricante, indicando a especificação, o método utilizado e os resultados obtidos, com a caracterização da cor, identificação macroscópica e microscópica e descrição da droga vegetal em farmacopeias reconhecidas pela Anvisa. Se inexistentes, é considerada válida a descrição apresentada em laudo de identificação emitido por profissional habilitado ou outra documentação técnico-científica. Para a renovação da notificação, é exigido um novo laudo para o último lote fabricado.

Em alguns casos, chás medicinais integrantes do *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* não são notificados, sendo, na prática, comercializados como chás na área de alimentos (Amaral *et al.*, 2020). Tal enquadramento é irregular quando a espécie e parte utilizada não se encontram no anexo I da instrução normativa (IN) n. 159, de 1º de julho de 2022, que estabelece as listas das partes de espécies vegetais autorizadas para o preparo de chás e para o uso como especiarias (Brasil, 2022b). Dessa forma, é usual encontrar chás medicinais à venda em supermercados e bancas de jornal (Amaral *et al.*, 2020), embora a dispensação de plantas medicinais deva ser privativa de farmácias e ervanarias, enquanto a comercialização é permitida, também, às drogarias, conforme a lei n. 5.991, de 17 de dezembro de 1973 (Brasil, 1973) e a IN n. 9, de 17 de agosto de 2009 (Brasil, 2009). A comercialização irregular de chás medicinais como alimentos dificulta a aplicação de medidas específicas de controle sanitário, a exemplo da documentação referente ao laudo de análise da droga vegetal, que contém métodos e resultados da avaliação da autenticidade baseada no estudo morfológico (Brasil, 2014).

## Caracteres Morfológicos Diagnósticos e Plasticidade

Em conformidade com a definição de “droga vegetal” apresentada na RDC n. 26/2014 (Brasil, 2014), as respectivas amostras encontradas no comércio são comumente constituídas de fragmentos de órgãos secos da planta medicinal (Amaral *et al.*, 2021) (Figura 1) e, nesse caso, é improvável que seja suficiente, para a identificação taxonômica, a análise da morfologia externa baseada na forma, tamanho, cor, textura e odor, fatores possivelmente comprometidos no processamento e acondicionamento (Zhao *et al.*, 2006). Nesse contexto, a anatomia vegetal revela-se como ferramenta essencial à avaliação da autenticidade de drogas vegetais, que podem ser constituídas de diferentes órgãos, sejam eles vegetativos – tais como raízes, caule, rizoma e folhas – ou reprodutivos – flores, inflorescência, frutos e sementes.

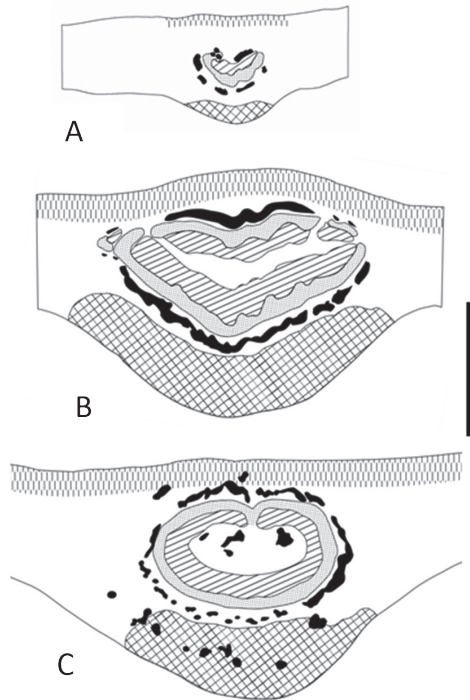
No *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2021), a droga vegetal indicada na fórmula de preparações extemporâneas frequentemente é a folha ou a inclui, como a “planta inteira”, “parte aérea” ou “sumidade florida”. Por esse motivo, ao órgão folha será destinada uma abordagem prioritária neste capítulo. No entanto, outros órgãos também são alvos de falsificação e adulteração no comércio, como as raízes de salsaparrilha (Martins *et al.*, 2014).

Historicamente, as folhas receberam especial atenção nos estudos de anatomia ecológica. Têm anatomia altamente variável, de acordo com o táxon (permitindo, muitas vezes, discriminar espécies, gêneros e famílias) e com características do ambiente onde se desenvolvem (como luminosidade, sombreamento e disponibilidade hídrica) (Vieira, 1995). Em geral, às variações qualitativas é atribuído valor sistemático, sendo considerados caracteres constantes e característicos de um táxon, por exemplo, a presença e o tipo de tricomas e estômatos, a organização do sistema vascular e o padrão de nervação, como é observado nos gêneros *Passiflora* (Passifloraceae) (Wosch *et al.*, 2015) e *Monteverdia* (Celastraceae) e seus adulterantes (Amaral *et al.*, 2021). Por sua vez, às variações quantitativas é atribuído valor plástico, sendo interpretadas como adaptações aos fatores ambientais aos quais se encontra submetido o organismo – como exemplo, tem-se o número de estratos epidérmicos e subepidérmicos (hipoderme), de camadas do parênquima clorofiliano (paliádico e lacunoso) e dos tecidos de sustentação (colênquima e esclerênquima), além da quantidade e posição de estômatos e tricomas (Vieira, 1995).

A identificação botânica deve basear-se em caracteres com valor sistemático, pois os de valor plástico são, em geral, pouco confiáveis ou informativos. A distinção entre essas duas categorias é necessária para cada espécie, descrevendo-se com exatidão a gama de variações anatômicas e a amplitude dessa variabilidade no corpo de um indivíduo e entre diferentes indivíduos, em relação ao ambiente, ontogenia e localização do tecido no órgão (Dickison, 2000).

A título de exemplo, o padrão e organização do sistema vascular em determinadas regiões da folha é apontado na literatura como um caráter diagnóstico adequado para a padronização de drogas vegetais, e a porção mediana do pecíolo e da lâmina foliar como a região padrão a ser descrita. No entanto, em algumas espécies, a estrutura desses tecidos varia ao longo da extensão do pecíolo e da nervura principal, como no gênero *Monteverdia*, em que se observa uma redução nos feixes vasculares em direção à região apical da folha, com grande variação no número e organização desses feixes na região mediana (Figura 2) (Joffily, 2002; Joffily & Vieira, 2005).

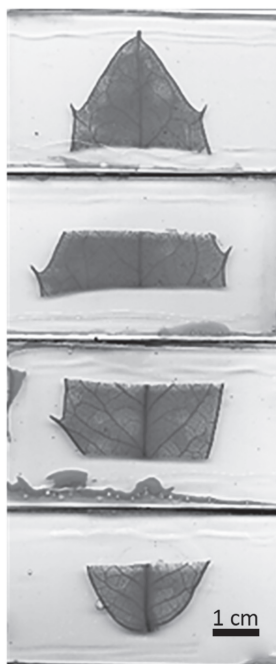
Figura 2 – Representações esquemáticas da organização da nervura principal em diferentes regiões da folha de espécies de *Monteverdia* (Celastraceae)



A = região apical; B = região mediana; C = região basal; barra = 500  $\mu\text{m}$ .  
Fonte: adaptado de Joffily, 2002.

Esse cenário torna-se problemático quando se leva em consideração que, no material fragmentado, a porção mediana da folha é de difícil identificação – enquanto regiões como a base podem ser identificadas pelo pecíolo, e o ápice, pelas características peculiares, conforme evidenciado em amostras comerciais de maracujá (Figura 1) e em folhas diafanizadas de espinheira-santa (Figura 3). Por esse prisma, é fundamental que estejam presentes, na documentação técnico-científica, a descrição de diferentes regiões do órgão e a identificação exata das regiões anatomicamente estudadas, de modo a permitir a completa e inequívoca caracterização das drogas vegetais e seus adulterantes.

Figura 3 – Folha de espinheira-santa, diafanizada conforme a metodologia descrita por Shobe e Lersten (1967)



### Etapas da Análise Morfológica de Drogas Vegetais para o Controle da Qualidade e Verificação da Autenticidade de Amostras Comerciais

Para a confirmação da identidade taxonômica de drogas vegetais e o controle da sua qualidade, podem ser empregados métodos físicos, químicos, moleculares e morfológicos, macro e microscópicos (Brasil, 2019a). Este último é o mais simples no que concerne à infraestrutura e recursos financeiros, sem prejuízo da confiabilidade, sendo, portanto, fundamental para a caracterização de drogas vegetais (Zhao *et al.*, 2006).

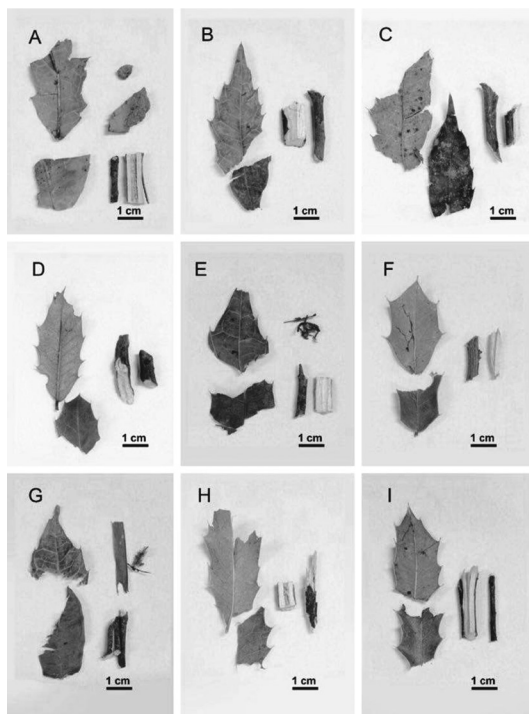
Conforme anteriormente descrito, particularidades intrínsecas a cada espécie de planta medicinal e aos respectivos órgãos que constituem a droga vegetal determinam a seleção de técnicas morfológicas específicas para a avaliação da autenticidade. A seguir, são apresentados métodos gerais que apresentam resultados efetivos no cotidiano da análise de amostras comerciais nas quais a droga vegetal é a folha.



## Análise preliminar

A avaliação de autenticidade inicia-se com a verificação do peso total da amostra, utilizando balança de precisão, seguida da determinação de matéria estranha, por meio da separação manual da droga vegetal de elementos como pedras, insetos e outras partes da planta ou de outros vegetais (Figura 4), inicialmente a olho nu, mas também com auxílio de lupa, em alguns casos. Se fragmentos com características distintas forem observados, são também incluídos na posterior avaliação da morfologia externa e anatomia da droga vegetal, a fim de confirmar a mistura de espécies. Em seguida, faz-se a verificação do peso efetivo da droga vegetal na amostra, utilizando balança de precisão, e a comparação dos pesos total e efetivo da amostra com o valor informado na embalagem.

Figura 4 – Elementos representativos de amostras comercializadas como espinheira-santa contendo fragmentos de folhas (droga vegetal) e matéria estranha, como pedaços de caule, outras espécies vegetais, pedra e tijolo



A-C, E, G = espécie adulterante; D, F, H-I = *Monteverdia ilicifolia*.

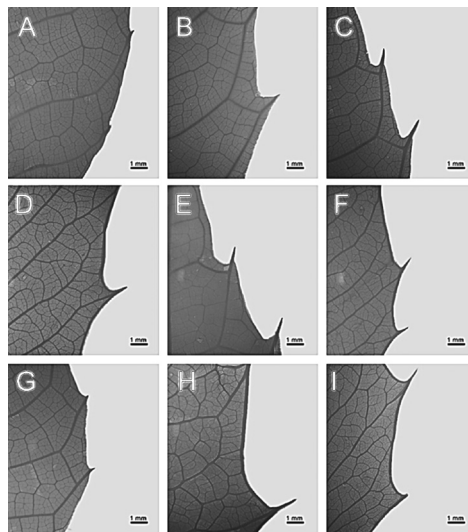
Fonte: Monteiro, 2017.

## Morfologia foliar externa

Para a análise da morfologia externa, as folhas são submetidas à diafanização, baseada na metodologia de Shobe e Lersten (1967): hidratação de três folhas inteiras ou fragmentos foliares de cada amostra em hidróxido de sódio 5%, em estufa a 60 °C, trocando a solução até completar o clareamento; lavagem com água destilada; imersão em hipoclorito de sódio 50% durante três minutos, caso haja pontos escuros; lavagem com água destilada; transferência para cloral hidratado até se tornarem transparentes; lavagem com água destilada; coloração com safranina aquosa 0,5%. Procede-se à montagem de lâminas semipermanentes em glicerina 50% entre duas lâminas, vedando-as com esmalte, e à observação e produção de fotografias, utilizando microscópio estereoscópico com câmera acoplada (Figura 5).

O padrão de nervação é analisado em comparação com a documentação técnico-científica disponível na literatura. Para angiospermas não monocotiledôneas, sugere-se a classificação de Ellis e colaboradores (2009).

Figura 5 – Folhas de amostras comercializadas como espinheira-santa, diafanizadas conforme a metodologia descrita por Shobe e Lersten (1967), evidenciando os padrões de nervação



A-C, E, G = espécie adulterante, com nervação semicraspedódroma; D, F, H-I = *Monteverdia ilicifolia*, com nervação craspedódroma simples.

Fonte: Monteiro, 2017.

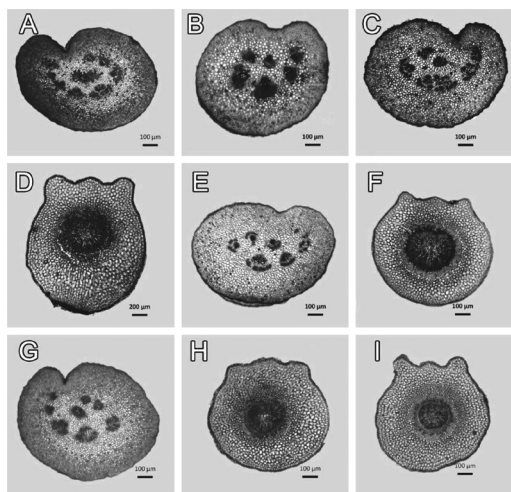
## Anatomia foliar

No estudo anatômico, pode ser necessário proceder à hidratação e amolecimento da amostra, em solução de glicerina e etanol 70% em iguais proporções durante, no mínimo, uma semana, ou em água destilada, mantida vedada em estufa a 60 °C durante pelo menos 24 horas, de acordo com as características do material vegetal.

A partir de três diferentes folhas ou fragmentos, são produzidas lâminas semipermanentes, conforme o seguinte procedimento: realização de cortes transversais à mão livre no pecíolo e lâmina foliar na região da nervura principal, com a obtenção de, no mínimo, três cortes para cada região de um fragmento; clarificação em hipoclorito de sódio 50%; lavagem com água destilada; neutralização em ácido acético 1%; lavagem com água destilada; coloração com safranina e azul de Astra em proporção de 9:1 volumes, descrita por Kraus e Arduin (1997); lavagem com água destilada; montagem em glicerina 50%, entre lâmina e lamínula. Com auxílio de microscópio óptico com câmera acoplada, as lâminas são observadas e fotomicrografias produzidas (figuras 6 e 7).

Para a identificação botânica, é feita a comparação dos dados morfológicos observados com a documentação técnico-científica disponível na literatura.

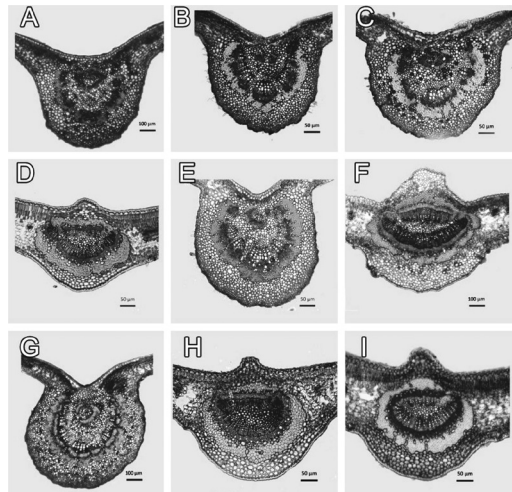
Figura 6 – Folhas de amostras comercializadas como espinheira-santa, em secção transversal do pecíolo



A-C, E, G = espécie adulterante; D, F, H-I = *Monteverdia ilicifolia*.

Fonte: Monteiro, 2017.

Figura 7 – Folhas de amostras comercializadas como espinheira-santa, em secção transversal da nervura principal



A-C, E, G = espécie adulterante; D, F, H-I = *Monteverdia ilicifolia*.

Fonte: Monteiro, 2017.

## Desafios para a Avaliação da Autenticidade de Drogas Vegetais Baseada na Análise Anatômica

A despeito da indubitável utilidade da anatomia como ferramenta para a análise de drogas vegetais comercializadas na forma fragmentada, a avaliação da autenticidade baseada em técnicas anatômicas enfrenta dificuldades relacionadas à necessidade de adequada documentação técnico-científica relativa às espécies vegetais, que deve ter definidos padrões morfológicos a serem utilizados pelo profissional com finalidade comparativa. Para muitas espécies com propriedades medicinais encontradas no comércio, inexistem monografias em farmacopeias (Willis, 2017), o que faz com que a respectiva literatura científica fique inconsistente. Com efeito, verificam-se descrições anatômicas divergentes entre autores para uma mesma espécie, não sendo claramente estabelecidos os caracteres constantes e os variáveis conforme influências ambientais, por vezes em razão da coleta de um ou poucos indivíduos por estudo; descrições incompletas, devido à utilização de metodologias distintas por cada autor, com diferentes regiões e planos de corte nos órgãos vegetais; além de estudos nos quais a identificação botânica do material é duvidosa, não sendo mencionado o depósito de material testemunho em herbário, nem

o determinador, ou seja, o indivíduo responsável pela identificação botânica do material, com conhecimento substancial em taxonomia (Zhao *et al.*, 2006; Eisenman, Tucker & Struwe, 2012; Rivera *et al.*, 2014; Wosch *et al.*, 2015; Dauncey *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2018).

De modo complementar, a fim de auxiliar a confirmação da autenticidade, é importante que na literatura científica integrem-se descrições anatômicas dos adulterantes. Quando pertencem a gêneros ou famílias diferentes da espécie original, circunstância frequentemente verificada, a confirmação da ocorrência de falsificação em amostras comerciais é, em geral, inequívoca. Tal situação pode ser exemplificada considerando o caso da espinheira-santa – *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral –, que pertence à família Celastraceae, mas é confundida com espécies de Moraceae, Leguminosae, Euphorbiaceae e Aquifoliaceae devido à presença de espinhos na margem foliar; nesse caso, é evidente a diferença morfológica macro e microscópica entre as famílias (Machado & Santos, 2004; Scheffer, 2004; Amaral *et al.*, 2021).

Todavia, se a descrição anatômica da amostra analisada corrobora a da espécie original, a possibilidade de falsificação pode ser excluída somente após o confronto com estudos comparativos envolvendo espécies a ela taxonomicamente relacionadas, as quais podem constituir adulterantes de difícil discriminação (Manhães, 2021). Quando um gênero tem grande riqueza de espécies, raramente tais estudos estão disponíveis na literatura; por conseguinte, a nível de espécie, o profissional apenas sugere a identificação botânica (Amaral *et al.*, 2021). Esse cenário é previsto em gêneros como *Mikania* (Asteraceae), do guaco, e *Passiflora*, do maracujá, os quais se encontram representados no Brasil por 199 e 157 espécies, respectivamente (Bernacci *et al.*, 2020; Ritter *et al.*, 2020). Entre elas, *Passiflora incarnata* L. é a única do gênero incluída na segunda edição do *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2021), enquanto apenas *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims têm monografia na sexta edição da *Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2019b). De *Mikania*, somente duas espécies são encontradas no *Formulário* (Brasil, 2021), entre as quais *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker possui monografia na sexta edição da *Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2019b) e *Mikania glomerata* Spreng. possui monografia publicada pelo Ministério da Saúde, na série *Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS* (Brasil, 2018).

A discriminação anatômica de espécies taxonomicamente relacionadas é fundamental porque a autenticidade da droga vegetal interfere não apenas

na eficácia, mas principalmente na segurança de consumo (Manhães, 2021). Embora seja usual que tais espécies compartilhem um perfil químico similar, particularidades na composição de cada uma podem conferir às preparações propriedades diferentes e relevantes (Costa *et al.*, 2018). Essa situação é evidenciada no gênero *Salvia* (Lamiaceae). Enquanto *Salvia officinalis* Linnaeus é considerada medicinal e especiaria, incluída no *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2021) e no anexo II da IN n. 159/2022 (Brasil, 2022b), *Salvia divinorum* Epling & Játiva é sujeita a controle especial, por estar incluída na “Lista de plantas proscritas que podem originar substâncias entorpecentes e, ou, psicotrópicas”, da portaria da Anvisa n. 344, de 12 de maio de 1998, sendo proibida sua importação, exportação, comércio, manipulação e uso (Brasil, 1998). Embora as duas espécies pertençam ao mesmo gênero e compartilhem alta similaridade morfológica, somente *S. divinorum* produz o diterpeno salvinatorina A (Willard, Mcguffin & Smith, 2012), a mais potente substância alucinógena de origem natural conhecida até o momento (Scheffler & Roth, 2003).

## Considerações Finais

Como se vê, a escassez de parâmetros para a verificação da autenticidade de drogas vegetais baseada na análise anatômica constitui um dos principais desafios para o diagnóstico de adulterações e falsificações de material botânico fragmentado. Dessa forma, é necessário estimular a realização de estudos e produção de documentação técnico-científica que estabeleça padrões metodológicos e morfológicos pertinentes às espécies medicinais contidas nos documentos oficiais e seus adulterantes. Considerando a notável relevância da anatomia vegetal como ferramenta para elucidar adulterações e falsificações, bem como a complexidade e responsabilidade envolvida no trabalho do anatomista, com implicações na saúde pública, é primordial o investimento na formação e capacitação de profissionais para atuarem nesse âmbito do controle da qualidade.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, F. M. *et al.* Analysis of labels of medicinal teas from formal trade and notes on the lack of concern for botanical nomenclature. *Research, Society and Development*, 9(9): e435997346-e435997346, 2020.
- AMARAL, F. M. *et al.* Pharmacobotanical characterization of *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reiss.) Biral leaves and its adulterants sold as medicinal tea in Brazil: a contribution to quality control. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 20(4): 386-393, 2021.
- BERNACCI, L. C. *et al.* Passiflora. In: Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- BRASIL. Decreto-Lei n. 2.848, de 7 dez. 1940. Código Penal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1940. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/del2848.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/del2848.htm)>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- BRASIL. Lei n. 5.991, de 17 dez. 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1973. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L5991.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L5991.htm)>. Acesso em: 30 jun. 2018.
- BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Constituicao/Constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm)>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- BRASIL. Lei n. 8.072, de 25 jul. 1990. Dispõe sobre os crimes hediondos, nos termos do art. 5º, inciso XLIII, da Constituição Federal, e determina outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1990. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L8072.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8072.htm)>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1998. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%2818%29PRT\\_SVS\\_344\\_1998\\_COMP.pdf/c4d48ff5-dd84-40d3-afb3-a705d659e559](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%2818%29PRT_SVS_344_1998_COMP.pdf/c4d48ff5-dd84-40d3-afb3-a705d659e559)>. Acesso em: 30 jun. 2018.
- BRASIL. Lei n. 9.782, de 26 jan. 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1999. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L9782.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9782.htm)>. Acesso em: 30 jun. 2018.
- BRASIL. Decreto 5.813, de 22 jun. 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2006. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2006/decreto/d5813.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/decreto/d5813.htm)>. Acesso em: 30 jun. 2018.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 9, de 17 ago. 2009. Dispõe sobre a relação de produtos permitidos para dispensação e comercialização em farmácias e drogarias. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2009. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_09\\_2009\\_.pdf/69483fc7-898c-4c28-8bc8-d8b8bb002fce](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_09_2009_.pdf/69483fc7-898c-4c28-8bc8-d8b8bb002fce)>. Acesso em: 30 jun. 2018.



- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n. 26, de 13 maio 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014. Disponível em: <[https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3171284/%285%29R-DC\\_26\\_2014\\_COMP.pdf/5b26b69d-c-252-4f57-8fae-6d631f8755b1](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3171284/%285%29R-DC_26_2014_COMP.pdf/5b26b69d-c-252-4f57-8fae-6d631f8755b1)>. Acesso em: 19 out. 2022.
- BRASIL. *Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: Mikania glomerata Spreng, Asteraceae – Guaco*. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/informacoes\\_sistematizadas\\_relacao\\_nacional\\_plantas\\_medicinais\\_interesse\\_sus\\_guaco.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/informacoes_sistematizadas_relacao_nacional_plantas_medicinais_interesse_sus_guaco.pdf)>. Acesso em: 5 mar. 2019.
- BRASIL. *Farmacopeia Brasileira*. v. 1. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019a. Disponível em: <[www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985j-son-file-1](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985j-son-file-1)>. Acesso em: 18 jun. 2021.
- BRASIL. *Farmacopeia Brasileira*. v. 2. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019b. Disponível em: <[www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7989j-son-file-1](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7989j-son-file-1)>. Acesso em: 18 jun. 2021.
- BRASIL. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2021. Disponível em: <[www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-capa2.pdf](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-capa2.pdf)>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n. 658, de 30 mar. 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2022a. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6415119/RDC\\_658\\_2022\\_.pdf/aff5cdd7-4ad1-40e8-8751-87df566e6424](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6415119/RDC_658_2022_.pdf/aff5cdd7-4ad1-40e8-8751-87df566e6424)>. Acesso em: 19 out. 2022.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 159, de 1º jul. 2022. Brasília: Anvisa, 2022b. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_159\\_2022\\_.pdf/f6971389-59ce-49b9-a921-b644d29970ce](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_159_2022_.pdf/f6971389-59ce-49b9-a921-b644d29970ce)>. Acesso em: 19 out. 2022.
- BUGNO, A. *et al.* Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 47-51, 2006.
- CAPASSO, R. *et al.* Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, 71: S58-S65, 2000.
- COSTA, V. C. O. *et al.* Comparison of the morphology, anatomy, and chemical profile of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*. *Planta Medica*, 84: 191-200, 2018.
- DAUNCEY, E. A. *et al.* Common mistakes when using plant names and how to avoid them. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(5): 597-601, 2016.
- DICKISON, W. C. *Integrative Plant Anatomy*. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000.
- EISENMAN, S.W.; TUCKER, A. O. & STRUWE, L. Voucher specimens are essential for documenting source material used in medicinal plant investigations. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(1): 30-43, 2012.
- ELLIS, B. *et al. Manual of Leaf Architecture*. New York: The New York Botanical Garden Press, 2009.
- JOFFILY, A. *Taxonomia e Anatomia de Cinco Espécies do Gênero Maytenus (Celastraceae-Celastraceae) Ocorrentes no Brasil*, 2002. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.



- JOFFILY, A. & VIEIRA, R. C. Anatomia foliar de *Maytenus* Mol. emend Mol. (Celastraceae), ocorrente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19: 549-561, 2005.
- KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. *Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal*. Seropédica: Edur, 1997.
- MACHADO, A. V. & SANTOS, M. Morfo-anatomia foliar comparativa de espécies conhecidas como espinheira-santa: *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), *Sorocea bonplandii* (Moraceae) e *Zollernia ilicifolia* (Leguminosae). *Insula Revista de Botânica*, 33: 1-19, 2004.
- MANHÃES, I. A. *Espinheira-santa* (Monteverdia ilicifolia) e seus possíveis adulterantes: uma abordagem diagnóstica, 2021. Monografia, Niterói: Universidade Federal Fluminense.
- MARTINS, A. R. *et al.* Use of anatomical, chemical, and molecular genetic characteristics in the quality control of medicinal species: a case study of Sarsaparilla (*Smilax* spp.). *Economic Botany*, 68: 410-425, 2014.
- MONTEIRO, S. S. R. *Avaliação da Qualidade de Amostras Comerciais de Folhas de Espinheira-Santa*, 2017. Monografia, Niterói: Faculdades Integradas Maria Thereza.
- PRAKASH, O. *et al.* Adulteration and substitution in Indian medicinal plants: an overview. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 1: 127-132, 2013.
- RITTER, M. R. *et al.* Mikania. In: Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5344>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- RIVERA, D. *et al.* What is in a name? The need for accurate scientific nomenclature for plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(3): 393-402, 2014.
- SCHEFFER, M. C. Uso tradicional e atual de espécies de *Maytenus*. In: REIS, M. S. & SILVA, S. R. (Orgs.). *Conservação e Uso Sustentável de Plantas Medicinais e Aromáticas: Maytenus spp., espinheira-santa*. 2. ed. Brasília: Ibama, 2004.
- SHEFFLER, D. J. & ROTH, B. L. Salvinorin A: the 'magic mint' hallucinogen finds a molecular target in the kappa opioid receptor. *Trends in pharmacological Sciences*, 24(3): 107-109, 2003.
- SHOBE, W. R. & LERSTEN, N. R. A technique for clearing and staining Gymnosperm leaves. *Botanical Gazette*, 128: 150-152, 1967.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. & MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28: 519-528, 2005.
- VIEIRA, R. C. Anatomia da folha de *Bauhinia radiata* Vell. em diferentes ambientes. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 38: 63-107, 1995.
- WILLARD, M. A. B.; MCGUFFIN, V. L. & SMITH, R. W. Forensic analysis of *Salvia divinorum* using multivariate statistical procedures. Part I: discrimination from related *Salvia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402: 833-842, 2012.
- WILLIS, K. J. (Ed.). *State of the World's Plants 2017*. Report. Kew: Royal Botanic Gardens, 2017.
- WOSCH, L. *et al.* Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 328-343, 2015.
- ZHANG, J. *et al.* Quality of herbal medicines: challenges and solutions. *Complementary Therapies in Medicine*, 20: 100-106, 2012.
- ZHAO, Z. *et al.* Authentication is fundamental for standardization of Chinese medicines. *Planta Medica*, 72: 865-74, 2006.



## 5

# Autenticação Genética de Plantas Medicinais

*Cassia Sakuragui, Francisco Prosdócimi e Ítalo Mario Cesari*

O aumento significativo do uso de medicamentos à base de plantas, que ocorreu em todo o mundo ao longo das últimas décadas, tem demonstrado corretamente que as plantas produzem importantes moléculas capazes de regular o metabolismo de outros organismos, destruir patógenos e trazer benefícios médicos e veterinários. Isso elevou a demanda por material vegetal e evidenciou diversas formas de adulteração que estavam sendo feitas por empresas que tentavam beneficiar-se indevidamente ao falsificarem não apenas os medicamentos fitoterápicos, mas também outros produtos de origem vegetal. A observação de que diversas formas de adulteração estavam acontecendo produziu demandas para a autenticação das matérias-primas vegetais – principalmente relacionadas às espécies de uso terapêutico que são utilizadas pela indústria e pelo comércio. Autenticar, nesse contexto, significa certificar, de forma inequívoca, que determinada amostra em questão é verdadeiramente uma certa espécie botânica. Esses métodos de autenticação precisam ser replicáveis, pois, em muitos casos, exige-se uma autenticação periódica das matérias-primas. A replicabilidade é, portanto, um dos principais desafios para a autenticação, como veremos no decorrer deste capítulo. Muitas das metodologias utilizadas para autenticação

morfológica, biológica e genética não são replicáveis e, por isso, não podem ser consideradas ferramentas.

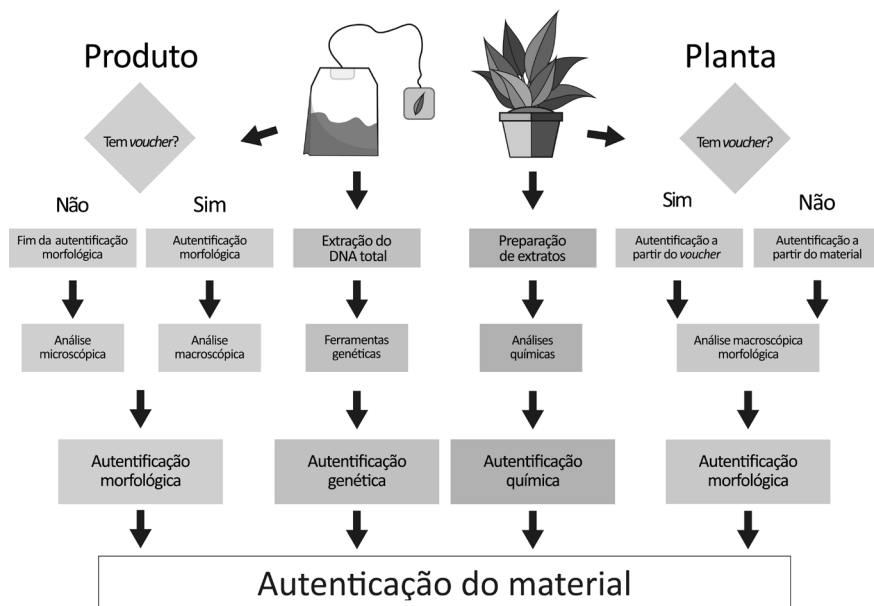
O código de barras do DNA, por exemplo, é um processo de autenticação que usa sequências genômicas curtas e padronizadas para a identificação das espécies. Essa tecnologia é bastante confiável e seus resultados não são afetados por fatores ambientais, nem pelo grau de amadurecimento do vegetal, tampouco pela parte vegetal utilizada. Existem, entretanto, desafios a serem superados no uso de tal ferramenta genética. Entre elas, podemos enumerar: dificuldades no isolamento de DNA de alta qualidade; remoção de metabólitos secundários; estabelecimento de regiões do DNA que sejam constantes, mas que também apresentem variabilidade entre as espécies.

Uma outra questão atual é que, para as indústrias e empresas privadas, o processo de autenticação genética esbarra no uso de algumas tecnologias patenteadas que podem ser utilizadas gratuitamente apenas para fins de pesquisa. É o caso das reações de amplificação de DNA conhecidas como PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase), as quais são imprescindíveis para a autenticação de plantas medicinais em que se utiliza a técnica do código de barras de DNA.

## Autenticação Química e Biológica de Espécies Vegetais

A autenticação biológica dá-se por meio da análise de fragmentos ou pó de tecidos vegetais num microscópio. Por exemplo, existem plantas que apresentam células epiteliais bastante específicas, outras são compostas de um conjunto de tecidos arrançados de maneira própria, mas poucas plantas são autenticadas somente por essa análise (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática da autenticação de produto ou planta medicinal



## Regulamentação Molecular de Plantas Medicinais

Existe um consenso de que os medicamentos à base de plantas devem ser adicionados aos sistemas de farmacovigilância local e nacional. Em países onde existe o controle de intoxicações com medicamentos, o aumento de casos é perceptível, o que demanda identificar os riscos e estabelecer padrões para a segurança de medicamentos de origem natural (Boer, Ichim & Newmaster, 2015).

Na Europa, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) apoia o uso de tecnologias analíticas inovadoras, tais como a utilização dos dados fornecidos pela técnica do código de barras de DNA, na complementação dos métodos tradicionais de identificação cromatográfica para detecção de substitutos, cargas e adulterantes em produtos à base de plantas (Raclariu *et al.*, 2018). Uma das primeiras ações foi a criação, na década de 1970, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), do Programa para Monitoramento Internacional de Medicamentos, baseado em dados armazenados em um banco global que é alimentado por mais de cem países, através de relatórios de segurança de casos individuais da OMS, o *VigiBase (Global Database of Individual Case Safety Report)*, gerenciado pelo Centro de Monitoramento de Uppsala (UMC), colaborador da OMS nesse projeto.

Considerando o desafio na regulamentação para a autenticação de plantas medicinais, ela ainda necessita de: padronização de protocolos moleculares, que depende de cada planta, do tipo de autenticação molecular utilizado, do conhecimento do código de barras do DNA para a espécie, da qualidade do DNA e dos métodos utilizados, entre outros; e criação e consolidação de bibliotecas e bancos de dados organizados com informações moleculares dos estudos já realizados e/ou em execução.

## Metodologias Baseadas em DNA na Identificação de Plantas

A genômica, a evolução e a filogenia das plantas estão em constante avanço e são interligadas entre si e com a fitoquímica. Elas tratam do conhecimento da origem e evolução dos genomas de plantas, bem como auxiliam em estudos do fenótipo metabólico, da correlação entre os dados genômicos, dos metabólitos produzidos e das vias biossintéticas usadas para produzi-los. A filogenia molecular e a filogenômica proporcionam previsibilidade de quimiodiversidade na bioprospecção, auxiliando a procura e a escolha de novas plantas a serem testadas quanto ao seu potencial terapêutico (Hao & Xiao, 2015).

A evolução de linhagens tem sido estudada através de marcadores moleculares, obtidos por sequenciamento parcial dos genomas vegetais. Alguns desses marcadores são considerados tão precisos para o reconhecimento de determinadas espécies que têm sido chamados de DNA *barcodes*, ou códigos de barras de DNA, que são sequências curtas de DNA encontradas unicamente no genoma de uma determinada espécie, garantindo, desse modo, sua identificação precisa. Assim, ao longo das últimas décadas, alguns métodos de identificação específica baseados em dados genômicos têm sido descritos para plantas medicinais (Techen *et al.*, 2014).

## Metodologias Baseadas em DNA no Controle de Qualidade Industrial

A padronização e a qualidade dos fitoterápicos garantem sua segurança e qualidade, e avaliar sua segurança é essencial para produzi-los em concordância com os padrões da OMS. A padronização é feita por meio de diferentes técnicas de identificação das plantas medicinais. O objetivo do controle de qualidade é buscar um padrão de qualidade, mas flutuações

ou pequenas diferenças são previstas e admitidas no processo de fabricação devido à variação natural morfológica e fitoquímica das espécies vegetais. A padronização e a garantia de qualidade requerem três atributos: autenticidade, pureza e ensaio. Com a autenticação, visa-se provar que o material é verdadeiro, o que envolve parâmetros estabelecidos por meio de análises morfológicas, microscópicas, químicas e moleculares. A qualidade de fitoterápicos depende da identificação segura das plantas.

Os marcadores moleculares são porções de DNA, compostos ativos ou biomoléculas, como proteínas, que são constituintes quimicamente definidos para a avaliação qualitativa e/ou quantitativa de um determinado material ou produto. Os marcadores de DNA, também chamados de marcadores genômicos, são preferidos para o controle de qualidade, visto que não estão sujeitos a variações do meio ambiente. As regiões não codificantes de DNA são mais adequadas, pois carregam informações particulares de cada organismo e apresentam a variabilidade necessária para a identificação, sem que as suas características se alterem em função do ambiente, parte da planta utilizada ou qualquer outro fator. Os marcadores moleculares de DNA frequentemente utilizados para identificação e autenticação de plantas podem ser baseados em várias técnicas, tais como RAPD (*random amplified polymorphic DNA*, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), AP-PCR ou AP-PCR (*arbitrarily-primed polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase preparada arbitrariamente), PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*, PCR-polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*, polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado), DALP (*direct amplification of length polymorphisms*, amplificação direta de polimorfismos de comprimento), SCAR (*sequence characterized amplified region*, região amplificada caracterizada por sequência) e SSRs (*single sequence repeats*, repetições de sequência única).

Os perfis genômicos são ferramentas importantes para o controle da qualidade de fitoterápicos e tem várias vantagens sobre métodos morfológicos e químicos. Além disso, é possível usar métodos moleculares de transcriptômica, proteômica e metabolômica, que são complementares.

### Autenticação genômica

O escopo da farmacognosia tradicional foi ampliado pela autenticação genômica que agregou marcadores moleculares para autenticação dentro da farmacognosia molecular. É a técnica mais usada e mais bem padronizada

entre as que veremos neste capítulo. De acordo com o método de análise dos marcadores genômicos, podemos dividi-los em: marcadores de hibridação, os que derivam de restrição, seguida ou não de amplificação; marcadores de PCR; e marcadores baseados em sequenciamento.

Os marcadores baseados em PCR envolvem a amplificação *in vitro* de sequências de DNA e usam sequências específicas de nucleotídeos conhecidas como iniciadores ou *primers*. Exemplos de técnicas em que se utilizam sequências arbitrárias ou randômicas são: RAPD, AP-PCR, DAF (*DNA amplification fingerprinting*, impressão digital de amplificação do DNA). Exemplos de técnicas mais sensíveis que utilizam iniciadores específicos são: semiespecífico primário – AFLP; iniciadores que detectam mutações específicas de sequência – SNP; marcadores baseados em microssatélites ou minisatélites – SSR, ISSR; marcadores baseados em transposon/retrotransposon – TD (*transposon display*, exibição do transposon); marcadores de junção – SCAR. O primeiro passo para realizar as reações em cadeia da polimerase é o isolamento do DNA, que pode ser dificultado pela quantidade de metabólitos na amostra.

Os marcadores baseados em hibridização têm um sistema de teste que utiliza a propriedade de pareamento de bases complementares, que permite que pequenos fragmentos de DNA sejam sondas que revelam os polimorfismos. Esses oligonucleotídeos iniciadores são fáceis de desenvolver e apresentam, em geral, baixo custo. Entretanto, a falta de reprodutibilidade torna esse método menos confiável e dificulta seu uso posterior na autenticação de características. Além disso, o RAPD oferece outras desvantagens, como ambiguidade na interpretação das bandas e a comigração de fragmentos de igual tamanho (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Exemplos de aplicações na autenticação de plantas medicinais são vistas nos trabalhos de Ruzicka e colaboradores (2009) e Cao e colaboradores (2010).

A técnica do AFLP fornece uma impressão digital do DNA e é baseada na amplificação, por PCR, de fragmentos gerados usando oligonucleotídeos específicos e envolve três etapas: 1) fragmentação do DNA e ligação de adaptadores oligonucleotídicos; 2) amplificação seletiva de conjuntos de fragmentos de restrição; e 3) análise em gel dos fragmentos amplificados. O método permite a amplificação específica de um grande número de fragmentos que são separados por eletroforese. O AFLP possui replicabilidade, resolução e sensibilidade (Mueller & Wolfenbarger, 1999) e permite a amplificação de 50 a 100 fragmentos de uma só vez. Nenhuma informação prévia da sequência é necessária para amplificação (Meudt & Clarke, 2007). Por sua vez, a

técnica que se baseia na identificação de microssatélites, SSRs ou repetições em tandem, trabalha com a identificação de sequências repetitivas de 1-6 pares de bases de DNA. Exemplos de aplicações na autenticação de plantas medicinais são vistas nos documentos de Su e colaboradores (2008) e Tamhankar e colaboradores (2009). Marcadores baseados em sequenciamento de genomas são usados para encontrar polimorfismos (mutações presentes em nível populacional) do DNA.

### Autenticação transcriptômica

Autenticação transcriptômica é uma análise global do perfil da expressão gênica de RNA mensageiro ou RNA total. Envolve o conhecimento do transcriptoma ou dos RNAs expressos, que determinam quais são os genes que estão ativos e como o nível de expressão gênica pode mudar durante a vida do organismo, diferentemente dos dados do DNA genômico, que se mantém constantes. Entre as tecnologias transcriptômicas para autenticação molecular, existem as abordagens baseadas em hibridização e em sequenciamento do DNA e RNA. Entre as técnicas de hibridização, uma delas é a incubação de DNA *microarrays* marcados com fluorescência, o que permite criar perfis para a expressão gênica. Nas abordagens baseadas em sequenciamento de cDNA (o DNA complementar ao RNA produzido em laboratório), são utilizadas técnicas dos tipos SAGE (*serial analysis of gene expression*, análise da expressão de gene em série), CAGE (*cap analysis gene expression*, expressão gênica de análise de cap), MPSS (*massively parallel signature sequencing*, sequenciamento de assinatura massivamente paralela), entre outras. O sequenciamento de RNA independente do genoma de referência, é uma tecnologia profunda, envolve a preparação da biblioteca de cDNA a partir do RNA (total ou fracionado). Embora possam ser adotadas, elas exigem um processamento de dados muito mais sofisticado do que as técnicas genômicas, utilizando análises estatísticas complexas.

### Autenticação proteômica

A proteômica ajuda na elucidação das proteínas produzidas por um organismo num determinado tempo. Ela possibilita estudar melhor as funções das proteínas produzidas em determinadas situações e constitui uma análise sistemática das proteínas traduzidas, permitindo também identificar



modificações pós-traducionais a que essas proteínas possam ter sido sujeitas. Ainda é necessário muito trabalho para o desenvolvimento de técnicas para a autenticação molecular nesse nível, ainda que a espectrometria de massa em *tandem* permita o conhecimento de proteínas obtidas de amostras de plantas medicinais.

### Autenticação metabolômica

A metabolômica envolve a análise quantitativa e qualitativa do conjunto completo de metabólitos secundários, principalmente presentes em um organismo. Como milhares de metabólitos são produzidos, essa técnica ajuda a encontrar alterações quantitativas deles em materiais de plantas medicinais. Ela é feita por meio de espectrometria de massas. É uma análise bastante complexa e precisa ser mais bem adaptada para a identificação molecular, contudo permite identificar precisamente metabólitos não proteicos muito importantes para a atividade farmacológica de extratos.

### Autenticação epigenômica

A epigenômica é o estudo das mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional, com a manutenção da sequência de nucleotídeos do DNA. É uma ciência que estuda desde padrões de expressão dos genes e suas mudanças no espaço e tempo, até a forma como os fatores ambientais podem influenciar a maneira como os genes são expressos. Os resultados desse tipo de estudo têm revolucionado algumas áreas na medicina, agricultura e biologia. Basicamente são três os mecanismos principais de alterações epigenéticas: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores. Na autenticação de plantas medicinais, essa abordagem permite a identificação especialmente das modificações pós-traducionais em proteínas histonas e modificações para análogos de bases nitrogenadas. Mudanças em mecanismos de expressão gênica em plantas medicinais podem ser avaliadas e contribuem para determinar se elas indicam diferenças no material utilizado ou se são produzidas a partir de variação ambiental. Entretanto, o esforço empreendido nesse trabalho normalmente leva ao pouco uso de tais técnicas para a autenticação molecular de plantas (Da-Cheng & Pei-Gen, 2018).

## DNA *Barcode* em Plantas

### Introdução à tecnologia de DNA *barcode*

O código de barras do DNA é um sistema em que se usam trechos espécie-específicos de sequência de DNA para a identificação inequívoca de espécies (Figura 2). O foco principal é que esta sequência universal seja conservada o suficiente no nível genérico e apresente diversidade suficiente no nível específico. O código de barras do DNA permite identificar uma amostra desconhecida utilizando classificação preexistente (Ganie *et al.*, 2015).

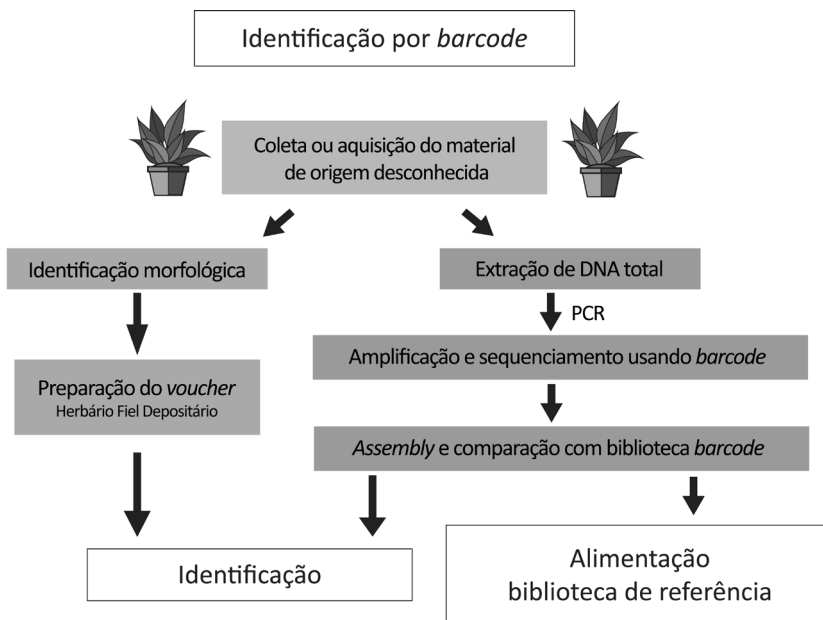
Hebert e colaboradores (2003) propuseram que o gene codificante da enzima citocromo oxidase 1 poderia ser usado como código de barras de DNA para muitos animais. Entretanto, devido à baixa taxa de mutação e evolução do DNA mitocondrial em plantas, o uso dessa enzima para o mesmo fim não foi viável em vegetais (Techen *et al.*, 2014). Dessa forma, a alternativa mais eficiente foi utilizar marcadores dos cloroplastos, associados a marcadores nucleares, como trechos de alguns genes *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *rpl36-rps8*, ITS e 5S rRNA (CBOL, 2009). Para cada grupo vegetal, existem propostas do emprego de códigos de barras baseados em genes ligeiramente diferentes, produzidos por alguma combinação dos genes citados. O uso de conjuntos de marcadores moleculares, bancos de dados e padrões de espécies vegetais fornecidos por grupos de pesquisa em todo o mundo tem aumentado o nível de confiabilidade dessa ferramenta (<[http://v3.boldsystems.org/index.php/Public\\_BINSearch?searchtype=records](http://v3.boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch?searchtype=records)>). Hoje em dia, o número de espécies estudadas por códigos de barras de DNA cujas informações estão disponíveis para comparação e certificação é muito alto.

### DNA *barcode* em espécies vegetais

Dois marcadores de cloroplastos mostraram os melhores resultados na identificação de múltiplas plantas com grande precisão. Eles consistem num trecho do gene *rbcL* (*ribulose biphosphate carboxylase large*, ribulose bifosfato carboxilase grande), considerado universal e com baixa variação em alguns táxons, e um trecho do gene *matK* (*megakaryocyte-associated tyrosine kinase*, tirosina quinase associada a megacariócitos). Cameron e Chase (1999) sugeriram que nem sempre a resolução desses marcadores é suficiente para a separação e a identificação de plantas de modo específico. Outros estudos mostraram que o uso de DNA *barcodes* do genoma nuclear, associados a

seqüências complementares, podem auxiliar na identificação de espécies medicinais (Li *et al.*, 2011), fraudes e espécies em extinção ou protegidas (Coghlan *et al.*, 2012), além de serem úteis na análise de adulterantes em produtos alimentícios (Kumar *et al.*, 2015).

Figura 2 – O DNA *barcode* são trechos espécie-específicos de seqüências de DNA que servem para a identificação de uma planta medicinal ou seus produtos



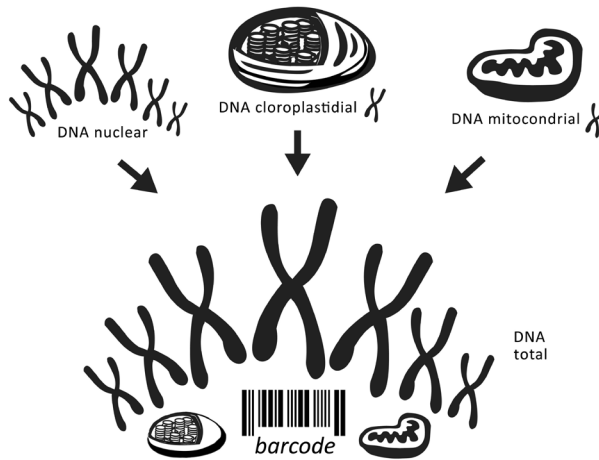
Essas seqüências alimentam uma biblioteca de referência para comparações de novas seqüências.

O uso de DNA *barcodes* para autenticação de plantas de interesse econômico tem apresentado bons resultados. Um exemplo é a do *Crocus sativus* L. (açafraão), uma planta medicinal importante e cara (Jiang *et al.*, 2014). Devido ao seu alto valor de mercado, os produtos à base dessa planta são frequentemente adulterados com *Carthamus tinctorius* L., *Calendula officinalis* L., *Daucus carota* L., *Curcuma longa* L. e *Zea mays* L. Os pesquisadores desenvolveram uma detecção precisa desses adulterantes usando o método de análise da curva de fusão juntamente com informações do código de barras.

### DNA vegetal

A palavra *genoma* refere-se ao repertório de DNA haploide contido em uma organela ou célula em particular. As plantas, em geral, têm dois genomas no núcleo, um terceiro na mitocôndria e um quarto no cloroplasto (Figura 3). Todos são importantes, entretanto o genoma nuclear é o maior e o mais complexo dos três. Ele transmite a grande maioria do conteúdo de DNA responsável pela expressão das características de um organismo vegetal.

Figura 3 – Genoma vegetal



O genoma vegetal é constituído de quatro genomas. O DNA *barcode* pode corresponder a seqüências específicas de qualquer um deles, sendo o cloroplastidial e os nucleares os mais utilizados em plantas.

Os genomas vegetais são grandes e codificam muitos genes. As angiospermas, grupo ao qual pertencem a maioria das plantas medicinais, têm 25 mil genes ou mais, sendo que para a maioria deles, a função ainda é desconhecida. Contudo, a grande maioria do genoma vegetal é não codificante. Além dos genes do genoma de vegetais de importância econômica, são estudadas as seqüências repetitivas, os RNAs não codificantes, os eventos de duplicação, entre outros (Zelenin, Badaeva & Muravenko, 2001).

O tamanho dos genomas vegetais pode variar muito. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., planta modelo para o estudo genético, tem aproximadamente 157 milhões de pares de bases (157 Mpb), enquanto o milho apresenta 2,3 bilhões de pares de bases (2,3 Gpb) e tem cerca de 70% do seu genoma composto de

seqüências repetitivas (Meyers, Tingey & Morgante, 2001). As seqüências repetitivas e elementos genéticos móveis como os retrotransposons e outros retroelementos são bastante comuns em plantas, sendo que tais inserções contribuem nas grandes diferenças de tamanho entre genomas vegetais. Outra característica genômica é a presença de eventos de poliploidização, entre 70 e 80% dos vegetais. Muitas plantas economicamente importantes são poliploides antigos, como o trigo, que tem um genoma muito grande (16 Gpb), cinco vezes maior do que o genoma humano, e que apresenta genoma oriundo de três diferentes genomas homólogos. Na genômica vegetal, os marcadores usados para autenticação de plantas medicinais são elaborados a partir dos genomas de cloroplasto e nuclear.

#### *Regiões-alvo para aplicação do DNA barcode*

Em plantas, a combinação de dois *loci* do DNA cloroplastidial permite atender aos critérios de universalidade e diversidade para o uso de um *barcode* vegetal padrão (CBOL, O banco de dados CBOL – *Consortium for the Barcode of Life*, em português Consórcio para o Código de Barras da Vida). Como já mencionado, o primeiro deles consiste numa região do gene *rbcL* com 599 pb, localizada na extremidade 5' do gene. O segundo consiste numa região de 841 pb, localizada no centro do gene *matK* e apresenta uma das mais rápidas taxas de evolução entre as regiões cloroplastidiais (CBOL, 2009; Hollingsworth, Graham & Litte, 2011). Embora sejam eficientes para algumas plantas, é necessário usar outros marcadores acessórios, quando esses dois não permitem a identificação precisa da amostra identificada em nível de espécie. Assim, mais duas regiões, *trnH-psbA* e ITS foram reconhecidas por códigos de barras de DNA (Bolson *et al.*, 2015). As regiões ITS estão localizadas no complexo genético do rDNA de todas as células eucarióticas (Yao *et al.*, 2010). Bolson e colaboradores (2015) utilizaram as regiões ITS e *trnH-psbA* para a diferenciação de angiospermas de florestas de araucárias, e o ITS foi o mais eficiente. Essas quatro regiões foram eleitas como DNA *barcodes* para plantas após testes com algumas regiões gênicas mitocondriais, cloroplastidiais e nucleares (Lahaye, Van der Bank & Bogarin, 2008; Newmaster *et al.*, 2013).

Outras regiões muito usadas como DNA *barcodes* são: *rpoC1*, *ycf5* e uma parte do ITS2. O rDNA nuclear seria a região mais adequada para aplicações do código de barras do DNA (Marcial-Quino, Mendoza-Espinoza & Sierra-Palacios, 2015). A capacidade de discriminação de ITS2 foi avaliada em mais de 6.600 amostras de plantas, 4.800 espécies e 753 gêneros diferentes, o que permitiu constatar que a taxa de identificação em nível específico foi de 92,7% (Chen *et al.*, 2010).

## Limitações e desafios do DNA *barcode* em plantas

O maior desafio em diferenciar espécies relacionadas através do DNA *barcode* esbarra ainda na descoberta de uma região universal e ao mesmo tempo variável o suficiente para abranger a maioria das espécies vegetais. O uso de vários marcadores aumenta as chances de autenticação, mas também coloca dificuldades. Cada amostra exige um protocolo diferente para cada marcador, e, por isso, a chance de que três protocolos funcionem a contento (são necessárias as três sequências amplificadas) fica menor. Além disso, todos os custos de reagentes triplicam. Finalmente, o uso do código de barras depende em grande parte da eficiência do processo de amplificação do DNA; para Ganie e colaboradores (2015), este é um dos aspectos mais complicados porque os marcadores de plantas medicinais são, em média, maiores do que 500 pb e, portanto, difíceis de amplificar de forma satisfatória.

## Construção de uma base de dados de DNA *barcode* de plantas medicinais

O banco de dados do CBOL, denominado BOLD (*Barcode of Life Database* – Banco de Dados de Código de Barras da Vida) (<[www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)>) está em sua terceira versão e conta com o depósito de sequências identificadoras para 310.284 diferentes espécies de vegetais, animais, fungos e protistas de todo o mundo, totalizando 8.090.251 de *barcodes* (Bold Systems, 2020). O Brasil, por meio do Projeto BrBOL (Brazilian Barcode of Life Network, Rede Brasileira de Código de Barras da Vida), contribui com o BOLD realizando a identificação molecular da biodiversidade brasileira em inúmeros diferentes projetos.

## Aplicações da tecnologia DNA *barcode* de plantas medicinais

Os códigos de barras de DNA têm servido como ferramenta eficaz e confiável para a autenticação de plantas medicinais. São muitos os códigos testados com sucesso até o momento, incluindo *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, ITS, ITS2, *rpoC1* (*Chloroplast rpoC1 gene*), *ycf5* (*Chloroplast ycf5 gene*). Com a utilização da ferramenta código de barras de DNA, em um estudo de autenticidade de preparações à base de plantas nos Estados Unidos, foi demonstrado, por exemplo, a adulteração da espécie *Actaea racemosa* L., Ranunculaceae, uma planta comumente usada por mulheres na pós-menopausa como substituto



Newmaster e colaboradores (2013) analisaram os constituintes em 44 fitoterápicos disponíveis no mercado e concluíram, com base na tecnologia do código de barras do DNA, que 59% dos produtos continham espécies vegetais não listadas nos rótulos. Essas informações foram divulgadas na mídia mundial, provocando forte reação da comunidade científica, que recomendou que a indústria de plantas medicinais utilizasse a ferramenta código de barras de DNA para a verificação da autenticidade dos constituintes vegetais em todos os seus produtos (Figura 4). Mohammed e colaboradores (2017) analisaram a eficiência do uso do código de barras na autenticação de plantas medicinais de forma mais geral.

## Tecnologias e Perspectivas

### Novos marcadores de DNA e tecnologias de sequenciamento: mini e metacódigos de barras

Os componentes das plantas medicinais passam por um processamento complexo, incluindo pulverização, extração, lixiviação, purificação, concentração, secagem e granulação, que podem destruir o DNA e dificultar a obtenção de códigos de barras completos, dificultando a identificação bem-sucedida das espécies. A técnica do minicódigo de barras do DNA foi proposta por Meusnier e colaboradores (2008) para superar as dificuldades associadas à amplificação do DNA degradado. Anteriormente, Taberlet e colaboradores (2017) demonstraram que uma região curta de tRNA-Leu (trnL) do DNA cloroplastidial, a alça P6 (10-143 bp), poderia ser amplificada a partir de amostras de alimentos processados. Os minicódigos de DNA ampliaram a utilidade do código de barras do DNA e têm sido considerados mais adequados para avaliar a qualidade e autenticidade de plantas medicinais em produtos (Song *et al.*, 2017). O minicódigo de barras do DNA é uma ferramenta complementar para identificar espécies de plantas medicinais que utiliza segmentos menores de DNA e que pode preencher as lacunas deixadas por outros métodos no campo da identificação molecular em planta (Gao *et al.*, 2017).

Uma outra terminologia usada para esse tipo de técnica é a “assinatura nucleotídica”, que consiste numa sequência de DNA muito curta (20 a 50 pb), única para uma espécie e muito conservada, com 100% de identidade de sequência pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local). Para detectar as sequências,



utiliza-se o minicódigo de barras. Essas assinaturas permitiram diferenciar o ginseng asiático do americano (Liu *et al.*, 2018).

O metacódigo de barras é uma técnica que usa *primers* de PCR universais para amplificar simultaneamente vários códigos de barras de DNA, identificando muitas espécies em amostras únicas. O ITS2 é muito usado em metacódigo de barras, pois suas sequências separam com alta eficiência espécies distintas. Os minicódigos de barras do DNA são semelhantes ao metacódigo, pois requerem regiões de sequenciamento mais curtas que os códigos de barras comuns (200 pb e 300 pb). Em estudos de metacódigo de barras, quando uma grande quantidade de sequências é analisada, o sequenciamento utilizando a plataforma do sistema Illumina® é o mais adequado (Taberlet *et al.*, 2012) e os trabalhos de Liu e colaboradores (2018) e Wang e colaboradores (2018) são exemplos de êxito no uso dessas ferramentas. Além disso, foi desenvolvida uma análise de fusão de alta resolução para uso com minicódigos de barras que não utiliza sequenciamento, sendo mais simples e mais econômica. A análise da curva de fusão foi introduzida na década de 1990, utiliza corantes fluorescentes e é capaz de detectar pequenas diferenças com alta resolução (Wittwer *et al.*, 2003). Exemplos do uso dessas curvas na identificação de espécies medicinais são encontrados em Duan e colaboradores (2018) e Mishra, Shukla e Sundaresan (2018).

Outra técnica consiste no uso de sensores de nanopartículas de DNA-ouro combinados com código de barras, permitindo uma detecção específica e sensível. Nesse caso, as nanopartículas de ouro se ligam ao DNA de fita simples e modificam suas cores permitindo que sítios com variação nucleotídica sejam detectados e analisados. O minicódigo de barras com as nanopartículas de ouro pode ser uma técnica para estudar organismos geneticamente modificados e detectar com sucesso a diferença entre espécies relacionadas. Essa técnica tem alta sensibilidade e resolve vários problemas, como a degradação inevitável do DNA pela manipulação do material, as baixas concentrações de DNA extraído e a baixa eficiência de amplificação por PCR (Lei *et al.*, 2015).

### Sequenciamento de próxima geração (NGS)

A técnica de sequenciamento de próxima geração (NGS) consiste no sequenciamento simultâneo de um enorme número de moléculas, gerando uma grande quantidade de dados genômicos medidos em milhões de sequências e gigabases de nucleotídeos. Ela é baseada na fragmentação do DNA e posterior amplificação em larga escala. A tecnologia NGS utiliza algoritmos

computacionais para filtragem, montagem e análise das sequências para caracterizar as espécies. As tecnologias mais usadas são as das plataformas Illumina® e MinIon®, que variam na capacidade de geração de dados e no tamanho dos fragmentos produzidos (Sarwat & Yamdagni, 2016). A geração dos dados por NGS auxilia na análise de transcriptomas de plantas medicinais que podem ser úteis no entendimento das respostas das plantas às mudanças ambientais. As metodologias de sequenciamento de RNA (cDNA) abordam questões relacionadas à epigenética e à adaptação das plantas ao meio e aos estímulos específicos que produzem a expressão diferencial de genes. Análises do transcriptoma fornecem dados importantes para rastrear metabólitos responsáveis pelas ações biológicas desejadas. Exemplos de estudos que usaram dados de NGS para autenticação de plantas medicinais são: Ghangal e colaboradores (2013) e Yun e colaboradores (2015).

A tecnologia NGS necessita que o DNA seja de alta qualidade, um problema para materiais secos ou processados. Mesmo para materiais frescos, a quantidade e a qualidade do DNA podem não estar adequadas. Outra dificuldade é a presença, mesmo em quantidades baixas, de polissacarídeos, taninos, óleos essenciais, fenólicos e alcaloides, que afetam a qualidade do DNA e podem inibir as PCRs e outras reações necessárias para a realização das técnicas de sequenciamento (Yun *et al.*, 2015).

## Perspectivas da Autenticação de Plantas Medicinais

A literatura sobre autenticação molecular de plantas medicinais aponta para combinações de métodos e marcadores. Por isso, é crucial estabelecer bibliotecas genômicas disponíveis no Brasil, para facilitar o processo de levantamento e comparação das informações. Várias plataformas de sequenciamento têm sido desenvolvidas e prometem avanços tecnológicos na resolução dos dados, como: a visualização em tempo real da incorporação de bases marcadas com fluorescência em uma única molécula de DNA imobilizada (no caso da tecnologia da empresa Pacific BioSciences); detecção da passagem em sequência dos nucleotídeos clivados de uma fita de DNA através de um nanoporo de proteína atuando como um sensor elétrico (no caso da tecnologia da empresa Oxford Nanopore Technologies); e a visualização direta das fitas de DNA com o uso da microscopia eletrônica (no caso da tecnologia da empresa ZS Genetics).

Uma abordagem promissora é o desenvolvimento de ferramentas baseadas em aprendizado de máquina e *deep learning*. Ambas as técnicas de inteligência artificial auxiliam na identificação automática (ou semiautomática) de uma

ampla cadeia de espécies de plantas. Nesta são processadas imagens ou sequências genômicas das quais são extraídas características e construídos padrões, com o objetivo de identificação (Wäldchen *et al.*, 2018).

## Considerações Finais

O perfil genético de espécies de plantas medicinais é uma parte extremamente importante no controle de qualidade dos produtos fitoterápicos. Entre as ferramentas genéticas citadas neste capítulo e usadas para autenticação de amostras de plantas medicinais, o DNA *barcode* é, ao nosso ver, a ferramenta mais adequada para se validar como padrão internacional efetivo e de baixo custo. Entretanto, as limitações discutidas ao longo do capítulo para o seu uso deixam claro que ele deve estar combinado com a identificação botânica (reconhecimento morfológico) e possivelmente com alguma identificação ou autenticação química do/s princípio/s ativo/s, de forma que se possa avaliar efetivamente a autenticidade e a consistência farmacológica das amostras de plantas medicinais utilizadas.

## REFERÊNCIAS

- BAKER, D. A.; STEVENSON D. W. & LITTLE, D. P. DNA barcode identification of black cohosh herbal dietary supplements. *Journal of AOAC International*, 95(4): 1.023-1.034, 2012.
- BOER, H. J.; ICHIM, M. C. & NEWMASER, S. G. DNA Barcoding and pharmacovigilance of herbal medicines. *Drug Safety*, 38: 611-620, 2015.
- BOLD SYSTEMS. Kingdoms of life being barcoded. Disponível em: [www.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser\\_Home](http://www.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Home). Acesso em: 13 abr. 2020.
- BOLSON, M. *et al.* ITS and trnH-psbA as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from Southern Brazilian Atlantic rainforests. *PLoS One*, 10(12): e0143049, 2015.
- CAMERON, K. M. & CHASE, M. W. Phylogenetic relationships of *Pogoniinae* (*Vanilloideae*, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America-eastern Asia phytogeographic disjunction. *Journal of Plant Research*, 112: 317-329, 1999.

- CAO, L. *et al.* Optimizing RAPD reaction system and authentic genuineness related genetic background of Fructus Evodia. *Chinese Traditional Herbal Drugs*, 41(6): 975-978, 2010.
- CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 12.794-12.797, 2009.
- CHEN, S. *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 5, 2010.
- COGHLAN, M. L. *et al.* Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns. *PLoS Genetics*, 8(4): e1002657, 2012.
- DA-CHENG, H. & PEI-GEN, X. Deep in shadows: epigenetic and epigenomic regulations of medicinal plants. *Chinese Herbal Medicine*, 10(3): 239-248, 2018.
- DUAN, B. Z. *et al.* Authenticity analyses of *Rhizoma Paridis* using barcoding coupled with high resolution melting (bar-HRM) analysis to control its quality for medicinal plant product. *Chinese Medicine*, 13: 8, 2018.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. Brasília: Embrapa. 1998. Disponível em: [www.researchgate.net/publication/264343631\\_Introducao\\_ao\\_uso\\_de\\_marcadores\\_moleculares\\_em\\_analise\\_genetica](http://www.researchgate.net/publication/264343631_Introducao_ao_uso_de_marcadores_moleculares_em_analise_genetica). Acesso em: 13 abr. 2020.
- GANIE, S. H. *et al.* Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*, 4: 83-99, 2015.
- GAO, Z. *et al.* Derivative technology of DNA barcoding (Nucleotide Signature and SNP Double Peak Methods) detects adulterants and substitution in Chinese patent medicines. *Scientific Reports*, 7: 5.858, 2017.
- GHANGAL, R. *et al.* Optimization of de novo short read assembly of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *PLoS One*, 8: e72516, 2013.
- HAO, D. C. & XIAO, P. G. Genomics and evolution in traditional medicinal plants: road to a healthier life. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 11: 197-212, 2015.
- HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of Royal Society of London B*, 270: 313-322, 2003.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W. & LITTLE, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*, 6(5), 2011.
- JIANG, C. *et al.* Barcoding melting curve analysis for rapid, sensitive, and discriminating authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) from its adulterants. *BioMedical Research International*, 2014.
- KRESS, W. J. Plant DNA barcodes: applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4): 291-307, 2017.
- KUMAR, J. U. *et al.* DNA barcoding to assess species adulteration in raw drug trade of “Bala” (genus: *Sida* L.) herbal products in South India. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61: 501-509, 2015.
- LAHAYE, R.; VAN DER BANK, M. & BOGARIN, D. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8): 2.923-2.928, 2008.
- LEI, Y. *et al.* J. Identification of Chinese herbs using a sequencing-free nanostructured electrochemical DNA biosensor. *Sensors*, 15: 29.882-29.892, 2015.

- LI, Y. *et al.* Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique. *Journal of Medical Plants Study*, 4: 2.706-2.709, 2011.
- LIU, Y. *et al.* Rapid authentication of *Ginkgo biloba* herbal products using the recombinase polymerase amplification assay. *Science Reports*, 8: 8.002, 2018.
- MARCIAL-QUINO, J.; MENDOZA-ESPINOZA, J. A. & SIERRA-PALACIOS, E. DNA barcoding: an alternative for the identification of the medicinal plants employed in Mexico. *Journal of Plant Sciences* 10 (4): 116-127, 2015.
- MEUDT HM, CLARKE A. C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science*, 12: 106-117, 2007.
- MEUSNIER, I. *et al.* A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9: 214, 2008.
- MEYERS, B. C.; TINGEY, S. V. & MORGANTE, M. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*, 11: 1.660-1.676, 2001.
- MISHRA, P.; SHUKLA, A. K. & SUNDARESAN, V. Candidate DNA barcode tags combined with high resolution melting (bar-HRM) curve analysis for authentication of *Senna alexandrina* Mill. With validation in crude drugs. *Frontiers in Plant Science*, 9: 283, 2018.
- MOHAMMED, A. B. *et al.* Review: DNA barcoding and chromatography fingerprints for the authentication of botanicals in herbal medicinal products. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 2017.
- MUELLER, U. G. & WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 389-394, 1999.
- NEWMMASTER, S. G. *et al.* DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Medicine*, 11(1): 222, 2013.
- PALHARES, R. *et al.* Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PLoS One*, 10(5), 2015.
- RACLARIU, A. *et al.* Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication. *Phytochemical Analysis*, 29(2): 123128, 2018.
- RUZICKA, J. *et al.* Identification of *Verbena officinalis* based on ITS sequence analysis and RAPD-derived molecular markers. *Planta Medica*, 75: 1.271-1.276, 2009.
- SARWAT, M. & YAMDAGNI, M. M. DNA barcoding, microarrays and next generation sequencing: recent tools for genetic diversity estimation and authentication of medicinal plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2): 191-203, 2016.
- SONG, M. *et al.* Identification of processed Chinese medicinal materials using DNA mini-barcoding. *Chinese Journal of Natural Medicine*, 15: 481-486, 2017.
- SU, H. *et al.* Use of inter-simple sequence repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipes*. *Journal Applied in Genetics*, 49: 233-235, 2008.
- TABERLET, P. *et al.* Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, 21: 1.816-1.820, 2012.

- TABERLET, P. *et al.* Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35: e14, 2017.
- TAMHANKAR, S. *et al.* Molecular profiling of “Chirayat” complex using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Planta Medica*, 75: 1.266-1.270, 2009.
- TECHEN, N. *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25: 103-110, 2014.
- WÄLDCHEN, J. *et al.* Automated plant species identification – Trends and future directions. *PLoS Computation Biology*, 14(4): e1005993, 2018.
- WANG, X. Y. *et al.* Detection of Cistanches Herba (Rou Cong Rong) medicinal products using species-specific nucleotide signatures. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1.643, 2018
- WITTWER, C. T. *et al.* High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC Green. *Clinical Chemistry*, 49: 853-860, 2003.
- YAO, H. *et al.* Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One*, 5: e13102. 2010.
- YUN, Y. E. *et al.* Next-generation sequencing identification and characterization of microsatellite markers in *Aconitum austrokoreense* Koidz., an endemic and endangered medicinal plant of Korea. *Genetic Molecular Research*, 14: 4.812-4.817, 2015.
- ZELENIN, A. V.; BADAIEVA, E. D. & MURAVENKO, O. V. Introduction into plant genomics. *Molecular Biology*, 35(3): 285-293, 2001.





## 6

# A Contribuição da Etnofarmacologia no Estudo de Produtos Naturais

*Danilo Ribeiro de Oliveira e Eliana Rodrigues*

O uso dos conhecimentos tradicional ou popular sobre as plantas medicinais na busca de substâncias biologicamente ativas é consagrado. O uso de plantas, segundo suas indicações medicinais baseadas na tradição, representa uma grande vantagem estratégica, ou seja, um atalho na descoberta de novos fitoterápicos e fitofármacos.

Nesse contexto, a etnofarmacologia é uma importante ferramenta no estudo das relações entre determinados grupos humanos e os recursos bioativos por eles utilizados, porque explora os saberes e as conceituações desenvolvidas por quaisquer culturas sobre suas práticas médicas e os agentes empregados terapêuticamente. Tais saberes vêm servindo de base para inúmeras estratégias etnofarmacológicas, amplamente empregadas em triagens biológicas (*screenings*) aplicadas a diversos propósitos terapêuticos, tais como: citotóxico/antineoplásico, imunomodulador/imunoestimulante, antialérgico, analgésico, anti-inflamatório, cicatrizante, antimicrobiano, antiviral, antimalárico, antidiarreico, hepatoprotetor, hipoglicemiante, anti-hipertensivo, contraceptivo etc. Este capítulo é dedicado às plantas medicinais na perspectiva dos estudos etnofarmacológicos, sem abordar os outros recursos envolvidos nessa ciência: animais, fungos, minerais, que não fazem parte do escopo deste livro.

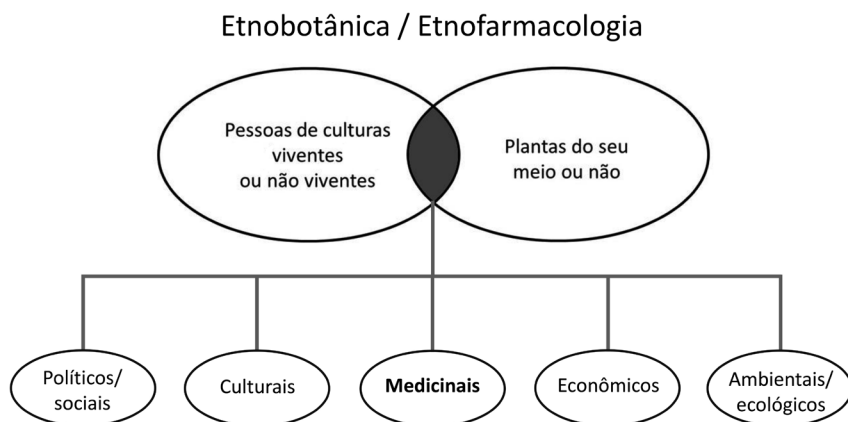


## Conceituando a Etnofarmacologia

Não é possível falar em etnofarmacologia sem conceituar a etnobotânica, ciência na qual se estuda a interrelação das pessoas e das plantas do seu meio, aliando-se a isso fatores culturais e ambientais e as concepções desenvolvidas sobre as plantas e o aproveitamento que delas se faz (Albuquerque, 2005).

Os estudos etnobotânicos sobre o registro de plantas, suas formas terapêuticas e seus usos por parte de grupos humanos têm alicerçado investigações, especialmente no campo da fitoquímica e da farmacologia, servindo de ferramenta para o descobrimento de novas drogas. Assim, etnofarmacologia insere-se como um ramo da etnobiologia/etnobotânica no qual se trata especialmente dos remédios usados em sistemas tradicionais de medicina (Elizabetsky & Coelho de Souza, 2004). A etnobotânica representa um universo de possibilidades no estudo da relação entre culturas “viventes” e “não viventes” e as “plantas do seu meio”, contudo, no caso de imigrantes, pode-se considerar a aquisição e o emprego de “plantas de fora do meio” em que se vive. Nolan e Turner, em 2011, definiram sete tópicos de pesquisa em etnobotânica contemporânea, que são: etnobotânica e conservação; etnobotânica simbólica; etnobotânica cognitiva; migrações históricas e etnobotânica; etnobotânica e o direito à propriedade intelectual; sistemas de classificação etnotaxonômicas; e etnobotânica médica. Esses tópicos remetem às abordagens demonstradas na Figura 1, considerando os aspectos: *culturais*, que abrangem elementos místicos/sobrenaturais/simbólicos; *políticos/sociais*, vinculados às políticas públicas, repartição de benefícios, ações afirmativas de inclusão etc.; *econômicos*, relativo às diferentes formas de aproveitamento das plantas para subsistência e geração de renda, arranjos produtivos locais etc.; *ecológicos/ambientais*, relacionados ao ecossistema e aos impactos sobre ele, como manejo e estratégias agroecológicas sustentáveis no cultivo de plantas medicinais; e *medicinais*, relativos à saúde e à qualidade de vida no emprego dos recursos naturais.

Figura 1 – Interfaces da etnobotânica e etnofarmacologia: perspectivas e desdobramentos acadêmico-científicos



A etnofarmacologia é uma disciplina recente no meio acadêmico. O termo surgiu primeira vez durante o Simpósio Ethnopharmacological Search for New Psychoactive Drugs, realizado em 1967, embora a ideia dessa disciplina já tivesse sido apresentada em 1931 por Louis Lewin na sua obra intitulada *Phantastica*, na qual o autor descreve e classifica as plantas usadas por diversas culturas no mundo como inebriantes, hipnóticas, excitantes, euforizantes e alucinógenas, trazendo contribuições muito relevantes. Essa descrição estava pautada na observação do consumo, na experiência prática de usuários, bem como em experimentos laboratoriais relacionados aos efeitos tóxicos e ações farmacológicas das drogas vegetais.

Originalmente, a etnofarmacologia era definida como uma ciência que procurava entender, a partir de trabalhos de campo, o universo dos recursos naturais (plantas e animais, entre outros) utilizados como drogas sob a ótica de grupos humanos. Uma dessas definições foi dada por Schultes (1988: 402): “a Etnofarmacologia, subárea da Etnobotânica, é uma disciplina recente, e refere-se ao uso médico ou pseudomédico de plantas e animais pelas sociedades pré-letradas”. Essa visão estava associada ao indígena ainda e vem sendo reforçada por alguns conceitos etnofarmacológicos mais recentes, como descrito pela Sociedade Internacional de Etnofarmacologia (2016): “estudo interdisciplinar das ações fisiológicas de plantas, animais e outras substâncias utilizadas nas medicinas indígenas das culturas do passado e do presente”. A pesquisa etnofarmacológica, bem como de seu potencial à descoberta de produtos naturais bioativos, estende-se muito além das ditas “sociedades primitivas ou pré-letradas”, abrangendo até mesmo comunidades não tradicionais ou

urbanas. Além disso, os termos primitivas ou pré-letradas tornaram-se incompatíveis com o fato de as comunidades servirem de fonte de conhecimento adquirido, ainda que de forma empírica, como uma ciência milenar, que pressupunha observação, experimentação, validação etc. (Elizabetzky, 1991).

Outros pesquisadores, ao longo do tempo, já definiram a etnofarmacologia no contexto dos estudos farmacológicos e fitoquímicos e não do trabalho de campo. Ou seja, plantas, fungos ou animais indicados durante os trabalhos de campo entre indígenas deveriam ser investigados por essa ciência, a fim de comprovar ou não o seu uso *empírico*; porém, o trabalho de campo em si não seria considerado um estudo etnofarmacológico. Nesse sentido, Heinrich (2014: 99, tradução nossa) definiu a etnofarmacologia como “uma abordagem científica voltada para a avaliação de atividades biológicas de preparações empregadas pelos humanos que têm, em um sentido muito amplo, efeitos benéficos ou tóxicos, ou outros efeitos farmacológicos diretos”. Para isso, afirma o autor, a “etnofarmacologia não constitui uma descrição dos usos (locais ou tradicionais), mas um amplo estudo dessas preparações entre as áreas antropológica-farmacológica-toxicológica associadas”.

Tais definições, de alguma forma, estabelecem um vínculo entre o conhecimento tradicional e/ou popular e o acadêmico, de modo que os dados das pesquisas de campo devam ser testados e comprovados, ou não, pela ciência acadêmica. Porém, essa não era a ideia original da disciplina, que se propunha a observar e descrever a medicina das outras culturas (Schultes, 1988). Os usos das plantas e animais e os seus efeitos eram vistos no contexto dos grupos humanos, não importando se a medicina oficial poderia valer-se dele ou não. Portanto, uma abordagem a ser considerada, mais ampla e menos exclusiva e utilitarista, é a de Santos e Fleurentin (1990: 26), que a conceituam como o “estudo científico interdisciplinar de materiais de origem animal, vegetal, ou mineral e conhecimentos relacionados e práticas que diferentes culturas usam para modificar o estado de um organismo vivo, através de propósitos terapêuticos (curativos/profiláticos) ou diagnósticos”.

## Quais os Possíveis Protagonistas nos Estudos Etnofarmacológicos?

Os estudos etnofarmacológicos podem ser realizados nas mais diversas culturas e povos, em ambientes urbano ou rural. Aqueles feitos com populações rurais são considerados mais promissores em virtude de um possível isolamento geográfico desses grupos em relação à medicina oficial, o que poderia

tornar a medicina local, muitas vezes, a única (ou principal) opção terapêutica disponível. Vale mencionar a distinção entre medicina tradicional e popular. A primeira está associada, de um modo geral, a determinados grupos, de acordo com os seus sistemas médicos, tais como as medicinas chinesa, aiurvédica, tibetana, nigeriana e indígenas; a medicina popular, em geral, é resultado da mescla de influências culturais diversas, congregando um conhecimento tradicional difuso.

No Brasil, os povos ou sociedades tradicionais são aqueles grupos que se diferenciam historicamente, do ponto de vista cultural, na reprodução do seu modo de vida, de forma mais ou menos isolada, com base na cooperação social e relações próprias com a natureza. Esses povos detêm modelos históricos e imemoriais de interação com a natureza que implicam na consolidação de ideias, através das experiências sentidas e vivenciadas por eles e seus antepassados, sendo presentes nos seus comportamentos, falas, crenças e tecnologias (Diegues & Arruda, 2001).

Esses conhecimentos tradicionais são produzidos e gerados de forma coletiva, por meio da troca e circulação de ideias e informações, e transmitidos de uma geração à outra (Santilli, 2005). No entanto, muitas vezes os conhecimentos não estão difusos nas sociedades e sim restritos aos curadores. Entre os índios da etnia krahô, os conhecimentos sobre como antagonizar doenças advindas de outras aldeias é particular ao curador/feiticeiro local (o *wajaca*) e não pode ser divulgado entre os membros daquela etnia ou traria fragilidades à própria aldeia a ser “protegida” pelo curador/feiticeiro. Contudo, os conhecimentos sobre as plantas que podem trazer riscos à saúde das gestantes, idosos e crianças da aldeia, que devem ser evitadas ou que se possam utilizar doses diferenciadas nesses estados e/ou fases de vida são disseminados (Rodrigues & Barnes, 2013). Nesse sentido, embora parte do conhecimento adquirido pelos curadores seja disseminado na sua comunidade, é importante enfatizar que nem todo conhecimento indígena é considerado coletivo pelos próprios indígenas, e nem poderia sê-lo. Ainda, outro paradigma que necessita ser quebrado é o fato de que esse conhecimento é passado para as gerações. Embora uma parte seja passada, esse conhecimento não é estático, e existem outras formas de sua aquisição, como seguir “pistas sensoriais” aliadas à Doutrina das Assinaturas, preconizadas por Paracelso (1493-1541), observar o comportamento de alguns animais no consumo de plantas e utilizar a intuição (Rodrigues, 2007).

No Brasil, as populações tradicionais são representadas pelos povos indígenas e demais sociedades tradicionais (não indígenas), como ribeirinhos, sítiantes e roceiros, quilombolas, caiçaras, pescadores artesanais, jangadeiros, praiheiros, açorianos, grupos extrativistas (seringueiros, castanheiros,

quebradeiras de coco, entre outros), sertanejos, pantaneiros, pampeiros (Diegues & Arruda, 2001), faxinalenses, pomeranos, retireiros do Araguaia, povos de cultura cigana e povos de terreiro (Brasil, 2007).

Quando pensamos qual parcela estudar de uma sociedade ou grupo, é importante considerar o conceito de comunidade tradicional e não tradicional. Então, o que diferencia “as comunidades” no âmbito das pesquisas nas áreas das ciências humanas e sociais? As comunidades tradicionais compreendem as indígenas e não indígenas, geralmente circunscritas a uma determinada localização. As comunidades tradicionais não indígenas também podem ser chamadas de “locais” quando o seu modo de vida e suas interações sociais e materiais são indissociáveis da diversidade biológica desse local e da reprodução dos conhecimentos tradicionais a ela associados. Atualmente, são denominadas de “grupo culturalmente diferenciado que se reconhece como tal, possui forma própria de organização social e ocupa e usa territórios e recursos naturais como condição para a sua reprodução cultural, social, religiosa, ancestral e econômica, utilizando conhecimentos, inovações e práticas geradas e transmitidas pela tradição” (Brasil, 2015). Essa definição é mais inclusiva, abarcando os povos de terreiros, ciganos, e até mesmo outros grupos que dependem da biodiversidade para sua sobrevivência, como as consolidadas e antigas comunidades que congregam o chá da ayahuasca.

O termo comunidade é amplamente empregado para designar categorias não tradicionais relacionadas a questões sociais, religiosas ou políticas. Exemplos frequentes desse emprego são as comunidades evangélicas, de permacultura ou carentes (precárias de serviços básicos e de infraestrutura, em que grande parte dos moradores tem baixa renda familiar), entre outras.

Na escolha do grupo humano que participará de um estudo etnofarmacológico, deve-se considerar o objetivo do estudo, visto que aqueles que envolvem o registro de plantas psicoativas, sobretudo as perturbadoras (Quadro 1), devem ser conduzidos entre indígenas e afro-brasileiros, pois eles não se deixaram inibir pela influência da Igreja católica e continuam usando plantas psicoativas nos seus rituais religiosos e de cura. Os caiçaras e ribeirinhos amazônicos praticamente abandonaram os usos dessas plantas após a incorporação da religião católica e, mais recentemente, da evangélica. Entre os ribeirinhos amazônicos tem-se observado o abandono de plantas relacionadas aos partos, uma vez que, na religião evangélica, não se pratica a reza. As parteiras administram animais e vegetais nas receitas para facilitar o trabalho de parto, rezam para que a criança nasça e, depois, continuam rezando para que a placenta saia do corpo. Sem reza não há como ser uma

parteira, assim perde-se um praticante de cura em virtude da mudança da religião local. Isso ocorre com outros praticantes de cura, como rezadores, benzedeiros e curadores, que utilizam rezas em seus processos de cura.

Quadro 1 – Exemplo das substâncias/plantas que agem no sistema nervoso central, classificadas como psicoativas

Depressoras	álcool, hipnóticos, ansiolíticos, analgésicos-narcóticos e outros
Estimulantes	antidepressivos e estimulantes da vigília
Perturbadoras	alucinógenos, anticolinérgicos e alguns solventes voláteis

Fonte: Chaloult, 1971.

## Pesquisa Etnofarmacológica: qualitativa e/ou quantitativa?

Conforme descrito anteriormente, uma das formas de aquisição do conhecimento tradicional dá-se pela transmissão de pais e avós aos seus descendentes, e essa transmissão quase sempre ocorre oralmente. O uso dos recursos naturais está fortemente presente na cultura popular, já que a maioria das comunidades detentoras do conhecimento tradicional não tem uma tradição escrita. Contudo, o preconceito trazido por fatores culturais, religiosos e econômicos diversos tem provocado uma interrupção dessa transmissão oral, resultando em uma erosão desse conhecimento. Métodos e técnicas da antropologia (etnografia) e da biologia (botânica e zoologia) podem ser integrados para preservar esse conhecimento. A etnografia registra a complexidade das medicinas locais, incluindo os usos terapêuticos de plantas, animais, fungos, minerais, algas, entre outras fontes naturais. Por sua vez, os métodos da botânica e zoologia são utilizados para a coleta dos recursos naturais das receitas (Rodrigues & Otsuka, 2011). Os métodos e análises dos dados ocorrem numa abordagem qualitativa ou quantitativa ou, ainda, envolvem ambas (Bernard, 2006; Vietler, 2002).

Atualmente, é considerado que a melhor abordagem seria, sempre que possível, um estudo qualiquantitativo (Vietler, 2002; Albuquerque *et al.*, 2014). Por um lado, os dados quantitativos permitem tratamentos estatísticos, robustez de resultados, extrapolações e comparações, que apenas a abordagem qualitativa não permitiria; por outro, o emprego apenas da abordagem

quantitativa não possibilita ao pesquisador compreender o que está por trás dos dados levantados, especialmente quando eles estão “impregnados por complexas representações simbólicas não facilmente decodificáveis e passíveis de serem ordenadas em termos temporais” (Eremites de Oliveira, 2003 *apud* Cavalcante, 2011: 356). Portanto, o mais adequado seria iniciar um estudo etnofarmacológico por uma abordagem qualitativa e profunda, para que se possa entender os fenômenos antes de medi-los; embora tenhamos dados estatísticos, eles não necessariamente refletiriam a realidade de determinado grupo humano.

Em estudos etnofarmacológicos é desejável que os representantes das culturas atuem como sujeitos participantes. Nesse contexto, técnicas de *rapport*, envolvendo o consentimento prévio e esclarecido daqueles que farão parte da pesquisa, contribuem na relação de confiança, interação e reciprocidade entre pesquisador e pesquisado (Barbosa, 2009). De acordo com Albuquerque, Lucena e Lins Neto (2014: 3), o *rapport* ajuda a conquistar a confiança e o respeito para conduzir um estudo com diversas culturas. Nas palavras dos autores,

As pessoas que vivem perto de fragmentos florestais protegidos provavelmente fazem uso dos recursos vegetais e animais da floresta, mesmo quando o acesso é proibido. Ganhar a confiança da população facilitará a coleta de informações porque as pessoas tendem a não dizer a verdade por medo de serem repreendidas.

De acordo com Eckert (1997), os registros etnográficos contemplam a entrevista e a observação (participante e não participante), permitindo um acesso mais efetivo aos significados, aos valores e às interpretações do grupo sobre sua própria dinâmica social e possibilitando ao pesquisador compreender a cosmovisão do grupo, distante do preconceito da visão academicista, vinculada à relação cartesiana do que se concebe como verdade-ciência.

## Êmico x Ético: rompendo preconceitos na pesquisa etnofarmacológica

Geertz (1999) destaca os prejuízos e limitações às pesquisas causados pelas dualidades entre exótico *versus* familiar, estranhamento *versus* familiaridade, “estar lá” *versus* “estar aqui”, “ser um deles” *versus* “não ser um deles”, trazendo uma reflexão para quem atua no campo etnobiológico, como na etnobotânica/etnofarmacologia, afirmando e assumindo a premissa

básica de que “somos todos nativos agora!”. Nesse contexto, é importante compreender as visões ou abordagens “êmica” e “ética”, conforme as apresentadas por Rosa e Orey (2012: 39, destaque do original):

*A abordagem ética* refere-se a uma interpretação de aspectos de outra cultura a partir das categorias daqueles que a observam, isto é, dos próprios pesquisadores e investigadores. Por outro lado, a *abordagem êmica* procura compreender determinada cultura com base nos referenciais dela própria. Em outras palavras, a *abordagem ética* é a visão externa, dos observadores e investigadores que estão olhando de fora, em uma postura transcultural, comparativa e descritiva, enquanto a *abordagem êmica* é a visão interna, dos observados que estão olhando de dentro, em uma postura particular, única e analítica. Então, a abordagem ética corresponde à visão do eu em direção ao outro, ao passo que a abordagem êmica corresponde à visão do eu em direção ao nosso... Contudo, é de extrema importância que determinada cultura seja primeiramente observada a partir da abordagem êmica, que procura compreender como os membros desse grupo cultural entendem as próprias manifestações culturais.

A observação no campo permite uma integração sem intrusão, entre o êmico e o ético, minimizando a influência de inventários superficiais pela aplicação fria de questionários. A análise êmica (“de dentro”) possibilita uma maior fidedignidade dos resultados, o que ocorre ao atingir a confiança recíproca (pesquisador *versus* pesquisado) e ao abrir a sua visão ao mundo alheio, desprovido de preconceitos, facilitando a compreensão de fenômenos biológicos encobertos ao pesquisador. Por considerá-los explicações mágicas e mitológicas, o pesquisador pode desprezar ou negligenciar muitas informações, considerando-as contos e lendas ingênuas.

A etnofarmacologia não trata de superstições, mas do conhecimento dos sistemas tradicionais de medicina, que é preciso admiti-lo, sem preconceito, como um corpo de conhecimento, um produto do intelecto humano (Elizabetsky, 1991). A maneira de enxergar uma alteração ou desequilíbrio à saúde na cultura popular/tradicional difere do padrão da medicina moderna, ao compreender a enfermidade como uma adversidade, sem caracterizá-la como uma doença propriamente diagnosticável em si (Oliveira & Leitão, 2018).

Não é suficiente para as ciências “etnos” saber apenas qual planta e em que dose é usada para uma doença. A compreensão dos conceitos saúde/doença da população, da forma como é preparado e administrado o recurso terapêutico e de quais suas consequências sob a ótica da cultura local é necessária,



e, com essas informações, pode-se relacionar os conceitos da comunidade com os biomédicos modernos. A seguir, serão apresentados alguns exemplos concretos para ilustrar os conceitos êmico e ético.

Durante um estudo etnofarmacológico realizado no Pantanal de Poconé (MT) (Rodrigues & Carlini, 2004), foi registrado o fumo tira-capeta. Ele é usado entre alguns quilombolas da Sesmaria Mata-Cavalos para “descansar e fortificar a cabeça”, “evitar gripe”, “problemas estomacais”, “dar sono” e acabar com o “vício” na maconha. O principal entrevistado, médium da umbanda e falecido em 2004, explicava que esse cigarro acabava com “vermes na cabeça”. Segundo seus relatos, essa doença era percebida quando a pessoa se queixava de “comichar a cabeça, o nariz, os olhos, o ouvido, entupimento de nariz, sem ser gripe. A pessoa sente uma dor que anda pela cabeça e não passa”.

O termo médico popular “vermes na cabeça” exemplifica a dificuldade que o pesquisador da área de etnofarmacologia encontra ao tentar estabelecer uma correlação entre um termo da medicina popular/tradicional, termo êmico, e aquele da medicina oficial, termo ético. Tal *tradução* poderia ser comparada a um tipo de quebra-cabeças e é um dos maiores desafios do pesquisador que realiza levantamentos etnofarmacológicos, sobretudo pela ausência de profissionais da área médica acompanhando os trabalhos de campo, que poderiam contribuir para estabelecer a correlação. Nesse sentido, a explicação fornecida sobre o termo “vermes na cabeça” (termo êmico) pode levar a imaginar que ele esteja relacionado à sinusite (termo ético); no entanto, não seria possível afirmar sem a confirmação de um médico e/ou exames clínicos.

Algumas vezes, tal correlação é prejudicada pela dificuldade de tradução. Esta se aplica aos casos das doenças negligenciadas, uma vez que raramente uma determinada comunidade refere-se às suas doenças com os termos usuais da medicina, como, por exemplo, leishmaniose (“lesho” ou “ferida brava”) ou esquistossomose (“barriga d’água”). Essa dificuldade dá-se em razão da falta de acesso a exames que confirmariam ou não o diagnóstico, sobretudo em locais com grande isolamento geográfico. Isso também se aplica ao “cobreiro” (termo êmico) associado no conhecimento popular a diversas doenças virais (herpes-zóster e catapora), bacterianas (impetigo) e fúngicas (impingem). Portanto, o diagnóstico preciso da doença (termo ético) é substituído de forma inespecífica por uma doença infecciosa dérmica que se espalha promovendo lesões na pele, gerando um aspecto visualmente análogo ao couro de determinados répteis e ao seu processo de troca de pele (ecdise), como o de uma cobra. Na Floresta Amazônica, povos tradicionais referem-se ao furúnculo (termo ético) como tumor (termo êmico), o que

poderia ser confundido, ou assimilado de forma imediata, com um câncer (Rodrigues, 2007).

Nesse contexto, ganha destaque a etnomedicina para compreender melhor a relação entre o ético e o êmico, por meio de dados qualitativos da pesquisa etnofarmacológica. Sem isso, muitas inferências equivocadas são realizadas em uma pesquisa científica enviesada, o que pode gerar uma pseudopesquisa etnobotânica/etnofarmacológica. A proposta de quantificar dados etnofarmacológicos antes de entender os fenômenos êmicos pode ser muito perigosa, pois pode-se tornar um desserviço do ponto de vista científico.

De acordo com Fabrega (1978), a etnomedicina é um campo de estudo que aborda comparativamente os diferentes quadros e interpretações de saúde e doença, com ênfase em um sistema médico de um grupo, com características socioculturais próprias. Assim, a relação entre a doença, o comportamento social e a adaptação do homem destaca-se na busca por se explicar a forma como determinados grupos sociais lidam com o adoecimento (ou adversidades) e os processos usados no reestabelecimento da saúde. As relações e derivações de um sistema médico compreendem uma cosmovisão sobre conhecimento do corpo (anatomia), seu funcionamento (dinâmica vital), formas de diagnóstico (anamnese), formas de tratamento e recuperação da saúde (intervenção). Portanto, de forma coletiva, a doença, ou mesmo algum sintoma, desequilíbrio ou adversidade, como um problema médico, tende a ser vista como uma categoria cultural e como um conjunto de eventos culturais relacionados a um grupo, em que o pesquisador não pode tentar rotular tal indicação ou menção como uma unidade analítica daquele povo, extrapolando a sua visão “ética”.

Analisando diferentes conceitos de enfermidade e doença entre populações tradicionais amazônicas, podemos verificar diversos contextos e interpretações simbólicas que influenciam a visão êmica sobre a forma de diagnóstico e tratamento. Existe a percepção de diferentes categorias de doenças, como: “doenças do espírito” *versus* “doenças do corpo” ou “doenças naturais” *versus* “doenças não naturais”. As “doenças do espírito” e as “naturais” têm forte interrelação entre mundo humano, natural e sobrenatural como: “mau-olhado”, “mau-olhado-de-sol”, “olho gordo”, “judiaria de gente”, “judiaria de bicho”, “psica”, “panema”, “malina”, “ramo de ar” e “quebranto”, entre tantas outras que podem deixar o pesquisador confuso e avesso, por não conseguir transportar as indicações para suas “categorias éticas” (Oliveira *et al.*, 2012).

Oliveira e colaboradores (2012) destacaram que as doenças naturais ou espirituais podem estar atreladas a elementos como vento, calor e frio, que provocam distúrbios e enfermidades, e remetem a uma analogia milenar

entre populações do Velho Mundo e do Novo Mundo. Eles mencionam que Hipócrates, conhecido como o “pai da medicina”, destacava o conceito quente-frio em sua teoria dos humores, em que as plantas quentes eram empregadas para tratar doenças frias, enquanto as plantas frias eram usadas para doenças quentes. Isso é observado no diagnóstico e no tratamento de povos amazônicos, como para ramo de ar, que está relacionado a acidente vascular cerebral ou derrame e é tratado com plantas quentes, como os óleos de gergelim (*Sesamum indicum*), andiroba (*Carapa guianensis*), piquiá (*Caryocar villosum*), banhas animais de sucuri, peixe elétrico e tartaruga, pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), alho (*Allium sativum*), gengibre (*Zingiber officinale*) e arruda (*Ruta graveolens*). Essa relação se repete para doenças quentes como a erisipela (“ensipa” ou “vermelha”), tratada com plantas frias como babosa (*Aloe* spp.), caapeba (*Piper marginatum*), diabinho (*Bryophyllum calycinum*), embaúba (*Cecropia* spp.), amor crescido (*Portulaca pilosa*) e manaiara (*Campsiandra comosa*). O tratamento de desordens e enfermidades relacionadas do trato urinário, como inflamações uterinas, pedras nos rins etc., também requer plantas frias e úmidas, como cana-do-brejo ou canafístula (*Costus* spp.), chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), verônica (*Dalbergia riedelii*) e unha-de-gato (*Uncaria* spp.). Muitas dessas são plantas típicas de locais com grande umidade.

A discussão entre o ético e o êmico é fundamental à pesquisa etnofarmacológica. Quando analisamos as indicações de usos tradicionais de recursos terapêuticos naturais, são comuns as menções genéricas relacionadas a órgãos do corpo humano, tais como doenças de pele, doenças do útero, doenças do fígado ou males do fígado. No caso de doenças de peito e doenças de pulmão, a relação dá-se com pneumonia e tuberculose, o que gera dificuldades de diagnóstico, se não houver o suporte dos resultados laboratoriais. Nas comunidades quilombolas de Oriximiná, o que eles acreditavam ser tuberculose era chamado de “enfraquecimento”, uma característica comum de quem tem esta enfermidade, que deixa as pessoas magras e debilitadas. Portanto, há casos em que há um “diagnóstico tradicional mais preciso”, ainda que sujeito a equívocos (Oliveira *et al.*, 2011a).

Até mesmo a questão de gênero é contemplada de forma inespecífica nas indicações de uso das plantas. As doenças de mulher, inflamação de mulher ou barriga de mulher são exemplos que podem estar relacionados a distúrbios menstruais, endometriose, ovário policístico, além de outras patologias (Oliveira *et al.*, 2014). No caso dos homens destaca-se a fraqueza de homem, relacionada com a impotência sexual ou ausência de libido. Questões como doença do mundo ou doença de rua remetem à promiscuidade e ao surgimento

de doenças sexualmente transmissíveis como sífilis, cancro e gonorreia. O diagnóstico ou a indicação de uso pode estar relacionado com uma característica da doença. Uma planta pode ser indicada para tratar vermelha, doença de pele relacionada à erisipela, que provoca uma vermelhidão e queimadura, em razão de um severo processo inflamatório dérmico, causado por infecção bacteriana. Fato similar ocorre para o amarelão, em virtude de a ancilostomíase promover uma anemia que leva a um quadro de icterícia (“desbotamento ou amarelamento da pele”). Portanto, é fundamental que o pesquisador esteja atento e sensível a todos os detalhes trazidos pelo pesquisado, de forma a não perder informações valiosas por conceitos preconcebidos (Figura 2).

Um dos maiores desafios da etnomedicina é o estabelecimento das categorias de uso medicinal segundo a lógica êmica. As classificações das doenças na perspectiva ética baseiam-se em sistemas usados pela biomedicina. Staub e colaboradores (2015) analisaram três sistemas: a Classificação Internacional de Doenças (CID); o Padrão de Coleta de Dados de Botânica Econômica (EBDCS); e a Classificação Internacional de Atenção Primária (CIAP). Os autores propuseram três sistemas de classificação, dependendo do foco da pesquisa: etnomedicina – as classificações locais devem ser entendidas em uma perspectiva êmica; análise transcultural – o CIAP como um padrão adequado que pode ser aplicado, mas modificado conforme necessário; e bioprospecção – sistema de classificação orientado por terapia biomédica, composta de 17 categorias de uso baseadas em medicamentos derivados de produtos naturais registrados.

Figura 2 – O pesquisador não perde um detalhe das informações trazidas por um indígena, que relata na visão êmica a importância daquela planta para ele



Ilustração Renato Takahashi.

Os estudos etnofarmacológicos também buscam – ou deveriam buscar – compreender em profundidade os aspectos descritos para a etnomedicina, já que, para se entender o contexto ritual e terapêutico do uso das diversas substâncias bioativas que fazem parte de rituais religiosos e das práticas necessárias à aplicação de sistemas médicos tradicionais/locais, é fundamental desvendar os aspectos levantados anteriormente.

## Tipos de Pesquisa Etnofarmacológica

Diversas são as abordagens etnofarmacológicas possíveis, das quais nem todas necessitam ser laboratoriais. Listamos parte delas a seguir.

- Levantamentos realizados durante trabalhos de campo, entre diversas culturas, a fim de conhecer os aspectos envolvidos no uso de agentes terapêuticos empregados na medicina local (Rodrigues & Barnes, 2013). Estudos que registram o conhecimento de determinados grupos nos aspectos do uso e segurança de plantas medicinais contribuem para demonstrar, ao longo do tempo, a tradicionalidade de uso, que pode auxiliar no desenvolvimento de produtos tradicionais fitoterápicos. Nesses casos, a comprovação dessa tradicionalidade por um período maior do que trinta anos pode contribuir para a inserção desse fitoterápico no mercado, sem que seja obrigatória a realização de todos os estudos de eficácia e qualidade (Oliveira, Oliveira & Marques, 2016). Pode-se incluir as chamadas etnofarmacopeias, destacando a *Farmacopeia Popular dos Raizeiros do Cerrado*, com 262 autores especialistas locais (Articulação Pacari, 2010).
- Estudos que partem do uso popular/tradicional de determinados agentes usados terapeuticamente, para o desenvolvimento de fitoterápicos e a oferta de novas opções terapêuticas. Dessa maneira, aproxima-se o “conhecimento empírico” da “fitoterapia baseada em evidências”, por meio de estudos pré-clínicos, com o uso de modelos *in vitro* e *in vivo*. Como exemplos, temos as seguintes atividades biológicas: antiulcerogênica da espinheira-santa para gastrites e úlceras; broncodilatadora do guaco como expectorante; hipoglicemiante da pata-de-vaca para diabetes; antilitiásica da quebra-pedra para cálculos renais; anti-inflamatória da copaíba e andiroba para dor e inflamação; ansiolítica do mulungu como calmante. Em muitos casos, a comprovação de eficácia e segurança não atende aos requisitos legais para registro de um fitoterápico, mas possibilita a prescrição

fitoterapêutica seguindo o modelo da “fitoterapia contemporânea”, em que muitas dessas espécies vegetais são preparadas e dispensadas em farmácias de manipulação e em programas de plantas medicinais e fitoterápicos, como Farmácias Vivas, em fórmulas magistrais (Saad *et al.*, 2016). Os estudos etnofarmacológicos “voltados à compreensão de um saber tradicional” geralmente não respeitam a forma de preparo, usando extratos brutos ou fracionados, como rotina dos laboratórios de pesquisa em produtos naturais; daí deriva o conceito da etnofarmacognosia, que é “a prospecção e o estudo de remédios de origem vegetal, mineral e animal preparados segundo técnicas apropriadas, de domínio de uma etnia ou comunidade” (Barbosa, 2009: 40). Um exemplo é o estudo da bebida aquosa, elaborada a frio, da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus*), usada na Amazônia na prevenção e tratamento de malária, entre outros usos (Oliveira *et al.*, 2011b).

- Estudos da etnofarmacologia que realizam triagens biológicas (*screening*) de plantas empregadas no tratamento de determinados sintomas e enfermidades para bioprospecção de agentes biologicamente ativos. Exemplos: plantas para tuberculose – *screening* antimicobacteriano (Oliveira *et al.*, 2011a); plantas para doença de Alzheimer e memória – *screening* de inibidores da acetilcolinesterase (Oliveira *et al.*, 2012); plantas para malária – *screening* antiplasmódico (Oliveira *et al.*, 2015). A aplicação de triagens biológicas etnodirigidas em larga escala (*high-throughput screening* – HTS) possibilita o teste de milhares de amostras (extratos, frações e substâncias isoladas) em pouco tempo, acelerando a descoberta de potenciais produtos bioativos oriundos do conhecimento tradicional associado.
- Estudos da etnofarmacologia que investigam determinadas classes químicas aplicadas a certas indicações terapêuticas, na interface com a quimiosistemática. Araújo e colaboradores (2008) demonstraram uma possível relação entre as plantas medicinais indicadas para o tratamento de inflamações e feridas e aquelas ricas em taninos e flavonoides consultando especialistas locais da Caatinga. Foi observada uma forte associação entre o teor de taninos e os usos populares atribuídos às plantas cicatrizantes e anti-inflamatórias; contudo, o mesmo não foi observado com relação aos flavonoides.

- Estudos da etnofarmacologia com determinadas espécies, gêneros e famílias, interagindo diretamente com a quimiosistemática. Oliveira e colaboradores (2006) realizaram um estudo focado em duas plantas medicinais do gênero *Lippia* (Verbenaceae) usadas tradicionalmente em Oriximiná, no Pará. Elas eram muito semelhantes, sendo ambas identificadas por taxonomistas como *Lippia alba*, embora fossem reconhecidas como duas etnoespécies – cidreira e carmelitana – diferenciadas pelos especialistas locais com base em mínimas diferenças botânicas e em seus usos medicinais. A cidreira era empregada principalmente como calmante, enquanto a carmelitana tinha como principal indicação o tratamento para gases e cólica de bebês. Finalmente, uma taxonomista especialista em Verbenaceae identificou a cidreira como *Lippia alba* e a carmelitana como *Lippia alba* fo. *Intermedia*, embora a segunda seja considerada uma sinonímia da primeira. Nesse estudo, os autores exploraram as diferenças entre os consensos de uso (etnobotânica quantitativa) associados aos dados botânicos, químicos e biológicos. A abordagem quimiosistemática pode ser muito explorada na diferenciação de uma diversidade de espécies vegetais de um mesmo gênero ou família usados com o mesmo fim, como as copaíbas (*Copaifera* spp.), quebra-pedras (*Phyllanthus* spp.), patas-de-vaca (*Bauhinia* spp.) ou mulungus (*Erythrina* spp.), demonstrando que muitas vezes uma comunidade reconhece determinada espécie como única, embora ela seja classificada em diferentes espécies pela taxonomia acadêmica, e vice-versa. A etnofarmacovigilância é um ramo das etnociências que se preocupa com a coleta, comparação, interpretação e análise de conhecimentos tradicionais relacionados a medicamentos tradicionais para melhorar a compreensão do perfil de segurança e danos desses medicamentos em relação ao seu uso por detentores de conhecimentos tradicionais e outros grupos (Rodrigues & Barnes, 2023).
- Estudos com base no conhecimento popular e/ou tradicional para identificar plantas (e outros recursos) que tenham restrições de uso, trazendo elementos para avaliação de seus riscos. Nesse contexto insere-se a etnofarmacovigilância, que chama a atenção para a relevância do registro dos aspectos de segurança, para além daqueles da eficácia, atestada em estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos (Rodrigues & Barnes, 2013). Como importantes exemplos: Lima e colaboradores (1995) realizaram um levantamento de plantas tóxicas em comunidades ribeirinhas do município de Acará, no Pará, onde foram identificadas

24 espécies venenosas, divididas em três categorias (tóxicas para pele, para o globo ocular e por ingestão); Rodrigues (2007) constatou que 15,6% das plantas registradas em três levantamentos etnofarmacológicos realizados na Amazônia, no Cerrado e no Pantanal de Poconé apresentaram algum/ns dos seis tipos de restrições de uso: abortivas, contraceptivas, contraindicadas na gestação, prescritas em doses inferiores para crianças e idosos, indutoras do trabalho de parto e as venenosas a animais e/ou humanos.

- Estudos etnotoxicológicos, que demonstram que a toxicidade de determinadas espécies e os riscos de uso desses recursos terapêuticos, a depender da forma de manuseio, preparo e administração, podem ser evitados ou minimizados. Diversos exemplos históricos podem ser mencionados, como o uso do veneno do curare para a caça; nesse caso, o indígena caçador que usava o veneno não poderia estar com qualquer lesão para manuseá-lo, logo existia um conhecimento empírico sobre a via de ação do curare (Soentgen & Hilbert, 2016). Contudo, a caça envenenada poderia ser consumida sem restrições pela via digestiva. Outro caso interessante é o uso medicinal de sementes do pinhão-branco (*Jatropha curcas*, Euphorbiaceae) por comunidades quilombolas de Oriximiná, no Pará. Elas relatam que cerca de seis sementes ingeridas por uma criança podem levá-la a morte. Porém, fazem o uso da planta, mas fazem a prévia detoxificação tradicional das sementes, o que leva à redução ou eliminação dos ésteres de forbol, a classe química predominantemente responsável pela toxicidade (Albino *et al.*, 2019).
- Estudos que comparam os conhecimentos etnofarmacológicos entre diferentes grupos e culturas. Rodrigues e Carlini (2006) comparam as medicinas indígena krahô e quilombola do Pantanal, considerando suas particularidades. Enquanto os indígenas krahôs indicavam apenas uma planta por “receita”, os quilombolas indicavam até dez; e, ao passo que os indígenas indicavam uma planta por doença ou condição, os quilombolas indicavam até sete usos terapêuticos para a mesma espécie. Esses dados permitiram entender que, na medicina indígena, a cura se dá em relação à doença, conquanto entre os quilombolas isso ocorra de acordo com o indivíduo.
- Estudos etnofarmacológicos envolvendo migrantes e fluxos migratórios. Um estudo de Garcia, Domingues e Rodrigues (2010) entre migrantes na cidade de Diadema, São Paulo, mostrou que o uso das plantas é



afetado pelos deslocamentos pelo território brasileiro. Diversas plantas foram adicionadas no repertório médico, em associação às doenças adquiridas nas cidades por onde passavam. Algumas foram substituídas no novo território por serem mais potentes na percepção dos migrantes, enquanto outras plantas tiveram seu uso mantido por serem reconhecidas como mais potentes para certos usos terapêuticos. Muitas plantas podem ser abandonadas durante o deslocamento, por tornarem-se “dispensáveis” pela ausência de certas doenças no novo local, como doença de Chagas, malária, esquistossomose etc. Porém, algumas práticas culturais fazem com que as plantas medicinais de origem sejam importadas, comercializadas e utilizadas por imigrantes.

- Estudos de dados etnofarmacológicos em literatura, para acessar o conhecimento sobre recursos medicinais. Plantas historicamente usadas contra doenças infecciosas, com uma possível atividade antimicrobiana (Coelho de Souza *et al.*, 2004); para febre e malária, com possível ação antiplasmódica (Brandão *et al.*, 2008); para doenças sexualmente transmissíveis, com possível atividade contra vírus, fungos e bactérias patogênicas das vias geniturinárias (Van Vuuren & Naidoo, 2010). Alguns estudos conduzidos a partir de fontes históricas dos séculos XVI ao XIX mostraram que as plantas foram pouco investigadas pela fitoquímica e pela farmacologia até o momento (Giorgetti, Rossi & Rodrigues, 2011). Literaturas contemporâneas são alvo de estudos etnofarmacológicos, como o conduzido por Otsuka e colaboradores (2010) que, ao estudarem 813 das 10 mil plantas descritas na coleção de Pio Correa (1926), o famoso *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, verificaram que apenas 104 delas haviam sido avaliadas pela fitoquímica. Fontes históricas da medicina tradicional chinesa e da aiurvédica têm sido exploradas quanto às suas fórmulas, muitas milenares, a exemplo de medicamentos chineses patenteados de formulações para o tratamento de viroses e em pandemias anteriores que vêm demonstrando resultados positivos no tratamento de Sars-CoV-2, como o *Lianhuaqingwen* e da decoção *Qingfei* (Ren, Zhang & Wang, 2020), compostas de 13 e 21 espécies vegetais, respectivamente.
- Estudos etnofarmacológicos que comparam plantas medicinais empregadas tradicionalmente de forma isolada com suas associações/combinções na medicina tradicional/popular, a fim de verificar se existe um efeito sinérgico e uma potencialização ou não com a associação, bem como a toxicidade (Naidoo *et al.*, 2013). Há estudos

realizados com uma combinação fixa de drogas vegetais da medicina tradicional chinesa para tratamento de acidente vascular cerebral, em que oito espécies vegetais usadas foram categorizadas como anti-inflamatórias, antitrombóticas e neuroprotetoras, resultando num efeito sinérgico, melhorando a circulação sanguínea e o fluxo sanguíneo no cérebro e protegendo-o contra a isquemia de forma superior as substâncias puras isoladas (Wagner, 2016).

- Estudos clínicos, duplos-cegos, randomizados, focados no desenvolvimento de novos fitoterápicos oriundos do conhecimento tradicional associado, com comprovação de eficácia e segurança, são extremamente necessários e garantem a confiabilidade para os prescritores e maior valor agregado aos produtos. Como exemplo o anti-inflamatório tópico à base de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*), Acheflan®, líder de venda no mercado nacional.
- Estudos de etnobotânica participativa, nos quais os próprios detentores do conhecimento tradicional registram seus saberes – podendo ser em suas línguas nativas – para uso por gerações futuras, por meio de capacitações recebidas de pesquisadores da academia (Rodrigues *et al.*, 2020). Sauini e colaboradores (2023) definem a etnobotânica participativa como “uma metodologia que envolve a participação ativa da comunidade no desenvolvimento da pesquisa, desde a definição dos seus objetivos, até o registro, análise e divulgação do próprio conhecimento, com apoio técnico da academia. Esse método contribui para o empoderamento dos membros da comunidade no que diz respeito ao uso dos recursos disponíveis no ambiente em que vivem, mantendo ao mesmo tempo os direitos de propriedade intelectual sobre seu próprio conhecimento”. Esse envolvimento tem-se dado também junto com profissionais da saúde, que contribuem para o conhecimento do que é usado, o diagnóstico situacional, atendimento de demandas da unidade de saúde e para a possível elaboração coletiva de materiais como memento terapêutico, seleção de espécies medicinais para Farmácias Vivas, cursos de capacitação, orientação à população (Santos, Léda & Oliveira, 2018; Léda *et al.*, 2019).
- Estudos etnofarmacológicos relacionados a medicalização do nome das plantas medicinais. Siqueira e colaboradores, em 2020, relataram o fenômeno da medicalização como um processo de substituição de nomes populares nativos por nomes de medicamentos comerciais,

princípios ativos ou pelas suas indicações terapêuticas, de acordo com o modelo biomédico ocidental e contemporâneo, o que tem se intensificado desde os anos 2000, tendo como exemplos: Anador<sup>®</sup>, Novalgina<sup>®</sup>, Atroveran<sup>®</sup>, Coramina<sup>®</sup>, Doril<sup>®</sup>, Elixir-Paregórico<sup>®</sup>, Figatil<sup>®</sup>, Heparema<sup>®</sup>, Melhoral<sup>®</sup>, Vick<sup>®</sup>, dipirona, penicilina, Terramicina<sup>®</sup>, insulina vegetal, mercúrio vegetal, iodex, saúde-da-mulher, entre tantos outros.

- Estudos etnofarmacológicos cujo objetivo é demonstrar o potencial econômico e tecnológico atrelado a determinadas espécies vegetais. Nesses casos, incluem-se na perspectiva política e social a importância da proteção do conhecimento “intelectual” de origem tradicional, a repartição de benefícios e a necessidade de se combater a biopirataria, como prática de apropriação indevida de recursos genéticos e/ou conhecimentos tradicionais associados, e sem consentimento prévio e informado dos guardiões e guardiãs desses saberes. Um exemplo importante é o trabalho de Oliveira e Nogueira (2017) sobre a relação entre o conhecimento tradicional associado e as patentes relacionadas a *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato).

## Aplicações da Pesquisa Etnofarmacológica

A etnofarmacologia não traz benefícios individuais ou coletivos, diretos ou indiretos, num primeiro momento, quando se trata de pesquisas de médio a longo prazo, com desdobramentos futuros. Dentre as possibilidades de sua aplicação, algumas são destacadas: valorização da diversidade cultural; valorização e conservação do conhecimento tradicional a respeito da utilização medicinal dos recursos naturais; entendimento sobre as dinâmicas do conhecimento tradicional local; promoção de pesquisas relacionadas a doenças do interesse do provedor do conhecimento tradicional associado; identificação de riscos e reações adversas de agentes naturais, a partir de observações das medicinas tradicionais e/ou populares; desenvolvimento científico e tecnológico de produtos oriundos do conhecimento tradicional; implementação de cultivo e/ou extrativismo sustentável (plano de manejo participativo); repartição de benefícios com povos tradicionais pelo conhecimento tradicional associado acessado; transferência de tecnologia e geração de renda em comunidades tradicionais; agregação de valor aos produtos originados a partir do saber de comunidade local.

A etnofarmacologia gera um universo de possibilidades. A lista de suas aplicações pode e deve ser ampliada, visto que é uma área de conhecimento nova no meio acadêmico. Sua importante interface com as ciências básica e aplicada reside nos conhecimentos oriundos de grupos humanos, impulsionando o direcionamento das pesquisas e a busca de novas opções e recursos terapêuticos.

## Etapas da Bioprospecção Guiada por Pesquisas Etnofarmacológicas

Na busca de novos medicamentos, cinco abordagens principais costumam ser consideradas para a seleção das espécies para aumentar a probabilidade de acerto: coletas randômicas, quimiotaxonomia, ecologia química, zoofarmacognosia e etnofarmacologia (Rodrigues & Otsuka, 2011).

Como estratégia na investigação de plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica pode combinar as informações adquiridas com os usuários da flora medicinal com estudos químicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento galênico. Nesse sentido, na Figura 3, é apresentada a sequência das etapas possíveis para o desenvolvimento de novos fitofármacos e fitoterápicos, tendo as pesquisas etnofarmacológicas como orientação.

A *primeira etapa* consiste em seguir as orientações éticas relacionadas com as pesquisas com seres humanos. Nessa etapa, é necessário registrar como se deu o processo de Registro do Consentimento Livre e Esclarecido (RCLE) com os entrevistados a fim de trazer todas as informações sobre a pesquisa, bem como sua garantia à recusa ou retirada da pesquisa, em qualquer momento, conforme previsto na resolução n. 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), complementada pela resolução n. 510/2016. Contudo, é fundamental saber se o grupo a ser pesquisado auto-define-se como uma comunidade tradicional, pois nesse caso passa a ser necessária a obtenção do Consentimento Prévio Informado (CPI), análogo ao RCLE, porém com a especificidade de envolver o conhecimento tradicional associado, submetendo a pesquisa à Lei da Biodiversidade (lei n. 13.123/2015) e ao seu decreto regulamentador (Silva & Oliveira, 2018).

A *segunda etapa*, antropológica e botânica, consiste na obtenção de dados etnofarmacológicos sobre preparo e uso das plantas medicinais, devendo ser acompanhada pela coleta e identificação botânica, com

depósito de material testemunho em herbário. A coleta dos dados deve ser conduzida por meio de entrevistas informais, não estruturadas, semiestruturadas ou estruturadas, observação participante e diários de campo (Bernard, 2006). Os entrevistados devem ser selecionados de acordo com métodos condizentes com os objetivos do estudo. Antes de iniciar o estudo, é necessário obter diversas autorizações e cadastros do governo para o acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado à coleta de plantas e o acesso a unidades de conservação, onde as comunidades em estudo estão alocadas (Rodrigues & Otsuka, 2011; Albuquerque *et al.*, 2014; Heinrich *et al.*, 2018). Essa etapa pode ser conduzida pelos próprios detentores dos conhecimentos tradicionais, por meio da etnobotânica participativa, a partir de capacitações recebidas por pesquisadores da academia. Os dados obtidos podem ser tão robustos quanto aqueles obtidos pelos etnofarmacólogos/etnobotânicos em outras abordagens (Hitziger *et al.*, 2016). Vale destacar os direitos de propriedade intelectual oriundos do conhecimento tradicional associado, que podem ser conduzidos pelos próprios detentores do conhecimento, sem intermediação de pesquisadores externos à comunidade.

A *terceira etapa* requer ampla revisão bibliográfica, de modo a orientar os estudos futuros, evitando repetição de trabalhos realizados e identificando as lacunas científicas no estado da arte da/s determinada/s espécie/s. A pesquisa bibliográfica é extremamente necessária para se buscarem modelos biológicos para os estudos farmacológicos o mais próximos possível ao uso tradicional que se pretende estudar (Elizabetsky & Coelho de Souza, 2004).

A *quarta etapa* envolve a química de produtos naturais, ou seja, análises químicas preliminares para obtenção de extratos, partições e caracterizações químicas, podendo ainda ser utilizada para a verificação da ausência de grupos químicos tóxicos e perigosos, como ésteres de forbol, glicosídeos cianogênicos, ácido aristolóquico, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides esteroidais etc. Em alguns casos não há problema em encontrar essas substâncias, desde que estejam abaixo de determinados teores ou que sejam empregadas exclusivamente para uso externo (Brasil, 2014).

A *quinta etapa* compreende os ensaios farmacológicos preliminares (*screening*), preferencialmente com modelos biológicos pertinentes às atividades procuradas de acordo com os usos, avaliando as formas tradicionais/

populares de preparo. Com a implantação de métodos de triagem em larga escala (HTS), pode-se testar o maior número possível de espécies, extratos e suas partições, ou seja, substratos de diferentes polaridades (Yunes & Cechinel Filho, 2016). Nessa etapa, torna-se mais barato e prático o uso de modelos *in vitro*, evitando o emprego de animais de laboratório.

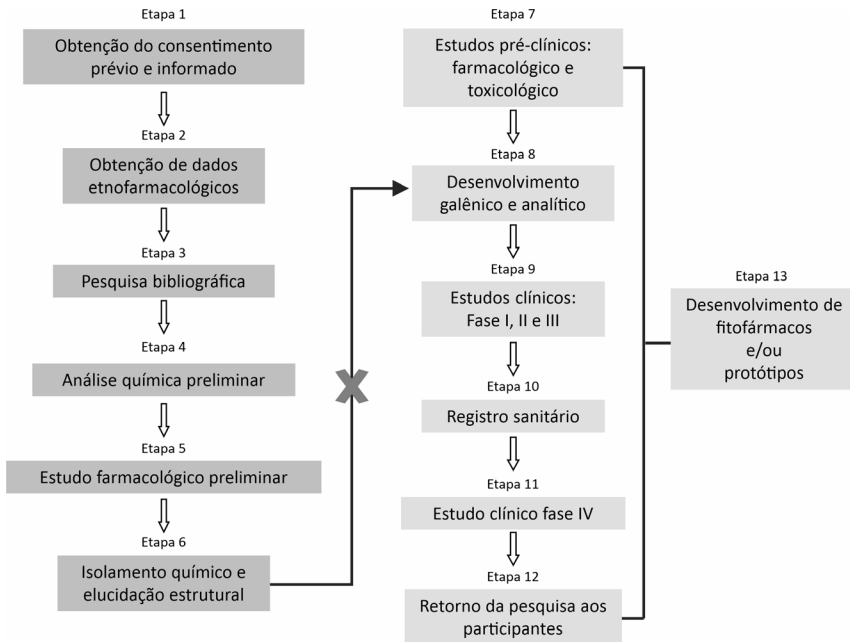
A *sexta etapa* prevê o isolamento e a purificação de substâncias dos extratos mais ativos, acompanhados da elucidação da estrutura dos princípios ativos, os quais devem ser submetidos aos ensaios biológicos na etapa anterior, a fim de se verificar um potencial aumento ou redução do resultado previamente encontrado (Lock, 2016).

A maior dificuldade no avanço das pesquisas com plantas medicinais é transpor a etapa seis para a sete e as seguintes. O desenvolvimento de um fitoterápico pode levar, em média, mais de 12 anos, com custo de milhões de dólares. Apenas um ativo vegetal, entre milhares de candidatos, gera um produto final com testes clínicos de fase III concluídos (Yunes & Cachinel Filho, 2016). Portanto, em razão do custo e do tempo, as etapas da segunda coluna da Figura 3 raramente são alcançadas. No Brasil, com a maior biodiversidade do planeta, isto é acentuado pela falta de comprovação de segurança e eficácia de espécies nativas, e uma boa parte do mercado fitoterápico nacional é composto de espécies exóticas (Oliveira *et al.*, 2016). Além disso, não existe grande interesse em produtos que sejam apenas bioativos, mas em produtos naturais com elevado potencial biológico.

A *sétima etapa* organiza-se assim: após autorização do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), dá-se início aos estudos toxicológicos e farmacológicos *in vivo* com o extrato mais ativo e/ou substâncias dele isoladas e caracterizadas, configurando a fase pré-clínica do estudo etnofarmacológico. Os testes toxicológicos e farmacológicos devem priorizar as preparações de acordo com as receitas populares/tradicionais (Barbosa *et al.*, 2012).

A *oitava etapa* consiste na validação do método analítico para o derivado vegetal, um extrato ou um fitofármaco. Paralelamente, dá-se início à escolha da forma farmacêutica mais apropriada e ao desenvolvimento galênico necessário para chegar a um novo bioproduto (Vilegas, Cardoso & Quevedo, 2016).

Figura 3 – Etapas envolvidas na busca de novos princípios ativos vegetais e desenvolvimento de fitomedicamentos ou fitofármacos e produtos derivados, a partir de pesquisas etnofarmacológicas



A *nona etapa* consiste nos estudos clínicos com seres humanos (fases I, II e III), acompanhados de estudos de farmacodinâmica e farmacocinética. Respeitando a legislação vigente para registro de fitoterápicos, em alguns casos é possível evitar o custo e o tempo necessários à realização de estudos clínicos. Para a notificação ou registro de produto tradicional fitoterápico, deve-se considerar e comprovar a tradicionalidade do uso seguro por um período superior a trinta anos (Oliveira, Oliveira & Marques, 2016).

A *décima etapa* é o registro sanitário do fitoterápico para que ele possa ser inserido oficialmente no mercado como produto farmacêutico industrializado. Essa etapa é desnecessária para fitoterápicos prescritos por fitoterapeutas, produzidos e dispensados em farmácias de manipulação, como formulações magistrais ou oficinais, ou usadas e comercializadas *in natura* como drogas vegetais (Anvisa, 2021; Barbosa *et al.*, 2012).

Na *11ª etapa*, acompanham-se os possíveis efeitos colaterais ou reações adversas, através da farmacovigilância, que é denominada de fase IV do estudo clínico, realizada a partir do momento em que o fitoterápico obtém

registro sanitário e começa a ser comercializado (Brasil, 2014). Essa etapa demonstra a preocupação sanitária com o fitoterápico, especialmente quanto à segurança dos usuários.

A 12<sup>a</sup> etapa consiste no retorno dos resultados aos sujeitos da pesquisa (grupo estudado). Os pesquisadores devem buscar formas de repartição de benefícios, monetária e/ou não monetária, já que toda pesquisa com seres humanos deve trazer benefícios individuais ou coletivos, diretos ou indiretos, sempre que possível (Oliveira *et al.*, 2010).

A 13<sup>a</sup> (e última) etapa consiste na identificação de protótipos para a síntese e modelagem molecular (estudos *in silico*). Nessa etapa, busca-se usar substâncias ainda mais ativas e menos tóxicas, o que pode ser acompanhado também de estudos biotecnológicos diversos (Yunes & Cechinel Filho, 2016), a exemplo do que acontece com lapachol, naftoquinona isolada do tronco do ipê-roxo, que tem sido alvo de inúmeros estudos sobre suas atividades anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalárica, anti-*trypanosoma*, antiulcerogênica, antimicobacteriana e antitumoral.

Aqui não foram contemplados os demais recursos naturais que fazem parte do conhecimento tradicional associado, como animais, fungos ou minerais, entre outros. Algumas vezes esses ingredientes compõem as receitas em associação com as plantas medicinais, e suas descrições são necessárias para a compreensão do uso tradicional e para a realização de testes de bioatividade. O conhecimento tradicional e/ou popular não precisa ser avaliado/testado pela *nossa* ciência para que seja válido. Ele existe independentemente da crítica ou avaliação pela *nossa medicina*. Além disso, quase não existem modelos farmacológicos que alcancem a racionalidade desses sistemas médicos, que sejam capazes de testar laboratorialmente determinadas indicações de uso.

Ainda assim, graças às pesquisas etnofarmacológicas, o conhecimento tradicional associado à flora já nos forneceu fármacos usados na clínica médica, ou que serviram de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos disponíveis no mercado. Como exemplo, temos a emetina (1817), quinina (1820), colchicina (1820), salicina (1827), atropina (1832), morfina (1833), codeína (1848), efedrina (1887), vincristina e vimblastina (1960) e artemisinina (1972). Além desses, há muitos fitoterápicos reconhecidos, disponibilizados comercialmente e prescritos mundialmente, originados do saber tradicional, por exemplo, ginseng, ginkgo, equinácea, arnica, alcaçuz, hipérico, valeriana, saw palmetto, sangue-de-dragão etc. (Yunes & Cechinel Filho, 2016; Lock, 2016).



## A Etnofarmacologia na Vanguarda da Descoberta de Princípios Ativos Naturais

Uma parte significativa dos medicamentos utilizados hoje provêm de informações obtidas de comunidades tradicionais. Segundo Farnsworth (1988), 74% dos derivados farmacêuticos de plantas superiores foram desenvolvidos a partir de uma abordagem etnofarmacológica.

A etnofarmacologia tem-se mostrado uma excelente ferramenta na descoberta de novos princípios bioativos, quando comparada a outros métodos como a abordagem randômica, conforme destacado na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação entre o número de acertos obtidos pelas abordagens etnofarmacológica *versus* randômica em pesquisas para diferentes atividades biológicas

Atividades biológicas	Abordagem randômica	Abordagem etnofarmacológica	Referências
citotóxica/ antineoplásica	6%	25%	Elizabetsky & Shanley, 1994
anti-helmíntica	9,8%	29,3%	Bourdy <i>et al.</i> , 2008
ictiotóxica	9,6%	38,6%	Bourdy <i>et al.</i> , 2008
tóxica/venenosa	10,5%	52,2%	Bourdy <i>et al.</i> , 2008
antimicrobiana	22%	37%	Boily & van Puyvelde, 1986
antiplasmódica	0,7%	18%	Carvalho & Krettli, 1991
	-	66,7%	Oliveira <i>et al.</i> , 2015
inibidora da acetilcolinesterase	8%	42,3%	Oliveira <i>et al.</i> , 2011a
antimico-bacteriana	16,7%	50%	Oliveira <i>et al.</i> , 2012

Segundo as pesquisas realizadas pelo Jardim Botânico de Nova York, o uso de conhecimentos tradicionais aumenta a eficiência do processo de seleção e investigação de plantas em busca de suas propriedades medicinais em mais de 400% (Shiva, 2001). Elizabestsky e Coelho de Souza (2004) compararam substâncias antivirais bioativas isoladas segundo a abordagem etnofarmacológica (usada por um determinado laboratório farmacêutico) e a abordagem randômica (empregada por um concorrente). Os resultados da abordagem etnofarmacológica foram muito superiores, já que o uso tradicional de plantas para doenças de origem viral direcionou o isolamento de diversas substâncias bioativas para o vírus sincicial respiratório (8,2%), vírus influenza (1,6%) e citomegalovírus (2,2%), enquanto na abordagem randômica muitas amostras foram testadas, resultando em baixíssimo número de substâncias ativas isoladas (0,013%) após inúmeras tentativas e erros.

## Etnofarmacologia na Prática: limitações e reflexões sobre trabalho de campo e pesquisa laboratorial

Na prática, uma das discussões importantes da etnofarmacologia é saber as limitações dos métodos laboratoriais, especialmente as relacionadas às análises químicas e farmacológicas, bem como do trabalho de campo, na perspectiva científica e acadêmica sobre os conhecimentos tradicionais e populares. Nesse sentido, cabem algumas reflexões: a farmacologia pré-clínica consegue *mensurar* os conhecimentos tradicionais? Existem métodos e modelos biomédicos capazes de avaliar esses conhecimentos? A biomedicina precisa validar esses conhecimentos para que tenham algum valor para a humanidade, ou tais conhecimentos já teriam um valor imensurável por si só?

Alguns exemplos podem ser destacados para estimular essa reflexão. Rodrigues e Oliveira (2020) reportaram o caso dos povos krahôs, em que mulheres indígenas amarram no próprio ventre uma entrecasca de árvore (envira) com a finalidade de determinar o sexo do filho a ser gerado, dias antes e durante o ato sexual – há espécies distintas e específicas para menino e menina (Figura 4). Tal prática cairia em descrédito para muitos pesquisadores. Contudo, seria de fato inviável que um cipó amarrado próximo ao ventre, por um longo período, com possíveis propriedades bioativas, tivesse alguma influência em seu sistema reprodutor que pudesse facilitar a seleção ou a potencialização de um gameta X ou Y, favorecendo-o no processo de fecundação? Como seria possível avaliar essa indicação em um modelo biológico?

Figura 4 – Uma rata com uma entrecasca amarrada em sua barriga buscando definir o sexo do filho que pretende gerar



Fonte: adaptado de Rodrigues & Oliveira, 2020.

Outra questão importante destacada por Oliveira e Leitão (2018) é que nem sempre é possível associar as indicações êmicas a termos éticos para a realização de estudos de bioprospecção oriundos do conhecimento tradicional associado. Ao estudar comunidades quilombolas de Oriximiná, no Pará, os autores buscaram plantas indicadas para: tratamento de tuberculose, pneumonia, tosse “braba” e doenças do peito, com possível atividade antimicrobacteriana; tratamento de malária, febre alta, males do fígado, com possível atividade antiplasmódica; memória, “caduquice” etc., com possível atividade inibidora da acetilcolinesterase. Os resultados obtidos mostraram-se em consonância com as formas peculiares de diagnóstico e tratamento em que o foco é o indivíduo, nas comunidades locais, em sua percepção holística, e não um alvo terapêutico ou a doença apenas. Dessa maneira, um indivíduo pode apresentar um quadro de desequilíbrio que, se não for reestabelecido, não poderá ser curado, seja de tuberculose, “memória fraca” ou malária. É frequentemente necessário, de acordo com o caso, o emprego de plantas tônicas, fortificantes ou revigorantes, entre outras. Muitas delas demonstram propriedades adaptogênicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunestimulantes ou imunomoduladoras, sendo responsáveis pelo fortalecimento do corpo e recuperação da saúde, resultando na cura ou melhora da qualidade de vida, de forma direta ou indireta.

## Considerações Finais

Ao considerarmos as características culturais do Brasil, principalmente no aspecto do rico saber acerca das plantas medicinais existentes nas diversas regiões do Brasil, verificamos que este é o momento de realizar o maior número possível de estudos etnofarmacológicos para que o conhecimento tradicional seja devidamente registrado, conservado e utilizado como subsídio às pesquisas com plantas medicinais. A urgência na realização desses trabalhos baseia-se no fato de o conhecimento tradicional e popular estar sendo rapidamente alterado ou até mesmo extinto, principalmente pela influência dos meios de comunicação de massa e em virtude do maior ou menor contato com processos de difusão da vida moderna, que tendem a modificar seus padrões existenciais.

A abordagem etnofarmacológica possibilita o emprego de diferentes modelos experimentais específicos e padronizados que serviriam de instrumento de avaliação de várias espécies vegetais, o que significa um menor custo na bioprospecção de produtos naturais e na obtenção de um produto final bioativo, seja ele um fitoterápico, um fitofármaco, seja um derivado obtido por semissíntese ou síntese.

A etnofarmacologia ainda possibilita uma interface com diversas outras abordagens ou subáreas na investigação de produtos naturais, como: etnomedicina, etnobotânica histórica, quimiosistemática, etnofarmácia, farmacovigilância, etnoveterinária e zoofarmacognosia, entre tantas outras, o que demonstra a sua versatilidade como ciência básica e aplicada. Por fim, vale ressaltar o valor dos estudos etnofarmacológicos nos registros da tradicionalidade de uso de plantas medicinais que podem contribuir no desenvolvimento de produtos tradicionais fitoterápicos, especialmente com espécies nativas, bem como na busca de repartir benefícios em prol dos guardiões desse incensurável conhecimento.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2021.
- ALBINO, R. C. *et al.* Traditional detoxification of *Jatropha curcas* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 241: 111970, 2019.

- ALBUQUERQUE, U. P. *Introdução à Etnobotânica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P. & LINS NETO, E. M. F. Selection of Research Participants. In: ALBUQUERQUE, U. P. et al. (Eds.). *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. New York: Springer, 2014.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Methods and techniques used to collect ethnobiological data. In: ALBUQUERQUE, U. P. et al. (Eds.). *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. New York: Springer, 2014.
- ARAÚJO, T. A. S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 72-80, 2008.
- ARTICULAÇÃO PACARI. *Farmacopeia Popular do Cerrado*. Goiânia: Articulação Pacari, 2010.
- BARBOSA, W. L. R. (Org.). *Etnofarmácia: fitoterapia popular e ciência farmacêutica*. Curitiba: CRV, 2009.
- BARBOSA, W. L. R. et al. Selecting medicinal plants for development of phytomedicine and use in Primary Health Care. In: RASOOLI, I. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. London: IntechOpen, 2012.
- BERNARD, H. R. *Research Methods in Anthropology – Qualitative and Quantitative Approaches*. 4. ed. New York: Altamira Press, 2006.
- BOILY, Y. & VAN PUYVELDE L. Screening of medicinal plants of Rwanda (Central Africa) for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 16: 1-13, 1986.
- BOURDY, G. et al. Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? *International Journal of Parasitology*, 38: 33-41, 2008.
- BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2): 141-148, 2008.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Povos e comunidades tradicionais, 2007. Disponível em: <<https://antigo.mma.gov.br/desenvolvimento-rural/terras-ind%C3%A9genas,-povos-e-comunidades-tradicionais.html>>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 26 de 13 maio 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014.
- BRASIL. Lei n. 13.123, de 20 maio 2015. Dispõe sobre o acesso ao Patrimônio Genético, sobre a proteção e o acesso ao Conhecimento Tradicional Associado e sobre a reparição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 21 maio 2015. Seção 1, p. 1.
- CARVALHO, L. H. & KRETTLI, A.U. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, supl. II: 181-184, 1991.
- CAVALCANTE, T. L. V. Etno-história e história indígena: questões sobre conceitos, métodos e relevância da pesquisa. *História*, 30(1): 349-371, 2011.

- CHALOULT, L. Vers une nouvelle classification des drogues. *Toxicomanies*, 4: 371-375, 1971.
- COELHO DE SOUZA, G. *et al.* Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(1): 135-143, 2004.
- DIEGUES, A. C. & ARRUDA, R. S. V. *Saberes Tradicionais e Biodiversidade no Brasil (Biodiversidade, 4)*. Brasília, São Paulo: Ministério do Meio Ambiente, USP, 2001.
- ECKERT, P. Why ethnography? In: KOT-SINAS, U.-B.; STENSTROM, A.-B. & KARLSSON, A.-M. (Eds.). *Ungdomsprak i Norden*. Stockholm: Stockholm University, 1997.
- ELIZABETSKY, E. Folklore, tradition, or know-how? The ethnopharmacological approach to drug discovery depends on our ability to value non-wester. *Cultural Survival Quarterly Magazine*, 1991. Disponível em: <www.culturalsurvival.org/publications/cultural-survival-quarterly/folklore-tradition-or-know-how-ethnopharmacological>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- ELIZABETSKY, E. & SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. *Pharmacology and Therapeutics*, 64: 201-214, 1994.
- FABREGA, H. Part One: ethnomedicine and medical science. *Medical Anthropology*, 2(2): 11-24, 1978.
- FARNSWORTH, N. R. Screening plants for new medicines. In: WILSON, E. O. (Ed.). *Biodiversity*. Washington: National Academy Press, 1988.
- GARCIA, D.; DOMINGUES, M. V. & RODRIGUES, E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6: 29, 2010.
- GEERTZ, C. *O Saber Local: novos ensaios em antropologia interpretativa*. Petrópolis: Vozes, 1999.
- GIORGETTI, M.; ROSSI, L. & RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the Central Nervous System: a study of historical sources from the 16th to 19th century. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21: 537-555, 2011.
- HEINRICH, M. Ethnopharmacology: quo vadis? Challenges for the future. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2): 99-102, 2014.
- HEINRICH, M. *et al.* Best practice in research: Consensus Statement on Ethnopharmacological Field Studies – ConSEFS. *Journal of Ethnopharmacology*, 211(30): 329-339, 2018.
- HITZIGER, M. *et al.* Maya phytomedicine in Guatemala – can cooperative research change ethnopharmacological paradigms? *Journal of Ethnopharmacology*, 186: 61-72, 2016.
- LÉDA P. H. O. *et al.* Agentes Comunitários de Saúde e plantas medicinais: etnobotânica na análise de remédios caseiros para introdução na atenção básica em Oriximiná – Pará, Brasil. In: FERLA A.A. *et al.* (Orgs.). *Atenção Básica e Formação Profissional em Saúde: inovações na Amazônia*. Porto Alegre: Rede Unida, 2019.

- LIMA, R. M. S.; SANTOS, A. M. N. & JARDIM, M. A. G. Levantamento de plantas venenosas em duas comunidades caboclas do estuário amazônico. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica*, 11(2): 255-263, 1995.
- LOCK, O. R. *Investigación Fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*. 3. ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, 2016.
- NAIDOO, D. *et al.* Plants traditionally used individually and in combination to treat sexually transmitted infections in northern Maputaland, South Africa: antimicrobial activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 149: 656-667, 2013.
- NOLAN, J. M. & TURNER, N. J. Ethnobotany: the study of people – plant relationships. In: ANDERSON, E. N. *et al.* (Eds.). *Ethnobiology*. Hoboken: Wiley & Sons, 2011.
- OLIVEIRA, A. C. D. & NOGUEIRA, M. A relação entre o conhecimento tradicional associado e as patentes relacionadas à Uncaria tomentosa (unha de gato). In: ENAPID: ENCONTRO ACADÊMICO DE PROPRIEDADE INTELECTUAL, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO, X, 2017, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: INPI, 2017.
- OLIVEIRA, D. R. & LEITÃO, S. G. Plantas tônicas, fortificantes e rejuvenescedoras: o conceito de adaptógeno. In: ALBUQUERQUE, U. P. & ALVES, R. R. N. *Introdução à Etnobiologia*. 2. ed. rev. e ampl. Recife: Nupeca, 2018.
- OLIVEIRA, D. R.; OLIVEIRA, A. C. D. & MARQUES, L. C. O estado regulatório dos fitoterápicos no Brasil: Um paralelo entre a legislação e o mercado farmacêutico (1995-2015). *Vigilância Sanitária em Debate*, 4(4): 139-148, 2016.
- OLIVEIRA, D. R. *et al.* Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 103-108, 2006.
- OLIVEIRA, D. R. *et al.* Autorização de acesso ao conhecimento tradicional associado para fins de bioprospecção: o caso da UFRJ e da Associação de Comunidades Quilombolas de Oriximiná - ARQMO. *Revista Fitos*, 5: 59-76, 2010.
- OLIVEIRA, D. R. *et al.* Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21: 793-806, 2011a.
- OLIVEIRA, D. R. *et al.* Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. *Acta Amazonica*, 41: 383-392, 2011b.
- OLIVEIRA, D. R. *et al.* Ethnomedical knowledge among the Quilombolas from the Amazon Region of Brazil with a Special Focus on Plants Used as Nervous System Tonics. In: RAI, M. *et al.* (Eds.). *Medicinal Plants: diversity and drugs*. New Hampshire: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2012.
- OLIVEIRA, D. R. *et al.* Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 206-214, 2014.
- OLIVEIRA, D. R. *et al.* Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 173: 424-434, 2015.
- OTSUKA, R. D. *et al.* Psychoactive plants described in a Brazilian literary work and their chemical compounds. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 10: 218-237, 2010.

- REN, J.; ZHANG, A. & WANG, X. Traditional Chinese medicine for covid-19 treatment. *Pharmacological Research*, 155: 104743, 2020.
- RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 295-302, 2007.
- RODRIGUES, E. & BARNES, J. Pharmacovigilance of herbal medicines. *Drug Safety*, 36: 1-12, 2013.
- RODRIGUES, E. & BARNES, J. Ethnopharmacovigilance and traditional medicines. In: BARNES, J. (Ed.). *Pharmacovigilance of Herbal and Traditional Medicines: Advances, Challenges and International Perspectives*. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023.
- RODRIGUES, E. & CARLINI, E. A. Plants used by a Quilombola group in Brazil with potential central nervous system effects. *Phytotherapy Research*, 18: 748-753, 2004.
- RODRIGUES, E. & CARLINI, E. A. A Comparison of plants utilized in ritual healing by two Brazilian cultures: Quilombolas and Kraho Indians. *Journal of Psychoactive Drugs*, 38: 285-295, 2006.
- RODRIGUES, E. & OLIVEIRA, D. R. Ethnopharmacology: a laboratory science? *Rodriguesia*, 71(e01612019): 1-7, 2020.
- RODRIGUES, E. & OTSUKA, R. D. Estratégias utilizadas para a seleção de plantas com potencial bioativo com ênfase nos métodos de etnobotânica e etnofarmacologia. In: CARLINI, E. A. & MENDES, F. R. (Orgs.). *Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais*. São Paulo: FAP, Unifesp, 2011.
- RODRIGUES, E. *et al.* Participatory ethnobotany and conservation: a methodological case study conducted with quilombola communities in Brazil's Atlantic Forest. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 16(2): 1-12, 2020.
- ROSA, M. & OREY, D. C. O campo de pesquisa em etnomodelagem: as abordagensêmica, ética e dialética. *Educação e Pesquisa*, 38(4): 865-879, 2012.
- SAAD, G. A. *et al.* *Fitoterapia Contemporânea: tradição e ciência na prática clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- SANTILLI, J. *Socioambientalismo e Novos Direitos*. São Paulo: Petrópolis, 2005.
- SANTOS, J. R. & FLEURENTIN, J. L'ethnopharmacologie, une approche pluridisciplinaire in ethnopharmacologie: sources, méthodes, objectifs. *Actes du 1er Colloque Européen d'Ethnopharmacologie*, 26-39, 1990.
- SANTOS, S. S.; LÉDA, P. & OLIVEIRA, D. R. Plantas medicinais e fitoterapia em Oriximiná – Pará, Brasil: percepção e intenção de uso pelos profissionais do Sistema Único de Saúde (SUS). *Vittalle-Revista de Ciências da Saúde*, 30(1): 11-25, 2018.
- SAUINI, T. *et al.* Participatory ethnobotany: comparison between two quilombos in the Atlantic Forest, Ubatuba, São Paulo, Brazil. *PeerJ*, 11:e16231.
- SCHULTES, R. E. Ethnopharmacological conservation: a key to progress in medicine. *Acta Amazonica*, 18: 393-406, 1988.
- SHIVA, V. *Biopirataria: a pilhagem da natureza e do conhecimento*. Petrópolis: Vozes, 2001.



- SILVA, M. & OLIVEIRA, D. R. The new Brazilian legislation on access to the biodiversity (Law 13,123/15 and Decree 8772/16). *Brazilian Journal of Microbiology*, 49: 1-4, 2018.
- SIQUEIRA, B. V. L. *et al.* Mercury: the beginnings in the medicalization of common names of medicinal plants in Brazil. *Rodriguesia*, 71(e00972019): 1-7, 2020.
- SOENTGEN, J. & HILBERT, K. A Química dos povos indígenas da América do Sul. *Química Nova*, 39(9): 1.141-1.150, 2016.
- STAUB, P. O. *et al.* Classifying diseases and remedies in ethnomedicine and ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 174: 514-519, 2015.
- VAN VUUREN, S. F. & NAIDOO, D. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3): 552-558, 2010.
- VIETLER, R. B. Métodos Antropológicos como ferramenta para estudos em etnobiologia e etnoecologia. In: AMOROSO, M. C. M. *et al.* *Métodos de Coleta e Análise de Dados de Etnobiologia, Etnoecologia e Disciplinas Correlatas*. Rio Claro: Editora Unesp, 2002.
- VILEGAS, W.; CARDOSO, A. L. & QUEVEDO, A. E. P. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R. A. & CECHINEL FILHO, V. (Orgs.). *Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*. 5. ed. Itajaí: Editora Univali, 2016.
- WAGNER, H. Pesquisa fitomédica no Novo Milênio: tendências e mudanças. In: YUNES, R. A. & CECHINEL FILHO, V. (Orgs.). *Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*. 5. ed. Itajaí: Editora Univali, 2016.
- YUNES, R. A. & CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs.). *Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*. 5. ed. Itajaí: Editora Univali, 2016.



# 7

## Busca Racional de Metabólitos Secundários Ativos: quimiosistemática

*André Mesquita Marques e Maria Raquel Figueiredo*

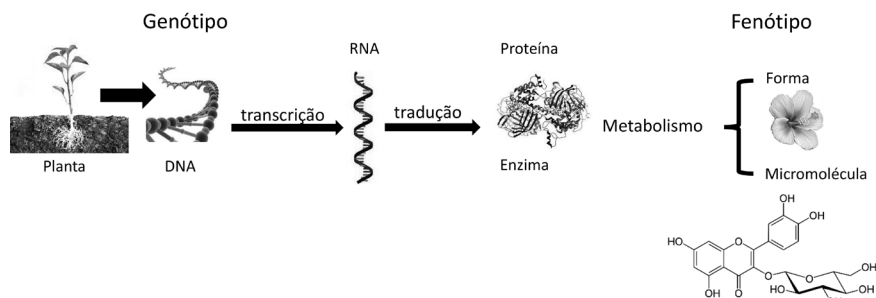
Desde a Antiguidade, o homem busca compreender incessantemente a função dos princípios ativos das plantas e seus benefícios para a saúde humana. A necessidade de distinguir espécies comestíveis das não comestíveis levou o homem primitivo a investigá-las e classificá-las quanto à possível toxidez, transmitindo suas experiências a outras comunidades. O avanço das técnicas modernas de prospecção química e o aperfeiçoamento dos métodos de identificação de metabólitos especiais em plantas fortaleceram as bases para o surgimento da quimiosistemática, estabelecendo um paradigma a ser seguido para ampliar os limites do conhecimento taxonômico. A quimiosistemática micromolecular vegetal é uma ciência interdisciplinar que abrange áreas como química micromolecular, botânica, evolução, taxonomia e ecologia. A partir de análises de dados micromoleculares e morfológicos das plantas, pode-se inferir tendências evolutivas para um determinado táxon, bem como prever sua posição no sistema de classificação, sua localização ecogeográfica e a potencialidade de uma determinada espécie como fonte promissora de produtos naturais biologicamente ativos. Essa abordagem científica da sistemática vegetal permite avaliar e ampliar as correlações entre a evolução de estruturas micromoleculares e a morfologia de plantas. Assim, torna-se uma ferramenta útil que possibilita correlacionar e até mesmo reaproximar *taxa* a partir de sua expressão fenotípica e buscar metabólitos secundários no Reino Vegetal.

## Origem e Desenvolvimento da Quimiosistemática

A quimiosistemática (químico-biologia quantitativa) foi criada num esforço interdisciplinar para compreender a vida. Essa abordagem tem como objetivo desvendar a linguagem biológica através da coleta, organização e correlação de informações de diferentes níveis organizacionais: substâncias (metabolismo), organismos (morfologia), biomas (biogeografia) e funcionalidade (bioatividade) (Gottlieb & Borin, 2012). Também chamada de quimiotaxonomia, constitui uma ferramenta de racionalização da observação de tendências evolutivas, mapeamento da biodiversidade e busca orientada de princípios bioativos. Essa ciência tem característica interdisciplinar e baseia-se na existência de um gradiente químico de afinidade entre os grupos vegetais (gêneros, famílias etc.), no qual se classificam os organismos (originalmente as espécies vegetais) não apenas de acordo com as diferenças e semelhanças em suas composições metabólicas, mas também conforme os aspectos genéticos e morfológicos. Assim, correlacionam-se os organismos considerando a tendência de biossíntese de determinadas substâncias por essas espécies (Gottlieb, 1980). Portanto, essa tendência pode ser utilizada para prever as ocorrências de certas classes químicas em um determinado táxon, além de poder agregar informações dos esquemas biogênicos. A quimiosistemática micromolecular conta com metodologias que utilizam dados moleculares integrados à classificação botânica. A utilização de características químicas nas classificações de plantas torna-as mais coerentes, contribuindo para o maior esclarecimento da evolução filogenética e da expressão do maquinário enzimático vegetal. Assim, um sistema ideal de classificação de plantas deveria considerar os diferentes níveis de manifestação do genótipo (Figura 1). A integração de dados químicos e morfológicos em um sistema único para estudos evolutivos, sistemáticos ou ecológicos é viável desde que se respeitem as diferenças organizacionais que os regem (Gottlieb, Kaplan & Borin, 1996).

O desenvolvimento das bases da quimiosistemática como ciência recebeu importante contribuição dos trabalhos do botânico britânico Ronald Darnley Gibbs (1974), com o artigo “História da taxonomia química”, em que ele resume a fitoquímica comparativa aplicada à sistemática, incluindo os termos taxonomia e sistemática no mesmo estudo. A quimiosistemática foi importante para a inclusão da química como parte da história natural das plantas porque permitia demonstrar a similaridade entre as espécies vegetais e sua interação com o meio biótico e abiótico (Gibbs, 1974).

Figura 1 – Níveis de manifestação do genótipo



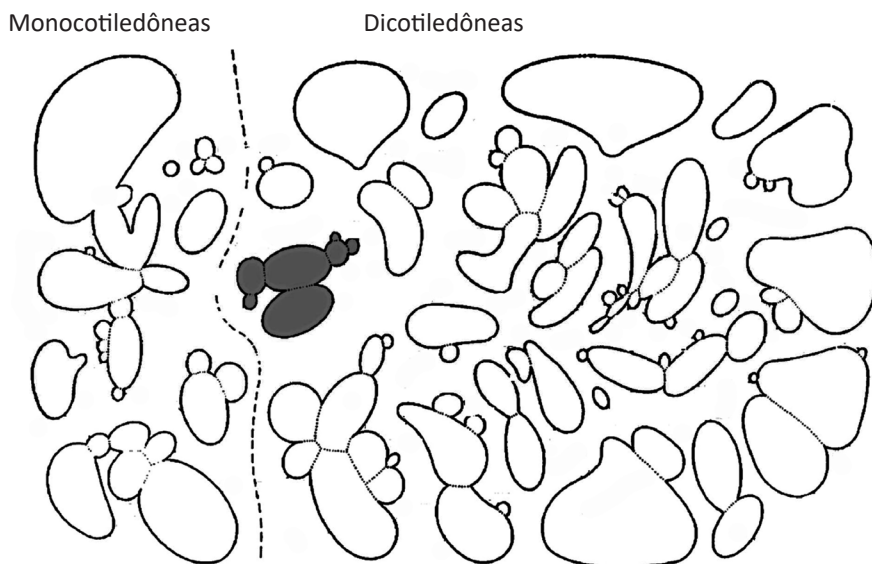
A partir dos anos 60, a quimiotaxonomia começou a ganhar relevância através do uso da química na nomeação e classificação de plantas. A sistemática passaria a ser definida como o estudo da diversidade e diferenciação de organismos e suas inter-relações, na qual as espécies vegetais já não seriam mais classificadas de acordo com apenas um único caractere isoladamente. A partir de então, o botânico sistemático teria a possibilidade de ampliar o conhecimento acerca do acervo filogenético vegetal ao avaliar informações sobre a relação das espécies em todas as suas manifestações com o meio.

A ocorrência de estudos colaborativos entre química e a botânica passaram ampliar os estudos das plantas, com descrições mais precisas para um novo gênero/espécie, acompanhados por uma descrição química da planta. Em 1963, Alston e Turner escreveram um livro chamado *Bioquímica Sistemática*, em que resumiram as ideias básicas de quimiosistemática. Os estudos basearam-se na relação entre os metabólitos e as plantas que os produzem, na interação de espécies distintas de plantas e as pressões do meio ambiente, fazendo uma ligação com a filogenia. Com os avanços das técnicas cromatográficas e dos métodos espectrométricos, centenas de milhares de substâncias oriundas de fontes naturais tornaram-se conhecidas. De 1965 a 1985 houve um grande aumento de trabalhos na área de quimiotaxonomia, envolvendo quase todas as famílias botânicas. Entre os principais avanços da sistemática que possibilitaram essa integração interdisciplinar, estão as contribuições do botânico dinamarquês Rolf Martin Theodor Dahlgren (1932-1987), que publicou, em 1975, um sistema de classificação que utilizava mais de cem caracteres diferentes, entre os quais caracteres morfológicos, anatômicos, embrionários e principalmente químicos. Em 1980, a revisão do sistema formulado por ele em 1975 permitiu que padrões de distribuição de dados químicos fossem inseridos em um arcabouço taxonômico filogenético.

Segundo Dahlgren, o diagrama (Figura 2) representa uma árvore fenética seccionada transversalmente. As superordens são apresentadas como áreas circundadas por linhas contínuas e a posição e a distância relativa entre elas representam suas relações filogenéticas, e a linha tracejada separa as monocotiledôneas das dicotiledôneas. O volume das áreas é proporcional ao número de famílias dentro das ordens, e o posicionamento periférico abriga as ordens mais evoluídas (Dahlgren, 1980).

No Brasil, o desenvolvimento da quimiosistemática micromolecular foi um dos grandes avanços da química de produtos naturais. Tal mérito coube ao notável professor Otto Richard Gottlieb (1920-2011). Um marco das suas contribuições foi a criação, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, de uma nova disciplina botânica intitulada “Quimiosistemática vegetal micromolecular”. Foi indicado em 1999 para o Nobel de Química por estudos sobre a estrutura química das plantas, os quais permitiram analisar o estado de preservação de vários ecossistemas a partir do desenvolvimento de um novo tipo de sistemática que pudesse unir a química a todos os níveis de organização dos seres vivos. Para essa finalidade, uma metodologia original foi desenvolvida fundamentada no mapeamento e na quantificação de dados químicos e biológicos em bases especializadas de química, biologia, etnobotânica e de farmacopeias. Essa metodologia integrada introduziu a fitoquímica quantitativa como uma poderosa ferramenta inovadora na classificação de espécies vegetais. O método permite interpretar os fenômenos ambientais para melhor compreensão das relações ecológicas mediante a integração de metabolismo, morfologia e ecogeografia, possibilitando, assim, o mapeamento e a quantificação da biodiversidade quando aplicado aos estudos de evolução (Caparica, 2012).

Figura 2 – Diagrama de classificação para Angiospermas, com destaque para o grupo primitivo da família Annonaceae incluída na ordem Magnoliales ou Annonales



Fonte: adaptado de Dahlgren, 1980.

O estudo fitoquímico passou a ter uma finalidade mais ampla, envolvendo a aquisição de informações mais completas e mais consistentes a serem utilizadas na busca da melhor compreensão dos fenômenos que ocorrem nas plantas, do ponto de vista químico. A grande diversidade de reações químicas proporciona uma enorme variabilidade estrutural no metabolismo das plantas e faz com que uma única espécie vegetal possa produzir um número considerável de substâncias (Canuto *et al.*, 2018). Segundo as teorias do professor Gottlieb, a presença de metabólitos secundários só vai configurar um quadro fidedigno das afinidades taxonômicas quando a categoria biossintética à qual o metabólito pertence for adequadamente diversificada no táxon. Dessa forma, a diversificação metabolômica reflete a capacidade adaptativa da espécie diante das pressões dos fatores bióticos e abióticos, mostrando o quanto a espécie evoluiu para se adaptar ao meio (Gottlieb & Borin, 2012). A ocorrência de uma substância não deve ser analisada isoladamente, sendo importante também analisar o tipo de esqueleto molecular ou até mesmo seu caminho biossintético. Uma substância pode estar ausente

por causa das oscilações fisiológicas ou ambientais ou pode não ser detectada por causa de limitações da técnica empregada no isolamento e caracterização das substâncias. Por sua vez, o critério de ausência pode fornecer pistas sobre tendências evolutivas de várias *taxa*. Por exemplo, *taxa* pertencentes ao eixo diagonal Myrtiflorae-Malviflorae do Diagrama de Dahlgren produzem micromoléculas de estruturas raramente diversificadas devido à presença concomitante de taninos gálicos e elágicos (Gottlieb, 1982). Assim, plantas taníferas podem abrigar um número bastante reduzido de diferentes grupos biogenéticos. O critério presença/ausência é muito útil quando se trabalha com a forma dos organismos. Caracteres morfológicos são mais facilmente identificáveis e, portanto, são bons marcadores sistemáticos, principalmente em baixos níveis hierárquicos (espécies ou gêneros). Por sua vez, os caracteres químicos são excelentes indicadores da polaridade evolutiva, quando analisados de acordo com parâmetros quantitativos (Gottlieb, 1990).

Um dos objetivos da sistemática de plantas é construir um sistema verdadeiramente filogenético que reflita as relações naturais existentes entre todos os *taxa* de plantas. Embora os vegetais exibam um perfil químico diversificado de constituintes, tem-se verificado que os produtos do metabolismo secundário preenchem os requisitos necessários à sua utilização em quimiosistemática (Gottlieb, 1980).

Os estudos de base genética são muito úteis para avaliar a relação filogenética entre os *taxa* de plantas em um nível mais alto de hierarquia taxonômica. Ao se considerarem níveis mais baixos – gênero, por exemplo –, é difícil encontrar uma característica molecular ideal. Quando analisamos *taxa* de níveis mais baixos, o número de características químicas disponíveis dos metabólitos secundários das plantas pode ser muito maior, e, conseqüentemente, obtemos uma quantidade suficiente de dados a serem utilizados para fins de análise de tendências evolutivas e correlações de *taxa*. Os caracteres químicos variam de acordo com as classes biogenéticas de substâncias, frequência de ocorrência e polarização química ou extensão de gradiente de evolução molecular (estado de oxidação e especialização esquelética), mas não se sustentam nos critérios de presença/ausência de metabólitos secundários (Gottlieb & Kaplan, 1993). No Reino Vegetal, algumas substâncias são de distribuição restrita, enquanto outras são amplamente encontradas em plantas e requerem técnicas pouco sofisticadas, são estáveis e podem ainda ser utilizadas como marcadores quimiosistemáticos.

## Metodologia Quimiosistemática

O primeiro passo para o início dos estudos quimiosistemáticos é a obtenção de informações botânicas a respeito do táxon ou da classe química a ser estudada. Através delas, o levantamento bibliográfico será direcionado, permitindo visualizar a distribuição da parte química do táxon no Reino Vegetal e eleger marcadores quimiosistemáticos que são caracterizados pela ampla ocorrência e diversidade estrutural. O objetivo principal da metodologia não é apenas registrar a ocorrência dessas substâncias, mas quantificar as modificações estruturais, buscando tendências e padrões sistemáticos, geográficos e evolutivos.

A partir da década de 1950, grupos de pesquisa em quimiosistemática desenvolveram e aprimoram índices químicos evolutivos. Ao utilizarem informações sobre distribuição e estrutura de micromoléculas, conseguiram medir o grau de relevância de categorias de metabólitos especiais pelo número de ocorrências (NO), número de ocorrências normatizado (NON), número de tipos (NT) e índice de diversificação (ID), além de quantificar o nível oxidativo médio dos carbonos das substâncias pelo índice de oxidação (IO) e o grau de modificação das estruturas em relação a um precursor biossintético pelo índice de especialização de esqueleto (IE) (Gottlieb, Kaplan & Borin, 1996).

Os dados obtidos na literatura especializada deverão ser registrados em formulário quimiosistemático, o qual incluirá: informação botânica, estrutura química, nome trivial, título e autores do artigo e informações bibliográficas complementares do táxon. A partir desses dados, o perfil químico é conhecido para os *taxa* em análise, o marcador quimiosistemático é determinado e o tabelamento das substâncias é iniciado, utilizando-se os diversos parâmetros quimiosistemáticos.

Os parâmetros quimiosistemáticos estão divididos em três categorias: índice morfológico, índice químico-morfológico e índices químicos. As metodologias utilizadas neste capítulo foram baseadas nos trabalhos descritos por Cruz (2007), Kaplan e colaboradores (2010) e Cipriani e colaboradores (2012).

### Índice morfológico: o índice de Sporne (IS)

O índice de Sporne (IS) é uma medida quantitativa, desenvolvida pelo botânico inglês Kenneth R. Sporne (Sporne, 1980). Constitui um parâmetro do percentual de avanço evolutivo morfológico para 291 famílias de dicotiledôneas. Baseado em determinados caracteres primitivos morfológicos (28



morfológicos e 2 químicos), o parâmetro indica o *status* evolutivo da família vegetal e a frequência com a qual esses 30 caracteres considerados basais estão ausentes em cada família de dicotiledôneas. O IS para ordens e superordens foi obtido pela média aritmética de IS das famílias que compõem o táxon, conforme a fórmula  $IS = A \times 100/B$ , na qual A é o número de características basais ausentes e B corresponde ao número de características consideradas (Sporne, 1980).

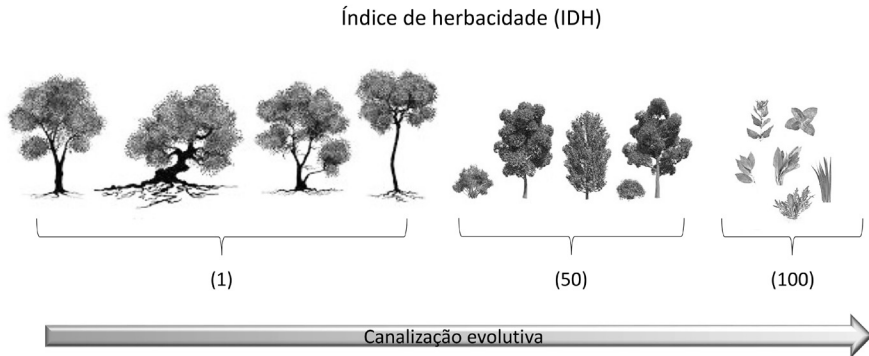
### Índices químico-morfológicos

Os índices morfológicos são ferramentas essenciais no campo da classificação biológica e taxonomia, auxiliando os cientistas na organização e compreensão da diversidade das espécies. Os índices morfológicos baseiam-se nas características físicas e estruturais dos organismos, como tamanho, forma e características anatômicas. Esses índices desempenham um papel crucial na taxonomia tradicional, permitindo aos cientistas classificar os organismos com base nos seus atributos visíveis (Gottlieb *et al.*, 1996).

#### *Índice de herbacidade (IH)*

O grupo do professor Gottlieb desenvolveu o índice de herbacidade (IH) com base no hábito predominante nas espécies, que se constitui em um índice de avanço evolutivo morfológico/químico no táxon em estudo (Figura 3) (Borin & Gottlieb, 1993). Esse parâmetro quantifica a tendência evolutiva de angiospermas no abandono da lenhosidade em favor da herbacidade, que ocorre com a retração do caminho do chiquimato e expansão do acetato/mevalonato, em uma canalização evolutiva (Gottlieb *et al.*, 1996). Esse índice permite a integração e correlação de informações morfológicas com químicas e ecológicas. O valor 100 é atribuído aos *taxa* formados apenas por representantes herbáceos e o valor 1 é atribuído aos *taxa* com representantes exclusivamente arbóreos. Na Tabela 1, relacionamos os tipos de hábitos aos seus respectivos IH.

Figura 3 – Índice de avanço morfológico evolutivo



Fonte: adaptado de Borin & Gottlieb, 1993.

Tabela 1 – Índice de herbacidade

TIPO DE HÁBITOS	IH
Árvores	1,0
Árvores predominando sobre arbustos	12,5
Árvores e arbustos	25,0
Arbustos predominando sobre árvores	37,5
Arbustos	50,0
Arbustos predominando sobre ervas	62,5
Arbustos e ervas	75,0
Ervas predominando sobre arbustos	87,5
Ervas	100,0

### Índices químicos

Os estudos quimiotaixonômicos das plantas baseiam-se nos cálculos dos índices químicos, por exemplo, comparando-se os níveis de oxidação das substâncias, e nas variações dos seus esqueletos carbônicos em relação ao precursor biossintético. As micromoléculas são marcadores químicos abundantes, que apresentam ampla diversidade estrutural expressa nas diversas classes metabólicas (Gottlieb, 1982). Ao examinar esses marcadores químicos, os cientistas

podem discernir relações evolutivas entre diferentes espécies e identificar semelhanças ou diferenças que podem não ser aparentes apenas por meio de observações morfológicas (Kaplan *et al.*, 2010).

#### *Número de ocorrências (NO)*

O NO é um parâmetro químico que indica o grau de relevância de uma determinada categoria metabólica para um táxon escolhido. Essa ocorrência será referente à classe micromolecular em questão, ainda que haja coincidência de substâncias em duas espécies diferentes, pertencentes a um mesmo táxon. Ao se contar  $n$  vezes uma mesma substância encontrada em espécies diferentes, consegue-se observar a tendência de sua produção no táxon escolhido (Gottlieb *et al.*, 1996).

#### *Número de ocorrências normatizado (NON)*

O NON é um parâmetro obtido da razão entre o NO e o número de espécies produtoras de determinada classe química em cada táxon. O cálculo é realizado por família, ordem e/ou superordem. O NON permite padronizar os valores de número de ocorrências para os diferentes níveis hierárquicos, pois leva em consideração o número de espécies analisadas. Seu cálculo segue a fórmula  $NON = NO/Spp.$ , na qual Spp. corresponde ao número de espécies estudadas.

#### *Número de tipos (NT)*

O NT está relacionado com a quantidade de tipos de estruturas diferentes formadas ao longo da biogênese dos representantes de uma determinada classe química.

#### *Índice de diversidade (ID)*

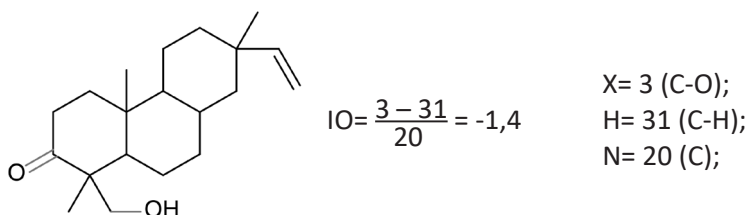
O ID expressa a frequência de distribuição de uma classe biossintética. É um índice obtido através do NO e dos NT estruturais de classes químicas divididos pelo número de espécies estudadas, segundo a fórmula  $ID = (NO \times NT)/Spp.$

#### *Índice de oxidação (IO)*

O IO é um parâmetro químico que evidencia o nível de oxidação de uma substância. O cálculo é relacionado com o grau de oxidação de cada átomo de carbono da estrutura molecular. Para cada ligação carbono-heteroátomo soma-se 1 ponto, ao passo que para cada ligação carbono-hidrogênio diminui-se 1 ponto. O resultado obtido é dividido pelo número de átomos de carbono

da substância. Se uma substância apresentar quebra de ligação com perda de átomo de carbono, em comparação com seu precursor biossintético, considera-se a estrutura do precursor no seu maior nível de oxidação no átomo de carbono perdido (por exemplo, um ácido que sofreu descarboxilação). Utiliza-se a fórmula  $IO = (X - H)/n$ , na qual X é o número de ligações carbono-heteroátomo, H representa o número de ligações carbono-hidrogênio e n refere-se ao número de átomos de carbono (Figueiredo, Kaplan & Gottlieb, 1995).

Figura 4 – Cálculo do índice de oxidação (IO) de um derivado diterpenoídico



O índice de oxidação do diterpeno (Figura 4) é determinado pela soma do número de ligações carbono-heteroátomo na estrutura (2 ligações C-O, referentes à carbonila) + (1 ligação C-O, referente a C-OH) levando a X = 3; seguida da diminuição do número de ligações carbono-hidrogênio (31 C-H), dividido pelo número total de átomos de carbono na estrutura química do diterpeno n = 20. Assim, encontra-se o número negativo -1,4 referente ao índice de oxidação da estrutura.

#### *Avanço evolutivo referente à oxidação (AEo)*

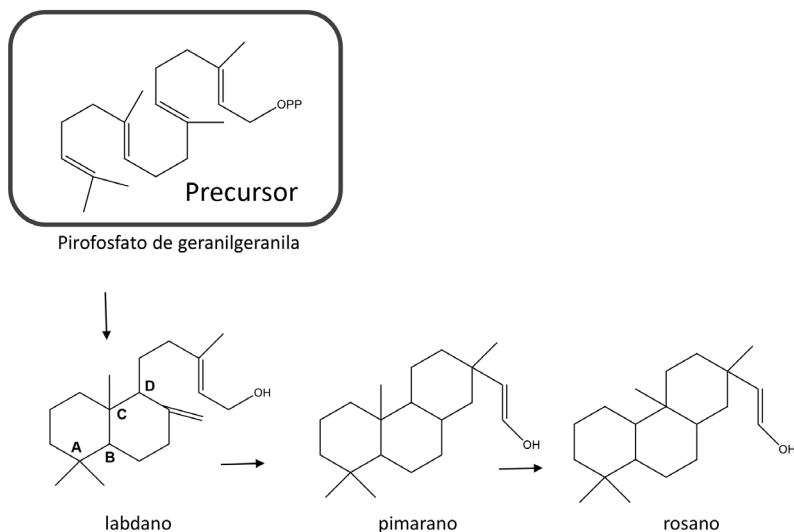
Os valores de AEo das substâncias químicas são obtidos pela razão do somatório dos IO de cada substância pelo seu número de ocorrência para famílias, ordens e superordens, segundo a fórmula  $AEo = \Sigma IO/NO$ , na qual  $\Sigma IO$  representa o somatório dos IO, e NO é o número de ocorrências.

#### *Índice de especialização de esqueleto (IE)*

O pirofosfato de geranilgeranila é o precursor biossintético da classe dos diterpenos e será utilizado como base das transformações biossintéticas dos tipos de esqueletos obtidos ao longo da formação do mapa biogenético. Para cada ligação carbono-carbono formada ou quebrada em relação ao precursor biogenético, conta-se 1 ponto. Somente as ligações sigma são consideradas.

Para as ligações carbono-heteroátomo, conta-se 1 ponto somente quando ocorre fechamento de anel. Quando ocorre descarboxilação, conta-se também 1 ponto, porque somente o carbono que permaneceu na estrutura teve a sua vizinhança modificada. Os valores obtidos são somados e divididos pelo número de átomos de carbono presentes na estrutura química. O cálculo é feito através da relação  $IE = (F + Q)/n$ , na qual Q e F referem-se ao número de ligações quebradas e ligações formadas, respectivamente, a partir do  $n$  precursor, sendo  $n$  igual ao número de átomos de carbono do esqueleto molecular (Figueiredo, Kaplan & Gottlieb, 1995).

Figura 5 – Exemplo de especialização de esqueleto de diterpenos partindo do precursor pirofosfato de geranilgeranila



A partir do pirofosfato de geranilgeranila ocorrerá a sequência biossintética de formação dos diterpenos, levando ao fechamento de anéis ciclo-hexânicos. O esqueleto do tipo labdano é o primeiro grupo dessa classe de metabólitos a ser formada. Na formação do esqueleto do tipo labdano (Figura 5), quatro ligações sigmas são formadas entre os carbonos ( $C_A-C_B$  e  $C_B-C_A$ ;  $C_C-C_D$  e  $C_D-C_C$ ) para o fechamento dos dois anéis ciclo-hexânicos na estrutura. Assim, o  $IE_{\text{labdano}} = (4 \text{ lig. sigmas formadas})/20 = 0,2$ . No caso da formação do esqueleto tipo pimarano, ocorre a formação de mais uma ligação sigma para o fechamento de um terceiro ciclo-hexano, totalizando 6 ligações C-C

formadas. Assim,  $IE_{\text{pimarano}} = (6 \text{ lig. sigmas formadas})/20 = 0,3$ . A formação do esqueleto tipo rosano, além da formação dos 3 ciclo-hexanos, terá quebra e rearranjo da metila na estrutura. Nesse caso teremos  $IE_{\text{rosano}} = (8 \text{ lig. sigmas formadas} + 2 \text{ lig. quebras})/20 = 0,5$ .

#### *Avanço evolutivo referente à especialização de esqueleto (AEe)*

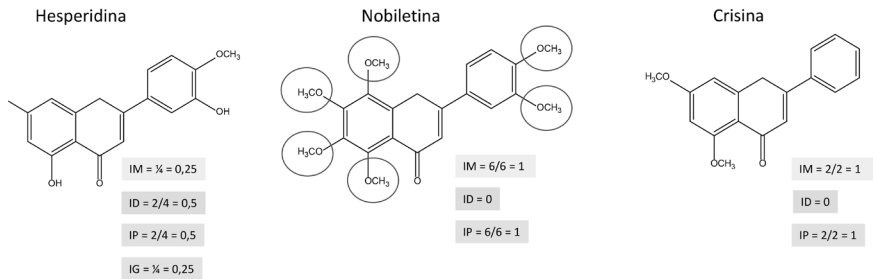
O parâmetro químico de avanço evolutivo referente à especialização de esqueleto (AEe) é o resultado da razão do somatório dos IEs pelo número de ocorrências em diferentes níveis hierárquicos: família, ordem e superordem. Sua avaliação é calculada de acordo com a fórmula  $AEe = \Sigma IE/NO$ , na qual  $\Sigma IE$  representa o somatório dos IEs dividido pelo NO.

#### *Índice de proteção de hidroxilas flavonoídicas*

A proteção das hidroxilas fenólicas nos metabólitos especiais dá-se, com certo destaque, em alguns grupos vegetais, e elas podem ser protegidas por grupos metila e/ou glicosila ou estar livres. As hidroxilas flavonoídicas protegidas indicam um certo grau evolutivo para os *taxa* produtores de tais substâncias (Gottlieb, Kaplan & Borin, 1996). Na Figura 6 apresentamos exemplos de cálculos dos índices de proteção, que são obtidos por meio das fórmulas a seguir:

- Cálculo do índice de proteção por glicosilação (IG)  
 $IG = \text{número de grupos O-glicosilados/número total de oxigrupos}$
- Cálculo do índice de proteção por metilação (IM)  
 $IM = \text{número de grupos O-Me/número total de oxigrupos}$
- Cálculo do índice de proteção total (IPT)  
 $IPT = \text{número de grupos O-Glc} + \text{número de grupos O-Me/número total de oxigrupos}$
- Cálculo do índice de desproteção (ID)  
 $ID = \text{número de grupos OH livres/número total de oxigrupos}$

Figura 6 – Cálculo dos índices de proteção de hidroxilas flavonoídicas



### Quantificação do grau de proteção das hidroxilas flavonoídicas

O parâmetro de avanço evolutivo de proteção de hidroxilas flavonoídicas por meio de metilação (AEm) e de glicosilação (AEg) é determinado pelo somatório dos respectivos índices de proteção das substâncias encontradas no táxon em estudo (gênero, família, ordem ou superordem), dividido pelo NO.

$$AEm = \frac{\sum Im}{NO}$$

$$AEg = \frac{\sum Ig}{NO}$$

O avanço evolutivo referente à desproteção das hidroxilas flavonoídicas (AEd) é o parâmetro químico determinado pelo somatório dos índices de desproteção das substâncias encontradas no táxon em estudo (gênero, família, ordem e superordem) dividido pelo NO.

$$AEd = \frac{\sum Id}{NO}$$

A quantificação dos parâmetros de avanço evolutivo referentes ao padrão de substituição de cada representante flavonoídico segue a metodologia elaborada por Barreiros (1990).

## Abordagem Metodológica de Estudos Quimiosistemáticos

A quimiosistemática tem como base os dados obtidos na literatura que possibilitam uma avaliação ampla da parte química do táxon em questão. A seleção de um determinado grupo de plantas, família ou gênero (táxon), na análise das substâncias presentes nos *taxa*, é considerada o primeiro passo no estudo quimiosistemático.

A abordagem desse estudo baseado na produção de determinados metabólitos ocorre quando se procura a distribuição de uma determinada classe química no Reino Vegetal como, por exemplo, diterpenos, cumarinas, alcaloides, xantonas etc. A distribuição da classe química nas plantas deve contemplar todas as divisões botânicas (por exemplo, família, subfamília, tribo, gênero e espécie). Após a definição da categoria a ser estudada, inicia-se o levantamento completo de dados químicos em várias bases de dados especializadas, como SciFinder, PubMed, SciELO, Scopus, Web of Science etc. As palavras-chave devem ser cuidadosamente selecionadas em relação ao táxon ou classe de metabólitos escolhida. Os dados obtidos na literatura são organizados no formulário quimiosistemático, exemplificado na Tabela 2, que inclui informações relevantes como divisão botânica do táxon, estruturas químicas, número de ocorrência e referência do artigo. Em seguida, os formulários são ainda complementados com as informações publicadas nos artigos e demais fontes de obras especializadas, além das informações sobre atividade biológica. A partir desses dados, o perfil químico é conhecido para os *taxa* em análise. Inicia-se o tabelamento das substâncias utilizando-se os diversos parâmetros quimiosistemáticos. Com a análise desses dados, é possível eleger marcadores quimiosistemáticos, que são caracterizados pela ampla ocorrência e diversidade estrutural de diferentes classes químicas.

Neste capítulo, será apresentado um estudo de caso abordando a química da família Annonaceae. As informações botânicas de todos os subgrupos (subfamílias, tribos e gêneros) foram obtidas e agrupadas segundo seus clados correspondentes.

## Abordagem quimiosistemática da família Annonaceae

O objetivo deste estudo é caracterizar a família Annonaceae como uma importante fonte de alcaloides e discutir seus aspectos químicos e biológicos, enfatizando sua importância como marcadores químicos para o táxon sob uma abordagem quimiosistemática. Essa família está organizada em 14 tribos circunscritas em 4 subfamílias, sendo constituída por 108 gêneros, *sensu* APG III (2009). Nos trabalhos de Chatrou e colaboradores (2012) e de Erkens e colaboradores (2012), a família Annonaceae foi amplamente estudada dos pontos de vista da filogenia e da morfologia e um panorama evolutivo para o clado foi traçado a fim de se explicar a riqueza de espécies da família e o impacto do mecanismo de radiação nesse processo.

Para o estudo quimiosistemático desse táxon foram utilizados os 108 gêneros da família como palavras-chave, baseadas no trabalho do Almeida, Oliveira Jr. e Oliveira (2015), uma vez que a busca pelo termo “Annonaceae”

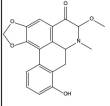
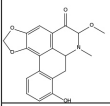
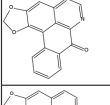
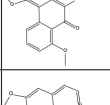
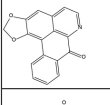
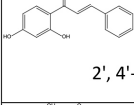
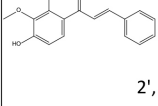
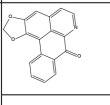
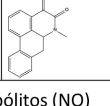


resultou em um número reduzido de trabalhos publicados. Após seleção e análise dos *abstracts* e artigos, o formulário quimiossistemático foi preenchido com os dados químicos de todas as espécies referentes aos gêneros selecionados (Tabela 2). Esses dados foram inicialmente organizados por espécie, sendo, em seguida, agrupados nos referidos gêneros para compor o mapa químico das tribos de Annonaceae. Assim, foi possível obter o panorama químico dos gêneros da família Annonaceae e vislumbrar uma tendência biossintética para o táxon. Os dados micromoleculares dos gêneros e tribos para a família Annonaceae constituem um registro representativo relevante para estudos quimiossistemáticos. A compilação e análise dessas informações são de grande importância para a avaliação do grau de relevância química do táxon em estudo, que apresenta destacada produção de metabólitos especiais variados em NO. Alcaloides, flavonoides, acetogeninas, diterpenos, esteroides, monoterpênicos e xantonas, entre outros, representam as classes químicas predominantes em Annonaceae, observados na Tabela 3. Nela, também pode ser visto que a classe dos alcaloides corresponde a 1.120 dos metabólitos listados, ou seja, 48% dos registros de metabólitos especiais para a família, o que demonstra uma forte tendência da espécie à síntese dessa classe de substâncias. Foi possível inferir que os metabólitos secundários da classe dos alcaloides são as substâncias preponderantemente biossintetizadas pela maioria dos gêneros das tribos de Annonaceae.

Com os dados coletados de artigos científicos provenientes das espécies dos 108 gêneros descritos para a família Annonaceae, foi criado um arquivo contendo as informações estruturais dos metabolitos especiais produzidos e selecionados em nível de espécies, posteriormente, agrupados para táxons de mais altos níveis hierárquicos. Os dados obtidos nessa pesquisa bibliográfica formaram um banco de dados sobre a ocorrência de metabólitos especiais nos cladados em estudo. Os dados referentes aos formulários quimiossistemáticos foram analisados, registrados e agrupados em um só arquivo para identificação do panorama metabolômico da família Annonaceae. As informações foram distribuídas em tabelas organizadas por subfamílias e tribos (Tabela 3). Assim, a coleta e organização desses dados possibilitou conhecer o perfil químico micromolecular para Annonaceae, evidenciando e/ou mostrando a produção de terpenos: sesqui, di e triterpenos, flavonoides e, com destaque, alcaloides, grupo de metabólitos de maior tendência biossintética. Destaca-se a tribo Miliuseae com a grande variedade de metabólitos produzidos.

Na Tabela 4 é possível observar a variedade metabolômica da tribo Miliuseae. Destaca-se o gênero *Polyalthia*, com a variabilidade de metabólitos secundários e a riqueza na produção de alcaloides, com NO igual a 135. Essa classe de metabólitos pode ser encontrada em quase todos os gêneros desta tribo, o que ressalta a importância dos alcaloides como marcadores químicos dos gêneros em Miliuseae.

Tabela 2 – Exemplo de formulário de sistematização de dados quimiosistemáticos das substâncias encontradas na família Annonaceae

Família	Tribo	Gênero	Espécie	Material botânico	Substâncias isoladas	NO	Referência
Annonaceae	MILIUSEAE	<i>Alphonsea</i>	<i>Alphonsea mollis</i>	cascas	 O-metilmoscatolina	1	Xie <i>et al.</i> , 1999.
		<i>Enicosanthum</i>	<i>Enicosanthum cupulare</i>	caule	 O-metilmoscatolina	3	Fujita <i>et al.</i> , 2010.
					 liriodenina		
					 oxostefanina		
		<i>Polyalthia</i>	<i>Polyalthia cauliflora</i> var. <i>cauliflora</i>	cascas	 liriodenina	3	Ghani <i>et al.</i> , 2012.
					 2', 4'-dihidroxicalcona		
					 2', 4'-dihidroxi-3'-metoxicalcona		
		<i>Oncodostigma</i>	<i>Oncodostigma monosperma</i>	caule	 liriodenina	2	Hadi <i>et al.</i> , 1985.
					 4,5-dioxoaporfina		
		Soma dos metabólitos (NO)					

Fonte: adaptado de Almeida, Oliveira Jr. & Oliveira, 2015.

Tabela 3 – Perfil químico da família Annonaceae (NO)

CLASSES QUÍMICAS	SUBFAMÍLIA (eae)	ANNONOID						ANAXAGOREOID	AMBAVIROID	MALMEIROID						NO TOTAL		
		BOCAGE (8)	XYLOPI (2)	DUGUET (5)	ANNON (8)	MONOD (11)	GUATTE (1)			UVARI (16)	(1)	(9)	PIOTOS (7)	MALMEE (13)	MAASI (1)		FENEVI (1)	DENDROK (1)
EST		8	-	-	9	13	2	-	5	4	8	9	-	-	-	-	22	80
MON		3	8	-	10	7	5	3	-	8	-	1	-	-	-	-	-	45
SES		10	14	-	19	21	12	13	1	31	6	8	-	-	-	1	7	143
DIT		2	54	-	1	-	-	-	-	2	1	2	-	-	-	-	-	154
TRI		-	9	-	5	18	-	47	-	1	6	9	-	-	-	3	20	118
ALC		28	151	106	118	54	79	120	12	62	21	98	-	-	-	1	269	1.120
FLA		2	32	-	3	-	-	147	10	13	1	4	-	-	-	-	49	261
LIG		5	4	-	3	3	-	-	3	4	2	-	-	-	-	-	41	65
XAN		-	-	-	-	-	1	10	12	-	1	7	-	-	-	-	1	32
ACE		-	54	-	118	5	-	27	-	1	6	-	-	-	-	-	5	216
FPR		-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	11	-	-	-	-	-	17
OLI		-	-	-	-	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	41	60
AGX		6	-	-	-	-	-	9	-	7	-	-	-	-	-	-	-	22
QUI		-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
AMD		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	26
LACT		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	18
THY		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
ABZ		-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12

Metabólitos: EST – esteroides; MONO – monoterpenos; DIT – diterpenos; SES – sesquiterpenos; TRI – triterpenos; ALC – alcaloides; FLA – flavonoides; LIG – lignanas; XAN – xantonas; ACE – acetogeninas; FPR – fenilpropanoides; OLI – oligossacarídeos; AGX – ácidos graxos; QUI – quinonas; AMD – amidas; LAC – lactonas; THY – timolderivados; ABZ – ácido benzoico.

Fonte: Almeida, Oliveira Jr. & Oliveira, 2015.

Tabela 4 – NO das principais classes químicas isoladas dos gêneros da tribo Miliuseae

TRIBO	GÊNERO	ALC	DIT	OLI	TRI	LGN	FLA	ACE	LAC	XAN	SES	EST	AMD	
MILIUSAE	<i>Alphonsea</i>	19	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	
	<i>Desmopsis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Ericosanthum</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Fitzalania</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Haplostichanthus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Marypopetalum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Meiogyne</i>	12	-	5	-	-	-	-	7	-	-	-	-	
	<i>Milusa</i>	13	-	5	28	18	2	-	-	-	-	-	-	
	<i>Mitrephora</i>	17	19	10	4	1	1	1	-	-	1	7	4	
	<i>Neouvaria</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Oncodostigma</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Orophea</i>	11	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Phoenicanthus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Popowia</i>	18	-	-	8	-	-	-	-	-	1	-	-	
	<i>Sapranthus</i>	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
	<i>Stelechocarpus</i>	2	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Trivalvaria</i>	09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Phaeanthus</i>	20	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Polyalthia</i>	135	71	21	19	3	19	2	9	1	5	14	21		
SOMA DOS METABÓLITOS	269	92	41	20	41	49	05	18	01	07	22	26		

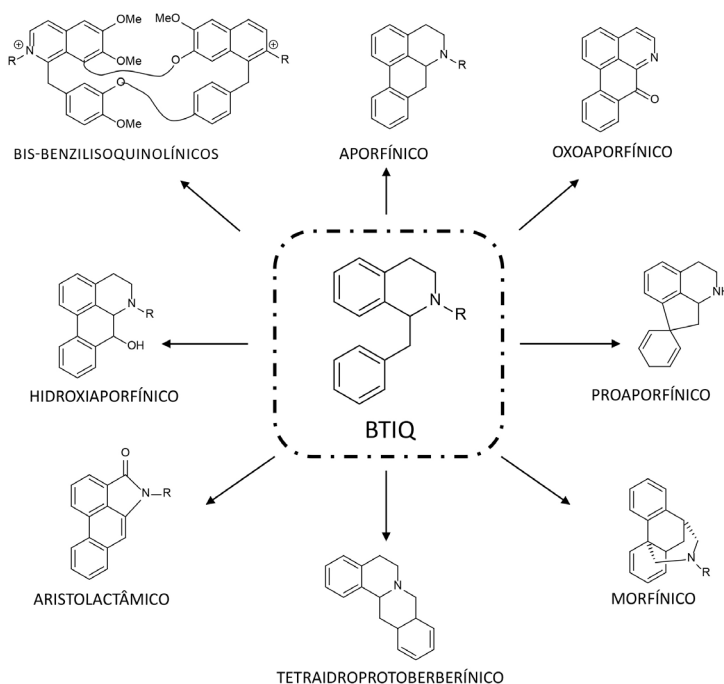
Destaque para produção de alcaloides do gênero *Polyalthia*.

Metabólitos: EST – esteroides; DIT – diterpenos; SES – sesquiterpenos; TRI – triterpenos; ALC – alcaloides; FLA – flavonoides; LGN – lignanas; XAN – xantonas; ACE – acetogeninas; OLI – oligossacarídeos; AMD – amidas; LAC – lactonas.

Fonte: Almeida, Oliveira Jr. & Oliveira, 2015.

A partir do conhecimento da tendência alcaloídica da família Annonaceae, foi realizada a triagem da variabilidade estrutural para definir o tipo de estrutura mais predominante e sua possível especialização de esqueleto. Ficou evidente a grande participação de alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos (BTIQ) em relação aos demais tipos de alcaloides. A análise dos derivados químicos de BTIQ obtidos para Annonaceae, considerando o NO e a sua distribuição nos diferentes *taxa* intrafamiliares, além da diversidade estrutural, permitiu eleger os alcaloides benzilisoquinolínicos como marcadores quimiosistemáticos da família Annonaceae. De posse do marcador quimiosistemático para o grupo em análise, o passo seguinte foi traçar o mapa biogenético e o avanço oxidativo estrutural no qual são relacionados todos os tipos estruturais do grupo biogenético em estudo para Annonaceae. Os *taxa* mais derivados devem conter as estruturas localizadas mais à direita e/ou à base do mapa. Na Figura 7 mostramos os tipos estruturais de alcaloides derivados de BTIQ que ocorrem em Annonaceae, deixando clara a riqueza da diversidade dessa classe química para a família.

Figura 7 – Derivados de alcaloides BTIQ



O mapa biogenético para os alcaloides BTIQ foi elaborado em função da relação biossintética dos esqueletos moleculares, organizados segundo passos oxidativos, de tal forma que, da direita para a esquerda e de cima para a base, o número de etapas reacionais necessárias para a formação de um determinado tipo estrutural aumenta. Esses resultados mostram esqueletos diméricos e, em escala mais expressiva, a derivação sequenciada pelas aporfinas, que constituem o grupo mais diversificado, além de outras duas derivações menos significativas. De acordo com essas considerações, pode-se perceber estreita coerência da posição de um clado Pantropical, que é formado por representantes com porte arbóreo, com uma química micromolecular compatível com a linha de sequenciamento das aporfinas. Esse grupo alcaloídico, bem diversificado em Annonaceae, ocupa, no mapa biogenético, um posicionamento mais para o alto e para o lado esquerdo do esquema, confirmando uma colocação pouco derivada na família.

Os estudos quimiosistemáticos permitem também uma avaliação abrangente da ocorrência de metabólitos especiais em um determinado táxon. Dessa forma, foi possível observar que, a partir da nova estruturação filogenética de Annonaceae, muitos gêneros circunscritos em subfamílias e tribos tinham poucos registros sobre sua composição química em metabólitos especiais, o que suscita uma busca racional e direcionada, não apenas de tais metabólitos, mas também de sua função biológica.

A ramificação biossintética observada em Annonaceae evidencia que o nível de evolução de um grupo monofilético em um período não foi significativamente afetado. Esse panorama torna-se claro quando comparamos a distribuição pantropical, a estrutura morfológica (porte arbóreo) e a filogenia molecular da família. Todos esses parâmetros apontam baixas taxas de derivação em Annonaceae. A família Annonaceae, apesar de ter registros de ocorrência para várias classes químicas, especializou-se na produção de alcaloides benzilisoquinolínicos. Esse arsenal metabólico constitui o marcador quimiosistemático para a família, representando 48% do total de metabólitos especiais produzidos por todas as espécies estudadas. A análise do mapa biogenético de Annonaceae permite observar as curtas linhas de derivação, com o maior desempenho para os derivados porfínicos (Almeida, Oliveira Jr. & Oliveira, 2015).

Considerando os resultados dos estudos quimiosistemáticos, especialmente os que analisam os parâmetros evolutivos da família com base na análise em seu marcador quimiotaxonômico, os alcaloides BTIQ, foi possível concluir que, apesar do aumento significativo do NO, especialmente o dos alcaloides, Annonaceae mantém um perfil químico sem maiores alterações, similar aos resultados encontrados nos estudos elaborados por Barreiros (1983).

## Considerações Finais

Este capítulo está apoiado numa estrutura metodológica que compreende diferentes áreas do conhecimento científico, propondo uma atividade multidisciplinar que reúne os conhecimentos em quimiotaxonomia, filogenia e química de produtos naturais. Nos últimos anos, a busca de entidades químicas biologicamente relevantes obteve menor êxito quando guiada basicamente por estudos baseados em características morfológicas, uma vez que mudanças no processo biossintético vegetal nem sempre vêm acompanhadas por alterações morfológicas. Assim, além da importância do estudo interpretativo da distribuição de cada uma das classes de metabólitos e sua correlação com determinado táxon, a quimiosistemática pode contribuir para se prever a tendência de determinada classe de metabólitos ocorrer em determinado táxon, facilitando a busca racional por novos agentes bioativos na pesquisa científica.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. G. S.; OLIVEIRA JR., R. G. & OLIVEIRA, A. P. ANNONACEAE: Tópicos selecionados. In: KAPLAN, M. A. C. *et al.* *Panorama Quimiosistemático em Annonaceae*. Curitiba: CRV, 2015.
- ALSTON, R. E. & TURNER, B. L. *Biochemical Systematics*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1963.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105-121, 2009.
- BARREIROS, E. L. *Evolução de alcalóides benzilisoquinolínicos em Angiospermae*, 1983. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- BARREIROS, E. L. *Flavonóides como Marcadores Sistemáticos da família Leguminosae*, 1990. Tese de Doutorado, São Paulo: Universidade de São Paulo.
- BORIN, M. R. M. & GOTTLIEB, O. R. Steroids, taxonomic markers? *Plant Systematics and Evolution*, 184: 41-76, 1993.
- CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolomics: definitions, state-of-art and representative applications. *Química Nova*, 41(1): 75-91, 2018.
- CAPARICA, C. Otto Gottlieb impulsionou a química de produtos naturais. *Ciência & Cultura*, 64(1): 1, 2012.
- CHATROU, L. W. *et al.* A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169: 5-40, 2012.

- CIPRIANI, F. A. *et al.* Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. *Química Nova*, 35(11): 2.125-2.131, 2012.
- CRUZ, A. V. M. *Correlações Quimiosistemáticas em Santaliflorae e Táxons Afins: métodos clássicos e quimioinformática*, 2007. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- DAHLGREN, R. H. T. A system of classification of angiosperms to be used to demonstrate the distribution of characters". *Botaniska Notiser*, 128: 119-147, 1975.
- DAHLGREN, R. H. T. A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of Linnean Society*, 80: 91-124, 1980.
- ERKENS, R. H. J.; MENNEGA, E. A.; LUBBERT, Y. A concise bibliographic overview of Annonaceae, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169: 41-73, 2012.
- FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. & GOTTLIEB, O. R. Diterpenes, taxonomic markers? *Plant Systematics and Evolution*, 195: 149-158, 1995.
- GIBBS, R. D. *Chemotaxonomy of the Flowering Plants*. 4 v. Montreal: McGill-Queen's University Press. 1974.
- GOTTLIEB, O. R. *Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology: an assay into a novel botanical discipline*. Berlin: Springer-Verlag, 1982.
- GOTTLIEB, O. R. Micromolecular systematic: principles and practice. *In*: BISBY, F. A.; VANGHAN, J. G. & WRIGHT, C. A. (Eds.). *Chemosystematics: principles and practice*. London: Academic Press, 1980.
- GOTTLIEB, O. R. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry*, 29(6): 1.715-1.724, 1990.
- GOTTLIEB, O. R. & BORIN, M. R. M. B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma. *Química Nova*, 35(11): 2.105-2.114, 2012.
- GOTTLIEB, O. R. & KAPLAN, M. A. C. Phytochemical Evolution: the redox theory. *Natural Products Letters*, 2 (3): 171-176, 1993.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. & BORIN, M. R. *Biodiversidade: um enfoque químico-biológico*. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1996.
- GOTTLIEB, O. R. *et al.* Biodiversity: the Brazilian interdisciplinary approach. *Ciência & Saúde Coletiva*, 3(2): 97-102, 1998.
- KAPLAN, M. A. C. *et al.* *Abordagem Quimiosistemática e Evolução Química de Fanerógamas*. Seropédica: Editora da UFRRJ, 2010.
- SPORNE, K. R. A re-investigation of character correlations. *New Phytologist*, 85(3): 419-499, 1980.
- SWAIN, T. Chemical plant taxonomy. *In*: GIBBS, R. D. (Ed.). *History of Chemical Taxonomy*. Cambridge: Academic Press, 1963.







## 8

# A Célula Vegetal e seu Metabolismo

*Raquel Elisa da Silva López*

**D**escobrir que as células são unidades funcionais de todos os seres vivos foi um grande avanço conceitual na ciência. As células vegetais se distinguem pela presença da parede celular de composição celulósica, mais ou menos rígida, e de organelas específicas que estão envolvidas em funções particulares, além de terem um tamanho maior. As plantas estabelecem relações ecológicas com vários organismos e, também, com o meio ambiente. A partir dessas relações, os vegetais produzem uma enorme diversidade de substâncias essenciais à sua sobrevivência e adaptação às variações do meio onde vivem e as fornecem a todos os seres vivos e a si mesmos. Os vegetais possuem um variado arsenal metabólico para suprir tais necessidades e, portanto, suas características morfológicas, estruturais e genéticas estão adaptadas para isso.

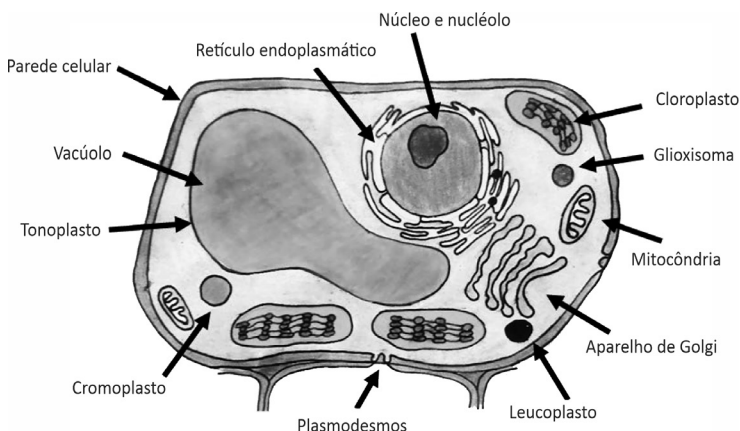
Neste capítulo serão considerados alguns aspectos estruturais da célula vegetal e seu metabolismo, didaticamente dividido em primário e secundário. Esses metabólitos vegetais, além do seu papel fisiológico e ecológico, têm importantes propriedades farmacológicas, o que justifica seu uso na terapêutica de determinadas doenças.

## A Célula Vegetal

Estruturalmente, a célula vegetal está dividida em parede celular e protoplasto. Seu conteúdo intracelular, no qual estão contidos o citoplasma e as organelas, é o protoplasto – que tem origem na palavra *protoplasma*, os constituintes dentro da parede celular. Ele é dividido em núcleo e citoplasma (Alberts *et al.*, 2017). A estrutura geral da célula vegetal é mostrada na Figura 1.

O núcleo da célula vegetal compartilha semelhanças estruturais e funcionais com todas as células eucarióticas, como envoltório nuclear, derivado do retículo endoplasmático (RE), nucleoplasma, cromatina, nucléolo e a organização do material genético de forma linear, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), e é uma das maiores organelas dos eucariotos. Muitas espécies de plantas possuem um número maior de cromossomos do que as células animais, que são geralmente diploides ( $2n$ , sendo  $n$  o conjunto dos cromossomas da espécie). Muitas plantas cultiváveis são poliploides: banana (triploide,  $3n$ ); café, amendoim, algodão, batata e milho (tetraploides,  $4n$ ); trigo (hexaploide,  $6n$ ) e cana-de-açúcar (octaploide,  $8n$ ). A poliploidia é comum, especialmente nas angiospermas (50% a 70%), mais evoluídas do que as gimnospermas. Os poliploides têm vantagens adaptativas pelas mutações cromossômicas durante a evolução da espécie. As células poliploides são maiores, têm maior quantidade de DNA nuclear, motivo pelo qual a célula vegetal é maior. Apesar de a manipulação genética de plantas ser praticada desde a Antiguidade e ser um dos campos mais avançados da ciência, apenas 183 espécies de plantas têm seu genoma sequenciado entre as mais de 400 mil espécies da natureza (Kress *et al.*, 2022).

Figura 1 – Esquema geral da estrutura de uma célula vegetal



Nem todos os plastídios estão representados.

O citoplasma é composto de membrana plasmática, organelas circundadas por duas membranas (plastídios e mitocôndrias), organelas circundadas por uma membrana (peroxissomas, glioxissomas, vacúolos e tonoplasto), sistemas de endomembranas (retículos endoplasmáticos rugosos e lisos, aparelho de Golgi e vesículas) e citoesqueleto, que compreende os microtúbulos e os filamentos de actina que garantem a organização dos componentes intracelulares. A estrutura da membrana plasmática da célula vegetal é muito parecida com as membranas dos eucariotos e segue o modelo de mosaico fluido composto de uma bicamada de fosfolipídeos, esfingolipídeos, glicolipídeos, esteróis e proteínas integrais e periféricas ligadas ao citoesqueleto. Os grupos polares da membrana (alcoólicos, oligossacarídeos e ácido fosfatídico) estão voltados para os meios extra e intracelular em contato com ambientes aquosos, e as cadeias alifáticas dos ácidos graxos (AG) e os grupos apolares dos esteroides estão voltados para o interior da membrana sem contato com a água, formando uma barreira que compartimentaliza o conteúdo intracelular do meio extracelular (Alberts *et al.*, 2017). Ao contrário das células animais, que têm níveis relativamente altos de colesterol nas membranas responsáveis pela fluidez, as células vegetais possuem menores níveis de fitoesteróis, já que a parede celular confere rigidez à célula. Em contraste com animais e fungos, as plantas produzem uma mistura complexa de esteróis:  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Os fitoesteróis participam da manutenção da estrutura e função das membranas, como benefício reduzem a absorção intestinal do colesterol e previnem a formação da placa de ateroma e da doença coronariana isquêmica (Raven, Evert & Eichhorn, 2014); e o campesterol é um precursor dos brassinosteroides, hormônios reguladores do crescimento e desenvolvimento da planta.

Entre as organelas circundadas por duas membranas, os plastídios são as mais características e participam da fotossíntese e armazenamento de moléculas de reserva. As mitocôndrias possuem duas membranas e são os sítios de respiração celular (Nelson & Cox, 2018). Os cloroplastos são os plastídios mais estudados, estão em todas as células e são os sítios da fotossíntese. Os cromoplastos e leucoplastos não são observados em todas as células vegetais e relacionam-se ao armazenamento de metabólitos. Os cloroplastos são cromoplastos verdes, repletos de clorofila e carotenoides, são numerosos e têm estrutura muito complexa. Eles captam a energia luminosa e a utilizam para a formação das ligações covalentes C-C, a partir do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) da atmosfera, para a síntese de D-glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) e amido e consequente liberação do  $\text{O}_2$ . Dessa rede de reações, a fotossíntese, participam sistemas enzimáticos, coenzimas organizadas nos tilacoides, estruturas derivadas da

membrana interna dos cloroplastos que se empilham formando os *grana*. Os cloroplastos têm nucleóides ricos em DNA linear envolvidos na síntese de aminoácidos e AG e no armazenamento temporário do amido. Eles são localizados próximo à parede celular para a captação da luz e às mitocôndrias, por razões energéticas. Existe uma teoria que supõe que mitocôndrias e cloroplastos se originaram da simbiose de uma cianobactéria com uma célula ancestral. Ambas possuem DNA circular sem histonas, semelhantemente às bactérias. Algumas proteínas são sintetizadas nessas organelas, mas a maioria é codificada pelo DNA nuclear (Raven, Evert & Eichhorn, 2014).

Os cromoplastos são plastídios com cores que participam da síntese e armazenamento de pigmentos do metabolismo secundário. Eles são: os eritroplastos, que armazenam pigmentos vermelhos como os licopenos do tomate; os cianoplastos, que contêm as cianofilinas, pigmento azul encontrado em pétalas de flores; os xantoplastos, que têm cor laranja e altos teores de carotenos e xantofilas observados em vegetais amarelos e alaranjados; e os feoplastos, que sintetizam e armazenam a feofeína, pigmento marrom de algas pardas. Os leucoplastos, sem coloração, localizam-se em células de armazenamento de caules, raízes e frutos. Amiloplastos, oleoplastos e proteinoplastos acumulam moléculas do metabolismo primário: respectivamente, amido, AG e proteínas (Buchanan *et al.*, 2000).

As organelas circundadas por membrana única são: vacúolos, tonoplastos, peroxissomos e glioxissomas com estruturas e funções típicas. Contudo, os peroxissomos (ou microcorpos) e vacúolos podem ser observados em células de outros organismos. Eles são esféricos, com conteúdo granuloso e estão associados com segmentos do RE. Não possuem DNA ou ribossomos e, assim como plastídios e mitocôndrias, movimentam-se na célula. Possuem enzimas oxidativas como a *catalase* e a *urato oxidase* para remover o O<sub>2</sub>, formar e remover peróxidos e participam da β-oxidação de AG. Os peroxissomos das folhas estabelecem contato com os cloroplastos, pois participam da primeira fase da fotossíntese, o ciclo de Calvin, que é a fixação do CO<sub>2</sub> atmosférico em ligação orgânica com a participação de um complexo enzimático denominado *RuBisCO*, *ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase*, a enzima mais abundante nas plantas e a proteína mais abundante no planeta (Bracher *et al.*, 2017). Os glioxissomas são peroxissomos especializados nas sementes em germinação, possuem enzimas do ciclo do glioxílico que participam do metabolismo de triacilgliceróis (TAG) e AG acumulados nos oleoplastos em ácido glioxílico que serão convertidos em glicose e usados pelo embrião (Nelson & Cox, 2018).

Os vacúolos, os plastídios e a parede celular são as três características estruturais que distinguem as células vegetais. Os vacúolos são envolvidos por uma

membrana única de composição diferenciada, denominada de tonoplasto ou membrana vacuolar. Eles se originam do RE, não sintetizam proteínas e armazenam água, íons ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , por exemplo), açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, além de regular o teor de água, a composição iônica e o pH celular. A célula vegetal imatura possui inúmeros vacúolos, que aumentam de tamanho e se fundem à medida que o volume celular aumenta. Na célula madura o vacúolo ocupa até 90% do volume (Tan *et al.*, 2019). O tonoplasto é rico em bombas e canais iônicos que transportam açúcares, peptídeos, alcaloides e íons para seu interior, e sua composição proteica e lipídica muda de acordo com as condições fisiológicas e ambientais. Eles não sintetizam moléculas, mas armazenam metabólitos de reserva nas sementes; removem e retém metabólitos secundários, como taninos, nicotina e xenobióticos; detoxificam herbicidas; estocam compostos antimicrobianos; reduzem danos oxidativos; e têm papel de defesa. Acumulam pigmentos polares de cores azul, roxa, violeta e vermelho escuro que conferem cores características ao nabo, repolho, uvas, cerejas, ameixas, flores e folhas. Eles possuem enzimas digestivas, sendo comparáveis aos lisossomas animais e participam da autofagia durante a escassez de nutrientes. Comparativamente ao pH citossólico (pH ~ 7,2), seu ambiente interno é ácido (pH 5,0). Eles são organelas estratégicas para a sobrevivência da célula pela hidratação, participam das trocas de material e informações entre meio ambiente, plantas e organismos (Kapilan, Vaziri & Zwiazek, 2018).

Os sistemas de endomembranas vegetais incluem RE, complexo de Golgi e suas vesículas e são semelhantes aos de todos os eucariotos, pois são conservados na morfologia e função e têm grande capacidade de síntese e secreção de substâncias. O RE é um complexo tridimensional de túbulos e vesículas achatadas que se estende por todo o citoplasma e funciona como um sistema de comunicação, distribuindo proteínas e lipídeos para toda a célula. O RE da célula vegetal forma um conjunto de filamentos, os *plasmodesmos*, que atravessam a parede celular e conectam uma célula vizinha, comunicando-se entre elas. O RE rugoso é o principal sítio celular de síntese de proteínas e muitas delas são direcionadas para o RE liso e o complexo de Golgi onde sofrem modificações pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, alquilação, sulfatação, isoprenilação, glicosilação, carboxilação, formação de pontes dissulfeto, entre outras, que conferirão funções específicas e determinarão suas funções. O RE liso é o principal local da síntese de lipídeos, armazenamento e regulação do cálcio intracelular e possui um sistema de metabolismo de xenobióticos que envolvem as reações de oxidação/redução

e conjugação/hidrólise. O complexo de Golgi é um conjunto de membranas que se apresenta como cisternas, discos ou sacos achatados empilhados e posicionados na rota de saída do RE, fazendo parte da secreção de proteínas, carboidratos e lipídeos. O complexo de Golgi é o local em que ocorre a síntese de polissacarídeos não celulósicos e de proteoglicanos e a glicosilação de proteínas, pela ação das *glicosiltransferases dependentes de uridina e difosfato* (Buchanan *et al.*, 2000).

Finalmente, a parede celular é uma das estruturas mais peculiares das células vegetais e é formada por microfibrilas de celulose, que são polímeros lineares de glicose com ligações glicosídicas  $\beta 1 \rightarrow 4$ , arranjadas de modo complexo. Tais microfibrilas estão imersas em uma matriz com hemiceluloses, pectinas e proteínas (extensinas e enzimas como *peroxidases*, *fosfatases*, *celulases* e *pectinases*), ceras, cutina, suberina e lignina. As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados, em ligações  $\beta 1 \rightarrow 3$ , de baixa massa molecular, que ligam celulose e lignina e promovem a flexibilidade das plantas. Elas são formadas também por xilose, glicose e ácidos urônicos. A lignina, substância fenólica mais abundante nas plantas depois da celulose, confere rigidez, força e resistência às paredes celulares, permitindo suportar o próprio peso e transportar água e minerais desde a raiz. Também é produzida em resposta à infecção ou lesão tecidual e tem propriedade antioxidante (Liu, Luo & Zheng, 2018). A parede é fonte de substâncias ativas e é importante defesa contra bactérias e fungos pela produção das fitoalexinas. A síntese de fitoalexinas é estimulada por micro-organismos com parede celular, estresses abióticos, como radiação ultravioleta (UV), choque térmico, ruptura de tecidos, entre outros. As fitoalexinas são antimicrobianas e pertencem a diversas classes químicas como flavonoides, terpenos, alcaloides e poliacetilenos. A expressão das fitoalexinas varia de acordo com a família botânica: de Brassicaceae foram isoladas 44 fitoalexinas, em sua maioria alcaloides derivados L-triptofano como camalexina, rutalexina e brassilexina. As leguminosas produzem fitoalexinas derivadas de isoflavonas e pterocarpanos como medicarpina e araquidinas. As fitoalexinas das uvas (Vitaceae) são os estilbenos resveratrol e  $\epsilon$ -viniferina, as de Brassica são antioxidantes, anticarcinogênicas e protetoras cardiovasculares. A 3-desóxi-antocianidina do sorgo (*Sorghum bicolor*) reduz a incidência de cânceres gastrointestinais, e o resveratrol de *Vitis vinifera* tem efeitos anticarcinogênico e anti-inflamatório e inibe a oxidação da lipoproteína de baixa densidade, prevenindo doenças cardiovasculares (Oh, Jang & Kim, 2018).

## Considerações sobre Metabolismo

O metabolismo é uma rede de reações químicas finamente acopladas e reguladas para produção/extração de energia e poder redutor de moléculas pequenas, como glicose, AGs e aminoácidos, bem como a síntese de macromoléculas para o armazenamento de energia e para a construção das estruturas celulares, como amido, celulose, proteínas, TAG. As enzimas são catalisadores específicos que direcionam essas reações que são denominadas de rotas ou vias metabólicas. A adenosina trifosfato (ATP) é a “moeda universal” de energia livre (G), pois fornece a energia necessária para a realização dos processos metabólicos. A ATP é sintetizada a partir de adenosina difosfato (ADP) + fosfato inorgânico ( $P_i$ ), e a energia para a sua síntese é proveniente da hidrólise das ligações C-C de moléculas pequenas. Todos os organismos precisam de entrada contínua de energia – da hidrólise do ATP – para a manutenção da vida, que envolve, basicamente: trabalho mecânico na movimentação; transporte ativo de moléculas e íons; e síntese de macromoléculas ou moléculas biologicamente ativas a partir de precursores simples. O metabolismo é constituído de reações que necessitam e geram energia. O tipo de metabolismo varia de acordo com as condições de disponibilidade de nutrientes e energia: se o organismo tem grande disponibilidade de nutrientes e energia, ele passará a armazenar tais nutrientes sob a forma de macromoléculas, como amido (planta), glicogênio (animais), proteínas e TAG, e esse estado metabólico é denominado de anabolismo. Em situações de baixa disponibilidade, as reservas energéticas são mobilizadas, esse estado é chamado de catabolismo. O metabolismo de animais é mais bem conhecido do que o vegetal, contudo, nos eucariotos, muitas vias são conservadas. As plantas, ao contrário dos animais, que são seres quimiotróficos e obtêm energia através da quebra das ligações C-C, são indivíduos fototróficos, que captam a energia luminosa e a transferem para as ligações C-C, sintetizando açúcares por meio da fotossíntese, liberando  $O_2$  para a atmosfera, que possibilitou o desenvolvimento da vida em nosso planeta como a conhecemos. Neste capítulo, serão abordados alguns aspectos da fotossíntese. Os produtos ativos das plantas medicinais derivam dos seus produtos finais, como a glicose, o gliceraldeído-3P (G3P) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), e de vias metabólicas específicas (Nelson & Cox, 2018).

As plantas têm grande capacidade de síntese de moléculas orgânicas e, por isso, seu metabolismo é didaticamente dividido em metabolismo primário e metabolismo secundário.



## Metabolismo primário

O metabolismo primário é um conjunto de reações universais, que acontecem em todos os seres vivos, logo é conservado. Ele garante os processos essenciais à vida da planta, como fotossíntese, respiração oxidativa, movimentos celulares, e se caracteriza pela grande produção de carboidratos, lipídeos e proteínas.

### *Fotossíntese*

A fotossíntese ocorre nos cloroplastos em dois estágios: o primeiro é a fase clara ou reações luminosas, e o segundo é a fase escura ou de fixação de carbono ou ciclo de Calvin. As *clorofilas*, os *carotenoides* e as *ficobilinas* são os principais pigmentos fotossintetizantes e organizados em fotossistemas nos tilacoides. Existem dois fotossistemas: I e II. A energia luminosa absorvida pelos pigmentos é transferida até a *clorofila a* no centro de reação e, com isso, um de seus elétrons eleva-se para um nível maior de energia, que é transferido para uma molécula receptora de elétrons, o  $P_{680}$  no fotossistema II e o  $P_{700}$  no fotossistema I para iniciar o fluxo eletrônico. A transferência destes elétrons culminará com a síntese de ATP a partir de  $ADP + Pi$  e a formação de NADPH a partir de  $(NADP^+) + H^+$ , representando o modelo atual de como os dois sistemas trabalham juntos, de modo simultâneo e contínuo (Figura 2) (Raven, Evert & Eichhorn, 2014).

Os *fotossistemas* estão separados no cloroplasto: o fotossistema II está nos tilacoides dos *grana* (grânulos), e o I, nos tilacoides do estroma. Os componentes de transporte de elétrons são semelhantes aos da cadeia de transporte mitocondrial de elétrons. Eles estão organizados na membrana de modo semelhante, e a transferência de elétrons acoplada ao bombardeamento de  $H^+$  do espaço intermembranar gera um gradiente eletroquímico de  $H^+$  que impulsiona a síntese de ATP. Esse processo é análogo à síntese de ATP na mitocôndria, na fotossíntese ele é chamado de fotofosforilação. Logo, ocorre a síntese de ATP e redução de  $NADP^+$  para formar NADPH na fase clara da fotossíntese (Raven, Evert & Eichhorn, 2014).

Na segunda série de reações da fotossíntese ou ciclo de Calvin, o ATP e NADPH gerados na fase clara são usados para fixar e reduzir o carbono do  $CO_2$  que chega pelos estômatos de folhas e caules verdes. Esse ciclo ocorre em três etapas:

1) *fixação* – inicia-se quando três moléculas de  $\text{CO}_2$  são ligadas a três moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP), reação catalisada pela *RuBisCO*. Logo depois a *RuBisCO* catalisa a hidrólise dos três compostos de seis carbonos para formar seis moléculas de 3-fosfoglicerato (Bracher *et al.*, 2017);

2) *redução* – as seis moléculas de 3-fosfoglicerato são fosforiladas até chegar a 1,3 bisfosfoglicerato pela *3-fosfoglicerato cinase* com gasto de ATP e formação de ADP. Logo, ele é reduzido pela *gliceraldeído 3P desidrogenase* em seis moléculas de gliceraldeído-3P (G3P), que usa o NADPH e libera *Pi*. Tanto o 1,3 bisfosfoglicerato quanto o G3P são intermediários da glicólise;

3) *regeneração do receptor* – seis das cinco moléculas de G3P são combinadas para formar três moléculas de RuBP para iniciar o ciclo e fixar mais três moléculas de  $\text{CO}_2$ . G3P é o produto líquido e do ciclo de Calvin, que será transportado para o citosol e é o ponto de partida para a síntese de todos os açúcares (Nelson & Cox, 2018). Embora a glicose seja representada como o carboidrato produzido pela fotossíntese, pouca glicose livre é gerada e a maior parte do  $\text{CO}_2$  fixado é convertido em sacarose ou em amido. Grande parte do G3P produzido pelo ciclo de Calvin é exportada ao citosol; contudo, o G3P que permanece nos cloroplastos é transformado em glicose e posteriormente em amido, que é temporariamente estocado como grânulos no estroma durante os períodos de luz. Durante a noite, a sacarose é produzida a partir desse amido estocado e exportada da folha para outras partes da planta (Buchanan *et al.*, 2000).

### *Metabolismo de carboidratos*

Os carboidratos, especialmente a glicose, são os principais substratos para a produção de energia sob forma de ATP e de intermediários energéticos, bem como para a síntese de moléculas orgânicas como oligo e polissacarídeos, aminoácidos, corpos cetônicos, entre outras moléculas biologicamente ativas.

### *Síntese do amido e sacarose*

Consideraremos o metabolismo de carboidratos a partir do G3P, o produto do ciclo de Calvin. A maior parte do  $\text{CO}_2$  fixado é convertido em sacarose, principal forma de transporte de açúcares, via floema, ou em amido, a principal forma de armazenamento de glicose na planta. O G3P que permanece

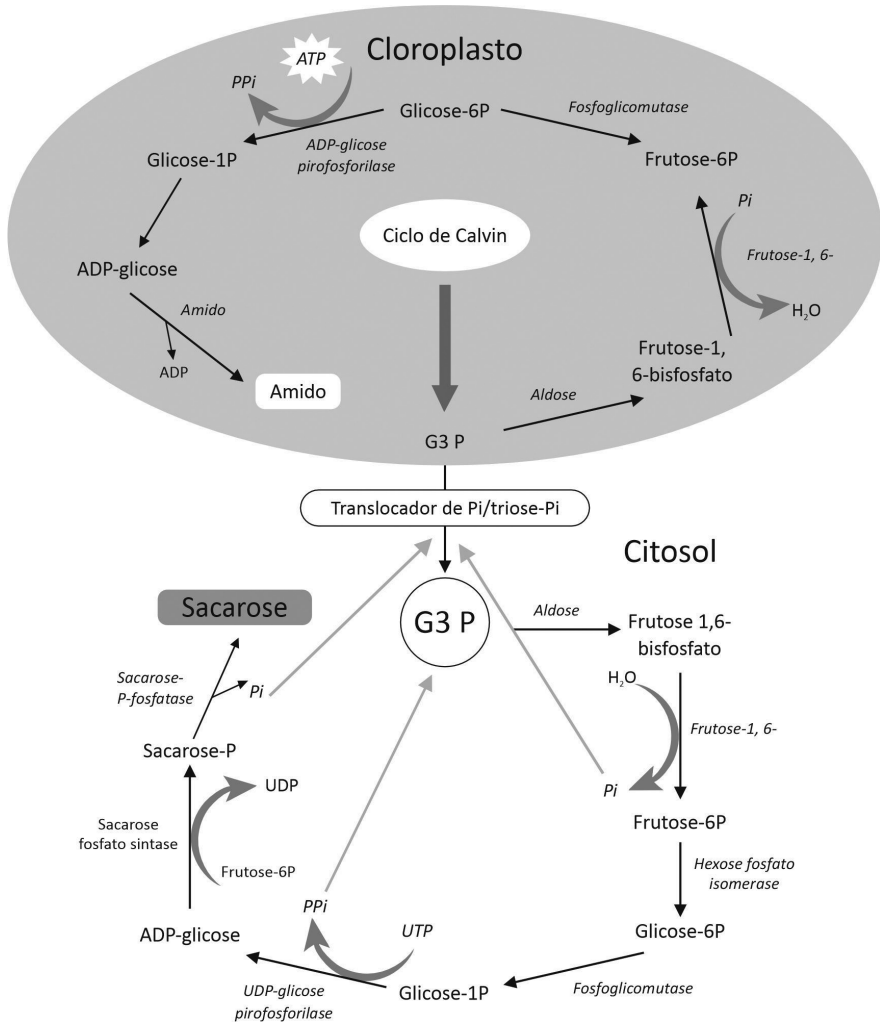
no estroma do cloroplasto é convertido em hexoses e amido, temporariamente armazenados no período de luz sob forma de grãos de amido. Nos amiloplastos das sementes, raízes e tubérculos, o amido é estocado por longos períodos. Ele é um polímero de glicose encontrado sob duas formas: a amilose, formada apenas ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  e conformação espiralada, e a amilopectina, a forma ramificada com ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$ , além das ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Contudo, grande parte do G3P vai para o citosol; e o G3P é convertido em hexoses e, posteriormente, em sacarose, dissacarídeo formado por glicose e frutose em ligações  $\alpha(1\rightarrow2)$  através de uma série de reações resumidas na Figura 4 (Pfister & Zeeman, 2016).

As sínteses de amido e sacarose compartilham muitos intermediários; contudo, essas rotas ocorrem em organelas separadas e possuem isoenzimas que são únicas para o cloroplasto e o citosol e, nas etapas de condensação de açúcar para formar as ligações glicosídicas, utilizam a uridina difosfato (UDP) como carreador da glicose (Figura 2). A UDP-glicose é formada pela condensação da uridina trifosfato (UTP) e glicose-1P, catalisada pela enzima *UDP-glicose pirofosforilase*, liberando um pirofosfato (*PPi*). Os nucleotídeos UTP ou ATP se condensam para formar nucleotídeos difosfatados ligados à glicose ou a outros açúcares e funcionam como carreadores das unidades glicídicas em todas as reações de sínteses de oligo e polissacarídeos nos organismos superiores (Pfister & Zeeman, 2016). As concentrações relativas de *Pi* e G3P são os principais fatores que controlam se o carbono fixado pela fotossíntese é alocado como amido nos cloroplastos ou como sacarose no citosol. Esses dois compartimentos se comunicam pelo translocador de fosfato/triose-fosfato que transloca o *Pi* em direção ao cloroplasto e G3P para o citosol. Quando ocorre diminuição da concentração de *Pi* no citosol, a exportação de G3P para o citoplasma diminui e, conseqüentemente, a síntese de amido no cloroplasto aumenta (Figura 3) (Kumar, Mukherjee & Ayele, 2018).

Estas rotas acontecem em tempos distintos: o amido é sintetizado durante o dia pela fotossíntese, e a sacarose é formada quando a luminosidade diminui, mobilizando o amido no cloroplasto. A *amido fosforilase* catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  do amido, promovendo a reação de *Pi* e a liberação de glicose-1P. À medida que a glicose-1P é produzida, reage com o UTP, formando UDP-glicose + *PPi* pela *UDPG pirofosfatase*. Em seguida, a *sacarose sintetase* catalisa as reações que produzem sacarose-6P + UDP a partir da UDPG + frutose 6P. Pela ação de uma *fosfatase*, a sacarose-6P é desfosforilada produzindo sacarose + *Pi*. A sacarose é transportada pelo floema e distribuída para todas as células da planta e, assim que entra nas células, é hidrolisada irreversivelmente pela *invertase*, em glicose

e frutose. A glicose e a frutose são fosforiladas no carbono 6 pela *hexoquinase*, originando glicose 6P e frutose 6P, que entram na via glicolítica, no citoplasma (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014).

Figura 2 – Resumo da biossíntese do amido e sacarose a partir do G3P nas células fotossintéticas



### *Glicólise*

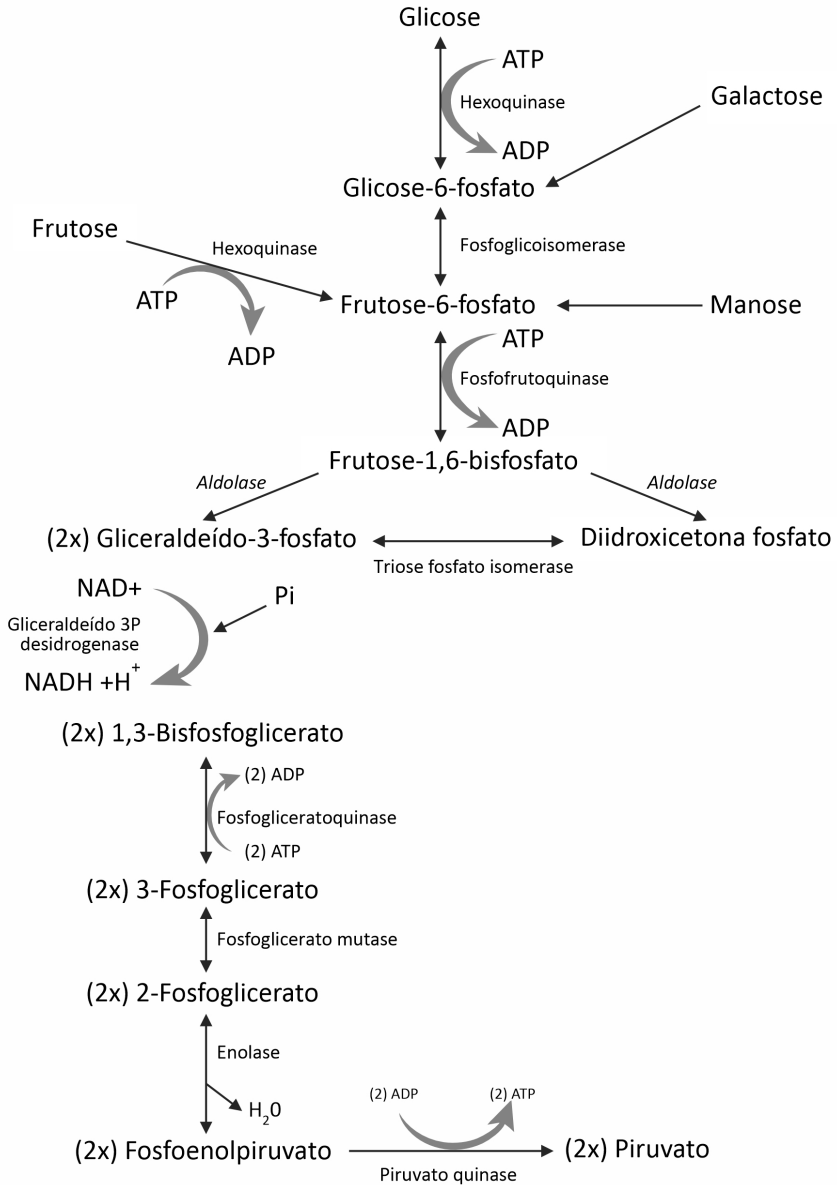
A glicólise, que tem papel central no metabolismo dos seres vivos, é a primeira etapa da oxidação de hexoses e ocorre no citoplasma para produção de energia. Seus produtos finais são piruvato, em aerobiose, e lactato, em anaerobiose (Figura 4) (Nelson & Cox, 2018).

A primeira reação da glicólise envolve a fosforilação da glicose e de outras hexoses pela *hexoquinase*, reação irreversível, com gasto de uma molécula de ATP por hexose. Essa reação mantém as hexoses dentro da célula e conservam a energia sob forma de ligação fosfato, gerando glicose-6P. Esta é isomerizada a frutose-6P pela *fosfoglicoisomerase*, que é novamente fosforilada para formar frutose-1,6-bisfosfato pela *fosfofrutoquinase*. Essa fase, a primeira da via glicolítica, é a preparatória, que leva a glicose até frutose-1,6-bisfosfato, com gasto de duas moléculas de ATP. Nela todos os intermediários apresentam seis carbonos.

A segunda é a fase de pagamento, quando o ATP é sintetizado a partir de ADP e de intermediários fosforilados. Inicia-se quando a *aldolase* cliva a frutose-1,6-bisfosfato em duas moléculas com três carbonos, o G3P, e di-hidroxiacetona, que é isomerizada em G3P (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014). As reações são duplicadas porque são gerados dois G3P a partir da glicose. Os intermediários sofrem modificações para aumentar sua energia livre e propiciar a síntese de quatro moléculas de ATP. Além disso, são formadas duas moléculas de NADH a partir de duas moléculas de NAD<sup>+</sup> e duas moléculas de piruvato. Os intermediários compreendem desde o G3P até o piruvato. Os (*e*) do NADH são então transportados pela cadeia respiratória para produção de ATP (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014).

Em condições aeróbicas o piruvato é transportado para dentro das mitocôndrias e sofre descarboxilação oxidativa pelo complexo multienzimático piruvato desidrogenase, formado pelas enzimas *piruvato desidrogenase*, *di-hidrolipoil transacetilase* e *di-hidrolipoil transacetilase*, que necessitam de cinco coenzimas: tiamina pirofosfato, derivada da vitamina B1; ácido lipoico; flavina adenina dinucleotídeo (FAD), derivada da riboflavina (vitamina B2); coenzima A (CoA), derivada do ácido pantotênico (vitamina B5); e NAD<sup>+</sup>, derivada da niacina (vitamina B3), como na seguinte reação: Piruvato + CoA + NAD<sup>+</sup> → Acetil-CoA + CO<sub>2</sub> + NADH + H<sup>+</sup>. Essa conversão em acetil-coenzima A (acetil-CoA) é o elo entre a glicólise e a respiração celular, pois a acetil-CoA carrega duas unidades de C provenientes da glicose e é fonte de energia para o ciclo de Krebs (Nelson & Cox, 2018).

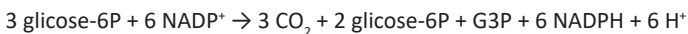
Figura 3 – Reações da via glicolítica simplificada



### *Via das pentoses*

A glicólise não é a única rota de oxidação da glicose. A via das pentoses-fosfato ou desvio da hexose-monofosfato é uma rota alternativa de oxidação de 5% a 20% da glicose em plantas (Figura 6). Ocorre no citosol e plastídios, não gera ATP, mas produz substâncias fundamentais: NADPH, para as sínteses redutivas de AG e esteroides, é um substrato para as reações de remoção de radicais livres do O<sub>2</sub> como na redução da glutatona; ribose, para biossíntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos; eritrose-4P, que se combina com o fosfoenolpiruvato (PEP) que produz compostos fenólicos, como aminoácidos aromáticos e precursores de antocianinas, ligninas, flavonoides, fitoalexinas e auxinas; intermediários do ciclo de Krebs (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014).

A sequência de reações na via das pentoses-fosfato é dividida em: 1) fase oxidativa, irreversível, em que a glicose-6P sofre desidrogenação e descarboxilação formando uma pentose, a ribulose-5P; e 2) fase não oxidativa, reversível, em que a ribulose-5P é convertida a glicose-6P por reações envolvendo a *transcetolase* e a *transaldolase*. É um processo multicíclico no qual três moléculas de glicose-6P produzem três moléculas de CO<sub>2</sub> e três pentoses, que se rearranjam para gerar duas moléculas de glicose-6P e uma molécula de G3P. Duas moléculas de G3P regeneram a glicose-6P, numa via que pode conduzir à completa oxidação da glicose:



Em tecidos vegetais jovens e meristemáticos, a atividade glicolítica é mais intensa, e, à medida que o tecido amadurece, a via das pentoses se intensifica proporcionando a deposição de ligninas e metabólitos secundários usando o NADPH como redutor. Essa via supre o processo fotossintético com o NADPH necessário para a assimilação do CO<sub>2</sub>. O NADP<sup>+</sup> pode ser reduzido pela cadeia respiratória e, também, pela via das pentoses-fosfato (Taiz *et al.*, 2004).

### *Degradação do amido e outros polissacarídeos de reserva*

Os animais armazenam glicose na forma de glicogênio no fígado e músculos e as plantas armazenam diversos polissacarídeos, principalmente amido. Em situações de mobilização de reservas, como na germinação de

sementes, as ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  do amido são hidrolisadas pelas  $\alpha$  e  $\beta$  *amilases*, produzindo uma mistura de maltose, maltotriose, dextrina-limite e glicose. A *enzima desramificante* hidrolisa as ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$  da dextrina-limite originando glicose e maltose, esta, por sua vez, é clivada em duas moléculas de glicose pela maltase que hidrolisa a ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$ . A glicose originada da mobilização do amido é fosforilada a glicose-6P e entra na via glicolítica (Macneill *et al.*, 2017).

Os polissacarídeos de parede são mobilizados nas sementes e têm como função prover o embrião de energia durante seu desenvolvimento. Os principais são os mananos, xiloglucanos e galactomananos. Os mananos são polímeros de manose com ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow3)$  e são hidrolisados por *endo- $\beta$ -mananase* e  *$\beta$ -manosidase*, liberando manose para ser convertida em frutose-6P para, então, ser metabolizada na glicólise para produção de ATP (Figura 6). Nas plantas, a degradação de mananos é induzida por giberelinas, fitormônios que estimulam a germinação, crescimento e desenvolvimento de folhas e flores. Os xiloglucanos são os principais componentes da hemicelulose e o segundo polissacarídeo mais abundante depois da celulose. Além de sua função estrutural, é fonte de energia. São constituídos por xilose, arabinose, glicose, manose, galactose, ácido glicurônico e galacturônico em ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow4)$ . São mobilizados pelas hidrolases  $\beta$ -galactosidase, *endo- $\beta(1\rightarrow4)$ -glucanase*,  *$\alpha$ -xilosidase* e  $\beta$ -glucosidase, após a germinação das sementes, produzindo hexoses que são direcionadas para a via glicolítica para produção de energia. As galactomananas, polímeros de glicose e galactose, são depositadas nas paredes celulares das sementes gerando seu espessamento e sua mobilização é catalisada por  $\alpha$ -galactosidase, *endo- $\beta$ -mananase* e *manosidase*, originando manose e galactose ao mesmo tempo que há produção de sacarose. Os galactanos têm cadeia linear alternada de  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-galactose com ligações  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow6)$ , apresentando arabinose, glicose, ácidos urônicos e ramnose, e, após a germinação, a maior parte da galactose e da arabinose é removida da parede pelas enzimas  $\alpha$ -arabinosidasases e  $\beta$ -galactosidasases. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise são direcionados também para a via glicolítica (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014; Macneill *et al.*, 2017). O metabolismo de carboidratos em plantas é muitíssimo complexo, pois sintetizam uma grande diversidade de açúcares com funções que vão além das estruturais e energéticas.

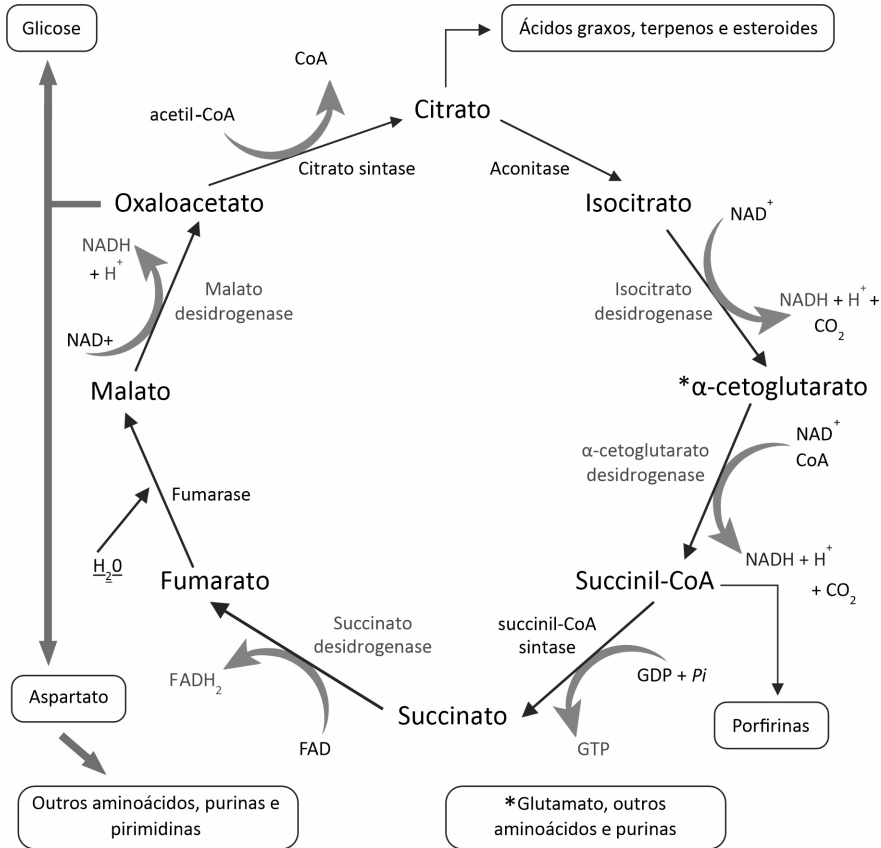
#### *Metabolismo energético intermediário: ciclo de Krebs e respiração oxidativa*

Os substratos para a produção de energia como carboidratos, lipídeos e aminoácidos são metabolizados para formar a acetil-CoA ou componentes do ciclo de Krebs. A acetil-CoA, para entrar nesse ciclo, condensa-se com um



ácido dicarboxílico de quatro carbonos, o oxaloacético, formando um ácido tricarboxílico de seis carbonos – o ácido cítrico – liberando CoA. Essa reação, uma condensação aldólica seguida por hidrólise, é catalisada pela enzima citrato sintase (Figura 4).

Figura 4 – Ciclo de Krebs



Este ciclo provê intermediários para síntese de glicose ou outras hexoses, aminoácidos, AG, terpenos, esteroides, porfirinas, purinas e pirimidinas.

\*O α-cetoglutarato origina glutamato, outros aminoácidos e purinas.

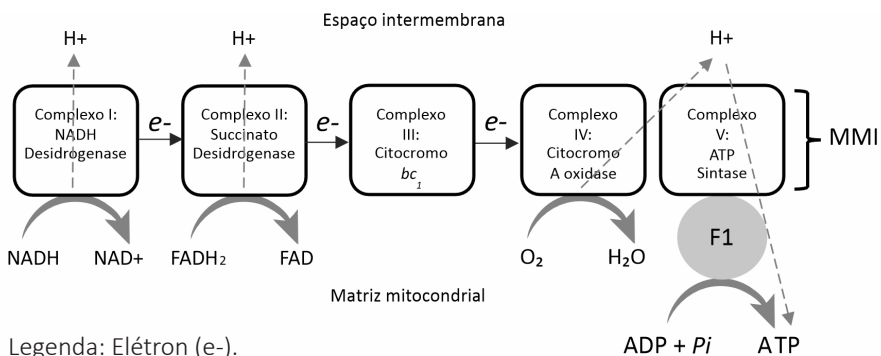
Em termos energéticos, o evento mais importante desse ciclo é a remoção dos equivalentes de redução sob forma de nucleotídeos que foram reduzidos pelas desidrogenases específicas: isocitrato desidrogenase,  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase. Para cada molécula de acetil-CoA que entra no ciclo, são removidas três moléculas de NADH e uma de FADH<sub>2</sub>. Outros eventos importantes são a descarboxilação oxidativa e a formação de guanosina trifosfato (GTP). Além da reconhecida função na produção de energia, esse ciclo tem importante papel biossintético quando as demandas energéticas da planta estão supridas. Muitos de seus intermediários são direcionados para síntese de glicose e outros carboidratos, AG, esteróis, terpenos, aminoácidos, bases nitrogenadas púricas e pirimidínicas, porfirinas e clorofilas (Nelson & Cox, 2018).

Os equivalentes de redução são removidos, sob a forma de NADH e FADH<sub>2</sub>, durante as reações do ciclo de Krebs, da via glicolítica, da conversão do piruvato a acetil-CoA, bem como de outras reações de oxirredução. Os elétrons do NADH e FADH<sub>2</sub> são transportados pela cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna (MMI) para produção de ATP. O ciclo de Krebs (Figura 4) ocorre em associação com a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa (Figura 5). Nas cristas da MMI, os transportadores de elétrons da cadeia respiratória estão organizados em: complexo I NADH desidrogenase, complexo II succinato desidrogenase, complexo III citocromo *bc*<sub>1</sub>, complexo IV citocromo oxidase e complexo V ATP sintase (Figura 7). Eles estão posicionados em ordem decrescente de potencial redox; o primeiro transportador, o NADH, tem maior potencial redox, e o último, o O<sub>2</sub>, tem o menor potencial e é o aceptor final de elétrons. Todos os transportadores têm grande capacidade de se oxidar e reduzir e, ao receberem elétrons, têm sua energia livre aumentada e, quando transferem tais elétrons para o próximo transportador, liberam a energia que é captada para a síntese de ATP a partir de ADP + *Pi* pela *ATP sintase* do corpúsculo elementar, que é formado por um canal proteico de prótons, a partícula Fo, e pela partícula F1, que se projeta para a matriz mitocondrial e está ligada à partícula Fo (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014).

Os elétrons são transportados até reduzirem o O<sub>2</sub> que se combina com H<sup>+</sup> originando H<sub>2</sub>O a partir de  $\frac{1}{2}$  O<sub>2</sub> e 2H<sup>+</sup>. Se a redução do O<sub>2</sub> não for completa, podem se formar os radicais livres ou espécies ativas do oxigênio que são ânion superóxido, íon hidroxila e peróxido de hidrogênio com alto poder oxidante, sobretudo nas membranas, causando danos celulares. Durante o transporte mitocondrial de elétrons, os H<sup>+</sup> dos equivalentes de redução (2H) são bombeados para o espaço intermembrana, formando um gradiente de pH entre o espaço, que fica muito ácido e com carga positiva pelo acúmulo de H<sup>+</sup>, e a matriz. À medida que os elétrons são transportados, libera energia em três locais da cadeia com energia suficiente para síntese de ATP. Esses locais da cadeia respiratória são: NADH →

coenzima  $Q_{10}$ ; citocromo  $bc \rightarrow$  citocromo A; citocromo A  $\rightarrow O_2$  (Nelson & Cox, 2018). A energia liberada pelo transporte mitocondrial de elétrons é captada pela *ATP sintase* do complexo V para formar ATP a partir de  $ADP + Pi$ . Para cada equivalente de redução do NADH transportado são formadas três moléculas de ATPs, enquanto para cada molécula de  $FADH_2$ , duas moléculas de ATPs são formadas. Cálculos estequiométricos atuais indicam que, para cada molécula de glicose, são sintetizadas 32 ou 30 moléculas de ATP (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014).

Figura 5 – Esquema simplificado da cadeia respiratória



### Metabolismo de lipídeos

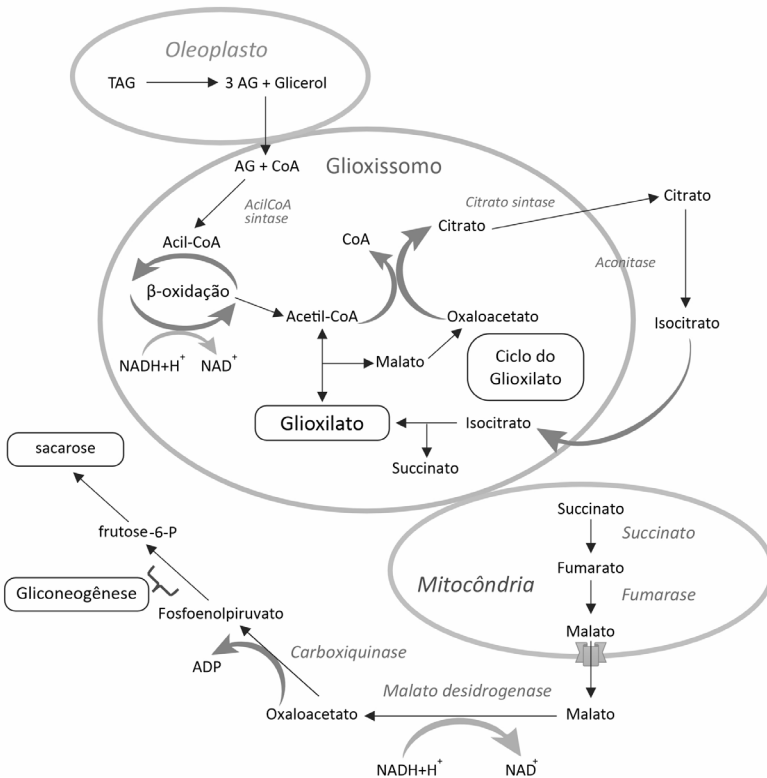
O principal armazenamento de energia nos animais é o TAG no tecido adiposo. Nas plantas eles são estocados em sementes e em alguns frutos. O TAG é formado por três moléculas de AG unidas covalentemente por ligações ésteres aos três grupos hidroxilas (OH) do glicerol. Em plantas os AG são normalmente ácidos monocarboxílicos com cadeia hidrocarbônica não ramificada com 16 ou 18 átomos de carbono. Os principais AG saturados são: láurico (12:0); mirístico (14:0); palmítico (16:0); e esteárico (18:0). Os insaturados podem apresentar uma ou mais ligações duplas e são: oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3) (Solomons, Fryhle & Snyder, 2018; Taiz *et al.*, 2004).

As plantas não transportam lipídeos das sementes para outros tecidos, por isso eles são convertidos na forma mais móvel, geralmente a sacarose. Esse processo é complexo, envolve várias etapas e ocorre nos oleossomos, glioxissomos, mitocôndrias e citosol. Ela se inicia com a hidrólise do TAG pelas lipases liberando AGs, que são oxidados em acetil-CoA. Os AGs são oxidados nos glioxissomos e metabolizados para produzir succinato, que é transportado para as mitocôndrias e lá é convertido a oxaloacetato, que é transformado em

malato. O processo termina no citosol, com a conversão do malato a glicose via gliconeogênese, formando sacarose (Figura 6) (Graham, 2008). Os TAGs são hidrolisados pelas lipases tanto em plantas como em animais. Contudo, nos animais, as *lipases* hidrolisam as ligações ésteres 1 e 3 liberando dois AG e o 2-monoacilglicerol. Nas plantas as lipases hidrolisam todas as ligações ésteres do TAG e libera três AGs e glicerol (3:1) (Kellu & Feussner, 2016).

Após a hidrólise do TAG, os AGs entram no glioixissomo por difusão simples através da membrana e são ativados pela conversão em acil-CoA, pela *acil-CoA sintase*, substrato inicial para  $\beta$ -oxidação; no glioixissomo sofrem ataque oxidativo no C-3 ou no carbono  $\beta$  e são sequencialmente quebrados em acetil-CoA. As enzimas da  $\beta$ -oxidação – *acil-CoA oxidase*, *enoi-CoA hidratase*,  *$\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase* e *acil-CoA transferase (tiolase)* – estão localizadas exclusivamente nos glioixissomos dos tecidos de reserva e catalisam as reações de oxidação, hidratação, desidrogenação e tiólise, respectivamente. Essa seqüência de reações envolve redução de  $\frac{1}{2} O_2$  a  $H_2O$  ou  $H_2O_2$ , formação de NADH e um  $FADH_2$  para a cada acetil-CoA produzido (Nelson & Cox, 2018).

Figura 6 – Degradação de TAG e destino metabólico dos AGs



A acetil-CoA originada na  $\beta$ -oxidação é metabolizada nos glioxissomos e citosol pelas reações do ciclo do glioxilato, encontrado apenas em plantas. Duas moléculas de acetil-CoA (2C) são convertidos numa molécula de 4C, o succinato. A cada volta a acetil-CoA reage com o ácido oxalacético originando citrato que, por sua vez, é isomerizado para formar isocitrato. O citrato sai do glioxissomo para o citosol, retornando como isocitrato que, então, é clivado pela *isocitrato liase* tornando-se succinato e glioxilato. O succinato sai do glioxissomo para a mitocôndria e o glioxilato reage com acetil-CoA pela *malato sintase*, formando malato, que é oxidado pela *malato desidrogenase*, formando oxaloacetato. As enzimas *isocitrato liase* e *malato liase* são exclusivas do ciclo do glioxilato e localizam-se no glioxissomo. Outras três enzimas, *citrato sintase*, *aconitase* e *malato desidrogenase*, também participam do ciclo de Krebs. O succinato que sai da mitocôndria é convertido em fumarato pela *succinato desidrogenase*; a fumarase hidrolisa o fumarato em malato. Este sai da mitocôndria pela lançadeira de malato e, no citosol, é convertido a oxaloacetato e posteriormente a PEP, que é metabolizado pelas enzimas da gliconeogênese para a produção de glicose. A sacarose é o produto final desse processo e é transportada das sementes aos tecidos da planta. Os produtos finais da via do ácido glioxílico são usados para a biossíntese da parede celular ou convertidos em sacarose para produção de ATP (Raven, Evert & Eichhorn, 2014; Nelson & Cox, 2018).

As plantas convertem AGs em glicose para produção de energia, os animais utilizam os AGs para síntese de ATP originando acetil-CoA que irá para o ciclo de Krebs. Os animais não convertem AGs em glicose, diferentemente das plantas. Nas plantas os polissacarídeos são as principais moléculas de reserva energética e são encontrados principalmente na parede celular e nas sementes (Graham, 2008; Kelly & Feussner, 2016).

#### *Metabolismo de aminoácidos e proteínas*

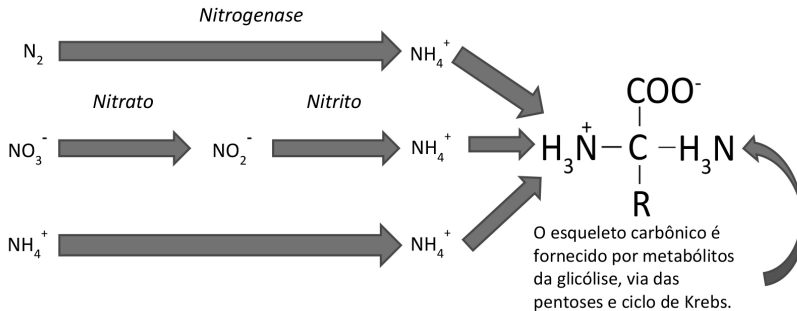
Os aminoácidos são formados por radicais amina e ácido carboxílico e têm grande diversidade de funções cruciais, como: mediadores químicos, neurotransmissores, pigmentos, hormônios e precursores de uma enormidade de compostos orgânicos. Contudo, sua principal função é compor peptídeos e proteínas e, para tal, devem ser L- $\alpha$ -aminoácidos. Sua estrutura geral está mostrada na Figura 7. As proteínas são macromoléculas lineares formadas por aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas que são cruciais para todos os seres vivos.

### *Síntese de aminoácidos e proteínas*

Na natureza, existe uma grande diversidade de aminoácidos, contudo são vinte tipos básicos de L- $\alpha$ -aminoácidos que compõem as proteínas, agrupados em sete grupos de acordo com a semelhança química e estrutural da cadeia lateral: 1) alifáticos – são aqueles que possuem uma cadeia lateral hidrocarbônica como glicina (Gly), valina (Val), alanina (Ala), leucina (Leu) e isoleucina (Ile); 2) aromáticos – contêm um anel aromático, como fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp); 3) ácidos e suas amidas – são aminoácidos que têm uma carboxila na cadeia lateral, além da carboxila  $\alpha$ , ácido glutâmico (Glu) e aspártico (Asp), glutamina (Gln) e asparagina (Asn); 4) básicos – são aminoácidos com uma amina na cadeia lateral, como arginina (Arg), lisina (Lys) e histidina (His); 5) contendo enxofre – cisteína (Cys) e metionina (Met); 6) contendo hidroxila – estes aminoácidos têm uma hidroxila na cadeia lateral e são serina (Ser) e treonina (Tre); e 7) com a prolina (Pro), um iminoácido (Quadro 1). Numa proteína é possível encontrar outros aminoácidos além desses, contudo são variações como o ácido  $\gamma$ -carboxi-glutamato, a hidroxiprolina, a hidroxilisina (Nelson & Cox, 2018). As plantas sintetizam todos os L- $\alpha$ -aminoácidos das proteínas, pois assimilam o CO<sub>2</sub> atmosférico produzido pela fotossíntese, fixam o N atmosférico e do solo e assimilam o S do solo nos aminoácidos Cys e Met (Taiz *et al.*, 2004; Raven, Evert & Eichhorn, 2014).

A fixação do nitrogênio em plantas se dá pela simbiose com bactérias fixadoras de N, retirando-o da atmosfera (N<sub>2</sub>), transformando-o em formas absorvíveis, amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou amônia (NH<sub>3</sub>) e tornando-o disponível para síntese de aminoácidos e outros nitrogenados (Figura 9). A relação simbiótica mais conhecida é entre leguminosas e bactérias da família *Rhizobiaceae* que formam nódulos nas raízes. Bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter* e *Clostridium* fixam o N nas plantas de modo não simbiótico. As cianobactérias, como o *Trichodesmium*, fixam o N do ecossistema marinho e são responsáveis por 50% de todo o N fixado nos oceanos. O NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato) é uma forma de N absorvida e armazenada nos vacúolos das folhas. Sua redução a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> se dá pela enzima *nitrato redutase*, que reduz o nitrato a nitrito, e a *nitrito redutase*, que reduz o nitrito a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>. Esses são transferidos ao glutamato pela *glutamina sintase* com gasto de uma molécula por N fixado. Essas enzimas estão nos cloroplastos e sua atividade aumenta na luz. O glutamato doa sua amina para a síntese de aminoácidos, bases nitrogenadas, açúcares e lipídeos aminados (Soler-Jofra, Péres & Van Loodsrecht, 2021).

Figura 7 – Assimilação do nitrogênio pelas plantas



Os esqueletos carbonados dos aminoácidos originam-se dos intermediários da via glicolítica e das pentoses e, principalmente, do ciclo de Krebs (Berg, Tymoczko & Stryer, 2014).

Quadro 1 – Famílias de aminoácidos de acordo com os metabólitos de origem

Família	Aminoácidos	Precusores	Vias que originam
Histidina	His	ribose 5-fosfato	pentoses
Aromáticos	Phe, Tyr e Trp	PEP e eritrose-4P	glicólise e pentoses
Serina	Ser, Gly e Cys	3-fosfoglicerato	glicólise
Piruvato	Ala, Val, Leu e Ile	piruvato	glicólise
Glutamato	Glu, Gln, Pro e Arg	$\alpha$ -cetoglutarato	ciclo de Krebs
Aspartato	Asp, Asn, Met, Lys e Trp	oxaloacetato	ciclo de Krebs

A assimilação do enxofre (S) inorgânico é feita pela sulfidrilção direta por plantas e micro-organismos que usam o sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico ( $H_2S$ ) para sintetizar a cisteína. O enxofre é um dos elementos mais versáteis, pois apresenta vários estados estáveis de oxidação: nas proteínas, garantem sua estrutura e função pelas pontes de enxofre; participa no transporte de elétrons pelos grupos ferro-enxofre em proteínas; e está presente nos sítios ativos de enzimas e nas coenzimas. A maior parte do enxofre orgânico encontra-se sob a forma de Cys e Met. A assimilação do S requer sua redução a Cys. A assimilação do sulfato ocorre principalmente nas folhas, sendo exportado pelo floema para os locais de síntese de proteínas na forma de glutatona, que sinaliza a absorção do sulfato pelas

raízes e partes aéreas (Soler-Jofra, Péres & Van Loosdrecht, 2021). A Met é sintetizada nos plastídios a partir da Cys. Após as sínteses de Cys e Met, o S pode ser incorporado nas proteínas e em outros compostos, como acetil-CoA e S-adenosilmetionina. Esta última é importante na síntese de lignina (Liu, Luo & Zheng, 2018). As proteínas são sintetizadas no RE rugoso das plantas a partir de aminoácidos ligados ao RNA de transferência e esse processo é muito semelhante entre todos os eucariotos, pois é um evento conservado (Alberts *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

### *Degradação de aminoácidos e proteínas*

As proteínas armazenadas nas plantas são degradadas para a manutenção da sua fisiologia. Contudo, essa degradação está aumentada nas fases de germinação e de crescimento vegetal. Tais proteínas de armazenamento são estoques de nitrogênio (N), enxofre (S) e carbono (C) e acumulam-se em condições de oferta de nutrientes, permitindo que a planta sobreviva a períodos de condições adversas, além de fornecerem nutrientes para o crescimento de novas plantas ou brotos. Elas se acumulam principalmente nas sementes e nos tubérculos, e, também, podem ser encontradas em depósitos discretos em todas as células vegetais, os corpos de proteína. Nas sementes, há quatro tipos bem definidos de proteínas de armazenamento: as prolaminas, as globulinas 7S e 11S e as albuminas 2S. Como exemplos de proteínas de reserva nos tubérculos, temos as patatinas na batata (*Solanum tuberosum*) e as dioscorinas no inhame (*Dioscorea* spp.). Contudo, algumas proteínas são inibidores de proteases (IP) de enzimas digestivas de predadores e proteínas com ação antifúngica. Essas proteases são secretadas por insetos e micro-organismos que atacam as plantas hidrolisando as proteínas e os IPs das plantas, são estratégias de defesa (Hildebrandt *et al.*, 2015).

As proteases das plantas mobilizam as proteínas de reserva, e os aminoácidos livres são usados para a síntese de outras proteínas, compostos fenólicos ou alcaloides ou, ainda, convertidos em amidas (Silva-López & Gonçalves, 2019).

### Metabolismo secundário

As plantas estão em contato com todos os seres vivos e com o meio ambiente e, como não se locomovem, desenvolveram mecanismos químicos para melhor interação. Os vegetais produzem uma grande diversidade de compostos orgânicos que não têm funções diretas no crescimento e desenvolvimento e, portanto, não são essenciais para sua sobrevivência. Esses



compostos, os metabólitos secundários ou especiais, diferem dos primários por terem distribuição restrita no Reino Vegetal, estarem envolvidos na sustentação estrutural e na pigmentação e desempenharem um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, como na proteção contra herbívoros, bactérias, fungos, vírus e plantas concorrentes, na comunicação entre plantas e micro-organismos simbióticos e na atração de polinizadores e dispersores de sementes. Eles possuem ação protetora em mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios UV e deficiência de minerais. Eles são classificados de acordo com sua estrutura química, e os mais estudados são os terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, que serão abordados nesta seção. Devido às suas atividades biológicas, o isolamento e a purificação desses produtos naturais de plantas medicinais foram as principais forças que impulsionaram o nascimento da indústria farmacêutica no século XIX (Raven, Evert & Eichhorn, 2014; Zaynab *et al.*, 2018).

#### *Terpenos e sua biossíntese*

Os terpenos têm como estrutura básica o isopreno ou 2-metilbutano-1,3-dieno ( $C_5H_8$ ), geralmente ligadas entre si por arranjo “cabeça-a-cauda” existente em ligação 1→4, que caracteriza a “regra do isopreno”. Os “*terpenos irregulares*” têm ligações diferentes, como o β-caroteno, que apresenta união “*cauda-a-cauda*” em ligação 4→4. Os terpenos cíclicos, como o limoneno, apresentam outros tipos de ligações. Sendo assim, são classificados de acordo com a quantidade de resíduos isoprenoides em: hemiterpenoides ( $C_5$ ), monoterpenoides ( $C_{10}$ ), sesquiterpenoides ( $C_{15}$ ), diterpenoides ( $C_{20}$ ), sesterterpenoides ( $C_{25}$ ), triterpenoides ( $C_{30}$ ) e tetraterpenoides ( $C_{40}$ ), com uma, duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades de isopreno respectivamente. Os politerpenoides possuem mais de oito unidades. Um isopreno com outro tipo de molécula são os meroterpenos, a saber: vincristina e vimblastina, que possuem alcaloides com propriedades anticâncer; alguns fenilpropanoides com cadeias de isopreno; e muitas proteínas que se unem por ligações covalentes a cadeias de isopreno. Os terpenos podem ainda ser subclassificados de acordo com o grau de ciclização em: acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos (Solomons, Fryhle & Snyder, 2018). Na Figura 10, mostra-se um esquema que resume suas vias biossintéticas.

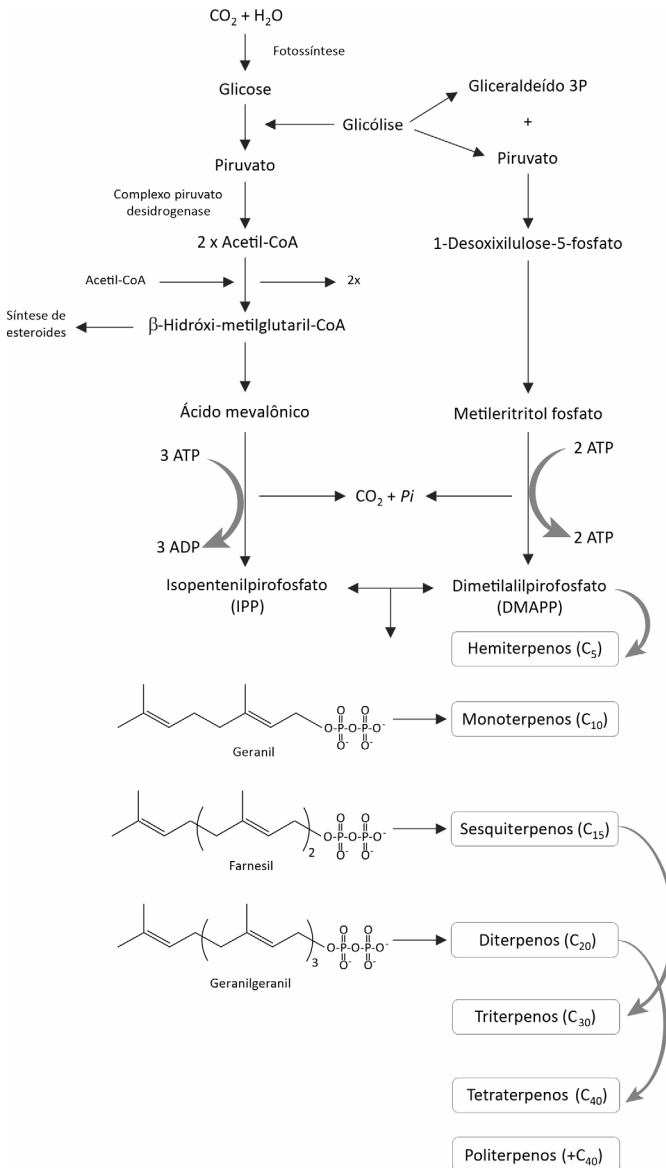
Os hemiterpenos, raramente encontrados livres na natureza, representam quantitativamente o menor grupo, são os voláteis liberados de tecidos fotosinteticamente ativos. Por sua vez, os monoterpenos, também voláteis pelas baixas massas moleculares, fazem parte das essências e de óleos essenciais, sendo atrativos de polinizadores. Eles são estocados em flores, folhas, cascas de caule e frutos; empregados em perfumes, como aromatizantes em alimentos, como mentol, linalol e citral, e como inseticidas (piretroides); possuem amplo

espectro de ações farmacológicas, como expectorantes, analgésicos, anticâncer, anti-infecciosos, descongestionantes hepáticos, como limoneno, pinenos, sabineno, canfeno, cimeno e mirceno (Tholl *et al.*, 2015). Os sesquiterpenos constituem a maior classe, são encontrados nos óleos essenciais, como as fitoalexinas nos aromas florais, como agentes repelentes e feromônios, e exibem muitas atividades, como anti-inflamatória, antifúngica, laxativa, antimalária, hepatoprotetora, diurética e antialérgica. Como exemplos de sesquiterpenos, citamos a matricina, letucinina, zingibereno, cariofileno, longifoleno, copaeno, nardosinona, germacrenos, capsidiol e farneseno (Oh, Jang & Kim, 2018; Santos, 2020).

Os diterpenos, um grande grupo de terpenos não voláteis, têm enorme variedade de atividades biológicas: são hormônios vegetais, como as gibberelinas; defesa contra herbívoro, como ácidos resínicos; fitóis que fazem parte da clorofila; fitoalexinas; agente anticâncer (taxol); tratamento do glaucoma (forskolina). Os triterpenos são divididos em três grupos:  $\alpha$ -amirina (ursano),  $\beta$ -amirina (oleanano) e lupeol. Eles compõem as resinas, látex, ceras, cutículas, fitoesteroides das membranas vegetais, algumas fitoalexinas e as saponinas e são precursores de hormônios vegetais brassinosteróis (Ferrer *et al.*, 2017). As saponinas formam espuma, e sua porção polar, geralmente formada por açúcares, e sua porção apolar, formada pelos triterpenos ou esteroides, são classificadas em glicosídeos saponosídicos do tipo triterpênico ou esteroídico. Suas atividades terapêuticas, em geral, são diuréticas, digestivas, anti-inflamatórias, antinociceptivas e gastro e hepatoprotetoras. Os tetraterpenoides são os pigmentos carotenoides que dão a coloração de flores e frutos amarelos, laranjas, vermelhos e púrpuras. Seus principais constituintes são os carotenos, em especial os  $\beta$ -carotenos precursores da vitamina A. Outros carotenoides, como as xantofilas, licopeno, luteína e neoxantina, têm atividade antioxidante. No grupo dos politerpenoides, a plastoquinona e a ubiquinona são potentes antioxidantes e participam nas reações de óxido-redução durante a respiração oxidativa e fotossíntese. O látex da borracha é um exemplo clássico da polimerização de 1.500 a 15 mil unidades isoprenoides e são encontrados nos vasos lactíferos da casca interna da seringueira (Zaynab *et al.*, 2018).

A biossíntese de terpenos foi estudada e elucidada por Bloch, Lynen, Cornforth e Popják (Figura 8), e essas descobertas, assim como os passos subsequentes na biossíntese do colesterol e outros esteróis, rendeu-lhes o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1964 (Ferrer *et al.*, 2017).

Figura 8 – Esquema simplificado da síntese de terpenos



Estão representadas as vias do mevalonato e MEP. Ambas originam o IPP e DMAPP para formar todas as famílias de terpenos.

### *Compostos fenólicos e sua biossíntese*

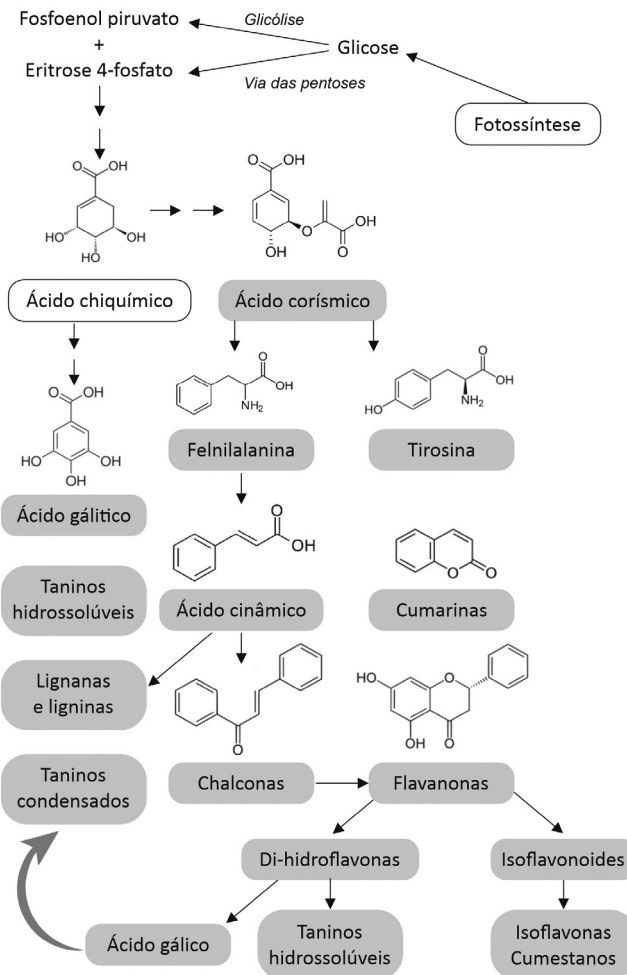
Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza, e mais de oito mil já foram encontrados em plantas, perfazendo cerca de 40% do C orgânico da biosfera. Esses compostos têm grande diversidade estrutural e possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um H é substituído por uma hidroxila. Os animais, a princípio, são incapazes de sintetizar o anel aromático. Porém, os vegetais e a maioria dos micro-organismos sintetizam esse anel e compostos fenólicos. Através dos intermediários da via do ácido chiquímico (Figura 9), formam-se os aminoácidos aromáticos Phe e Tyr, que formam o ácido cinâmico, que dá origem a outros derivados como fenóis simples, ácidos fenólicos e seus derivados, como cumarinas, ligninas e derivados do fenilpropano. A via do acetato ou das policetonas origina as quinonas, xantonas, orcinóis, entre outros (Figura 8). Alguns fenólicos de plantas são sintetizados por rotas mistas, que combinam as vias do chiquimato e do acetato, como os flavonoides, ou que surgem pela combinação da via do mevalonato com a via do chiquimato, como os furanos e as piranocumarinas. Os fenólicos originados da via do acetato são formados via ciclização da cadeia linear e são derivados da acetil-CoA e malonil-CoA (Zaynab *et al.*, 2018; Santos, 2020).

A via do ácido chiquímico pode ser dividida nas seguintes seções: 1) biossíntese do ácido chiquímico e taninos hidrolisáveis, na qual se forma o anel aromático, conservado ao longo de todas as rotas; 2) rotas de corismato, nas quais PEP é incorporado e o anel insaturado é ativado para gerar uma eliminação adicional e formar um sistema aromático no qual o N pode ser incorporado no anel aromático; 3) rotas das antraquinonas, nas quais o corismato é condensado com um equivalente nucleofílico de 4 C e um esqueleto linear sintetizando as naftoquinonas de origem não policetídica e a adição de um radical poliprenila leva à síntese das antraquinonas e vitaminas K; 4) rotas dos fenilpropanoides, nas quais a nova unidade de PEP incorporada pode ser transposta e conectada ao benzeno formando o ácido pré-étnico (os precursores de Phe e Tyr entram nesta rota e dão origem aos fenilpropanoides e seus derivados); e 5) via do antranilato-triptofano, que leva à síntese de sistemas heterocíclicos fundidos do tipo quinazolina ou condensa-se com esqueletos adicionais, sintetizando quinolina, acridina, carbazol e indol, que formam o Trp e derivados (Simões *et al.*, 2017).

A biossíntese dos fenólicos é mais pronunciada durante o crescimento ou na diferenciação vegetal e em resposta às pressões ecológicas. As figuras 11 e 12 mostram esquemas simplificados das vias de síntese de alguns fenólicos. Eles possuem inúmeras funções: defesa primária contra pragas, patógenos, insetos,

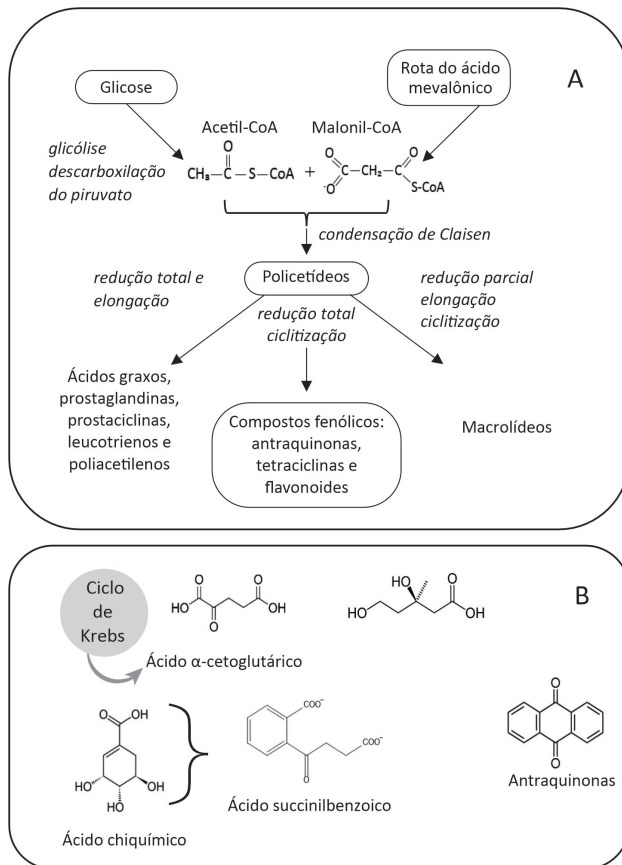
doenças, radiações UV e fermentos; antioxidantes por excelência, pois reagem com radicais livres prevenindo o estresse oxidativo e o dano tecidual que leva ao envelhecimento celular e doenças como os cânceres; fazem parte da parede celular protegendo a planta e proporcionando dureza para a madeira; influenciam no metabolismo de lipídios e respiração oxidativa, pois inibem o transporte de glicose, síntese de celulose e interferem na floração, entre outras atividades (Raven, Evert & Eichhorn, 2014, Simões *et al.*, 2017; Tinikul *et al.*, 2018).

Figura 9 – Esquema simplificado de algumas reações da via do ácido chiquímico e síntese de compostos fenólicos. Estão representados alguns intermediários e produtos finais.



Apesar de todos terem um anel fenólico, diferenciam-se de outros fenólicos pela origem biossintética, pois ela determina o padrão de substituição do composto resultante. Pela via do ácido chiquímico, obtêm-se compostos com hidroxila na posição orto formadas a partir do ácido cinâmico. Por sua vez, os derivados da via do acetato produzem compostos com grupos OH na posição meta (Figura 10). De modo geral, os fenólicos possuem características ácidas e podem se complexar com metais (quelatos metálicos) cruciais em sistemas biológicos. Sendo assim, são classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades de fenol na molécula, e, na planta, podem estar na forma livre ou ligados a proteínas, açúcares, alcaloides ou terpenos (Santos, 2020).

Figura 10 – Esquema simplificado da via do acetato-mevalonato (A) e via mista (B) na síntese de compostos fenólicos



Várias classes de compostos fenólicos foram categorizadas com base em seu esqueleto básico: C6 (fenóis simples, benzoquinonas), C6-C1 (ácido fenólico), C6-C2 (acetofenona, ácido fenilacético), C6-C3 (ácido hidroxicinâmico, cumarina, fenilpropanos, cromonas), C6-C4 (naftoquinonas), C6-C1-C6 (xantonas), C6-C2-C6 (estilbenos, antraquinonas), C6-C3-C6 (flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides), (C6-C3-C6)<sub>2,3</sub> (bi- e triflavonoides), (C6-C3)<sub>2</sub> (lignananas, neolignananas), (C6-C3)<sub>n</sub> (ligninas), (C6)<sub>n</sub> (catecol, melaninas) e (C6-C3-C6)<sub>n</sub> (taninos condensados). Eles podem também ser classificados em fenólicos simples, ácidos fenólicos, derivados do ácido benzoico, derivados do ácido cinâmico, ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos e cinâmico, derivados do ácido fenilacrílico, derivados do ácido cafeico, derivados do ácido tartárico, derivados do ácido láctico, derivados dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico e derivados fenilacrílicos. Os fenólicos mais encontrados em plantas são os ácidos fenólicos, os flavonoides e os taninos (Solomons, Fryhle & Snyder, 2018).

#### *Alcaloides e sua biossíntese*

Os alcaloides constituem um grande grupo de metabólitos nitrogenados com vasta diversidade biossintética, química, estrutural e farmacológica e representam cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Desde os primórdios da civilização, as plantas ricas em alcaloides eram usadas como medicamentos, venenos e em “poções mágicas”. Somente no século XIX, Wilhelm Meissner introduziu o termo para designar tais substâncias como produtos naturais que se comportam como bases. A designação mais aceita é de Pelletier (1983 *apud* Simões, 2017), que afirma que um alcaloide é uma substância orgânica cíclica contendo um N em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os seres vivos. Além disso, este N pode se apresentar como amina secundária, terciária, amida ou sal de amônio quaternário (Simões *et al.*, 2017).

O grupo compreende mais 15 mil compostos, mais de 75% oriundos das plantas superiores Angiospermas, e são observados em todos os órgãos vegetais. Eles são sintetizados no RE liso e acumulados nos vacúolos de tecidos em crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Entre as possíveis atividades nos vegetais estão: defesa contra herbívoros, devido à toxicidade e ao sabor amargo para animais e insetos; reserva de N; reguladores de crescimento (inibição da germinação); manutenção do equilíbrio iônico (caráter alcalino); agentes de desintoxicação e transformação simples de substâncias nocivas ao vegetal; defesa

contra micro-organismos; e proteção contra os raios UV, pois a maioria possui núcleo aromático que absorve tal radiação (Schläger & Dräger, 2016).

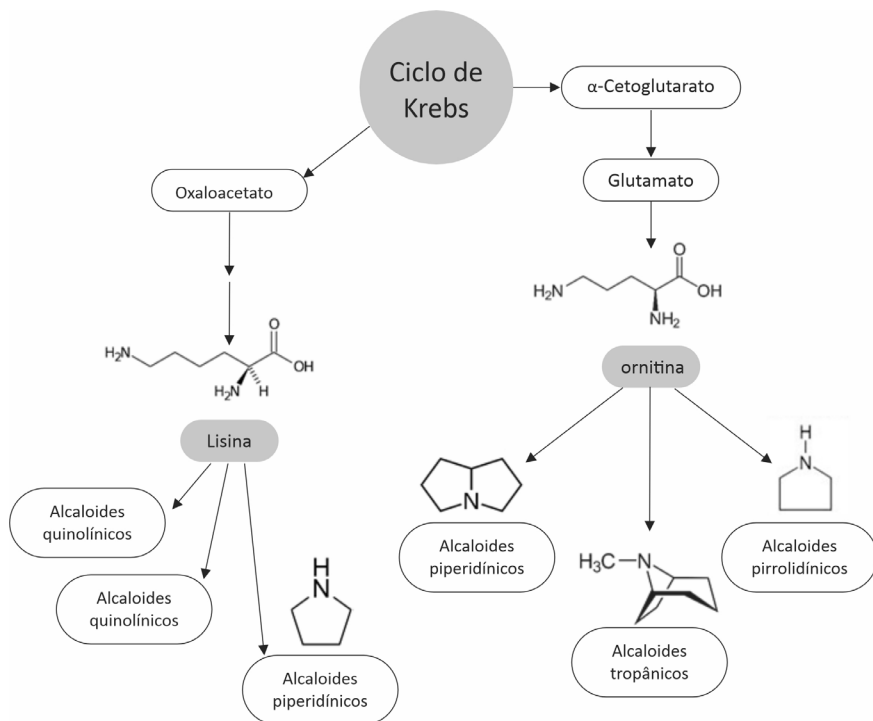
Os alcaloides são um grupo muito heterogêneo e, portanto, existem vários critérios de sua classificação (Simões *et al.*, 2017; Santos, 2020), que incluem:

- 1) botânico – classifica os alcaloides segundo o vegetal ou a família a partir das quais se originam, como, por exemplo, alcaloides da “quina” ou alcaloides do “ópio”;
- 2) biossintético – classifica em três principais grupos
  - a) alcaloides verdadeiros, que são derivados dos aminoácidos ornitina, Lys, Phe, Tyr, Trp ou ácido antranílico, e possuem N em anel heterocíclico;
  - b) protoalcaloides, cujo átomo de N não pertence a um sistema heterocíclico; e
  - c) pseudoalcaloides, compostos nitrogenados não derivados de aminoácidos cujo N pode ou não estar em anel heterocíclico. Possuem todas as características dos alcaloides verdadeiros, mas se originam do metabolismo dos terpenos ou do acetato. Esquema simplificados sobre a síntese destes compostos são mostrados na Figura 11 (Ziegler & Facchini, 2008; Santos, 2020);
- 3) químico – em função da posição do N, podem ser classificados em alcaloides primários ( $\beta$ -feniletilamina), secundários (núcleos pirrolidina, pirrol, piperidina e indólico), terciários (núcleos piridina, tropano, pirrolizidina, quinolizidina, quinoleína e isoquinoleína), quaternários e alcaloides fenólicos;
- 4) farmacológico – baseado na atividade farmacológica em determinado órgão ou sistema em anestésicos, analgésicos, antipiréticos, antiespasmódicos, anti-hipertensivos, psicotrópicos ou depressores do sistema nervoso central, anticâncer ou antibióticos, entre outras ações.

De modo geral, um composto desempenha mais de uma atividade.



Figura 11 – Esquema simplificado da síntese de alcaloides a partir dos aminoácidos alifáticos lisina e ornitina



## Considerações Finais

Como pudemos observar neste capítulo, as plantas produzem uma grande variedade de moléculas químicas, os metabólitos primários e secundários, por conta da sua gigantesca rede metabólica e de suas organelas supraespecializadas. Os vegetais utilizam tais moléculas como estratégias para garantir sua sobrevivência, reprodução, adaptação ao meio ambiente em que vivem, mesmo quando as condições ambientais variam e nem sempre são favoráveis, e, também, para se relacionarem com outras plantas, animais e micro-organismos. Desde a Pré-História, o homem usava plantas contendo tais metabólitos, de modo empírico, para tratar as mais diversas doenças e condições. Desse modo, as plantas têm sido valiosas fontes de substâncias químicas com atividades farmacológicas notáveis. A identificação, a caracterização e a formulação desses metabólitos vegetais, bem como de seus extratos, têm sido fundamentais no desenvolvimento de medicamentos e da indústria farmacêutica.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. S. *Bioquímica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- BRACHER, A. *et al.* Biogenesis and metabolic maintenance of Rubisco. *Annual Review in Plant Biology*, 68: 29-60, 2017.
- BUCHANAN, B. B.; GUISSEM, W. & JONES, R. L. (Ed.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- FERRER, A. *et al.* Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in Lipid Research*, 67: 27-37, 2017.
- GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 115-142, 2008.
- HILDEBRANDT, T. M. *et al.* Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, 8: 1.563-1.579, 2015.
- KAPILAN, R.; VAZIRI, M. & ZWIAZEK, J. J. Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*, 51: 4-15, 2018.
- KELLY, A. A. & FEUSSNER, I. Oil is on the agenda: lipid turnover in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1.861: 1.253-1.268, 2016.
- KRESS, J. W. *et al.* Green plant genomes: what we know in an era of rapidly expanding opportunities. *Pnas*, 119: e2115640118, 2022.
- KUMAR, R.; MUKHERJEE, S. & AYELE, B. T. Molecular aspects of sucrose transport and its metabolism to starch during seed development in wheat: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 36(4): 954-967, 2018.
- LIU, Q.; LUO, L. & ZHENG, L. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Science*, 19: 335-367, 2018.
- MACNEILL, G. J. *et al.* Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal of Expert Botanical*, 68: 4.433-4.453, 2017.
- MARTIN, W. F.; BRYANT, D. A. & BEATTY, J. T. A. physiological perspective on the origin and evolution of photosynthesis. *FEMS Microbiology Review*, 42: 205-231, 2018.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.
- OH, J.; JANG, C. H. & KIM, J. S. Soy-derived phytoalexins: mechanism of in vivo biological effectiveness in spite of their low bioavailability. *Food Science and Biotechnology*, 28: 1-6, 2018.
- PFISTER, B. & ZEEMAN, S. C. Formation of starch in plant cells. *Cellular Molecular Life Science*, 73: 2.781-2.807, 2016.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

- RODWELL, V. W. *et al.* *Bioquímica Ilustrada de Harper*. 30. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.
- SANTOS, D. Y. A. C. *Biossíntese, Funções e Aplicações dos Metabólitos Secundários de Plantas*. Curitiba: Appris, 2020.
- SCHLÄGER, S. & DRÄGER, B. Exploiting plant alkaloids. *Current Opinion in Biotechnology*, 37: 155-164, 2016.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. & GONÇALVES, R. N. Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 6: 101-109, 2019.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia*. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SOLER-JOFRA, A.; PÉRES, J. & VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: a review. *Water Research*, 190:116723, 2021.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. & SNYDER, S. A. *Química Orgânica*. 12. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018.
- TAIZ, L. *et al.* *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAN, X. *et al.* Review of plant vacuoles: formation, located proteins, and functions. *Plants (Basel)*, 8: 327-349, 2019.
- THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnological*, 148: 63-106, 2015.
- TINIKUL, R. *et al.* Biotransformation of plant-derived phenolic acids. *Biotechnology Journal*, 13(6): e1700632, 2018.
- WANG, W. *et al.* New insights into the metabolism of aspartate-family amino acids in plant seeds. *Plant Reproduction*, 31: 203-211, 2018.
- ZAYNAB, M. *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbiological and Pathogens*, 124: 198-202, 2018.
- ZIEGLER, J. & FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review in Plant Biology*, 59: 735-769, 2008.



# 9

## Isolamento e Caracterização dos Principais Metabólitos Primários Ativos: proteínas vegetais

*Raquel Elisa da Silva López*

**O**s metabólitos primários compreendem as proteínas, os carboidratos e os lipídeos. Contudo, existem proteínas e carboidratos ligados a metabólitos secundários, proteínas ligadas a carboidratos e lipídeos e metabólitos secundários que compartilham características químicas com os lipídeos. O metabolismo é uma rede integrada em que as moléculas interagem em resposta a estímulos bioquímicos, fisiológicos ou ambientais, o que culminará com a expressão de um fenótipo para garantir a sobrevivência do organismo e sua reprodução.

A divisão entre metabolismos primário e secundário é apenas didática, contudo as técnicas para estudar tais metabólitos são distintas e adequadas a cada classe ou tipo de metabólito a ser investigado e estão em concordância com as características químicas de cada molécula. Os lipídeos, como são apolares e geralmente anfífilos, compartilham técnicas de isolamento e caracterização com alguns metabólitos secundários, como as cromatografias em camada delgada, de alta eficiência e contracorrente. Os carboidratos das plantas apresentam uma enorme variedade química e estrutural e, devido à presença de muitas hidroxilas em suas estruturas, são moléculas muito polares e compartilham com as proteínas metodologias muito semelhantes de purificação e análise.

As proteínas são os principais metabólitos primários farmacologicamente ativos, e alguns aspectos de sua extração, isolamento, purificação e caracterização serão abordados neste capítulo.

## Considerações sobre Estrutura de Proteínas

As proteínas são macromoléculas formadas pela combinação de pelo menos vinte diferentes tipos de L- $\alpha$ -aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas. Por isso, têm uma enormidade de estruturas tridimensionais e desempenham muitas funções nas células, que vão desde a manutenção da estrutura celular até o controle do metabolismo e da fisiologia vegetal. A função da proteína depende da integridade de sua estrutura nativa, que é bastante complexa e mantida por ligações covalentes, peptídicas e dissulfeto e por ligações não covalentes, como as iônicas, de hidrogênio e hidrofóbicas (Figura 1). As ligações peptídicas ocorrem entre a  $\alpha$ -carboxila de um aminoácido e a função/grupamento  $\alpha$ -amina de outro e têm 40% caráter de ligação dupla, conferindo, assim, rigidez à proteína (Nelson & Cox, 2017).

A estrutura das proteínas é muito complexa e é estudada em quatro diferentes níveis. A estrutura primária (1<sup>ária</sup>), presente em toda proteína, é estabilizada pelas ligações covalentes. Ela compreende a sequência linear e específica de aminoácidos na cadeia polipeptídica e a localização das ligações dissulfeto (Figura 1).

A estrutura secundária (2<sup>ária</sup>) é o arranjo regular e repetido da cadeia proteica ao redor de um eixo. Ela é estabilizada por ligações de hidrogênio de resíduos de aminoácidos adjacentes, formando as  $\alpha$ -hélices, ou por resíduos distantes, formando as  $\beta$ -hélices ou folha  $\beta$  pregueadas (Figura 1). Além dessas estruturas, existem as chamadas voltas e alças. As voltas conectam os segmentos de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$  pregueadas que mudam a direção da cadeia. As alças são segmentos maiores, com 8 a 16 aminoácidos que têm estrutura variável. Os domínios – sequências específicas de aminoácidos em um polipeptídeo – de estrutura secundária são encontrados em todas as proteínas, contudo existem proteínas formadas apenas por estruturas secundárias e são denominadas de proteínas fibrosas, como o colágeno.

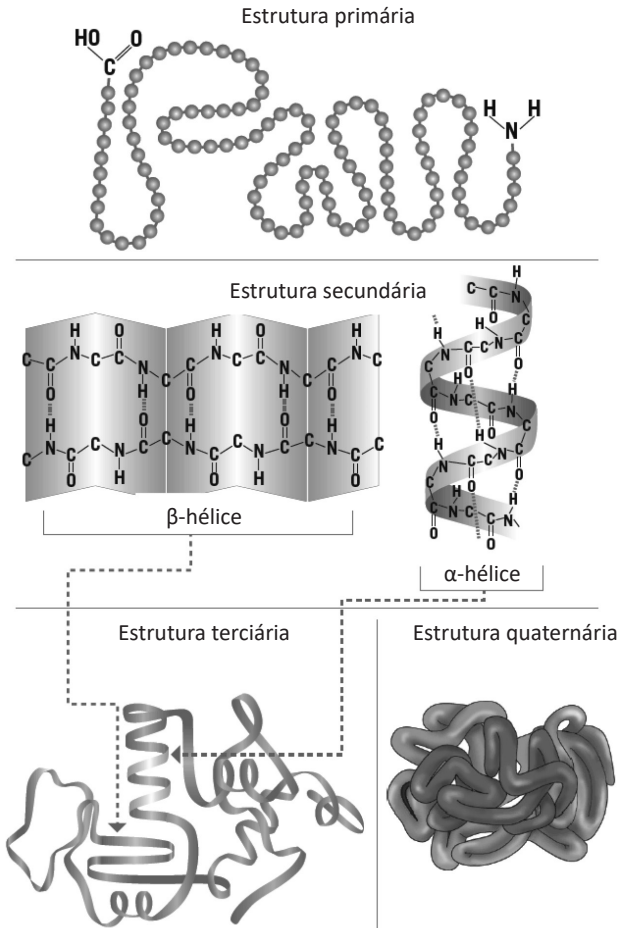
A estrutura terciária (3<sup>ária</sup>) refere-se à relação espacial entre todos os aminoácidos de um polipeptídeo, que não está orientado em relação a um eixo e depende das interações não covalentes das cadeias laterais dos

aminoácidos, das ligações dissulfeto e das ligações de coordenação com íons metálicos (Figura 1). Nas proteínas enoveladas, que são denominadas de globulares, os domínios da estrutura 3<sup>ária</sup> são diferentes dos da estrutura 2<sup>ária</sup>.

Finalmente, a estrutura quaternária (4<sup>ária</sup>) ocorre apenas em proteínas com mais de uma cadeia polipeptídica (Figura 1). Essa estrutura é estabilizada pelas mesmas interações da estrutura 3<sup>ária</sup> e compreende a reunião de diferentes subunidades que interagem por meio dos grupos laterais de aminoácidos em cadeias diferentes. Um exemplo digno de nota é a hemoglobina, que tem quatro cadeias polipeptídicas, cada uma das quais tem um grupo prostético (heme) que se liga ao O<sub>2</sub>. A ligação da primeira molécula de O<sub>2</sub> ao ferro do radical heme da primeira cadeia polipeptídica vai aumentar a afinidade de ligação das outras cadeias polipeptídicas ao oxigênio sucessivamente de modo cooperativo, pois as cadeias polipeptídicas da hemoglobina interagem entre si (Braden & Tooze, 1999; Rodwell *et al.*, 2017).

A manutenção da estrutura tridimensional das proteínas e, conseqüentemente, de sua função depende de condições controladas dos sistemas biológicos. A desnaturação, que é a perda da estrutura nativa, estrutura energeticamente mais estável, é desencadeada por agentes químicos e/ou físicos que rompem as ligações químicas das proteínas e “desfazem” essa estrutura. Os principais agentes desnaturantes são: calor (altas temperaturas), que desestabiliza as ligações de hidrogênio; ácidos e as bases fortes, que promovem o deslocamento de elétrons e alteram a carga dos grupos ionizáveis dos aminoácidos; altas concentrações de sais divalentes, que removem a camada de solvatação e facilitam a interação dos grupos de cargas opostas na superfície das proteínas, causando sua precipitação; solventes orgânicos, que invertem a polaridade da proteína, ou seja, os grupos apolares do interior da proteína são expostos na superfície, e vice-versa; metais pesados, que se ligam irreversivelmente aos grupos carregados na superfície da proteína formando precipitados insolúveis; e radiações ultravioletas, raios X, alta pressão/ultrassom, que atuam de maneiras inespecíficas quebrando as ligações covalentes e não covalentes e afetando a estrutura nativa de proteínas e polipeptídeos (Braden & Tooze, 1999; Nelson & Cox, 2017).

Figura 1 – Representação esquemática dos níveis de organização estrutural de uma proteína



São representadas as ligações químicas que estabilizam as estruturas da proteína.

Fonte: adaptado de Ghahri & Mohebbi, 2016.

Algumas proteínas têm maior estabilidade do que outras, e isso se deve à determinadas sequências de aminoácidos e ao tipo de ligação que as cadeias laterais desses aminoácidos estabelecem. O maior teor do aminoácido cisteína, que tem uma sulfidril na cadeia lateral, amplia o número de ligações dissulfeto, tornando as proteínas mais estáveis ao calor, pressões e radiações. Os aminoácidos alanina, leucina e serina aumentam a tolerância das proteínas à oxidação e, portanto, elas são mais estáveis a ácidos e bases. Por sua vez,

aminoácidos polares e carregados na superfície da proteína, como glutamina, serina, asparagina, glutamina e ácido glutâmico, elevam a formação de ligações de hidrogênio e conferem resistência à ação de solventes orgânicos. Os resíduos de carboidratos nas superfícies das proteínas, que são poli-hidroxi-lados e muito polares, protegem-nas de agentes desnaturantes químicos. Além disso, proteínas mais glicosiladas são mais resistentes à proteólise enzimática (Gonçalves, Barbosa & Silva-López, 2016).

## Proteínas Vegetais Farmacologicamente Ativas

As proteínas vegetais mais estudadas para fins farmacológicos são as lectinas, as enzimas e os inibidores enzimáticos.

As lectinas são proteínas multiméricas que se ligam, com alta especificidade, a resíduos de carboidratos em glicoproteínas e glicolípídeos na superfície de organismos e, portanto, são capazes de aglutinar células, como eritrócitos e glicoconjugados, e são conhecidas como aglutininas. Elas distribuem-se amplamente na natureza, mas, em especial, nos vegetais e são obtidas de todos as partes da planta, principalmente de sementes de leguminosas e gramíneas. A maioria das lectinas de sementes maduras funciona como reserva de nutrientes mobilizada durante a germinação (Raven *et al.*, 2014). O papel biológico das lectinas nas plantas ainda não está completamente estabelecido, mas acredita-se que elas tenham efeito inseticida, podendo ser exploradas como pesticida. Sua ação anti-infecciosa deve-se a sua propriedade de se ligar às superfícies de vírus, bactérias, fungos ou protozoários. Algumas estimulam o sistema imune, pois reconhecem antígenos na superfície de células tumorais, estimulam a mitose, inibem o crescimento celular e induzem apoptose em vários tipos de células, em particular as tumorais. Extratos ricos em lectinas e lectinas isoladas de espécies do gênero *Viscum* (Loranthaceae) apresentaram efeitos antitumorais e imunomodulatórios em ensaios clínicos com pacientes com cânceres de mama (fase III), gástrico (fase IV) e pulmão (fase II). Além disso, elas reduziram os efeitos colaterais da radioterapia e quimioterapia (Marvibaigi *et al.*, 2014). As lectinas de leguminosas são o maior grupo e vêm sendo empregadas em vários processos biotecnológicos, como no tratamento de infecções bacterianas, virais e fúngicas. As mais estudadas são: concanavalina A do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), a favina da fava (*Vicia faba*), a fito-hemaglutinina-L (PHA-L) do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), a lectina de soja (*Glycine max*) (SBA), a lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*) (PSA), e a lectina ou aglutinina da ervilha (*Pisum sativum*) (PSA) (Katoch & Tripathi, 2021).



As enzimas de plantas mais investigadas e mais empregadas medicinalmente são as proteases. Elas catalisam a clivagem das ligações peptídicas, são essenciais à sobrevivência de todos os organismos e são encontradas em todas as células como produtos de secreção celular. Nos vegetais, são abundantes em cloroplastos e vacúolos. Elas são classificadas de acordo com os aminoácidos catalíticos do sítio ativo em serino, cisteíno, aspártico, metalo, treonino, glutâmico e asparagino proteases e de acordo com a região do substrato onde clivam em endopeptidases, quebram ligações peptídicas no interior da cadeia, ou em exopeptidases, clivam ligações que envolvam os resíduos N ou C terminais e, por isso, respectivamente são denominadas de aminopeptidases (no citoplasma das células dos tecidos de armazenamento vegetal) e carboxipeptidases (Rawlings & Bateman, 2021). Nas plantas, as proteases estão envolvidas na digestão e assimilação de aminoácidos, morfogênese e embriogênese, remodelagem de tecidos, crescimento, desenvolvimento, defesa contra patógenos, senescência, meiose, apoptose, diferenciação dos tecidos e órgãos, maturação das sementes, mobilização das reservas proteicas, germinação, divisão celular e reprodução, adaptação às condições ambientais, desenvolvimento de estômatos, biogênese de cloroplastos e controles do metabolismo e da expressão gênica, entre outras funções. Além de essenciais para a sobrevivência de todos os seres, são de grande importância na medicina, agricultura e biotecnologia. As mais usadas para fins medicinais são as cisteíno proteases como: papaína (EC 3.4.22.2), obtida do látex do mamão papaya e do mamoeiro (*Carica papaya*); bromelina (EC 3.4.22.4), do caule e fruto do abacaxi (*Ananas comosus*); e ficina (EC 3.4.22.3), do látex do figo e da figueira (*Ficus carica*) (Silva-López & Gonçalves, 2019).

A papaína foi a segunda enzima a ser cristalizada e sua estrutura tridimensional foi determinada em 1968. Ela é uma endopeptidase com cadeia simples de 23 k Da. Essa protease é comercializada em cápsulas para tratar dispepsias, distúrbios na capacidade de absorção gastroentérica e na produção de ácidos biliares. As formulações tópicas são agentes fibrinolíticos, usadas no debridamento de lesões, úlceras, varicoses, queimaduras, feridas em geral. A papaína acelera a cicatrização, tem ação bacteriostática, bactericida e anti-inflamatória, pois proporciona o alinhamento das fibras de colágeno, promovendo o crescimento tecidual uniforme (Wani *et al.*, 2019; Silva-López & Gonçalves, 2019).

A bromelina é um extrato aquoso do fruto e do caule do abacaxi, composto das proteases bromelaína e ananaína. Sua principal aplicação no Brasil é na indústria farmacêutica e foi reconhecida como agente medicinal em 1957. Suas ações incluem: inibição da agregação plaquetária, ação fibrinolítica, anti-inflamatória, antitumoral, debridamento, aumento da absorção de

drogas, propriedades mucolíticas, digestivas, cicatrizante e melhora do sistema cardiovascular. No mercado existem diversos produtos à base de bromelaína sob várias formulações como cápsulas, xaropes e géis. Sua atividade tem sido mantida em cápsulas (na forma liofilizada) e géis (Silva-López, 2017).

A ficina é uma protease homóloga à papaína. Nas regiões tropicais é usada em cápsulas para tratar infecções parasitárias pela sua habilidade de digerir vermes vivos, como lombrigas, sem causar danos aos hospedeiros (Morellon-Sterling *et al.*, 2020). As proteases de plantas tropicais têm grande estabilidade em altas temperaturas, que é uma adaptação ao ambiente, e essa característica é essencial para seus empregos biotecnológico e farmacológico (Wani *et al.*, 2019).

Os inibidores enzimáticos vegetais são geralmente polipeptídeos que inibem principalmente amilases e proteases de predadores e de enzimas da planta. Os mais estudados são os inibidores de amilase (IA) e os inibidores de proteases (IPs). Os IAs controlam a atividade da  $\alpha$ -amilase endógena e de insetos, fungos, bactérias e vírus de importância agrônômica. Alguns são descritos como fatores antinutricionais. A inibição das  $\alpha$ -amilases humanas por IAs de plantas é uma abordagem terapêutica na redução da glicemia no controle do diabetes *mellitus*. Eles possuem atividade contra micro-organismos patógenos de humanos e animais que se utilizam da  $\alpha$ -amilase como fator de virulência (Cohen, Davydov & Fluhr, 2019). Os IPs de plantas são polipeptídeos, com a capacidade de inibir uma grande variedade de enzimas proteolíticas, incluindo proteases digestivas de mamíferos, insetos, bactérias e fungos, além de regular o metabolismo de proteínas das plantas. Eles são importantes estratégias de defesa contra predadores e patógenos, visto que as plantas não dispõem de um sistema imune, e são sintetizados constitutivamente ou sua síntese é induzida em resposta ao ataque de agentes externos. Esses IPs são estáveis à variação de temperatura e de pH e podem ser usados no tratamento de diversas patologias. Eles são classificados em inibidores de serino, cisteíno, aspártico, treonino e metaloproteases. Os inibidores de serino proteases são os mais abundantes da natureza e os mais expressos em plantas, cujas principais famílias são Bowman-Birk (BBI) e Kunitz. Contudo, alguns inibidores interferem em mais de um tipo de protease com diferentes afinidades de ligação (*K<sub>i</sub>*) (Silva-López, 2009). Os IPs vegetais como o BBI (8 kDa) e o inibidor de tripsina do tipo Kunitz (22 kDa), ambos da soja (*Glycine max*), são agentes anti-inflamatórios e supressores de tumores colorretal, de mama e de próstata. Alguns estudos clínicos sobre formulações orais e intravenosas do BBI voltadas para diferentes tipos de cânceres têm mostrado resultados muito promissores (Srikanth & Chen, 2016).

## Isolamento de Proteínas Vegetais

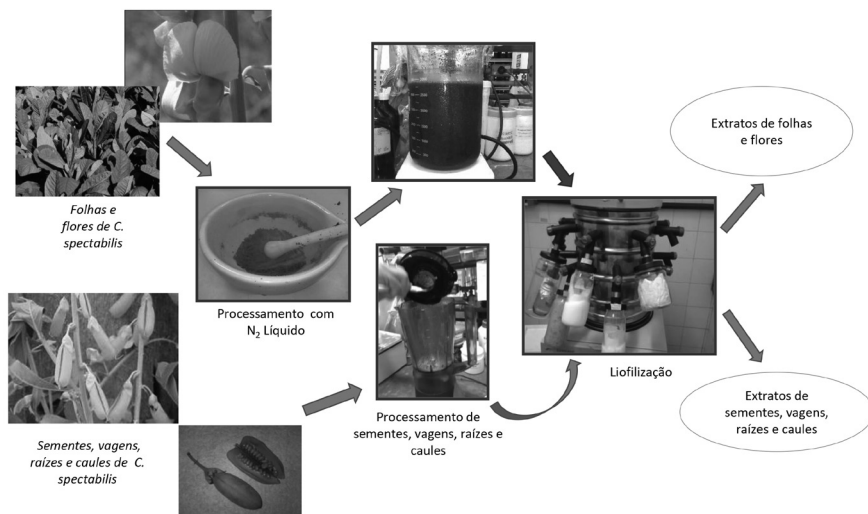
As proteínas e os polipeptídeos têm estruturas complexas e delicadas, pois atuam em sistemas biológicos cujas condições de temperatura, pH e concentrações de solutos são muito controladas. A preservação de suas estruturas tridimensionais nativas é crucial para a manutenção de suas funções biológicas (Braden & Tooze, 1999). Portanto, as condições de extração, isolamento e purificação de proteínas devem ser brandas para evitar a perda das suas estruturas nativas. Elas são hidrofílicas porque contêm aminoácidos com grupos polares expostos nas superfícies e aminoácidos com grupos apolares voltados para o interior da cadeia polipeptídica enovelada, nas proteínas globulares e das hélices das proteínas fibrosas. Tal arranjo confere alta polaridade às proteínas quando estão dispersas em organelas ou nos líquidos biológicos; quando associadas às membranas, as cadeias laterais apolares estão unidas aos lipídeos de membrana (Nelson & Cox, 2017). Proteínas e peptídeos são encontrados em todos os compartimentos celulares, livres ou associados às membranas das células vegetais e sua extração depende de sua localização, por exemplo, se estiverem embebidos nas membranas, é necessário o uso de detergentes não iônicos para preservar sua estrutura/atividade. Contudo, a maioria das proteínas vegetais estão solúveis em organelas e requerem soluções aquosas e/ou tampões para isolamento (Alberts *et al.*, 2017). A temperatura é um fator crucial na extração, pois são desnaturadas em temperaturas elevadas. Por isso, é comum empregar temperaturas em torno de 4 °C para obtenção de proteínas e polipeptídeos (Silva-López, Coelho & Simone, 2005).

### Extração

Para evitar a desnaturação, a extração das proteínas de tecidos vegetais requer o uso de condições experimentais suaves, como: baixas temperaturas, tampões levemente ácidos ou alcalinos e ausência de solventes orgânicos. Os solventes orgânicos são usados para extrair os metabólitos secundários que têm estruturas mais simples e caráter mais hidrofóbico. Além disso, proteínas e polipeptídeos são estruturas mais polares, com exceção daqueles que se inserem na membrana e que necessitam de detergentes para sua extração, mas não de solventes orgânicos. Logo, não devem ser usados ácidos e bases fortes, temperaturas elevadas, solventes orgânicos, detergentes iônicos, alta concentração de sais divalentes e surfactantes. De modo geral, as proteínas vegetais são mais termoestáveis e resistentes aos agentes externos do que proteínas de animais, visto que aquelas precisam se adaptar às condições climáticas do ambiente (Rodwell *et al.*, 2017).

A premissa básica para a obtenção de proteínas ativas é que o vegetal esteja fresco, ou seja, coletado poucas horas antes de ser processado. O congelamento em nitrogênio líquido é um método bastante usado para processar os órgãos vegetais sem desnaturar suas proteínas. As folhas e flores são mais adequadas para esse procedimento; elas são maceradas até se formarem partículas muito pequenas para, então, serem extraídas com água, tampões ou soluções aquosas salinas, em agitação leve, à temperatura ambiente ou a 4 °C. As proteínas extraídas estão na fase aquosa, e o material particulado é removido por centrifugação (4 °C); elas são concentradas por liofilização (Figura 2), ou precipitadas por meio de concentrações elevadas de sais divalentes (*salting out*). As sementes, os caules e as raízes, mais endurecidos, são macerados em condições um pouco mais drásticas e suas proteínas são extraídas por meio de liquidificadores, com baixa rotação, por pouco tempo. A formação de espuma indica a presença de proteínas desnaturadas. As proteínas extraídas estão na fase aquosa, e o preparo dos extratos segue como descrito anteriormente (Pacheco & Silva-López, 2012; Gonçalves, Barbosa & Silva-López, 2016).

Figura 2 – Esquema de extração de proteínas



Os diferentes órgãos da leguminosa *Crotalaria spectabilis* (*C. spectabilis*) foram processados com soluções aquosas para obtenção de extratos liofilizados.

## Isolamento e purificação

A principal metodologia de isolamento, fracionamento e purificação de proteínas e polipeptídeos é a cromatografia, que é uma técnica de separação de substâncias baseada nas diferentes velocidades de migração destas ao serem arrastadas por um solvente em movimento (fase móvel – FM), através de um meio poroso (fase estacionária – FE). A velocidade das substâncias a serem isoladas/purificadas vai depender da interação destas com a FE. Se a proteína ou polipeptídeo forem mais retidos na FE, sua velocidade de migração será menor do que a de uma proteína que é mais retida na FM (Collins, Braga & Bonato, 2017).

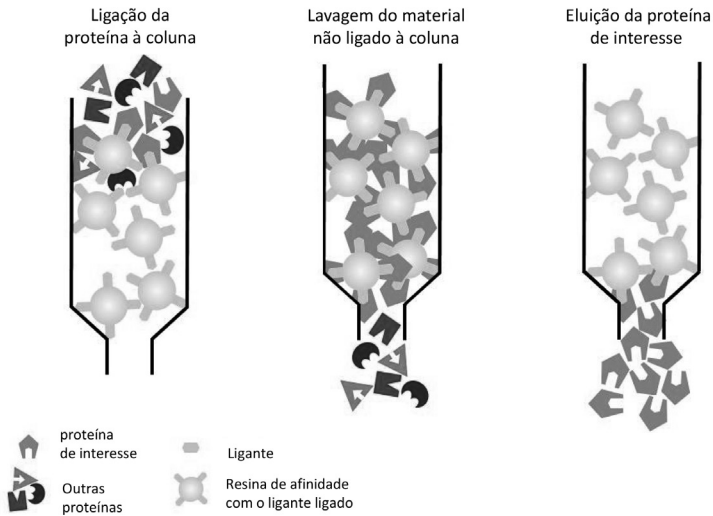
As estratégias cromatográficas mais utilizadas para isolar, fracionar e purificar proteínas de uma mistura complexa, que é um extrato vegetal, são as de afinidade, troca iônica e filtração em gel. A cromatografia líquida clássica é a mais empregada. Sua FE é geralmente uma resina empacotada em uma coluna de vidro ou plástico, cuja FM é um líquido que é aplicado sob baixa pressão, visto que a pressão aplicada nas cromatografias líquidas de alta e média pressão podem afetar a estrutura das proteínas, já que são moléculas grandes e de estrutura complexas (Grinberg & Car, 2017). A cromatografia em fase normal, cuja FE é mais polar que a FM, é frequentemente empregada para proteínas e polipeptídeos quando o composto de interesse é polar. Em fase reversa, utilizada para moléculas mais apolares, como os metabólitos secundários, a cromatografia raramente é usada para isolar e purificar proteínas, visto que, além de elas serem polares, os solventes orgânicos usados como FM desnaturam as proteínas. Contudo, polipeptídeos com cadeias menores são separados em colunas de fase reversa, usando cromatografia líquida de alta e média pressões. Nas análises de polipeptídeos usam-se colunas de gel de sílica ligadas principalmente a cadeias alquila, como a coluna com octadecilsilano ( $C_{18}$ , como é conhecida, é a mais usada). A FM é formada por um constituinte aquoso, soluções de ácidos orgânicos (ácido trifluoroacético) e outro solvente orgânico, como metanol, acetonitrila e/ou propanol (Collins, Braga & Bonato, 2017). Os detectores de absorção de UV são usados para peptídeos, pois a ligação peptídica absorve na faixa de 205 a 220 nm e de 270 e 280 nm pela presença dos anéis aromáticos dos aminoácidos (Zaia, Zaia & Lichtig, 1998).

A cromatografia de interação hidrofóbica é um processo de partição que se baseia na interação dos grupos apolares da FE e das cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos das proteínas. De modo geral, os grupamentos apolares estão voltados para o interior da proteína, e, para que ocorra a interação com os grupos apolares da FE, eles devem estar expostos na superfície das proteínas. Para isso, usam-se soluções salinas muito concentradas que removem parcialmente a camada de solvatação, expondo as regiões ricas em aminoácidos apolares, que interagem com a matriz hidrofóbica da FE. A FM para eluição da proteína ligada na coluna compreende uma mistura de soluções aquosas, solventes orgânicos ou detergentes. Algumas proteínas são desnaturadas irreversivelmente, e, por isso, tal metodologia não é muito utilizada para obtenção de enzimas. Todavia, é amplamente empregada para obtenção de proteínas sem função enzimática com baixa solubilidade em soluções aquosas (Fleming, 2020).

#### *Cromatografia de afinidade*

A cromatografia de afinidade é muito utilizada quando se busca uma atividade biológica definida. Ela se baseia no princípio da afinidade biológica, ou seja, a proteína vegetal é isolada/purificada de acordo com sua função. Para isso, o ligante imobilizado na FE irá interagir com a amostra de proteínas com afinidade química, estrutural e biológica (Figura 3). Se, na cromoterapia, visa-se ao isolamento de uma enzima (E), os possíveis ligantes da FE serão o substrato (S) ou o inibidor específico (I) dessa enzima. Para o isolamento de proteases de plantas, usa-se um inibidor competitivo, que é um ligante mais estável do que o S, e esse I vai interagir com o sítio ativo da enzima. Para o isolamento de um I inibidor peptídico, a respectiva E é imobilizada na FE (Silva-López & De Simone, 2005).

Figura 3 – Esquema de uma cromatografia de afinidade



As proteínas da amostra interagem com o ligante da FE por afinidade (A), e as que não têm são eluídas pela FM (B). As proteínas de interesse são desligadas da FE pela variação de pH ou força iônica e coletadas para posteriores análises (C).

Fonte: adaptado de Wunderlich, 2016.

Numa amostra complexa, como um extrato vegetal, existe uma enormidade de moléculas dos metabolismos primário e secundário, e as proteínas que não têm afinidade com a FE são eluídas da coluna pela FM, com o auxílio da força da gravidade ou pelo uso bombas peristálticas que injetam a FM em baixa pressão. As proteínas de interesse permanecem ligadas na FE e são eluídas da coluna quando elas perdem a afinidade pelo ligante, ou seja, quando seu estado de ionização e sua carga são modificados utilizando uma outra FM com valores de pH distintos daquele utilizado para ligar a E ou I à FE ou tampões com elevada força iônica. A eluição da proteína ou peptídeo de interesse é feita coletando-se as frações e monitorando a absorvidade destas em espectrofotômetro na faixa do UV, pela presença dos anéis benzênicos dos aminoácidos aromáticos que possuem máximo de absorção a 280 nm. Esse tipo de cromatografia é versátil porque permite isolar uma enormidade de proteínas de acordo com sua função biológica. Por exemplo, se buscamos isolar um anticorpo, o antígeno estará ligado na FE, assim como um hormônio pode ser isolado quando acoplamos seu respectivo receptor na matriz.

As colunas de afinidade podem ser compradas prontas com o ligante covalentemente acoplado à matriz ou serem preparadas pelo usuário. Elas devem apresentar: adsorção inespecífica muito baixa; poros largos para

permitir a passagem das biomoléculas; bom fluxo para uma rápida separação; e grande estabilidade em condições ácidas, básicas, de grande força iônica e detergentes. As matrizes mais usadas em colunas de afinidade são agarose e Sepharose® (Chou *et al.*, 2012).

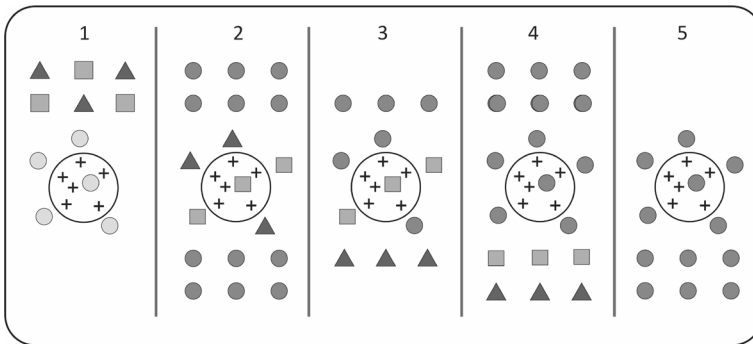
#### *Cromatografia de troca iônica*

O princípio que rege a cromatografia de troca iônica (CTI) é a ligação iônica entre as substâncias eletricamente carregadas da amostra, que está diluída na FM, e a FE com carga elétrica oposta. O fracionamento das moléculas por CTI está baseado nas diferenças de suas cargas líquidas superficiais. As substâncias são adsorvidas de modo reversível e diferencial à FE, e o grau de afinidade deve-se à diferença da carga líquida superficial destas substâncias e é possível controlar esta carga alterando o pH e a força iônica da FM. Com isso, as cargas das moléculas da amostra podem variar e exibir distintos graus de interação com a FE de acordo com a carga geral, a densidade de carga e a distribuição de carga na sua superfície. As proteínas e peptídeos são poli-íons anfotéricos, suas cargas superficiais mudarão gradualmente à medida que o pH do ambiente for alterado. Em ambientes ácidos as proteínas apresentam carga positiva, pois seus grupamentos amina estarão protonados; em ambientes com valores de pH próximos à neutralidade, a proteína, além de ter sua amina carregada positivamente, terá suas carboxilas desprotonadas, ficando, assim, com carga negativa, o que faz com que o número de cargas positivas e negativas se iguale e a proteína fique eletricamente neutra. Em meios de pH básico, cuja concentração de íons hidrogênio é baixa, a proteína também ficará desprotonada e com carga negativa (Kilislioglu, 2012).

A FE da CTI consiste em uma matriz porosa, inerte, insolúvel em soluções aquosas e em solventes orgânicos e está ligada covalentemente a um grupo carregado, o trocador. As matrizes mais usadas são Sepharose® e Sephadex® (*SEparation Pharmacia DEXtran*). Assim como agarose e Sepharose®, a Sephadex® é composta de polímeros de  $\alpha$ -D-glicose em ligações  $\alpha 1 \rightarrow 6$  que formam fibras insolúveis de alto peso molecular, originando poros. Os trocadores catiônicos trocam cátions com a FM, pois apresentam carga negativa; os aniônicos, por sua vez, trocam ânions e possuem carga positiva. Quanto à intensidade de carga, eles podem ser fortes ou fracos: os trocadores fortes mantêm sua carga durante todo o processo cromatográfico, mesmo sendo empregados tampões com uma ampla faixa de pH. Por sua vez, os trocadores fracos vão apresentar a carga desejada numa faixa mais estreita. Se o pH do tampão usado sair da faixa de capacidade da matriz, a coluna perderá sua distribuição de carga e a molécula de interesse poderá ser perdida. Contudo, apesar da menor faixa de pH de trabalho, os trocadores fracos têm maior especificidade (Chou *et al.*, 2012).



Figura 4 – Representação esquemática de uma CTI com trocador aniônico



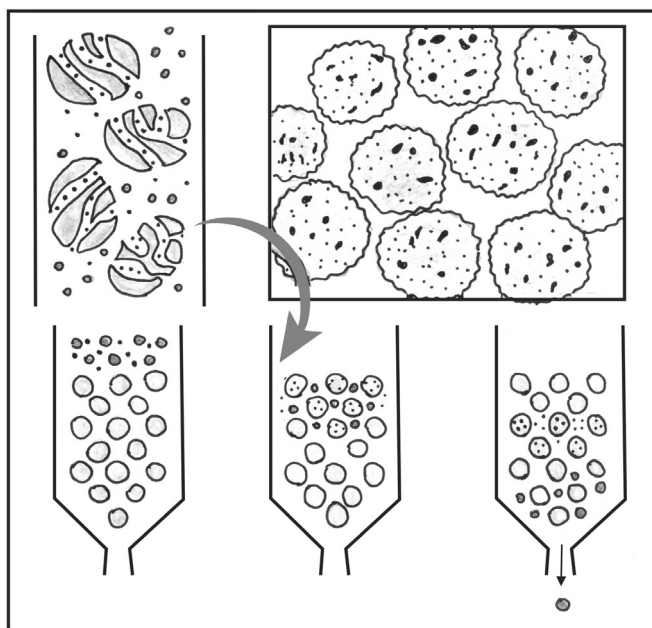
Fonte: adaptado de Kilislioglu, 2012.

Existem dois tipos de CTI: a catiônica e a aniônica. Quando a FE tem grupos positivos que atraem ânions, a CTI é chamada de aniônica; quando existem grupos negativos na FE, os cátions são atraídos, então a CTI é chamada de catiônica. Na Figura 4, apresentamos uma separação por CTI aniônica por meio de um trocador positivo. No estágio inicial, a resina trocadora é equilibrada com uma FM contendo íons de carga positiva, representados por esferas cinza-claras (1). Na amostra existem duas proteínas com cargas positivas, representadas por triângulos e quadrados, que interagem com a FE com intensidades diferentes: aquela com maior carga tem maior força de interação com a FE (2). Após a adsorção das proteínas por ligação iônica, elas são eluídas da coluna por uma FM em gradiente de pH, representada por esferas cinza-escuras, e as proteínas se tornam neutras e desligam da coluna. As proteínas representadas por triângulos apresentam menor interação iônica com a FE e são eluídas da coluna antes das proteínas representadas por quadrados, que têm maior interação com o trocador pois têm maior carga negativa líquida e menor velocidade de migração e maior tempo de retenção (3 e 4). Após a separação a coluna é regenerada para garantir a completa eluição das proteínas ainda ligadas, ou as ligadas de modo inespecífico e o trocador é ligado com o cátion usado no estágio inicial (5) (Grinberg & Car, 2017). A CTI é usada para fracionar todos os tipos de moléculas carregadas, como proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos de pequeno tamanho e, também, para eliminar os íons contaminantes de uma amostra. Sua grande vantagem é que a CTI afeta muito pouco a estrutura e a atividade biológica das moléculas (Kilislioglu, 2012).

### *Cromatografia por exclusão molecular*

Cromatografia por exclusão molecular é também chamada de cromatografia de filtração em gel e baseia-se num processo mecânico de separação. A FE é uma matriz inerte de partículas com formatos, tamanhos e porosidades uniformes. As moléculas de interesse serão separadas por tamanho, uma vez que as menores penetrarão nos poros da matriz e seus percursos serão maiores do que das moléculas de maior tamanho. Por sua vez, as moléculas que não penetram nos poros, que são as de maior massa molecular, serão excluídas e seu percurso na FE será menor, conseqüentemente, sua velocidade de migração será maior (Figura 5). As proteínas excluídas são eluídas primeiro da coluna e as demais seguirão em ordem decrescente de massa molecular (Collins, Braga & Bonato, 2017). O fracionamento será acompanhado pela leitura das absorvâncias em 280 mn de cada fração coletada (Zaia, Zaia & Lichtig, 1998).

Figura 5 – Cromatografia por exclusão molecular



Na parte superior da figura, representação da resina com poros (FE), e ao lado a microscopia eletrônica das superfícies das "pérolas" de Sephadex®. Abaixo, uma representação da cromatografia de filtração em gel, na qual estão excluídas as moléculas de maior massa, enquanto as de menor massa entram nos poros da resina e são retiradas pela FE.

Fonte: adaptado de Shrestha, 2013.

As resinas do gel de dextrano, Sephadex®, são as mais usadas. Existem duas séries de Sephadex®: a G, usada no fracionamento de substâncias polares, como as proteínas, e as da série LH, no de substâncias menos polares, como os metabólitos secundários de plantas. As resinas da série G se diferenciam pelo grau de ligações cruzadas e, conseqüentemente, pelo tamanho dos poros e pela resolução da faixa de massa molecular que pode separar. Por exemplo, a Sephadex® G-200 tem a capacidade de separar moléculas na faixa de 5.000 a 800.000 Da, a Sephadex® G-50 separa na faixa de 2.000 a 30.000 Da. Logo a Sephadex® G-200 tem poros maiores do que a G-25 e permite a resolução de proteínas de maior massa molecular (Chou *et al.*, 2012).

## Caracterização

Os principais ensaios bioquímicos empregados na caracterização de uma amostra proteica são: dosagem do teor de proteínas, eletroforese, avaliação da atividade biológica e determinação das estruturas primária e secundária da proteína.

### *Dosagem do teor de proteínas*

A dosagem do teor de proteínas é a primeira caracterização de um extrato, fração ou proteína purificada. Muitas metodologias foram desenvolvidas para minimizar as interferências dos componentes não proteicos da amostra e aumentar a sensibilidade do método. Além das sementes, os tecidos vegetais não são tão abundantes em proteínas quanto os tecidos animais. Logo, a metodologia para dosar proteínas em extratos vegetais deve ser sensível e minimizar a interferência de alcaloides e compostos fenólicos comumente encontrados em plantas, portanto o método de Bradford reúne estas atribuições, sendo a metodologia de escolha. É importante ressaltar que tais metabólitos têm anéis aromáticos que absorvem na faixa da radiação UV. Esse método se baseia na absorvância máxima no espectro visível de uma solução ácida de um corante, o azul brilhante de Coomassie® G-250, a 595 nm, quando ele se liga aos grupos amino e carboxila das proteínas que contêm especialmente aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (Bradford, 1976). A leitura da absorvância tem sensibilidade a partir de 1 µg de proteína e é feita em espectrofotômetro ou leitor de microplacas. Apesar de esse método ser mais rápido, sensível e estar sujeito a um número muito menor de interferentes do que outras metodologias, suas desvantagens incluem a variação da absorvância específica para diferentes

proteínas, devido à sua baixa solubilidade ou ao seu baixo peso molecular. Para contornar tais problemas, aumenta-se a concentração do corante e a solubilização das proteínas (Bradford, 1976).

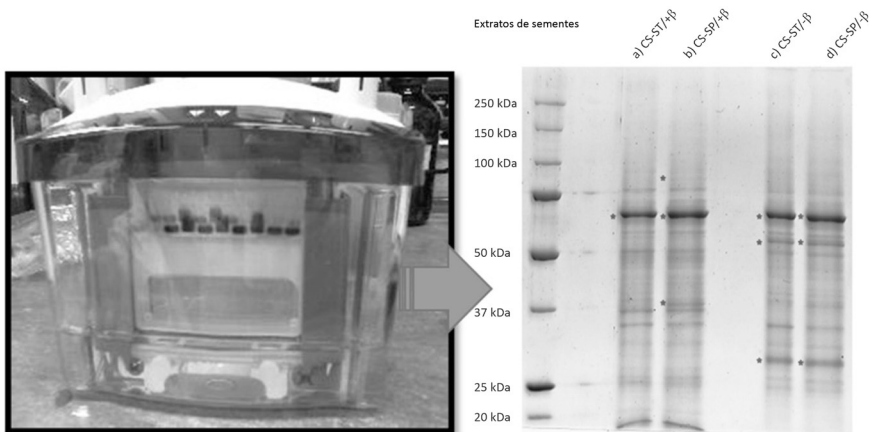
### *Eletroforese*

A eletroforese se baseia na migração de substâncias carregadas quando é aplicado um campo elétrico, ou uma diferença de potencial elétrico (ddp). Portanto, moléculas com carga negativa migrarão para o polo positivo, o ânodo, e moléculas com carga positiva migrarão para o polo negativo, o cátodo. A velocidade de migração dependerá do equilíbrio entre a força eletromotriz do campo elétrico e uma força retardante, a friccional, imposta pelo meio suporte no qual ocorre a eletroforese. Essas forças, por sua vez, são influenciadas pela amostra (carga líquida, tamanho molecular, forma), ddp (intensidade de corrente, voltagem e resistência), meio que carrega a corrente (composição, força iônica, pH) e pelo meio suporte (adsorção, eletroendosse, peneira molecular) (Magdeldin, 2012).

A eletroforese é classificada de acordo com o meio em que ocorre. As mais utilizadas acontecem em meio estabilizado, que tem um suporte (sólido ou gelatinoso), denominadas de eletroforeses zonais. O tipo de eletroforese empregado para analisar proteínas é a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que é feito entre placas de vidro e tem formato de uma folha retangular (Figura 7). A poliacrilamida se polimeriza, por ligações cruzadas, com a bis-acrilaminida, formando poros cujos tamanhos podem variar de acordo com o conteúdo de acrilamida. Os géis de 7, 10, 12, 15 e 20% são os mais utilizados. O tamanho do poro do gel está relacionado ao tamanho molecular da proteína em análise, o mesmo princípio da cromatografia de filtração em gel. Entretanto, na eletroforese, as proteínas maiores têm menor velocidade de migração: quanto maior a proteína, maior será o poro do gel. Os polipeptídeos costumam ser analisados em géis de tamanhos superiores a 20%, com poros pequenos. O detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) é essencial nessa técnica, pois ele se liga às proteínas conferindo carga negativa e um formato característico de bastão. No SDS-PAGE a amostra de proteínas é previamente tratada com o tampão de amostra (pH alcalino, SDS e azul de bromofenol). Esse tampão garantirá carga negativa à proteína, pois seus grupamentos ionizáveis perderão seus prótons e assumirão carga negativa, e o corante permite visualizar a amostra durante a corrida. Com isso, as proteínas com diferentes cargas e formas ficam com carga negativa e com o mesmo formato alongado, portanto o diferencial para análise é o tamanho molecular. As proteínas de baixo peso molecular e

os peptídeos migrarão com maior velocidade através do SDS-PAGE para o cátodo que fica no final do gel, pois têm menores coeficientes friccionais. As proteínas maiores terão mais dificuldade de passar pelos poros do gel. Os íons dos tampões alcalinos irão empurrar as proteínas do ânodo (parte de cima do gel) para o cátodo. A voltagem é outro fator essencial para a corrida eletroforética, visto que a partir dela é gerado uma ddp e, assim, o fornecimento de energia suficiente para propiciar uma corrente elétrica necessária para que as proteínas migrem do ânodo para o cátodo. Contudo, ela não deve ser muito alta para não aumentar a resistência de modo que a eletroforese não aconteça, pois uma voltagem muito grande provocará distribuição irregular de calor e distorção das bandas de proteínas (Laemmli, 1970).

Figura 6 – Eletroforese de proteínas



Numa cuba de eletroforese, à esquerda, um SDS-PAGE é submetido a uma diferença de potencial e as amostras são empurradas do ânodo para o cátodo, de cima para baixo; à direita, um gel corado e seco. Na esquerda estão assinalados os padrões de pesos moleculares e na parte superior do gel são identificadas diferentes amostras de extratos de plantas com proteínas de diversos pesos e concentrações.

Após uma corrida eletroforética, o gel é corado ou impregnado por íons prata para a visualização das bandas de proteínas. Aquelas de maior peso ficarão na parte superior do gel. O corante comumente usado é o azul brilhante de Coomassie® R-250. Sua sensibilidade é de 300-1.000 ng de proteínas por banda, menos sensível que a impregnação por íons prata, cuja sensibilidade é de 1-10 ng de proteína por banda. A eletroforese de proteínas permite estudar o perfil de proteínas de uma amostra complexa, um extrato vegetal,

ou acompanhar o fracionamento e a purificação de uma proteína/polipeptídeo. Se proteína estiver “pura” ou “homogênea”, ela apresentará apenas uma banda de proteína no gel. Essa técnica permite estimar as massas moleculares das proteínas quando comparadas a um padrão de proteínas, cujas massas são conhecidas quando analisadas em conjunto (Magdeldin, 2012).

#### *Avaliação da atividade biológica*

As proteínas desempenham inúmeras funções biológicas em decorrência da grande variedade de estruturas encontradas na natureza. Contudo, as enzimas e os inibidores enzimáticos são as moléculas biológicas mais empregadas como fármacos. Existem algumas maneiras de se estudar a atividade biológica de uma proteína num organismo e uma delas é a manipulação do seu genoma. O silenciamento do gene ou sua mutação podem interferir na função da proteína, causando alterações na fisiologia ou no fenótipo do organismo geneticamente modificado. Logo, essa abordagem é muitíssimo complexa, pois requer o conhecimento prévio do seu genoma, grande gasto de tempo e de investimento.

Uma abordagem mais simples é buscar a atividade biológica desejada ensaiando as reações bioquímicas de tais moléculas responsáveis pelo seu efeito farmacológico. Se a proteína for uma E, sua atividade será avaliada pela capacidade de catalisar a transformação de um S em um P. Para isso, é necessário conhecer as características cinéticas da E e do S da reação, pela determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), ou seja, a concentração de S responsável pela metade da velocidade máxima, os valores de pH e a temperatura nos quais a atividade da enzima é máxima.

Os S usados nas reações enzimáticas são geralmente cromóforos colorimétricos ou fluorimétricos e a formação de P é acompanhada em espectrofotômetro ou fluorímetro, respectivamente. A atividade enzimática é expressa por mol de P formado por minuto de reação (M/min.) e a atividade específica leva em consideração a concentração de proteínas na reação (M/min./mg de proteína). A protease papaína é um exemplo de E de plantas, cujos S podem ser de natureza proteica ou de peptídeos miméticos (sintéticos com aminoácido em ligação carbamida que se assemelha a uma ligação peptídica). Como ela é uma cisteíno protease, é fundamental que o pH reacional seja levemente ácido, característico dessa classe de proteases, para que os aminoácidos catalíticos do sítio ativo estejam na forma iônica adequada para a catálise. Cada enzima tem sua faixa de pH em que sua atividade é máxima (Silva-López & Gonçalves, 2019).

Caso a proteína vegetal seja um inibidor enzimático (I), estuda-se o efeito inibitório sobre a atividade da E alvo na reação de formação do P, e existem múltiplas possibilidades de produtos reacionais, como o complexo enzima-inibidor (EI), típico de uma inibição enzimática competitiva, o complexo enzima-substrato (ES), o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI), que é observado numa inibição enzimática não competitiva ou incompetitiva ou, ainda, E, I, S e P livres. Se a quantidade de P formado for reduzida ou inexistente em relação a uma reação enzimática controle sem a adição do I, pode-se dizer que o I em questão é eficiente, e, portanto, apresenta potencial farmacológico (Silva-López, 2009).

Se a proteína vegetal for um antígeno, estuda-se a capacidade da ligação específica através de reações colorimétricas como o ensaio de imunoabsorção enzimática, o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou pelo *immunoblotting*, também denominado de *western blotting*. O *immunoblotting* requer a separação prévia das proteínas da amostra por eletroforese e, depois, sua detecção pelas reações imunoenzimáticas. Embora o *immunoblotting* seja mais específico, o ELISA é o mais usado por ser mais rápido e mais barato, pois não exige a separação prévia da amostra por eletroforese. A imunofluorescência é uma outra técnica de detecção de antígenos e de anticorpos, contudo é mais empregada para identificação de antígenos em tecidos ou células e requer um fluorocromo como marcador para análise, um equipamento especial e um operador especializado, logo é uma técnica muito mais cara (Ferreira & Moraes, 2013).

A proteína vegetal, além de ser uma enzima ou um inibidor ou um antígeno, pode ainda ser um ligante, um agonista ou um antagonista de um receptor. Portanto, diferentes abordagens metodológicas que estudam tais ligações muito específicas são empregadas nos radioimunoensaios que marcam tais moléculas com isótopos radioativos.

#### *Determinação das estruturas primária e secundária da proteína*

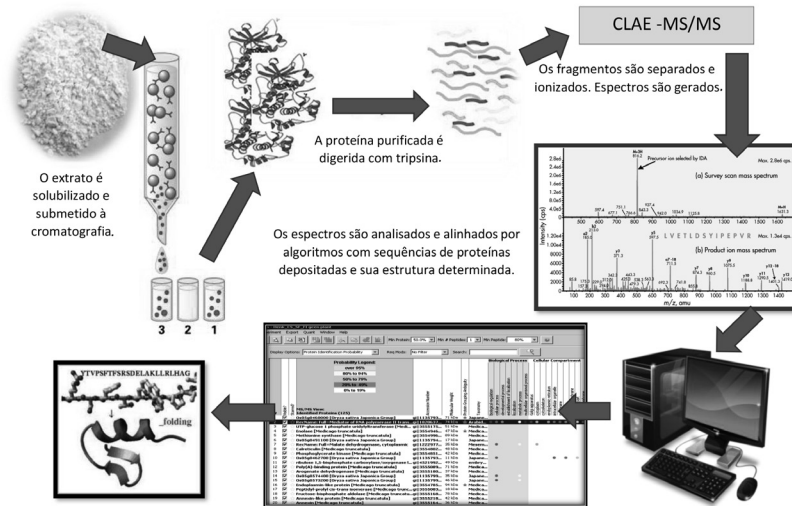
A estrutura primária (1<sup>ária</sup>) de uma proteína, ou seja, sua sequência de aminoácidos e a localização de suas pontes de enxofre (ligações covalentes), é de extrema importância para sua caracterização, identificação e função, pois a mudança ou mutação de um único aminoácido na cadeia polipeptídica pode interferir na sua atividade biológica. Inicialmente, era empregada a técnica da degradação de Edman, que utilizava um sequenciador de aminoácidos, e a proteína era degradada sequencialmente a partir no seu NH<sub>2</sub> terminal e

os aminoácidos eram identificados por derivação. Essa metodologia é muito precisa, contudo permitia identificar pequenas sequências de estrutura 1<sup>ária</sup> e o tempo gasto para obter a estrutura completa de uma proteína era muito grande. Atualmente, com os avanços do sequenciamento de genomas, as sequências de aminoácidos de muitas proteínas têm sido preditas a partir das sequências do DNA e depositadas em bancos de dados de proteínas como *Protein Data Bank* (PDB), National Center for Biotechnology Information (NCBI), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG), Pfam, Swiss Prot e ExPasy.

A determinação da estrutura 1<sup>ária</sup> de proteínas de uma amostra segue um protocolo padrão que inclui a digestão das proteínas pela tripsina, uma serino protease que hidrolisa as ligações peptídicas com arginina (Arg) em sítio P1. Posteriormente, os fragmentos peptídicos trípticos são separados em uma coluna de fase reversa em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM), que produz íons a partir dos fragmentos trípticos e separa-os de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ), gerando um registro (espectro) de suas abundâncias. Os resultados da relação  $m/z$  obtidos no EM são analisados por algoritmos computacionais como *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), que compara tais informações com aquelas depositadas nos bancos de dados, sugerindo sequências de aminoácidos baseados na similaridade da relação  $m/z$  com os peptídeos já depositados, fazendo o alinhamento de sequências (Figura 7). Esses métodos são heurísticos, ou seja, são métodos empíricos de informática que, em regras gerais, buscam sequências de aminoácidos. Embora a metodologia utilizada não seja tão fidedigna quanto a degradação de Edman, ela é capaz de lidar com muitas informações ao mesmo tempo de modo bastante rápido (O'Neill, 2019). Contudo, a enorme limitação no estudo de proteínas vegetais é que existem muito poucas sequências depositadas em bancos de dados, visto que, na natureza, existem em torno de 400 mil espécies vegetais, mas apenas 181 plantas tiveram seus genomas sequenciados: 6 espécies de briófitas, 14 de plantas vasculares (9 gimnospermas) e o restante das espécies de angiospermas (Gonçalves *et al.*, 2021).

A estrutura secundária (2<sup>ária</sup>) de proteínas/peptídeos é estudada por técnicas *in silico*, como a modelagem por homologia e dinâmica molecular, particularmente quando se conhece a estrutura 1<sup>ária</sup> da proteína. A metodologia *in vitro* inclui principalmente métodos espectroscópicos como o dicróismo circular (DC), espectrofotometria no infravermelho (IV) e a ressonância magnética nuclear (RMN).

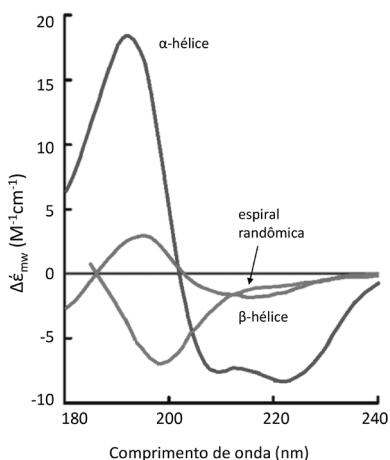


Figura 7 – Fluxo metodológico para determinação da estrutura 1<sup>ária</sup> de uma proteína

Do extrato vegetal, submetido à cromatografia, isolou-se uma proteína que é digerida pela tripsina. Os peptídeos são separados e ionizados por CLAE-EM/EM. Os espectros gerados são analisados por bancos de dados de sequências de proteínas.

O DC está baseado na absorção de radiação na faixa do UV, e o espectro é gerado pela diferença na capacidade de absorção dos componentes esquerdo e direito da luz circularmente polarizada por moléculas quirais. Para proteínas os espectros de CD podem ser utilizados para estudo de: enovelamento e estrutura secundária ( $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ ); estrutura de proteínas de membrana; monitoramento da integridade estrutural por agentes desnaturantes; quantificação das alterações conformacionais; e caracterização de domínios em comparação com modelos computacionais, entre outros. Os sinais da ligação peptídica dominam o espectro de DC de proteínas, com transições eletrônicas em 190 nm e 220 nm para amina secundária, ligações peptídicas de todos os aminoácidos e 200 nm para as ligações peptídicas da amina terciária prolina. Outros espectros importantes são aqueles dos anéis aromáticos de tirosina, fenilalanina e triptofano e os das ligações dissulfeto que absorvem no UV próximo. As estruturas secundárias  $\alpha$ -hélices, folhas  $\beta$  e as estruturas irregulares (desordenadas) têm espectros de CD característicos (Wei, Thyparambil & Latour, 2014) (Figura 8).

Figura 8 – Espectros de CD característicos das estruturas 2<sup>árias</sup> do tipo  $\alpha$ -hélice, folhas  $\beta$  e as estruturas desordenadas



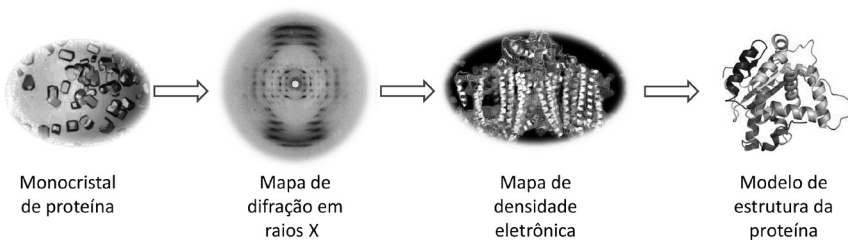
Fonte: adaptado de Wei, Thyparambil & Latour, 2014.

A região do IV no espectro eletromagnético localiza-se entre 14.000 e 200  $\text{cm}^{-1}$ . A região do IV médio está entre 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  (2.500 a 25.000 nm) e é usada para estudar as estruturas de proteínas, pois tem energia para provocar modificações nos níveis de energia vibracional ( $E_v$ ) e estas são acompanhadas por alterações nos níveis de energia rotacional ( $E_r$ ). A análise da estrutura 2<sup>ária</sup> de uma proteína a partir de seu espectro vibracional permite inferir qual a estrutura que ela adota. As regiões vibracionais da proteína são as ligações peptídicas (amídicas) e as cadeias laterais, como as sulfidrilas das cisteínas e as carbonilas dos ácidos aspártico e glutâmico. É importante lembrar que a estrutura 2<sup>ária</sup> das proteínas é mantida principalmente por ligações hidrogênio entre os grupamentos N-H e C=O da cadeia polipeptídica com os mesmos grupos na volta seguinte da  $\alpha$ -hélices ou fita  $\beta$  vizinha da folha. A vibração das  $\alpha$ -hélices ocorre em cerca de 1.650  $\text{cm}^{-1}$  e a das estruturas desordenadas a, aproximadamente, 1.645  $\text{cm}^{-1}$ . Por sua vez, as folhas  $\beta$  apresentam várias regiões de vibração e são mais difíceis de elucidação estrutural (Wei, Thyparambil & Latour, 2014).

A RMN e a cristalografia por difração de raios x são as técnicas experimentais mais importantes para dar informações sobre as estruturas tridimensionais 3<sup>árias</sup> e 4<sup>árias</sup> de amostras puras de proteínas e foram usadas para identificar cerca de 97% das estruturas depositadas no PDB. O número de estruturas

resolvidas por cristalografia é aproximadamente cinco vezes maior do que por RMN, visto que existe um limite de tamanho de uma proteína a ser resolvida por RMN: em torno de 6 kDa por técnicas bidimensionais e de 40 kDa por técnicas de três ou mais dimensões. A RMN é observada quando se incidem ondas de radiofrequência em uma amostra que tem isótopos com spin nuclear maior que zero na presença de um campo magnético, e seu sinal reflete o ambiente químico em que o núcleo se encontra na molécula. Em proteínas, os núcleos atômicos mais abundantes são  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ . Um conjunto distinto de ressonâncias observadas pode ser analisado para fornecer uma lista de núcleos atômicos próximos um do outro e para caracterizar a conformação local dos átomos que estão ligados entre si. Essa lista de restrições é, então, usada para construir um modelo da proteína que mostra a localização de cada átomo. No arquivo PDB, encontram-se dois tipos de entradas de coordenadas para estruturas de RMN: o primeiro inclui o conjunto completo da determinação estrutural, com cada estrutura designada como um modelo separado, e o segundo é uma estrutura média minimizada. Com base nas diferentes observações no conjunto, esses arquivos tentam capturar as propriedades médias da molécula, como ligações de hidrogênio e dissulfeto, distâncias entre hidrogênios próximos e restrições na conformação, como também a estereoquímica local da cadeia (Sekhar & Kay, 2019).

Figura 9 – Fluxo de trabalho para obtenção da estrutura de proteínas por cristalografia por difração de raios X



Um monocristal de proteínas difrata os raios X, gerando um padrão de difração que fornece um mapa de densidade eletrônica, possibilitando criar um modelo estrutural.

Na cristalografia por difração de raios X, é necessário obter monocristais de proteínas, sem rupturas, defeitos e sem contornos de grão. Esses cristais são submetidos a um feixe de raios X ( $\lambda = 1$  a  $100 \text{ \AA}$ ) e suas proteínas difratam o feixe em várias direções de acordo com a simetria do agrupamento de átomos.

A difração origina um padrão de intensidades, característico de manchas, que pode ser interpretado segundo a distribuição dos átomos no cristal, aplicando a lei de Bragg. O mapa da densidade eletrônica é interpretado para determinar a localização de cada átomo (Figura 9). Os raios X são usados porque têm  $\lambda$  da mesma ordem de grandeza das distâncias interatômicas, gerando, assim, difrações significativas. A grande limitação da cristalografia é a obtenção de monocristais: enquanto algumas proteínas formam cristais perfeitos e bem ordenados, outras formam cristais fracos. A precisão da estrutura atômica gerada pela difração de raios X depende da qualidade dos cristais, pois a estrutura atômica de cristais perfeitos reflete a estrutura da proteína. A cristalografia é um excelente método para proteínas rígidas que formam cristais ordenados, pois as moléculas estão alinhadas exatamente na mesma orientação. Porções flexíveis de proteínas não são bem visualizadas nos mapas de densidade eletrônicas de cristalografia (Gawas, Mandrekar & Majik, 2019).

Ainda não existe metodologia capaz de descrever as características conformacionais de uma proteína de forma absoluta. Os dados experimentais de várias técnicas, junto com as abordagens *in silico*, permitem o refinamento de modelos estruturais de proteínas, as alterações conformacionais resultantes da ligação de ligantes e as interações com macromoléculas. Cada metodologia tem suas vantagens e desvantagens, e é preciso extrair as informações de cada uma delas para criar um modelo final que seja consistente com os dados experimentais, com a composição e geometria esperadas da proteína.

## Considerações Finais

As proteínas, entre todas as moléculas biológicas da natureza, são as que têm as estruturas mais complexas e com alto grau de diversidade, e, por causa disso, são capazes de desempenhar inúmeras funções nos organismos e nos ambientes. Além disso, se uma determinada proteína apresentar mutações, sua estrutura estará alterada e conseqüentemente sua função biológica também, o mesmo acontece quando ela está ausente ou sua síntese é insuficiente. A alteração da função das proteínas pode modificar o metabolismo e a fisiologia do indivíduo, acarretando um processo patológico. Tanto pela variedade de funções que desempenham quanto pela importância dessas funções, as proteínas têm sido utilizadas para fins biotecnológicos e farmacológicos e fazem parte da classe de fármacos biológicos. Tais fármacos trazem soluções inovadoras e mais efetivas para enfermidades intratáveis com medicamentos sintéticos, como doenças degenerativas e do sistema

imune. As proteínas de plantas são muito atrativas para fins farmacológicos pois, além de serem filogeneticamente distantes de humanos e animais, são resistentes em temperaturas elevadas e na presença de agentes químicos, têm boa atividade biológica e baixo custo de obtenção, requisitos importantes para a produção industrial de medicamentos.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- BRADEN, C. & TOOZE, J. *Introduction to Protein Structure*. 2. ed. New York: Garland Publishing, 1999.
- CHOU, J. *et al.* Porous bead-based diagnostic platforms: bridging the gaps in healthcare. *Sensors*, 12: 15.467-15.499, 2012.
- COHEN, M.; DAVYDOV, O. & FLUHR, R. Plant serpin protease inhibitors: specificity and duality of function. *Journal of Experimental Botanic*, 70: 2.077-2.085, 2019.
- COLLINS, C. H.; BRAGA G. L. & BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. 6. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2017.
- FERREIRA, A. W. & MORAES, S. L. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2013.
- FLEMING, R. ADC Analysis by hydrophobic interaction chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 2.078: 147-161, 2020
- GAWAS, U. B.; MANDREKAR, V. K. & MAJIK, M. S. Structural analysis of proteins using x-ray diffraction technique. In: MEENA, S. N. & NAIK, M. (Eds.). *Advances in Biological Science Research: a practical approach*. Cambridge: Academic Press, 2019.
- GHAHRI, S. & MOHEBBY, B. Soybean as adhesive for wood composites: applications and properties in soybean. In: KASAI, M. (Ed.). *The Basis of Yield, Bio-Mas and Productivity*. Rijeka: Intech, 2017.
- GRINBERG, N. & CARR, P. W. *Advances in Chromatography*. Boca Ratón: CRC Press, 2017.
- GONÇALVES, R. N.; BARBOSA S. D. G. & SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases from *Canavalia ensiformis*: active and thermostable enzymes with potential of application in biotechnology. *Biotechnology Research International*, 1-11, 2016.
- GONÇALVES, R. N. *et al.* A novel cucumisin-like serine protease from leaf of legume *Canavalia ensiformis*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 30: 147-159, 2021.
- KATOCH, R. & TRIPATHI, A. Research advances and prospects of legume lectins. *Journal of Biosciences*, 46: 104-134, 2021.

- KILISLIOGLU, A. *Ion Exchange Technologies*. Rijeka: Intech, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- MAGDELDIN, S. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. Rijeka: InTech, 2012.
- Marvibaigi, M. *et al.* Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *BioMed Research International*, 2014.
- MORELLON-STERLING, R. *et al.* Ficin: a protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162: 394-404, 2020
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7. ed. New York: W. H. Freeman, 2017.
- O'NEILL, J. R. An overview of mass spectrometry-based methods for functional proteomics. *Methods in Molecular Biology*, 1.871: 179-196, 2019.
- PACHECO, J. S. & SILVA-LÓPEZ, R. E. Study of the proteolytic activity of the tropical legume *Crotalaria spectabilis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67: 495-509, 2012.
- RAVEN, P. H. *et al.* *Biologia Vegetal*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- RAWLINGS, N. D. & BATEMAN, A. How to use the MEROPS database and website to help understand peptidase specificity. *Protein Science*, 30: 83-92, 2021.
- RODWELL, V. W. *et al.* (Eds.). *Bioquímica Ilustrada de Harper*. 30. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.
- SEKHAR, A. & KAY, L. E. An NMR View of protein dynamics in health and disease. *Annual of Review in Biophysical*, 48: 297-319, 2019.
- SHRESTHA, U. T. Gel filtration. My Scientific Blog, Research and Articles, 26 maio 2013. Disponível em: <<http://upendratts.blogspot.com/2013/05/gel-filtration.html>>. Acesso em: dez. 2023.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. Inibidores de proteases oriundos de plantas: uma abordagem útil para o desenvolvimento de novos fármacos. *Revista Fitos*, 4: 108-119, 2009.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. Debridement applications of bromelain: a complex of cysteine proteases from pineapple. *Advances in Biotechnology and Microbiology*, 3, 2017.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. & GONÇALVES, R. N. Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. *Journal Applied Biotechnology Bioengineering*, 6: 101-109, 2019.
- SILVA-LÓPEZ, R. E.; COELHO, M. G. & SIMONE, S. G. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology*. 131(Pt 1): 85-96, 2005.
- SRIKANTH, S. & CHEN, Z. Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. *Frontier in Pharmacology*, 7: 470, 2016.
- WANI, S. S. *et al.* Therapeutic potential of medicinal plant proteins: present status and future perspectives. *Current Protein Peptide Science*, 21: 443-487, 2019.

WEI, Y.; THYPARAMBIL, A. A. & LATOUR, R. A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230nm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1.844: 2.331-2.337, 2014.

WUNDERLICH, I. Protein affinity chromatography - Caframo Lab Solutions, ago. 2016. Disponível em: <[www.caframolabsolutions.com/application/protein-affinity-chromatography](http://www.caframolabsolutions.com/application/protein-affinity-chromatography)>. Acesso em: dez. 2023.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. A. T. & LICH-TIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 21: 787-793, 1998.



# 10

## Isolamento, Purificação e Caracterização de Metabólitos Secundários Vegetais

*Dulcinéia Furtado Teixeira, André Mesquita Marques,  
Leonardo Lucchetti Caetano da Silva e Carla Junqueira Moragas Tellis*

O potencial alimentício, terapêutico e nutracêutico de espécies vegetais baseia-se na existência de determinadas substâncias bioativas presentes nelas que sejam capazes de promover efeitos fisiológicos benéficos ou de participar de processos metabólicos para manutenção ou melhoria das funções de um organismo. Tais substâncias podem ser encontradas em diversas matrizes, como raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes. A importância desses produtos naturais está não somente no seu consumo *in natura*, mas também na sua aplicação como base para a formulação de novos produtos alimentícios, cosméticos ou medicinais (Samtiya *et al.*, 2021). Uma planta, para ser considerada matriz para a obtenção de um produto farmacêutico, em sua forma íntegra ou em parte, como fonte de algum derivado, precisa ter sua composição minimamente conhecida. Os medicamentos sintéticos (ou especialidades farmacêuticas) apresentam, em suas bulas, a descrição completa de sua composição e as proporções entre seus constituintes. Naturalmente, o mais importante é a identificação e a quantidade do ativo por dose. No caso de plantas e seus produtos derivados, tal informação não é tão simples de ser obtida, devido à complexidade e variedade dos metabólitos que as constituem (Veiga Jr. & Pinto, 2005).

Um dos aspectos mais importantes para garantir a eficácia e a segurança de um fitomedicamento é o conhecimento de sua composição e do quanto ela pode variar em função de diversos fatores, tais como sazonalidade,



ritmo circadiano e herbivoria (Lopez-Bucio, 2006). A compreensão total da composição de um insumo vegetal complexo que sirva de insumo farmacêutico ativo ainda é uma utopia. Assim, para que ela seja conhecida da maneira mais profunda possível, a planta precisa ser submetida a ensaios laboratoriais que levem ao isolamento, purificação e caracterização de seus constituintes (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). O processo inicia-se com a identificação inequívoca da espécie por um profissional especializado (botânico), que deve acompanhar a colheita do material vegetal, que pode ser ou não sucedida pela etapa de secagem, a depender das substâncias de interesse. No caso das plantas medicinais cujo estudo tem por objetivo obter óleos essenciais, o processo de secagem não deve ser realizado e a planta deve passar pelo processo de extração na forma mais fresca possível, para prevenir a eliminação de seus constituintes voláteis (Valli, Russo & Bolzani, 2018). As etapas de colheita e secagem, em conjunto com a etapa subsequente de extração foram descritas nos capítulos 2 e 3 deste livro. Neste, são descritos as ferramentas e os procedimentos típicos da chamada etapa fitoquímica.

## Etapa Fitoquímica

A etapa fitoquímica compreende uma série de procedimentos destinados à identificação prévia, a separação, o isolamento e a purificação dos metabólitos secundários vegetais. Idealmente, buscam-se aquelas substâncias envolvidas em alguma atividade biológica do extrato analisado, os chamados marcadores biológicos. Contudo, nem sempre eles estarão presentes em quantidades mensuráveis. Assim, na impossibilidade de obter tais substâncias, seja por sua baixa concentração nos extratos, seja por sua própria complexidade química, outras mais abundantes no extrato e/ou de mais fácil isolamento devem ser selecionadas e extraídas. Neste caso, temos os chamados marcadores químicos, que são extremamente úteis para a realização das etapas futuras de controle da qualidade da matéria-prima e essenciais na garantia da eficácia e da segurança dos extratos candidatos a medicamentos (Souza, Mello & Lopes, 2011).

## O fracionamento

O fracionamento de substâncias naturais de plantas é um procedimento fundamental na busca de produtos naturais bioativos. Após a extração das amostras vegetais, em que as substâncias são liberadas do material de origem,

o fracionamento poderá ser realizado, a fim de se separar e purificar as substâncias naturais. Técnicas como cromatografia, destilação e extração líquido-líquido são utilizadas para separar os diferentes constituintes com base em suas propriedades físico-químicas. Isso resulta na obtenção de frações cada vez mais puras, permitindo a identificação e o isolamento dos metabólitos de interesse. Esses componentes isolados podem ser analisados quanto às suas propriedades biológicas e potenciais aplicações terapêuticas, farmacêuticas ou industriais. O fracionamento é crucial para explorar a riqueza química das plantas, o que facilita a descoberta de novos fármacos, ingredientes alimentícios funcionais e compostos de interesse industrial.

#### *Partição líquido-líquido*

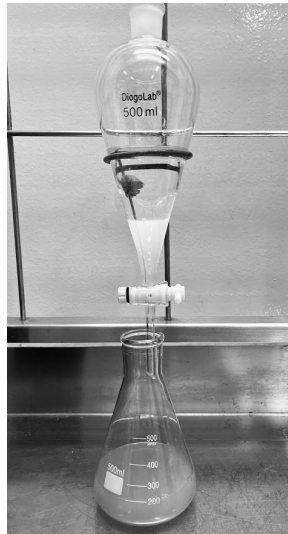
Uma vez terminado o processo de extração, discutido no capítulo 3, inicia-se o fracionamento. Essa etapa é imprescindível, pois raros são os casos de obtenção de substâncias puras diretamente do extrato bruto. Como exemplos, temos a pilocarpina (do jaborandi) e a rutina (da unha-de-gato) que, em virtude de sua abundância nos extratos das plantas de origem, são obtidas de forma simples a partir deles (Abreu *et al.*, 2007).

Uma vez que o extrato bruto é obtido, ele é submetido a algum processo de secagem e seu rendimento, avaliado, em percentual, na relação entre a massa da planta e a do material seco. Todas as etapas são relevantes, pois um conjunto de procedimentos realizados com boas práticas e qualidade são fundamentais para a repetibilidade, a previsibilidade e, portanto, para a qualidade do produto (Silva & Loh, 2006).

O fracionamento inicial do extrato bruto, muitas vezes, inicia-se com extrações líquido-líquido. Tal procedimento objetiva a redução da complexidade química da amostra inicial, que pode conter uma infinidade de metabólitos secundários de classes químicas e polaridades muito distintas entre si, a fim de facilitar o isolamento de substâncias. Após sua ressuspensão em solvente adequado (geralmente um sistema composto de proporções variadas de metanol ou etanol e água) que permita sua dissolução total, a mistura é transferida para um funil ou ampola de separação e um solvente imiscível é adicionado. O funil é agitado para permitir a mistura das fases e promover a migração preferencial dos componentes para o solvente no qual são mais solúveis, de acordo com seus coeficientes de partição. Sendo assim, o conhecimento prévio da polaridade dos metabólitos e das forças intermoleculares envolvidas ajuda a mensurar a seletividade da solubilidade dos metabólitos-alvo. O processo envolve misturas de solventes, geralmente em ordem crescente de polaridade, e é repetido por quantas vezes forem necessárias, até o esgotamento

possível, de forma a gerar várias frações enriquecidas e menos complexas se comparadas com o extrato bruto original. Tipicamente, extratos hidrofílicos (aquosos ou hidroalcolóicos), em geral muito complexos na diversidade de componentes (e de polaridades também diversas), são particionados, sucessivamente, com *n*-hexano, acetato de etila, cloreto de metileno ou clorofórmio e, finalmente, butanol-1. Dessa forma, são obtidas frações de polaridade crescente que tornam os procedimentos de isolamento das substâncias mais fácil (Nhien *et al.*, 2016). Os solventes e suas proporções variam de caso a caso. Na Figura 1, damos um exemplo do processo de partição líquido-líquido.

Figura 1 – Funil ou ampola de separação, contendo dois solventes imiscíveis, usado no processo de separação líquido-líquido



Esse tipo de partição é usado nas etapas laboratoriais para conhecer a composição do vegetal e sua variabilidade, para posterior caracterização estrutural e submissão das substâncias para testes de atividade biológica. Uma vez que são usados solventes tóxicos e proibidos nas boas práticas de fabricação, esse tipo de procedimento não é usado em escala industrial (Zou *et al.*, 2018).

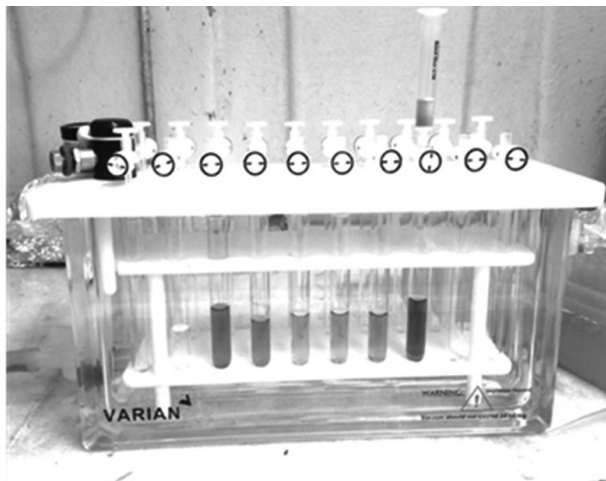
#### *Extração em fase sólida (EFS)*

Apesar de ser amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa, a técnica de extração líquido-líquido tem algumas limitações. Entre elas, está

a saturação de um solvente no outro, fazendo com que, frequentemente, não seja possível concentrar a totalidade das substâncias em apenas uma das fases. Assim, como alternativa para minimizar alguns de seus aspectos negativos, tais como o uso de grandes volumes de solventes e/ou a possibilidade de formação de emulsões difíceis de serem desfeitas, em 1976 foi introduzida a técnica de extração em fase sólida (EFS, ou *solid-phase extraction* – SPE). Atualmente, a EFS tornou-se uma das técnicas mais empregadas no preparo, concentração e purificação de amostras de forma mais rápida e precisa que as extrações manuais (Hennion, 1999; Poole, 2002).

A EFS funciona como uma cromatografia sólido-líquido em coluna e tem um poder de separação de cerca de cinquenta vezes maior que uma extração líquido-líquido. Para realizar a separação aplicando essa técnica, devem ser escolhidas fases estacionárias (FE, os adsorventes) e fases móveis (FM, os solventes), de modo que a amostra aplicada ao sistema passe diretamente pelo leito cromatográfico e seja adsorvida pela FE, podendo haver alguma retenção seletiva de constituintes. A maioria das FE usadas em EFS é formada por sistemas orgânicos com grupos C18, C8, C2, cicloexila, fenila e aminopropila, ligados quimicamente à sílica. A escolha da fase mais apropriada deve ser orientada pelos mesmos critérios da escolha das FEs usadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): estrutura química do analito, propriedades do solvente e características da amostra. Na Figura 2, mostramos um aparato típico de EFS (Camel, 2003; Jardim, 2010).

Figura 2 – Equipamento para EFS

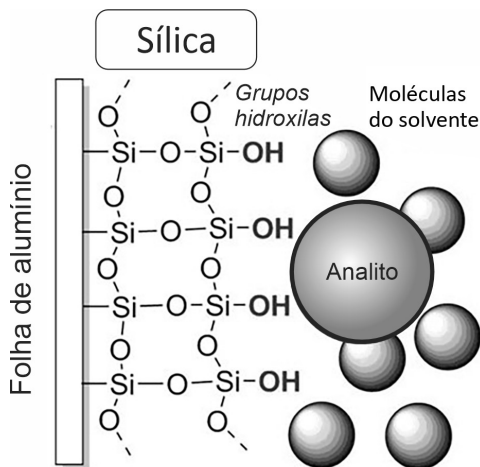


## A Cromatografia como Ferramenta de Fracionamento, Isolamento e Purificação: conceitos, fundamentos e tipos

A cromatografia é um método físico-químico de separação de substâncias de uma amostra eluídas por uma FM de acordo com diferenças de comportamento em uma FE. Para isso, emprega-se uma FM que promoverá a migração diferencial dessas substâncias através da FE. O procedimento de separação acontece pela ação de diferentes forças intermoleculares e pela interação diferenciada dos componentes da amostra com a FM e FE, os quais se deslocam em diferentes velocidades pelo sistema. Os fenômenos mais utilizados nas operações de separação baseiam-se na adsorção-dessorção, na partição, na filtração em gel e na troca iônica. A técnica é tradicionalmente subdividida em dois tipos: planar e em coluna. Ambas são usadas rotineiramente em laboratórios de pesquisa e com diferentes aplicabilidades. A cromatografia planar é mais utilizada para a compreensão da natureza química dos componentes da amostra, sua complexidade, e permite que sejam inspecionados os grupos funcionais das moléculas separadas numa etapa denominada revelação, o que será discutido mais adiante. Ela também antecede a cromatografia em coluna que, por sua vez, é mais aplicada em processos de fracionamento, uma vez que permite a aplicação de grande quantidade de amostra. O fracionamento consiste em, gradativamente, simplificar a composição do extrato em termos de número de espécies químicas presentes, fracionando, isolando e, em última análise, levando à purificação de componentes. Para que tais etapas sejam bem-sucedidas, é necessário compreender os fenômenos físico-químicos dos modos de separação para que sua seleção seja mais adequada à natureza da amostra (Collins, Braga & Bonato, 2006).

A adsorção-dessorção é um fenômeno baseado nas características eletrônicas das moléculas que interagirão com a FE durante o procedimento cromatográfico, sendo caracterizado como um fenômeno de superfície (Figura 3).

Figura 3 – Exemplo de placa contendo gel de sílica e mecanismo de adsorção de analitos



Em detalhe, as hidroxilas dos grupos silanóis livres.

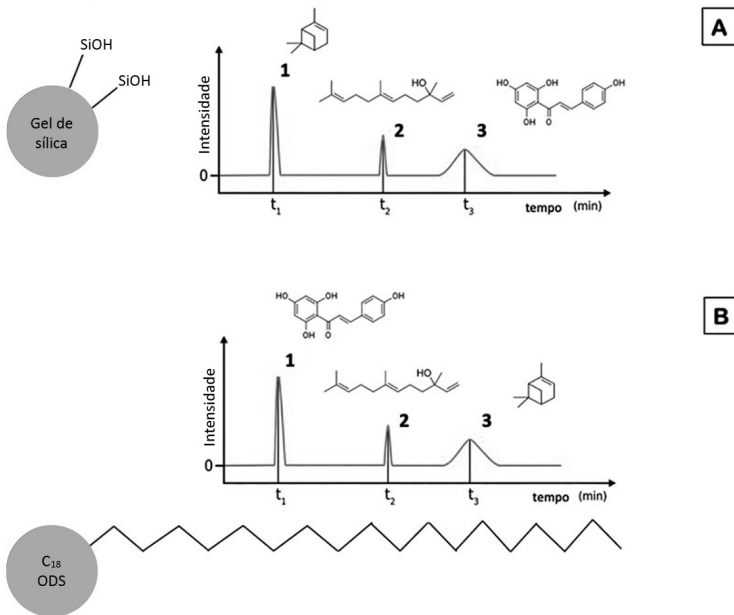
Fonte: adaptado de Chembam, 2023.

O polímero mais amplamente utilizado como FE é o gel de sílica, seguido pelas aluminas. O gel de sílica é mais aplicável para analitos de caráter mais lipofílico – antagônico à natureza da FE. A FM empregada é, geralmente, composta de misturas de solventes de natureza equivalente à do analito, o que permite que a amostra permaneça solúvel durante a operação. Para misturas mais polares, utiliza-se FE com gel de sílica, porém funcionalizado para cromatografia fase reversa. A FE mais utilizada é a composta de grupamentos octadecilsilano (ODS) (conhecido como RP-18 ou  $C_{18}$ ). Nesse tipo de separação, o fenômeno observado é o da partição, o qual ocorre entre a fase FM líquida e longa cadeia ODS líquida associada à sílica. Para esse modo de cromatografia, a mistura de solventes que compõem a FM é hidrofílica.

Para que ocorram separações melhores, ao longo do curso do processo, pode-se aumentar ou diminuir a polaridade da FM nas cromatografias com fase normal e reversa, respectivamente (Schröder, 2017; Skoog *et al.*, 2006). Nesse processo, as interações intermoleculares dos analitos e dos grupos hidroxilas do gel de sílica e a diferença entre as forças de interação entre os analitos e os grupos silanóis levarão a graus diferenciados de retenção dos metabólitos na placa cromatográfica na fase normal, pela diferença de afinidade entre os analitos e a FE. Entre as possibilidades de interações, temos as ligações de hidrogênio, as interações dipolo-dipolo e, em último caso, interações do tipo

Van der Waals, as mais fracas. Na cromatografia de fase reversa, grupos alquila de cadeia longa são ligados à sílica, o que modifica o caráter polar do polímero e leva à formação de um filme líquido apolar. Assim, enquanto na fase normal as substâncias mais polares, capazes de fazer ligações de hidrogênio, são as mais retidas na FE, na fase reversa ocorre o contrário, ou seja, as substâncias mais polares são as primeiras a migrarem na placa ou na coluna devido à baixa interação com a sílica modificada (Figura4).

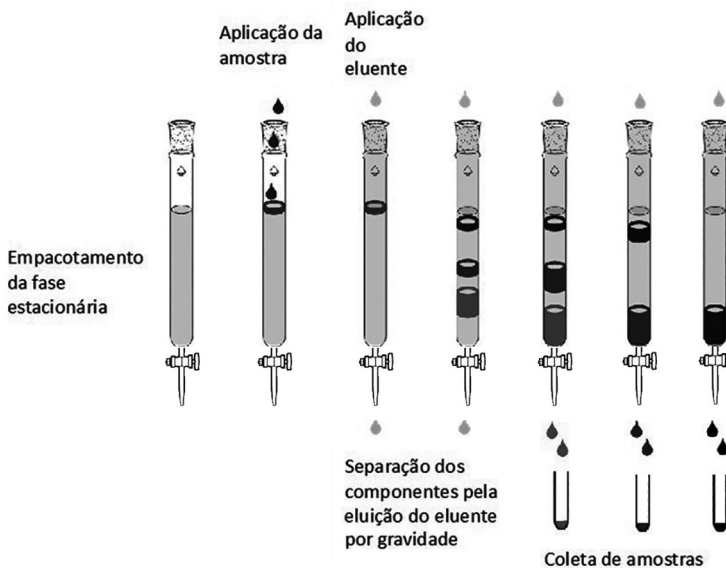
Figura 4 – Exemplo de cromatograma e ordem de eluição de metabólitos em fase normal contendo gel de sílica (A) e em fase reversa contendo sílica modificada com C<sub>18</sub> (B)



Fonte: adaptada de Wikipedia Commons.

Tais processos de separação baseados em ambos os fenômenos podem ser divididos em cromatografia líquida clássica (CLC), realizada em colunas de vidro ou aço, sob pressão atmosférica e fluxo de FM pela gravidade, e cromatografia *flash* (CF), que, além da gravidade, é auxiliada por um fluxo de nitrogênio ou ar (Amorim, 2019), conforme pode ser visto na Figura 5.

Figura 5 – Exemplo de cromatografia em coluna líquida clássica sob pressão atmosférica



Fonte: adaptada de Chembam, 2023.

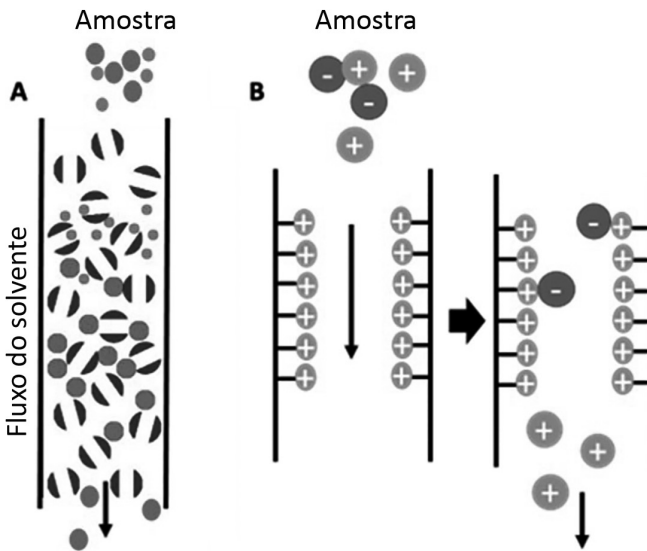
Outro processo bastante utilizado é o da filtração em gel na cromatografia em coluna. Esse fenômeno não é aplicável ao modo planar. Nessa modalidade, a coluna é preenchida com resina que, ao entrar em contato com a FM, expande-se formando poros de dimensões conhecidas que variam em função do tipo de FE. Por ser considerado um procedimento que envolve filtração molecular, o mecanismo envolvido nessa etapa é relacionado diretamente à diferença de peso molecular (tamanho molecular distinto) entre os analitos (Figura 6A). Sua principal utilização é na separação de moléculas grandes e pequenas, geralmente hidrossolúveis. Nessa filtração, as moléculas pequenas ficam retidas, enquanto as maiores são eluídas primeiro, uma vez que não transitam por entre os poros da FE. Com isso, obtém-se um gradiente de substâncias determinadas por tamanho. Entre as fases mais utilizadas nessa operação, podemos citar a resina Sephadex® LH-20, que é muito requerida para a separação de terpenos e peptídeos de baixo peso molecular.

O último tipo de cromatografia é o de troca iônica (CTI), comumente utilizada para separação de moléculas biológicas como peptídeos, aminoácidos ou proteínas, por isso é conhecida como biocromatografia. Ela se



baseia na separação de moléculas ionizáveis e é aplicável apenas a moléculas carregadas. Os trocadores de íons utilizados na análise química são praticamente insolúveis em água e em solventes orgânicos e contêm íons ativos (ou contraíons) capazes de serem trocados reversivelmente com outros íons em solução. Dessa forma, a CTI é baseada na atração de moléculas de cargas opostas. Para tal, é empregada uma resina trocadora de íons que pode estar carregada positiva (trocadores de ânions) ou negativamente (trocadores de cátions). Moléculas carregadas negativamente ligam-se aos trocadores de ânions, enquanto as de carga positiva ligam-se aos trocadores de cátions (Jungbauer & Hahn, 2009). A Figura 6B, a seguir, exemplifica esse processo de separação.

Figura 6 – Exemplo de tipos de mecanismo de separação cromatográfica em coluna



(A) Modelo cromatográfico de filtração molecular; (B) modelo cromatográfico de troca iônica.

Fonte: adaptada de Wikidoc, 2023.

A seguir, serão discutidos os principais modos de cromatografia realizados rotineiramente em laboratórios de pesquisa e desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais.

## Cromatografia planar

Atualmente a cromatografia planar tem como suportes o papel, o alumínio e o vidro. O papel, por ser de aplicação mais restrita, não é tão utilizado quanto as cromatografias com os outros suportes. O alumínio é o mais usado por ser resistente ao calor – empregado em muitas reações de identificação, como será visto mais adiante – e, também, por permitir que as folhas, originalmente comercializadas na medida de 20 x 20 cm, com 0,20 mm de espessura, possam ser cortadas de acordo com a necessidade do usuário. As placas de vidro são mais usadas na modalidade preparativa, quando é aplicada uma quantidade maior de amostra da qual se deseja obter substâncias com maior grau de pureza, após raspagem e extração da FE. Para isso, esse tipo de placa tem espessura de 1 mm de camada de gel de sílica. Em ambos os casos, denomina-se essa modalidade de cromatografia em camada fina ou delgada (Amorim, 2019).

### *A técnica da cromatografia em camada fina*

A técnica da cromatografia em camada fina, também conhecida como cromatografia em camada delgada (CCD), oferece como vantagens baixo custo relativo, facilidade de operação e rapidez na obtenção de informações e como desvantagens, a baixa resolução e, de certo modo, a limitação na qualidade das informações que o cromatograma revela. A técnica é utilizada, fundamentalmente, para monitorar a presença de substâncias (ou, pelo menos, identificar seus grupamentos funcionais) numa amostra e avaliar seu grau de complexidade, com a perspectiva em etapas subsequentes de isolamento de componentes. Para compreender como tais finalidades são alcançadas, cabe uma rápida explicação dos fundamentos de seu uso.

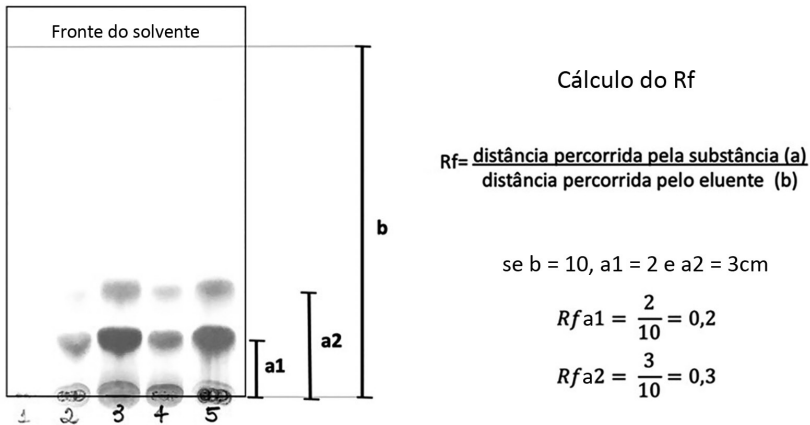
A depender da natureza de um extrato ou de uma fração, principalmente em função de sua solubilidade, grau de complexidade e diversidade química de componentes (polares ou apolares), é selecionado o tipo de FE e o suporte que a sustenta. Essa tomada de decisão se assemelha à da ocasião do desenho de um procedimento para o uso de cromatografia em coluna, como será visto mais adiante.

Quando a amostra é lipofílica, como extratos ou frações obtidos com solventes apolares (*n*-hexano, clorados, acetato de etila etc.), preferencialmente emprega-se a alumina ou o gel de sílica para a fase normal, porque têm caráter polar. O gel de sílica é muito mais utilizado em razão de sua versatilidade, estabilidade e resistência aos agentes reveladores. A natureza da FE deve ser antagonista, em termos de polaridade, à da mistura a ser analisada. A sílica é

formada por unidades –  $\text{SiO}_4$  e tem caráter fracamente ácido, por isso pode ser usada na separação de substâncias como aldeídos, cetonas, fenólicos, ácidos graxos, aminoácidos, alcaloides, terpenoides e esteroides. Nessa FE ocorre o fenômeno da adsorção-dessorção dos analitos (Figura 3). Cada substância terá seu grau de afinidade com a sílica, a depender da força de interação intermolecular formada, e a ligação hidrogênio entre as hidroxilas livres dos grupos silanóis é uma das mais importantes.

Quanto mais polar for a substância a ser analisada, por mais tempo ela ficará adsorvida; inversamente, quanto menos polar ela for, menos retida ficará na FE e mais facilmente será eluída junto com o sistema de solventes (FM). Nesse sentido, ao ser submetida a uma mistura de solventes, sempre de natureza antagônica à da FE, quanto mais polar um analito for, mais afinidade ele terá pela FE e, portanto, migrará pouco na trajetória ascendente da fase móvel, no caso da CCD realizada em cuba cromatográfica clássica. Quanto menos polar for o analito, maior será a migração deste junto com a FM. Essa migração diferencial pode ser medida através da relação entre a capacidade de migração de uma substância em relação à migração da FM e o ponto de aplicação da amostra, sendo conhecido como fator de retenção do analito ( $R_f$ ) ou de retardamento. Esse fator é, portanto, um dos aspectos mais importantes na interpretação de um cromatograma. Ele é um parâmetro adimensional, obtido por meio da divisão da distância de migração da substância a ser analisada pela distância percorrida pela FM ao término da corrida cromatográfica, geralmente medida em centímetros. Considerando que a FM tem migração total e que as substâncias em análise devam migrar em algum grau entre a retenção total e a ausência de retenção (tal qual a FM), obtém-se o valor desse fator ( $R_f$ ) dividindo-se as distâncias. Assim, o valor obtido será sempre compreendido entre 0 (totalmente retido) e 1 (totalmente eluído junto com a FM). O  $R_f$  de uma substância será uma constante, desde que reproduzidas todas as condições de FM e FE e parâmetros da amostra de uma referência, seja da literatura, seja de algum experimento. Esse fator será sempre característico, porém não específico para uma determinada substância, analisada sob determinadas condições experimentais específicas (Amorim, 2019). Na Figura 7, mostra-se um esquema do procedimento da cromatografia em camada fina e como o fator é calculado.

Figura 7 – Esquema do procedimento da cromatografia em camada fina e cálculo do fator de retenção (Rf)



Em uma amostra hidrofílica, mais polar, o gel de sílica é muito pouco eficiente, porque tem grande afinidade pelas substâncias e, assim, as retém. Uma mistura polar em uma FE polar não permitirá que a cromatografia ocorra adequadamente pois as substâncias tenderão a permanecer retidas próximas ao ponto de aplicação. Assim, opta-se pelo uso do gel de sílica funcionalizado para fase reversa e, nesse caso, o fenômeno de adsorção-dessorção é substituído pelo de partição. As longas cadeias hidrofóbicas dos grupamentos ODS (C<sub>18</sub> ou RP-18), que compõem a FE mais utilizada no modo reverso, permitem que substâncias mais polares migrem mais que as menos polares, como mostrado na Figura 4. Outra FE de uso comum, porém de aplicação mais restrita, é a poliamida. A interpretação do cromatograma e o cálculo do valor do Rf das substâncias são os mesmos. Além do ODS, outros grupamentos também podem ser utilizados e serão selecionados em função do tipo de amostra a ser analisada, como diol, ciano, octilsilano, poliamida etc. (Aquino Neto & Nunes, 2003).

#### *Revelação de um cromatograma*

Ao término da corrida cromatográfica, o registro obtido na placa é chamado de cromatograma. Uma vez que a mistura de solventes é incolor e a FE, branca, apenas as substâncias coloridas da amostra poderiam ser visíveis a olho nu, ainda assim, a depender da sua concentração. A técnica, criada pelo botânico Mikhail Tswett no início do século XX, consistia em um

procedimento de separação de pigmentos (*chroma* = cor; *graphos* = escrita). Em seu livro, intitulado *Clorofilas no Mundo Vegetal e Animal*, exigido como parte de seu doutoramento, é assim que ele explica o processo de separação: “uma vez que as diferentes substâncias apresentem diferentes constantes, irão, conseqüentemente, mover-se com diferentes velocidades de deslocamento ao longo do fluxo e, assim, serão separadas como zonas de adsorção independentes”. Essa afirmação se mantém aplicável conceitualmente nos dias de hoje (Collins, 2009). A técnica desenvolveu-se e tornou-se imprescindível em qualquer laboratório de fitoquímica. Sua versatilidade, baseada nas diferentes combinações de fases e formas de detecção, torna-a aplicável a todas as substâncias de origem vegetal, independentemente de sua natureza química.

Para que analitos brancos ou incolores pudessem ser também analisados pela técnica, procedimentos para revelar as substâncias nas placas ou folhas cromatográficas precisaram ser desenvolvidos. Esse processo de revelação permite localizar os componentes da amostra para, além de calcular o Rf, avaliar também a natureza química das substâncias separadas de acordo com os seus grupamentos funcionais e, assim, confirmar a presença de metabólitos ou inferir possíveis classes químicas desses metabólitos na amostra (Waksmundzka-Hajnos, Sherma & Kowalska, 2008).

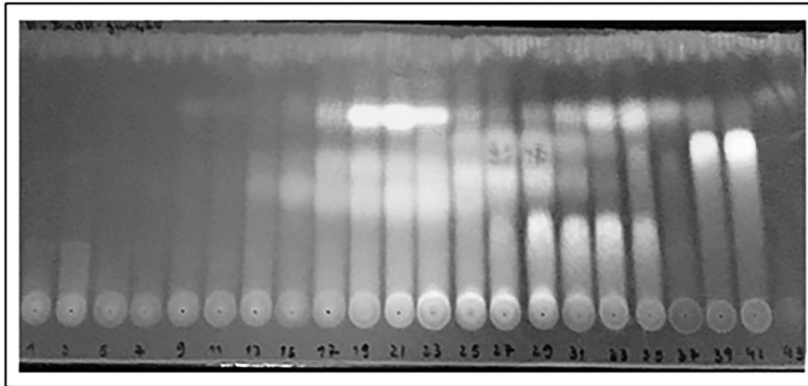
O gel de sílica que recobre as folhas e as placas cromatográficas utilizadas na escala analítica pode ter indicadores na região do ultravioleta (UV), em geral representado pelo código F<sub>254</sub> na caixa de placa. Dessa forma, após o término da corrida, ela é levada a uma câmara escura e iluminada por dois comprimentos de onda (254 e 365 nm). Esses dois comprimentos de onda permitem que manchas ou bandas sejam visualizadas na placa – o que é impossível a olho nu, em comparação à observação da sílica. Desse modo, pode-se localizar as regiões na placa de CCD para poder proceder ao cálculo do Rf. As placas para uso em modo preparativo não devem conter o indicador, pois são próprias para raspar a região com a substância de interesse para posterior extração. Se a FE contiver algum componente além da sílica, a zona raspada com a substância de interesse estaria contaminada (Collins, 2010).

Após esta investigação visual, o analista pode recorrer a reações cromáticas. Existem substâncias que, quando em soluções reveladoras, reagem com os componentes da amostra eluída, gerando produtos coloridos. Algumas delas reagem indiscriminadamente, são, portanto, consideradas reveladores universais, com mediação de ácidos fortes. Nesse caso, a partir da utilização

de reagentes universais, as cores geradas nos locais da placa em que as substâncias ficaram retidas não costumam ser usadas para auxiliar na identificação das funcionalidades. Entre os reveladores mais usados, encontram-se o sulfato cérico, vapores de iodo e amônia. A principal vantagem desses reveladores é permitir a visualização de todas as substâncias aplicadas e eluídas na placa que sejam sensíveis à oxidação. Alguns reagentes podem auxiliar de forma mais sugestiva na caracterização de classes de metabólitos, sendo de grande valia na confirmação ou possível indicação sobre a presença de determinadas substâncias em extratos vegetais. O uso de vanilina, em solução de ácido sulfúrico, em contato com terpenoides, substâncias aromáticas ou fenólicas, evidencia manchas nas cores rosa ou roxo características. Os esteroides, por sua vez, surgem como manchas amarelas; os diterpenos, como zonas róseas; e os triterpenos, roxas. O revelador p-anisalaldeído cora os fenóis, terpenos, açúcares e esteroides em roxo, azul, cinza ou verde, dependendo da substância presente; por sua vez, o ácido fosfomolibdico revela esteroides através de manchas azul-escuras.

Alternativamente, existem também reveladores para determinados grupos funcionais das moléculas. Dentre eles, destacam-se a ninhidrina, que gera coloração púrpura ou amarela para aminoácidos de caráter básico e reativos gerais para detecção e caracterização dos alcaloides, como os de Bouchardat (Wagner), Dragendorff, Bertrand e Hager. As colorações apresentam variações do castanho-alaranjado, a depender da subclasse do alcaloide. As substâncias fenólicas costumam reagir com cloreto férrico, gerando produtos de coloração verde, amarela ou ainda violácea, conforme a estrutura, como flavonoides, taninos etc. Se o analito for glicoconjugado, pode-se utilizar a solução de orcinol em ácido sulfúrico para verificar a presença de O-glicosídeos, o que gera compostos arroxeados. A caracterização preliminar de flavonoides, de maneira geral, pode ser auxiliada pelo uso de um reagente conhecido popularmente como difenilboriloxietilamina e polietilenoglicol (NP-PEG). Esse reagente permite a visualização de fluorescências características de diferentes estruturas fenólicas presentes em derivados de ácidos fenólicos e núcleos flavonoídicos, respectivamente. Enquanto as flavonas são visualizadas como amarelo-esverdeadas após aplicação do reagente NP-PEG, os derivados do tipo flavonóis ficam laranja-amarelados; a presença de manchas azuladas indica substâncias fenólicas simples, como ácido ferrúlico, por exemplo (Figura 8). O hidróxido de potássio, por sua vez, pode ser utilizado para a revelação de amostras com cumarinas porque o contato com a substância e a exposição à radiação UV (366 nm) fazem com que a mancha adquira, pouco a pouco, fluorescência verde (Wagner & Bladt, 1996; Matos, 2009).

Figura 8 – Cromatografia em camada delgada do fracionamento de uma amostra rica em derivados fenólicos contendo flavonas, flavonóis e ácidos fenólicos revelados com o reagente difenilboriloxietilamina-polietilenoglicol



### Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna é um método amplamente utilizado na separação de componentes de uma mistura com base em suas propriedades físico-químicas. Nesse processo, uma coluna é preenchida com um material estacionário, como sílica gel ou resinas, onde a amostra a ser separada é aplicada. Ao adicionar um solvente, conhecido como fase móvel, a interação entre a FM e a FE permite a separação diferenciada dos componentes presentes na mistura. Devido às diferentes afinidades dos componentes da amostra com a fase estacionária, cada substância se move em velocidades distintas ao longo da coluna, resultando na separação das substâncias.

#### *Tipos de colunas e modos de operação*

O outro modo de cromatografia, além do planar, é realizado por meio de colunas cilíndricas preenchidas com FE. Nesse modo estão as cromatografias:

- em coluna de vidro ou aço, empacotada com FE (tal qual na cromatografia em camada fina, como visto anteriormente), cujo modo de eluição da FM pode ser feita por ação gravitacional, por baixa pressão ou por vácuo, sendo considerada como cromatografia em coluna clássica (Figura 5);
- líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) e, mais modernamente, cromatografia líquida

de ultra eficiência (CLUE ou UPLC, do inglês *ultra performance liquid chromatography*), realizada em colunas de aço nos modos analítico, semipreparativo ou preparativo (a depender da quantidade de amostra suportada) e em cromatógrafos específicos;

- com fase gasosa (CG ou GC, de *gas chromatography*), realizada em colunas preenchidas com FE sólidas ou líquidas que são perpassadas por gases, que atuam como FM, em instrumentos específicos; e
- em contracorrente (CCC), preenchidas com sistemas de solventes imiscíveis, nos quais um deles atua como FE, sendo retido na coluna, enquanto o outro solvente é eluído, fazendo com que ocorra a migração diferencial mediante os coeficientes de partição dos analitos entre os dois solventes em aparelho específico (Françóis, Sandra & Sandra, 2009; Bocelli, Borsatto & Santos Neto, 2018).

#### *A operação em coluna*

Na cromatografia em coluna, assim como no modo em camada fina, as substâncias coloridas podem ter sua eluição monitorada visualmente quando colunas de vidro são utilizadas. No entanto, nem sempre será possível observar a presença das substâncias durante o processo cromatográfico, uma vez que muitos metabólitos naturais não apresentam cromóforos com absorções significativas na faixa do espectro visível. Assim, além da presença de um cromóforo, sua concentração é também fundamental para a visualização das substâncias. Na CLUE e na CLAE, o monitoramento é feito por intermédio da tela do computador que opera o controle do aparelho. O detector utilizado manda o sinal da passagem da substância por ele que, por sua vez, aparece como um sinal cromatográfico na tela. Em qualquer dos processos, quanto mais concentrada na amostra a substância estiver, maior será o alargamento do sinal correspondente a ela no cromatograma ou da faixa/banda observada ao longo da coluna (no caso de colunas clássicas), por exemplo. Portanto, pior será a separação e maior será o consumo de solventes necessário para promover a eluição da substância. Isso é mais evidente no caso da cromatografia em colunas abertas, em que as frações serão recolhidas em frascos ou tubos de volumes variáveis e definidos pelo analista, ou na CLAE em escalas preparativa ou semipreparativa. Em geral, o aumento da eficiência de técnicas cromatográficas de alta performance pode ser correlacionado com o aumento do caminho cromatográfico, aumento da superfície de contato e, consequentemente, diminuição do tamanho das partículas dos componentes da FE, o que promove maior interação destes com os analitos e, assim, possibilita a



obtenção de amostras mais puras no fim do processo cromatográfico (Gritti & Guiochon, 2006).

Após a coleta das frações na cromatografia em colunas abertas, as frações obtidas costumam ser submetidas à CCD para avaliação da eficiência da separação após inspeção por luz na região do UV/visível e através das reações de revelação química. As frações recolhidas nas cromatografias instrumentais também podem ser avaliadas dessa forma, pois fornecerão informações complementares às geradas pelo detector.

## A rotina cromatográfica no fracionamento e no isolamento de metabólitos

Posteriormente, ou mesmo em alternativa à partição, a cromatografia é um procedimento realizado em todos os laboratórios de pesquisa, desenvolvimento, produção e controle nos quais se utilizem amostras derivadas de matrizes vegetais.

Um dos procedimentos mais comuns em um laboratório de fitoquímica é submeter um extrato bruto a algum processo cromatográfico para o início dos trabalhos de fracionamento. A cromatografia em camada fina, que costuma ser o primeiro passo, é geralmente utilizada para verificar a complexidade da amostra e as funcionalidades químicas das substâncias, assim como estabelecer condições de composição de FM para o trabalho posterior de cromatografias em coluna para o isolamento das substâncias, quando geralmente é aplicada uma grande quantidade de amostra, em caso do modo preparativo (Nicoletti, 2011).

Após a verificação na camada fina, os extratos, frações, assim como as misturas obtidas nos particionamentos entre solventes imiscíveis, podem ser aplicados diretamente em colunas cromatográficas preparativas. Esse modo de separação pode ser realizado: em coluna aberta, com a eluição ocorrendo por ação gravitacional; aplicando-se vácuo ao fim da coluna (geralmente, utilizando-se um frasco Kitassato acoplado e realizando-se a cromatografia *flash*) e acelerando a eluição; ou aplicando-se pressão no topo da coluna, com o mesmo efeito. Dessa forma, podem ser visualizadas zonas ou faixas – muitas vezes com delineamentos não muito bem definidos – que concentram as substâncias com afinidades similares pela FE. As frações coletadas são comumente analisadas por CCD, com FE de mesma natureza daquela que foi empacotada na coluna. Ao término do processo em coluna, são então obtidas frações que apresentam componentes com um comportamento cromatográfico semelhante, o que permite deduzir que tenham também polaridades e solubilidades

próximas. A similaridade dos perfis de eluição, baseados no  $R_f$  e na revelação, permite a unificação das frações equivalentes, que são, então, submetidas a um novo processo cromatográfico, desta vez em coluna específica a fim de purificar as frações enriquecidas no processo anterior de separação. Por específica, entenda-se aquela empacotada com FE nova (que pode ser da mesma natureza química da coluna original) e, possivelmente, com dimensões menores. Uma coluna mais fina e com comprimento maior tende a permitir uma separação mais eficiente, uma vez que se aumenta a possibilidade de interação entre as substâncias e a FE; nessa etapa também pode ser aplicada menor quantidade de amostra. O processo é repetido tanto quanto for necessário, até que as substâncias sejam obtidas no maior grau de pureza possível, sendo definidas geralmente pela presença de uma única mancha/banda na placa de CCD ou o suficiente para que as suas estruturas sejam caracterizadas por métodos analíticos (Jabin & Nasreen, 2016; López-Bucio *et al.*, 2006).

## Cromatografia instrumental

A cromatografia instrumental refere-se à utilização de equipamentos específicos e altamente sensíveis para realizar a separação de componentes em uma mistura. Ao contrário da cromatografia em papel ou em coluna, a cromatografia instrumental envolve o uso de instrumentos sofisticados, como cromatógrafos a gás ou a líquido de alta eficiência, entre outros.

### *Cromatografia líquida de alta e ultraeficiência (CLAE)*

A CLAE é uma técnica cromatográfica que permite a separação, identificação e quantificação de substâncias presentes em uma amostra, sendo caracterizada por sua alta eficiência e resolução. Na CLAE, a amostra é injetada em uma coluna estacionária, tipicamente recheada com partículas muito pequenas, e uma fase móvel líquida é bombeada através dessa coluna à alta pressão. Por sua vez, a CLUE se caracteriza pelo uso de colunas com partículas estacionárias ainda menores e por operar a pressões significativamente mais altas do que a CLAE convencional, permitindo uma separação mais rápida e, consequentemente, melhorando a resolução e eficiência.

### *Instrumental e colunas*

O equipamento da cromatografia líquida tem como módulos básicos: bomba; misturador; unidade de armazenamento de amostras e injetor; forno para instalação da coluna (quando disponível); detector; e integrador,

com todos os módulos controlados por computador. A Figura 9 mostra um cromatógrafo a líquido de alta eficiência. O equipamento de ultraeficiência é muito parecido.

Figura 9 – Equipamento utilizado em CLAE



A bomba promove a impulsão dos solventes que compõem a FM através da coluna. Em aparelhos mais avançados, podem ser utilizadas até quatro fontes de solventes, que são misturados e eluídos em modo isocrático (mesma proporção ao longo da corrida cromatográfica) ou em gradiente (quando as proporções mudam ao longo da corrida, em tempos e proporções programados pelo analista). A pressão também é definida quando do estabelecimento do método: quanto maior, mais rápida será a corrida cromatográfica. Quando são utilizadas colunas analíticas, método em que a separação não possibilita a coleta do material eluído, as pressões costumam ser menores do que as utilizadas em colunas mais grossas e longas, que suportam maior quantidade de amostra e destinam-se à coleta de frações nos modos preparativo ou semipreparativo.

As colunas, de aço, são recheadas com FEs equivalentes às usadas nos demais tipos de cromatografia. Geralmente, são usados géis de sílica para fase normal ou géis funcionalizados para fase reversa (ODS, octilsilano, diol e ciano são os mais comuns) ou géis de interação hidrofílica, em inglês *hydrophilic-interaction chromatography* (HIC). Esse tipo de cromatografia pode ser utilizado

para a separação de solutos polares, e é bastante similar à cromatografia líquida em fase normal. Todavia, neste caso emprega-se um eluente contendo água, tampão e uma concentração elevada de solvente orgânico miscível com água (típico de fase reversa). Em geral, as colunas têm comprimentos variados, que vão de 5 (para ultraeficiência) até 50 cm (alta eficiência, em escalas preparativa ou semipreparativa). Para CLAE em escala analítica, há uma preferência por se trabalhar com colunas menores (15, 25 ou 50 cm de comprimento são as mais comuns), para se obter uma maior resolução de sinais cromatográficos e reduzir o tempo de corrida das análises e gasto com solventes, aumentando, assim, a produtividade analítica e a qualidade dos resultados. Para a escolha do diâmetro interno da coluna, tem-se preferido trabalhar com tamanhos menores, geralmente de 2 a 5 mm (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017).

#### *A detecção e a hifenização*

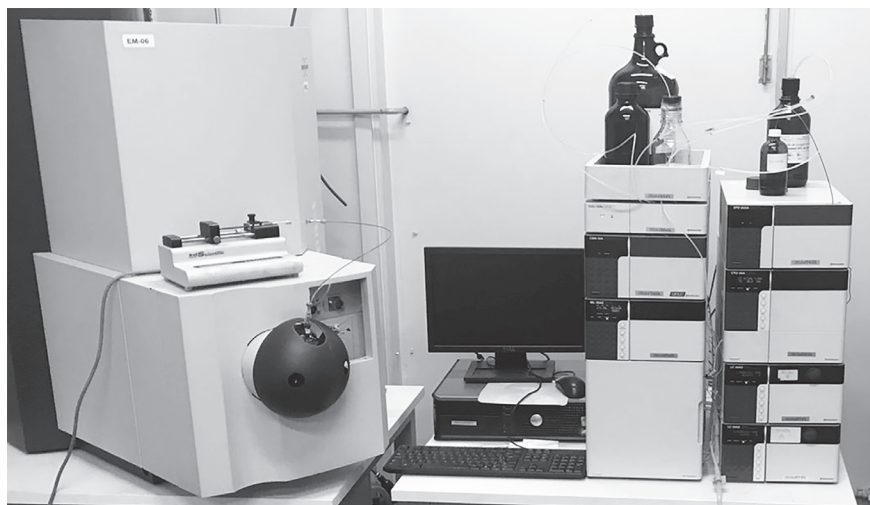
De modo diferente da cromatografia em coluna clássica, na CLAE o material eluído (ou eluato) é monitorado ininterruptamente ao longo do tempo de análise pelo uso dos detectores. O seu funcionamento é de acordo com diferentes princípios, mas todos geram um sinal elétrico que é proporcional a alguma propriedade do analito. O mercado disponibiliza diversos deles, cada qual com sua aplicabilidade referente à propriedade e às características da amostra.

O detector mais amplamente usado é o que opera na região do espectro eletromagnético do UV e do visível. A faixa de trabalho vai de 200 a 800 nm, e, hoje em dia, aqueles detectores com redes de diodos são a grande maioria. Com eles é possível, além de monitorar o eluato em diversos comprimentos de onda ( $\lambda$ ), selecionados em função da região na qual os analitos absorvem luz, obter seus espectros nessas regiões. Tais informações podem ser úteis para a verificação da porção da molécula responsável pela absorção. O resultado desse ensaio permite a obtenção de um espectro de UV que indica os comprimentos de ondas absorvidos e a intensidade da absorção em cada comprimento. A partir da comparação com um banco de dados, é possível correlacionar os comprimentos de ondas absorvidos com as ligações presentes na amostra, e a intensidade da absorção com o número das ligações, uma vez que cada tipo de ligação química absorve um comprimento de onda específico. Assim, moléculas com cromóforos em forma de ligações duplas e/ou triplas conjugadas, anéis aromáticos (conjugados ou não com ligações dessaturadas) e heteroátomos (como oxigênio, enxofre e nitrogênio, por exemplo) podem ser visualizadas e terem parte de sua estrutura devidamente assinalada (Wilson & Brinkman, 2003).

Outros detectores comuns são: de índice de refração (universal, que permite o monitoramento de toda substância presente na amostra); o eletroquímico e o espectrômetro de massa. Este, de forma análoga ao detector na região do UV/visível, permite a obtenção do espectro de massa dos analitos, garantindo informações sobre as estruturas moleculares (Rijke *et al.*, 2006). O acoplamento da cromatografia com espectrômetros é conhecido como hifenização ou hifenação.

Os métodos cromatográficos podem ser utilizados separadamente ou em conjunto, a depender da classe das substâncias de interesse. A CLAE e a cromatografia com fase gasosa (CG) podem ser acopladas a detectores espectrométricos, como os espectrômetros de massa (EM), ou espectroscópicos, como o de ressonância magnética nuclear (RMN). Dessa forma, temos a associação de técnicas modernas de separação, detecção e identificação de metabólitos: cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) (Figura 10), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN), entre outras (Crotti *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006).

Figura 10 – Exemplo de acoplamento de espectrômetro de massa a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência



As técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais têm como principal vantagem, em comparação com as técnicas espectroscópicas sem hífenação, o fato de não necessitarem de grande quantidade (miligramas) do analito na sua forma purificada para obtenção de dados de qualidade com tempo reduzido de análise.

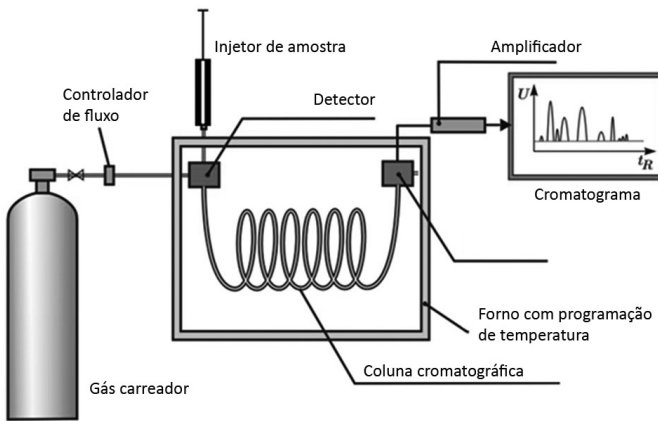
#### *Cromatografia com fase gasosa*

Cromatografia com fase gasosa é uma forma de cromatografia que apresenta diferenças fundamentais e peculiares em comparação às demais (Nascimento *et al.*, 2018). Nessa modalidade, a amostra, mesmo inserida em forma sólida (em injetores tipo *headspace*) ou líquida (a forma mais comum), precisa ser vaporizada antes de ser introduzida na coluna, onde os analitos precisam permanecer volatilizados ao longo de toda a corrida. Eles serão eluídos por uma FM em estado gasoso, normalmente chamada de gás de arraste, e passarão por uma coluna revestida com uma FE líquida. Esse processo pode ser caracterizado como uma partição gás-líquido. A FM é eluída de forma contínua e pode ser controlada conforme a necessidade da análise por divisão de fluxo. Na CG a FM deve ser composta de gases inertes e não reativos, como hélio, argônio ou nitrogênio. A coluna é mantida dentro de um forno controlado, e, assim, o processo cromatográfico pode ser conduzido no modo isocrático ou com gradiente de temperatura. Caso sejam condensados, a separação fica comprometida. A técnica é aplicada, no âmbito dos produtos naturais, principalmente à análise de óleos essenciais e demais substâncias volatilizáveis nas condições operacionais, principalmente moléculas de baixo peso molecular e cujas ligações intermoleculares sejam relativamente fracas. Dessa forma, moléculas que fazem ligações intermoleculares fortes, como as ligações hidrogênio, devem ser analisadas preferencialmente por cromatografia líquida. Para que tais moléculas possam ser analisadas por essa técnica, devem ser previamente submetidas a reações de derivação, que serão vistas mais adiante (Bonato, 2006).

#### *Instrumental e colunas*

O esquema do equipamento é semelhante ao equipamento para a CLAE e CLUE, já visto. As diferenças principais na estrutura são a substituição do recipiente e do misturador de solventes por cilindros e controladores de vazão e mistura de gases (acetileno, hidrogênio, nitrogênio, hélio, argônio e ar sintético são os principais) e o injetor, que precisa aquecer a amostra o suficiente para que as substâncias presentes sejam volatilizadas (Figura 11).

Figura 11 – Esquema de funcionamento de cromatógrafo com fase gasosa



Fonte: adaptado de Wikimedia Commons, 2023.

A coluna, obrigatoriamente, fica acondicionada num forno cuja temperatura de aquecimento é programada em função da natureza da amostra, e o detector tem princípio de operação diferente do dos usados na cromatografia líquida. As colunas para essa cromatografia são bastante diferentes daquelas da cromatografia líquida. Originalmente, eram de aço e, internamente, eram preenchidas com sílica, e o princípio de separação era baseado em adsorção-dessorção. Seus comprimentos eram de até 15-20 m. Gradativamente, com a evolução da técnica, surgiram as colunas capilares, que são mais flexíveis, com paredes revestidas por derivados de silanos como FE e que promovem a separação por partição. Atualmente, essas colunas podem chegar a até 100 m de comprimento. Na Figura 12A, mostra-se um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massa e, no detalhe, a coluna capilar instalada em seu forno.

Figura 12 – (A) Equipamento de cromatografia com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa; (B) coluna capilar instalada no forno do cromatógrafo



Após a separação, os analitos são detectados e apresentados graficamente na forma de sinais cromatográficos, equivalentes aos observados na cromatografia líquida. Os detectores mais usados são os de ionização em chama, de condutividade térmica e de captura de elétrons. Além deles, o espectrômetro de massa é também muito utilizado, pois, além de permitir a aquisição do perfil de separação das espécies da amostra, gera o perfil de fragmentação das moléculas.

### *A derivação*

A limitação da técnica da CG é a volatilidade das substâncias. Para contornar tal problema e fazer com que moléculas pouco voláteis possam ser analisadas na fase de vapor, foram desenvolvidas as reações de derivação. Entre elas, as mais comuns e de ampla aplicabilidade para metabólitos secundários que apresentam hidroxilas são as reações de sililação, acetilação e metilação. Como os próprios nomes indicam, os grupamentos polares -OH, que têm ligações de hidrogênio fortes, são convertidos em seus derivados trimetilsililados ou metilados. Dessa forma, mesmo que o peso molecular aumente, a interação dos grupos torna-se muito mais fraca, o que favorece a volatilização. No caso de ácidos carboxílicos, convertem-se as carboxilas em seus derivados acetilados para que se obtenha o mesmo efeito (Toyo'oka, 1999).

### *Cromatografia em contracorrente (CCC)*

A cromatografia em contracorrente (CCC) é uma técnica versátil de separação de substâncias de produtos naturais. Ela difere de outras formas



de cromatografia, pois não utiliza uma matriz estacionária sólida para separar os componentes de uma mistura. Em vez disso, a CCC aproveita a diferença de afinidade entre duas fases líquidas imiscíveis para separar os constituintes presentes nas misturas. A CCC é particularmente útil na separação de substâncias sensíveis ao calor, pois as condições suaves de separação oferecem a capacidade de isolar componentes sem degradá-los, e, por isso, é considerada uma abordagem flexível e suave para a separação de metabólitos secundários.

### *Fundamentos teóricos*

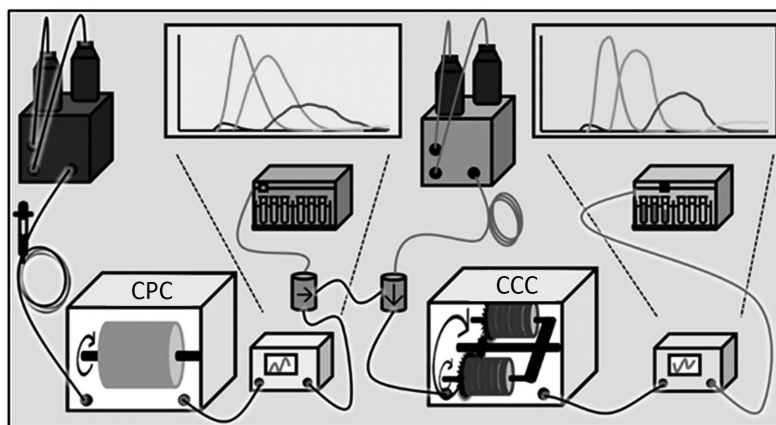
A CCC foi criada no fim da década de 1960 por Yoichiro Ito em seu laboratório no National Institutes of Health em Bethesda, Maryland (EUA) (Ito, 1984). Trata-se de uma técnica na qual tanto FE quanto FM são líquidas, por isso é considerada uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido em que não há a utilização de um adsorvente. O princípio da separação envolve a partição de um soluto entre as duas fases líquidas imiscíveis, em que uma é mantida como estacionária em um sistema tubular giratório, e outra age como FM que é bombeada pelo sistema. A proporção de soluto que passa para cada uma das fases corresponde a uma função do seu coeficiente de partição. Essa técnica tem sido amplamente utilizada na separação de produtos naturais e oferece algumas vantagens de execução por não ter um suporte sólido, o que não leva à adsorção irreversível e degradação de constituintes. Outra grande vantagem é a capacidade de separação de substâncias com ampla variação de polaridade. Essa técnica é muito atrativa para a purificação de produtos naturais devido à possibilidade de recuperação total da amostra ao fim do processo de separação, ao baixo consumo de solventes, ao curto tempo de separação, à pureza das frações, à capacidade de aumento de escala (*scale-up*) e à alta reprodutibilidade (Ito & Bowman, 1970; Marston & Hostettmann, 1994; Berthod, Ruiz-Angel, Carda-Broch, 2009).

O bom resultado dessa técnica está relacionado diretamente à escolha correta do sistema de solventes, que pode ser previamente definida através de CCD, das informações sobre a distribuição das substâncias em partição líquido-líquido ou da consulta de listas de solventes otimizados para as classes específicas de produtos naturais (Ito & Bowman, 1970; Han *et al.*, 2002; Santos, Oliveira, Figueiredo, 2007).

O verdadeiro avanço da técnica de CCC veio laboratório de Ito em 1981, com a invenção da *coil planet centrifuge* (CPC), que ficou conhecida como cromatografia de contracorrente de alta velocidade (HSCCC, sigla em inglês

para *high speed countercurrent chromatography*). As separações no HSCCC ocorrem em uma *bobina multicamada* formada em torno de uma tubulação inerte de Teflon® ou aço inox. A possibilidade de conectar bobinas em série eleva a capacidade de separação de grandes volumes de amostra. O processo de separação e retenção da FE líquida deve-se aos movimentos de rotação e translação das bobinas, que giram de forma planetária, levando a um movimento simultâneo em torno de seu próprio eixo *planetário* e em torno do eixo *solar*. Esse movimento leva à formação de uma força centrífuga que permite a mistura das fases de forma vigorosa e cria zonas de separação e zonas de mistura dentro da coluna (Winterhalter, 2007). Na Figura 13, mostram-se os esquemas dos equipamentos de CPC e CCC.

Figura 13 – Esquema de funcionamento da cromatografia CPC e a CCC acoplada a detectores



Fonte: Hammerschick & Vetter, 2022.

Nos últimos anos, essa técnica tem-se tornado um método alternativo versátil e econômico para separações quirais ao dissolver-se seletores quirais na FE líquida. É considerada mais econômica que a CLAE porque não requer coluna específica quiral e solventes ultrapuros, de alto valor, embora necessite de mais tempo. Todavia, o número de seletores quirais possíveis de serem utilizados ainda é limitado (Wang *et al.*, 2017).

Desde a sua invenção, a HSCCC é utilizada para obtenção de diversos derivados terpênicos, alcaloídicos, lipídeos, polissacarídeos e fenólicos, entre outros, o que evidencia grande performance na separação, especialmente em

aplicações preparativas (Leitão, 2005). Vários grupos de pesquisa exploraram o uso dessa técnica para a separação em grande escala de proantocianidinas, antocianinas e seus derivados de diferentes fontes (Marques & Kaplan, 2013; Marques, Fingolo & Kaplan, 2017; Gong *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

## A Caracterização de Metabólitos

Uma vez que tenham sido obtidas frações de complexidade relativamente baixa ou substâncias isoladas, o passo seguinte é a sua caracterização. A identificação das estruturas é uma etapa fundamental no processo de pesquisa de um insumo que seja entendido como precursor de um produto ativo. Considerando que ele seja o ingrediente principal de um produto, é obrigatório, em nome da segurança e eficácia, que a substância seja compreendida o mais possível, tanto nos aspectos de atividade biológica quanto em sua química (Cherobin *et al.*, 2022).

Parte da caracterização é obtida por meio das etapas cromatográficas que levaram ao seu isolamento e à sua purificação. Os dados a respeito, por exemplo, dos tempos de retenção (em CLAE/CLUE ou CG) ou do  $R_f$  em CCD já servem de informações úteis na sua identificação. Como já mencionado, o tempo e o fator de retenção são característicos de uma substância, sob condições analíticas determinadas. Todavia, o tempo de retenção não deve ser considerado como único parâmetro para identificação inequívoca de substâncias. Algumas substâncias, principalmente as que compartilham similaridades estruturais, podem gerar respostas cromatográficas semelhantes.

Quando as análises são realizadas pelas cromatografias instrumentais, novas informações são obtidas além dos tempos de retenção. Os detectores na região do UV/visível com rede de diodos são ferramentas relevantes em CLAE e CLUE que permitem a aquisição dos espectros de absorção dos analitos. O espectrômetro de massa que pode ser acoplado como detector das cromatografias instrumentais a líquido e a gás gera informações bem mais detalhadas a respeito das estruturas das substâncias. Tanto o íon molecular, que remete à massa molecular da substância, quanto sua fragmentação geram muito mais detalhes sobre a identidade do metabólito. Adicionalmente, como importante fornecedor de informações sobre a vizinhança química dos átomos que compõem a estrutura das substâncias, temos RMN como técnica de análise. Estudos em metabolômica de plantas baseados nestas duas técnicas serão discutidos no próximo capítulo deste livro (Wu *et al.*, 2013).

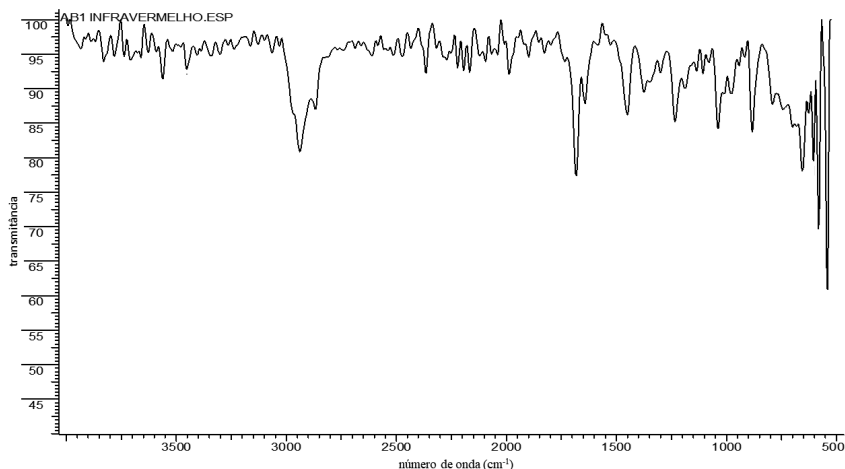
A espectroscopia no IV é uma ferramenta útil na caracterização de reações químicas, pois permite que sejam observados estiramentos de ligações interatômicas e deformações angulares nas moléculas. A região do espectro eletromagnético em que essas vibrações ocorrem auxilia na identificação de grupos funcionais, como aqueles que contêm heteroátomos (O-H e N-H, por exemplo), carbonilas, carboxilas, anéis aromáticos etc. (Ribeiro & Souza, 2007).

Um espectro no UV/visível é um gráfico que relaciona o comprimento de onda de absorção *versus* a intensidade da absorção (em transmitância ou absorbância). Comprimentos de onda nessa região são geralmente expressos em nanômetros ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). A região do UV próximo é especialmente interessante e estende-se de 190 a 350 nm. A atmosfera é transparente nessa região, o que a torna facilmente acessível com o uso de ótica de quartzo. A absorção atmosférica começa a ser importante abaixo de 200 nm, e a região passa a ser acessível apenas sob condições especiais (vácuo). Os métodos espectroscópicos são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético utilizado. As frequências mais comuns são as de raios gama, raios X, UV, visível, IV, micro-ondas e radiofrequência. O IV e demais métodos espectroscópicos modernos, como a RMN, e os já discutidos constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. São, também, de alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias (Skoog *et al.*, 2006).

### Espectrofotometria no infravermelho

A região espectral do IV refere-se à faixa de comprimentos de onda do espectro eletromagnético imediatamente superior à região visível e abaixo da região de micro-ondas. Ela compreende a radiação com número de onda que varia de  $12.800$  a  $10 \text{ cm}^{-1}$ , sendo subdividida em três regiões, denominadas IV-próximo, IV-médio e IV-distante. As ligações interatômicas envolvidas nesses modos de vibração, normalmente, são C-H, N-H, O-H e S-H. Para que ocorra uma absorção da radiação IV é necessário que haja uma variação no momento de dipolo elétrico das moléculas, que é determinado pela magnitude da diferença entre as cargas e a distância dos dois centros de carga. Os espectros obtidos são, geralmente, de transmitância. Na Figura 14 mostra-se um exemplo de espectro na região do IV para o ácido betulínico, isolado de folhas de *Eugenia florida* DC.

Figura 14 – Espectro no IV do ácido betulínico



Fonte: Conceição *et al.*, 2017.

Para a obtenção de um espectro no IV, é necessário que as moléculas sejam submetidas a uma radiação eletromagnética que promoverá um incremento no movimento de suas ligações covalentes, que podem ser do tipo axial (quando há estiramento e compressão na distância entre os átomos) ou angular (quando há alteração no ângulo da ligação). Elas podem ser percebidas no espectro e mostram absorções características de acordo com os grupamentos funcionais da molécula (Solomons, Fryhle & Snyder 2018).

Os espectrofotômetros de IV mais comuns são os de feixe duplo e apresentam cinco seções principais: fonte (de radiação), área de amostra, fotômetro, rede de difração e detector. Podem-se obter espectros na região do IV de gases, líquidos e sólidos pulverizados dispersos em discos prensado de KBr ou em filme vítreo depositado sobre uma placa transparente.

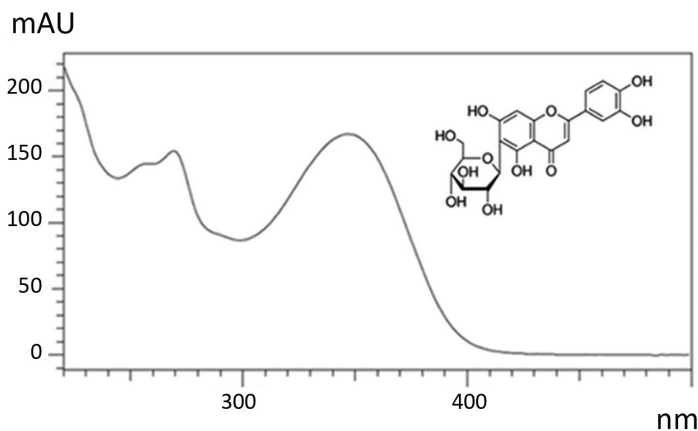
A espectroscopia na região do IV é uma técnica de grande importância na análise orgânica qualitativa, muito utilizada nas áreas de química de produtos naturais e síntese orgânica. O IV e demais métodos espectroscópicos modernos, como a RMN, espectroscopia na região do UV/visível e EM, constituem, hoje, os principais recursos para a identificação, elucidação e quantificação de substâncias orgânicas e determinação da sua pureza, bem como para o controle e acompanhamento de reações e processos de separação. O uso desses métodos reduz o tempo de análise e as quantidades de amostra, além de ampliar a capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas,

não causar a destruição da amostra (exceto EM) e poder acoplar com métodos modernos de separação, como a CG e a CLAE. A espectroscopia na região do IV é amplamente utilizada em linhas de produção, no controle de processos industriais (Souza & Poppi, 2012).

### Espectrofotometria no ultravioleta/visível

A espectrofotometria na região do UV/visível, acoplada ou não com outras técnicas, é um dos métodos mais usados para a quantificação de diversos tipos de substâncias. A metodologia tem como fundamento a interação de radiação na zona do visível e/ou UV com uma solução e a determinação da absorção e transmissão dessa radiação que ocorre através da amostra analisada, a depender das características dos cromóforos presentes em sua estrutura. A espectrofotometria no UV/visível permite determinar a absorção da luz numa amostra no intervalo de comprimentos de onda entre 200 e 800 nm. A região UV é considerada entre 200 a 400 nm e a região do visível entre 400 e 800 nm. Na Figura 15, a seguir, mostra-se um espectro no UV típico de uma flavona.

Figura 15 – Espectro no UV da iso-orientina



A concentração de uma determinada substância em solução corresponde à radiação absorvida ou transmitida, e é interpretada por meio de um espectro que fornece a intensidade da radiação por comprimento de onda da fonte de luz. Os detectores do tipo dispositivo de carga acoplada (*charge-coupled device*)

ou detectores de arranjos de diodos (DAD) (em inglês *photodiode array*) são empregados para substituir os convencionais, porque oferecem uma combinação de maior sensibilidade, alta velocidade de aquisição de espectros, baixo ruído, baixo custo e robustez, vantagens que fizeram com que essa técnica se tornasse uma das mais utilizadas nas análises em pesquisas e rotinas. A espectrofotometria no UV/visível é um método de baixo custo, rápido, de fácil operação, versátil e de fácil aquisição. Tem como principais desvantagens a difícil determinação de analitos em baixas concentrações e a necessidade de calibrações frequentes para manter a exatidão e precisão, além de não garantir maiores informações sobre estruturas químicas além dos grupamentos responsáveis pela absorção de energia na região – os cromóforos (Skoog *et al.*, 2006).

## Considerações Finais

Os derivados de plantas medicinais são insumos medicamentosos extremamente complexos, e sua composição química depende de fatores bióticos e abióticos. Em nome da segurança e eficácia no consumo, o conhecimento de seus constituintes deve ser o mais profundo possível. Para que se compreenda a composição química em metabólitos secundários de um vegetal, existem diversos procedimentos laboratoriais para fazer com que os extratos se tornem cada vez menos complexos, de modo a se obterem, com qualidade, porções com menor número de espécies químicas até que se possa chegar às substâncias puras. Por mais laboriosos que possam ser, em virtude do tempo gasto e do material empregado, esses procedimentos são imprescindíveis no trabalho em química de produtos naturais.

Entre os processos mais utilizados, encontram-se os métodos químicos e físico-químicos, que envolvem solubilizações, partições, precipitações, fracionamentos e reações, e os físicos, que se baseiam em análises instrumentais que envolvem, tipicamente, as técnicas espectroscópicas, espectrométricas e espectrofotométricas. O estabelecimento, a otimização e padronização das etapas que levam do extrato até as substâncias isoladas e caracterizadas são fundamentais para a obtenção de insumos ativos com qualidade.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. *et al.* Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21: 1.205-1.213, 2007.
- AMORIM, M. F. V. *Química: métodos cromatográficos*. Fortaleza: UECE, 2019
- AQUINO NETO, F. R. & NUNES, D. S. E. S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- BERTHOD, A.; RUIZ-ANGEL, M. & CARDA-BROCH, S. Counter-current chromatography: People and applications. *Journal of Chromatography A.*, 1.216: 4.206-4.217, 2009.
- BOCELLI, M. D.; BORSATTO, J. V. B. & SANTOS NETO, A. J. UHPLC capilar: aspectos teóricos e práticos. *Scientia Chromatographica* 10(1): 39-48, 2018.
- BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. (Orgs.). *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, 2006.
- CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements – Review. *Spectrochimica Acta Part B.*, 58: 1.177-1.233, 2003.
- CHEMBAM. Adsorption chromatography. Creative Commons Attribution 4.0 International License. Disponível em: <<https://chembam.com/definitions/adsorption-chromatography>>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- CHEROBIN, F. *et al.* Plantas medicinais e políticas públicas de saúde: novos olhares sobre antigas práticas. *Physis*, 32: 3, 2022.
- COLLINS, C. H. Michael Tswett e o “nascimento” da cromatografia. *Scientia Chromatographica*, 1: 1, 2009.
- COLLINS, C. H. O Desenvolvimento da cromatografia em camada fina. *Scientia Chromatographica*, 2(1): 5-12, 2010.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. (Orgs.). *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, 2006.
- CONCEIÇÃO, F. C. *et al.* Caracterização espectroscópica de ácido betulínico isolado de folhas de *Eugenia florida* DC. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, XVI, 2017, Rio de Janeiro.
- CROTTI, A. E. M. *et al.* P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high molecular weight compounds. In: TAFT, C. A. *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Kerala: Research Signpost, 2006.
- FRANÇOIS, I.; SANDRA, K. & SANDRA, P. Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations – a review. *Analytica Chimica Acta*, 64: 1-2, 14-31, 2009.
- GANORKAR, S. B. & SHIRKHEDKAR, A. A. Design of experiments in liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmaceuticals: analytics, applications, implications and future prospects. *Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3), 2017.



- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-381, 2007.
- GONG, Y. *et al.* The applicability of high-speed counter current chromatography to the separation of natural antioxidants. *Journal of Chromatography A*, 1.623: 461150, 2020.
- GRITTI, F. & GUIOCHON, G. Adsorption mechanisms and effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. Meaning of the classical Van't Hoff plot in chromatography. *Analytical Chemistry*, 78(13): 4.642-4.653, 2006.
- HAMMERSCHICK, T. & VETTER, W. Online hyphenation of centrifugal partition chromatography with countercurrent chromatography (CPC-CCC) and its application to the separation of saturated alkylresorcinols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414: 5.043-5.051, 2022.
- HAN, X. *et al.* Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 971: 237, 2002.
- HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2): 3-54, 1999.
- ITO, Y. Development of high-speed countercurrent chromatography. *Advances in Chromatography*, 24: 181-226, 1984.
- ITO, Y. & BOWMAN, R. L. Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Science*, 16(73.916): 281-283, 1970.
- JABIN, F. & NASREEN, S. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *International Journal of Applied Research* 2(8): 293-295, 2016.
- JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, 2(1): 13-25, 2010.
- JUNGBAUER, A. & HAHN, R. Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymology*, 463: 349-371, 2009.
- LEITÃO, G. G. Uso da Cromatografia Contracorrente na obtenção de padrões de origem Vegetal. *Revista Fitos*, 1(2): 48-52, 2005.
- LÓPEZ-BUCIO, J. Novel signals for plant development. *Plant Biology*, 9: 523-529, 2006.
- MARQUES, A. M. & KAPLAN, M. A. C. Preparative isolation and characterization of monoterpene isomers present in the citral-rich essential oil of *Pectis brevipedunculata*. *The Journal of Essential Oil Research*, 25(3): 210-215, 2013.
- MARQUES, A. M.; FINGOLO, C. E. & KAPLAN, M. A. C. HSCCC separation and enantiomeric distribution of key volatile constituents of *Piper clausenianum* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Food Chemical Toxicology*, 109: 1.111-1.117, 2017.
- MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *Journal of Chromatography A*, 658(2): 315-341, 1994.
- MATOS, F. J. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2009.
- NASCIMENTO, R. F. *et al.* *Cromatografia Gasosa: aspectos teóricos e práticos*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018
- NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of botanicals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5): 818-823, 2011.

- NHIEN, L. C. *et al.* Design and assessment of hybrid purification processes through a systematic solvent screening for the production of Levulinic acid from lignocellulosic biomass. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(18): 5.180-5.189, 2016.
- POOLE, C. F. Chapter 12 Principles and practice of solid-phase extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 37: 341-387, 2002.
- RIBEIRO, C. M. R. & SOUZA, N. A. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. *Química Nova*, 30: 1.026, 2007
- RIJKE, E. *et al.* Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1.112: 31-63, 2006
- RODRIGUES, M. V. N. *et al.* O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. *MultiCiências: Construindo a História dos Produtos Naturais*, 7(5), 2006.
- SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, R. R. & FIGUEIREDO, M. R. Cromatografia contra-corrente no Isolamento de Bisflavonóide de *Garcinia xanthochymus*. *Revista Fitos*, 3(3): 32-36, 2007.
- SAMTIYA, M. *et al.* Potential health benefits of plant food-derived bioactive components: an overview. *Foods*, 10(4): 839, 2021.
- SCHRÖDER, C. H. K. *Análise Instrumental Aplicada à Farmácia*. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2017.
- SILVA, L. H. M. & LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, 29: 1.345-1.351, 2006.
- SKOOG, D. A. *et al.* *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. & SNYDER, S. *A Química Orgânica*. 12. ed. v. 1. Rio de Janeiro: LTC, 2018.
- SOUZA, A. M. & POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova*, 35(1): 223-229, 2012.
- SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P. & LOPES, N. P. (Orgs.). *Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais*. Ouro Preto: Editora Ufop, 2011.
- TOYO'OKA, T. *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*. s.l.: John Wiley & Sons, 1999.
- VALLI, M.; RUSSO, H. M. & BOLZANI, V. S. The Potential Contribution of the Natural Products from Brazilian Biodiversity to Bioeconomy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1): 763-778, 2018.
- VEIGA JR., V. F. & PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28(3): 519-528, 2005.
- WAGNER, H. & BLADT, S. *Plant Drug Analysis: a thin chromatography atlas*. 2. ed. Berlin: Springer, 1996.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. & KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phytochemistry. *Science Series*, 99, 2008.

- WANG, D. *et al.* An efficient method for the preparative isolation and purification of flavonoid glycosides and caffeoylquinic acid derivatives from leaves of *Lonicera japonica* thunb. Using High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC) and prep-HPLC guided by DPPH-HPLC experiments. *Molecules*, 22: 229, 2017.
- WIKIDOC.COM. SizeExchromatografy. Disponível em: <<https://s3.amazonaws.com/static.wd7.us/0/02/SizeExChrom.jpg>>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- WIKIMIDIA COMMONS. Schema-Gaschromatograph dutch. Licença Creative Commons CC0. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schema-Gaschromatograph\\_dutch.png?uselang=pt-br](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schema-Gaschromatograph_dutch.png?uselang=pt-br)>. Acesso em: 10 nov. 2023.
- WINTERHALTER, P. Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. *Trends in Food Science & Technology*, 18(10), 507-513, 2007.
- WILSON, I. D. & BRINKMAN, U. A. T. Hyphenation and hypernation: the practice and prospects of multiple hyphenation. *Journal of Chromatography A*, 1000: 325-356, 2003.
- WU, H. *et al.* Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72: 267-291, 2013.
- YANG, Y. *et al.* Advances in separation and purification of bioactive polysaccharides through highspeed counter-current chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 58: 10, 992-1000, 2020.
- ZOU, S. *et al.* Liquid–Liquid Equilibria of Formic Acid and Furfural in a Biphasic Aqueous – Organic System: optimization of Solvent and Amine Extractant. *Journal of Chemical & Engineering Data* 63:12, 4314-4324, 2018.



# 11

## Métodos e Processos para Estudos em Metabolômica de Plantas Medicinais: aplicações da ressonância magnética nuclear e da espectrometria de massa

*Erika Martins de Carvalho, Leonardo Lucchetti Caetano da Silva e  
July Andrea Hernández Muñoz*

**O**s produtos naturais derivados de plantas medicinais, há muito, são considerados fonte valiosa de compostos para o desenvolvimento de medicamentos. Esses produtos contêm uma infinidade de substâncias, algumas ativas, outras não, mas que, em associação, podem demonstrar efeito terapêutico. No entanto, isolar cada componente de um extrato natural nem sempre é possível devido à complexidade da matriz e à presença da maioria dos metabólitos secundários em concentrações muito baixas. Para que uma planta ou fitoterápico possa ser empregado, é necessária uma avaliação segura e precisa de sua atividade biológica e eventual toxicidade. Essa avaliação exige o conhecimento de sua composição química, ou seja, das moléculas presentes, suas identidades e suas proporções.

As técnicas espectrofotométricas moleculares, notadamente aquelas na região do ultravioleta/visível (UV/vis) e do infravermelho (IV), são ferramentas relativamente simples e rápidas e comumente aplicadas na análise de rotina de produtos de origem vegetal. A radiação UV evidencia a presença de cromóforos, porém tem como limitação a observação do restante da molécula que não absorve nessa região e a não distinção daquelas que apresentam

um mesmo cromóforo. A espectrofotometria na região do IV, por sua vez, fornece espectros que podem funcionar como impressão digital de moléculas conhecidas, o que auxilia, assim, na sua identificação, mas *esbarra* em limitações semelhantes ao UV, pois não permite a elucidação estrutural de uma nova molécula. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta mais poderosa na elucidação estrutural de produtos naturais, porém seu uso na rotina é mais restrito em razão do custo da instrumentação, treinamento e itens de consumo. A espectrometria de massas (EM), mesmo que não seja uma técnica barata e que demande treinamento, é bastante útil na pesquisa e na rotina, em análise de amostras isoladas ou como técnica de detecção acoplada a cromatógrafos a líquido ou a gás.

Neste capítulo não se pretende garantir informações suficientes sobre as técnicas de RMN e EM, apenas demonstrar seus fundamentos, usos e importância na pesquisa e na rotina de trabalho com produtos naturais, focado na aplicação em metabolômica. A busca de informações mais detalhadas na literatura específica é recomendada.

## Métodos Empregados na Identificação e Caracterização dos Produtos Naturais

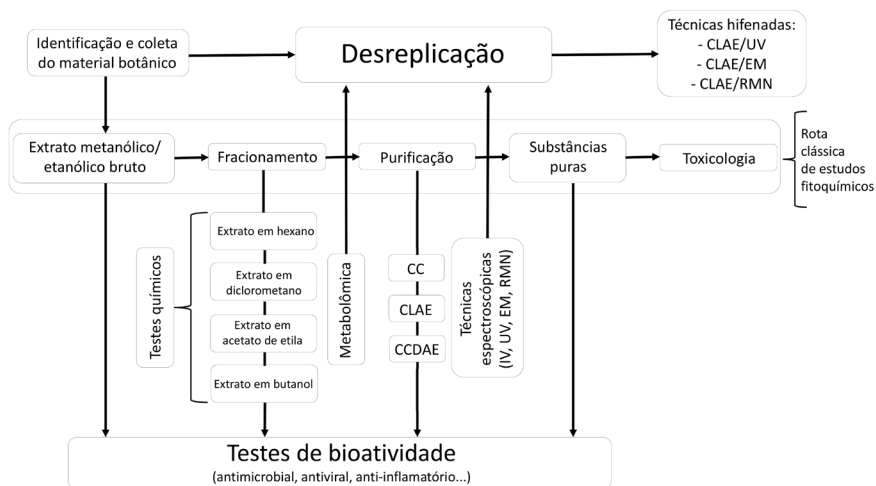
A caracterização fitoquímica é o primeiro passo para a identificação de metabólitos ativos. Apesar de os produtos de origem natural conterem, em suas matrizes, centenas de metabólitos secundários com potencial farmacológico, apenas os majoritários são isolados e estudados pela fitoquímica clássica (Figura 1). Essa triagem química inicial pode ser realizada tanto por testes químicos quanto por técnicas cromatográficas (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

Os testes químicos baseiam-se nas propriedades dos metabólitos vegetais e resultam no aparecimento de coloração, formação de precipitados ou espumas ou separação de fases. Na análise fitoquímica, normalmente se usam técnicas físico-químicas tradicionais, como as cromatografias em camada delgada (CCD), em CCD de alto desempenho, a líquida de alta eficiência (CLAE) e com fase gasosa (CG), para isolamento e/ou purificação dos metabólitos. Nessa etapa, técnicas espectroscópicas como IV, UV, RMN, assim como a espectrometria de massas, são frequentemente empregadas (Funari *et al.*, 2013; Queiroz & Hostettmann, 2013).

A desreplicação (do inglês, *dereplication*) consiste na triagem dos extratos brutos com o objetivo de estabelecer o grau de ineditismo de substâncias presentes, de maneira a evitar-se o isolamento de uma substância que não

seja inédita. O uso de técnicas cromatográficas acopladas a detectores de UV, EM e RMN têm papel fundamental na pesquisa, quantificação, isolamento e determinação estrutural de substâncias inéditas.

Figura 1 – Abordagens utilizadas para isolamento, caracterização e identificação de produtos naturais bioativos



Siglas: cromatografia líquida (CL); ultravioleta (UV); espectrometria de massas (EM); cromatografia em coluna (CC); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE).

## A Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN, assim como todas as formas de espectroscopia, é resultado da interação da radiação eletromagnética (absorção) – neste caso, do seu componente magnético – com a matéria. Essa interação ocorre porque muitos núcleos atômicos comportam-se como ímãs girando ao redor de um eixo (*spin*). Quando os núcleos atômicos são colocados na presença de um campo magnético ( $B_0$ ), o *spin* adota orientações específicas que não têm a mesma energia (Diehl, 2008; Pavia *et al.*, 2015). Quando estão alinhados a favor do campo magnético externo aplicado, têm menor energia (momento magnético de mais baixa energia) e, portanto, o que é favorável à orientação antiparalela (momento magnético de mais alta energia). Se os núcleos são submetidos a um segundo campo magnético de frequência apropriada ( $B_1$ ), ocorre absorção de energia que conduz a um estado de mais alta energia, invertendo

a orientação de *spin* em relação ao campo aplicado  $B_0$ . Quando esse segundo campo ( $B_1$ ) é interrompido, os núcleos excitados retornam ao estado fundamental, e esse fenômeno é denominado relaxação. Enquanto os *spins* relaxam, emitem radiação eletromagnética, denominada decaimento de indução livre (FID, sigla em inglês para *free induction decay*).

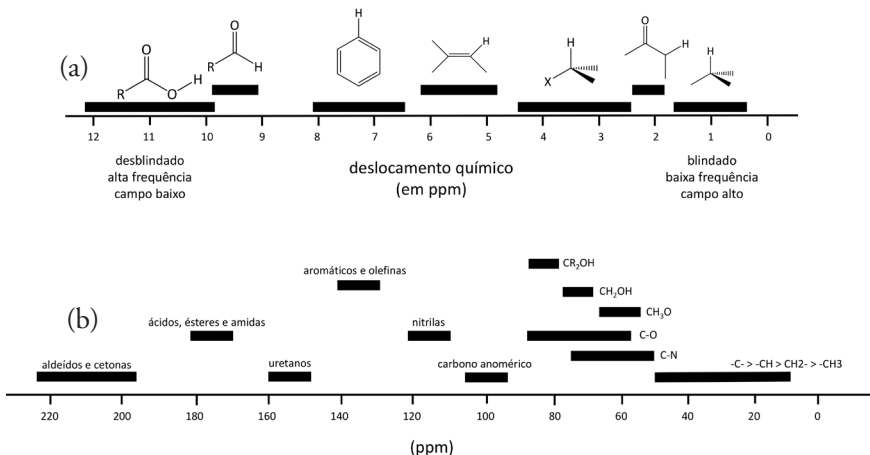
Entretanto, nem todos os núcleos têm a propriedade chamada *spin*, como o isótopo majoritário do carbono ( $^{12}\text{C}_6$ ). Essa propriedade somente está presente quando os núcleos têm massa ímpar ou número atômico ímpar, ou ambos (Quadro 1).

Quadro 1 – Número quântico de *spin* de alguns núcleos comuns

Elemento	$^1\text{H}_1$	$^2\text{H}_1$	$^{12}\text{C}_6$	$^{13}\text{C}_6$	$^{14}\text{N}_7$	$^{19}\text{F}_9$	$^{31}\text{P}_{15}$
N. quântico de <i>spin</i>	1/2	1	0	1/2	1	1/2	1/2
Estados de <i>spin</i>	2	3	0	2	3	2	2

Os núcleos presentes numa molécula não apresentam ressonância na mesma frequência. No caso do hidrogênio, por exemplo, essa variabilidade ocorre porque os núcleos estão rodeados por elétrons que geram ambientes químicos diferentes uns dos outros devido aos efeitos estereoeletrônicos. Esses elétrons em movimento que circulam os núcleos em estudo criam um campo magnético local de direção oposta ao campo externo. Dessa forma, o campo magnético *sentido* (efetivo) pelo núcleo é mais fraco do que o campo aplicado. Esse fenômeno de *proteção* é denominado blindagem diamagnética ou anisotropia magnética. Em consequência, o núcleo precisa em uma frequência mais baixa e, por conseguinte, absorve radiação em uma frequência mais baixa, resultando em frequências de ressonância diferentes (Figura 2) (Pavia *et al.*, 2015).

Figura 2 – Deslocamentos químicos característicos de hidrogênios (a) e carbonos (b)



Essas pequenas diferenças nos campos magnéticos efetivos de cada núcleo podem ser detectados e, assim, gerar um sinal distinto de RMN. Para separar as frequências de cada núcleo, um método matemático denominado análise de transformada de Fourier (FT, sigla em inglês para *Fourier transform*) é aplicado ao FID para obter o espectro no domínio da frequência.

Na prática, geralmente, não é observado um único pico para um determinado núcleo, mas sim o desdobramento em picos múltiplos. Assim, o sinal no espectro de RMN de  $^1H$  fornece dados sobre a quantidade de núcleos representados pela integral de área dos sinais, bem como o número de vizinhos pela multiplicidade dos sinais e a distância em relação ao número de ligações existentes entre os núcleos observados e a relação angular pelas constantes de acoplamento (Pavia *et al.*, 2015).

A espectroscopia de RMN é uma das principais ferramentas para o estudo das substâncias de origem natural devido à robustez e à sensibilidade da técnica, com aplicações na identificação e na elucidação estrutural dos metabólitos, no controle da qualidade, nos estudos quimiotaxonômicos (Fan *et al.*, 2012), na análise da equivalência de plantas geneticamente modificadas (Okazaki & Saito, 2012; Mamadalieva *et al.*, 2016) e na influência dos fatores bióticos e abióticos sobre a produção de metabólitos (Piasecka, Kachlicki & Stobiecki, 2019). Impulsionada pelos avanços tecnológicos de *hardware* e *software*, a RMN proporciona um conjunto diversificado de aplicações associadas à determinação e caracterização dos constituintes majoritários e minoritários de uma matriz, assim como em estudos de suas atividades biológicas.



A RMN de estado líquido é a técnica mais utilizada para elucidar estruturas, configurações e conformações de produtos de origem natural. Oferece vantagens relevantes sobre as demais técnicas espectroscópicas e espectrométricas, tais como: manipulação mínima da amostra, aquisição de dados de forma não destrutiva, teor de pureza (fornece resposta quantitativa) e excelente reprodutibilidade entre diferentes espectrômetros de RMN e usuários (Halabalaki *et al.*, 2014).

### Instrumentação, experimentos e espectros uni e bidimensionais

Desde os primeiros espectrômetros de RMN, equipados com eletroímãs ou ímãs permanentes e operados numa frequência de ressonância inferior a 60 MHz para hidrogênios, a sensibilidade e resolução de espectrômetros de RMN foram grandemente aperfeiçoados. Atualmente, a técnica utiliza ímãs supercondutores que podem operar em ressonância de campo na ordem de GHz (Roth, 2015). Nos últimos vinte anos, vários avanços ocorreram em relação à capacidade inerente dos aparelhos de RMN, como a redução dos tempos dos experimentos e o aumento da sensibilidade, o que resultou em análises mais eficientes para amostras disponíveis em escala de microgramas. No início da década de 1990, as sondas de detecção inversa de 3 mm reduziram o volume de amostra de 600  $\mu\text{L}$  (tubo de 5 mm) para 140  $\mu\text{L}$  e duplicaram a razão sinal/ruído (S/N). Por volta dos anos 2000, as sondas criogênicas de 3 mm aumentaram a razão do S/N em 3,5 vezes, quando comparadas às sondas de temperatura ambiente. A atual geração de sondas de 1 e 1,7 mm (sondas de microvolume) utilizam cerca de 10  $\mu\text{L}$  e as de microbolhas (1,5 a 2,5 mL de volume ativo) e possibilitam a aquisição de espectros em amostras em escala nanomolar.

Além das sondas de líquidos, o desenvolvimento de sondas de RMN para o estado semissólido de alta resolução com rotação em torno do ângulo mágico (HR-MAS, sigla em inglês para *high resolution magic angle spinning*) ocasionou a possibilidade de analisar a composição química de produtos naturais, como, por exemplo, tecidos intactos de folhas e flores. No entanto, embora tenha sido o HR-MAS bem incorporado na análise de alimentos, ainda não foi amplamente introduzido nas análises dos metabólitos primários e secundários de produtos naturais (Halabalaki *et al.*, 2014).

O progresso obtido em *hardware* na RMN não foi proporcional ao desenvolvimento de novos experimentos relacionados à elucidação estrutural dos metabólitos naturais. Mesmo hoje em dia, apesar do grande número de experimentos para determinar as estruturas de metabólitos de baixo peso molecular (i.e., < 1.000 Da), apenas um pequeno subconjunto, que engloba

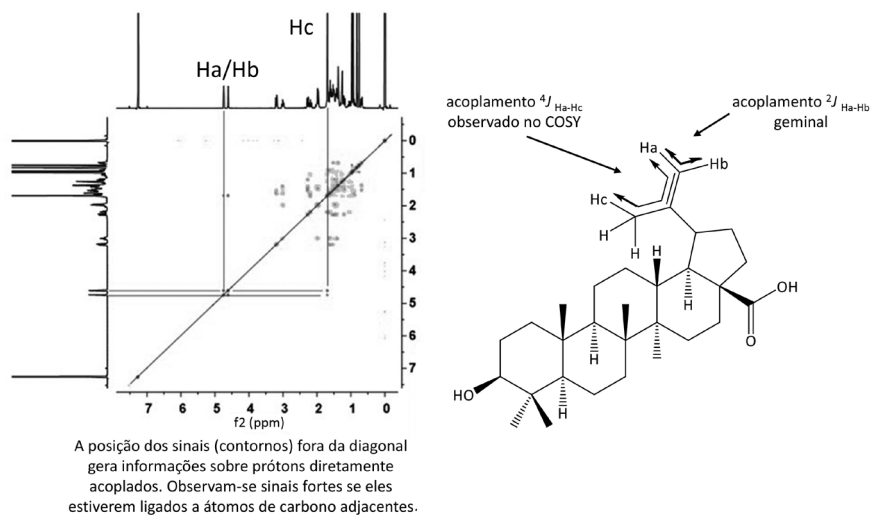
experimentos uni (1D) e bidimensionais (2D) são utilizados nos estudos de elucidação estrutural de moléculas naturais (Quadro 2) (Molinski, 2010; Breton & Reynolds, 2013).

Quadro 2 – Experimentos 2D mais utilizados

Experimento	Características
HSQC ( <i>heteronuclear single quantum correlation</i> )	O espectro do HSQC mostra as correlações heteronucleares que surgem como resultado de acoplamentos $^1J_{C-H}$ entre os núcleos de $^{13}C$ e hidrogênios ligados diretamente. Isso permite detectar todos os CH, CH <sub>2</sub> e grupos CH <sub>3</sub> . ME-HSQC ( <i>multiplicity edited HSQC</i> ) utiliza o espectro de DEPT-135 para diferenciar os grupos CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> e CH no espectro HSQC.
COSY ( <i>correlation spectroscopy</i> )	O espectro COSY mostra correlações homonucleares (acoplamentos de <i>spin</i> ) entre hidrogênios vicinais separados até por três ligações ( $^3J_{HH}$ ). Com este experimento é possível identificar os átomos de carbono vizinhos conectados por uma ligação química.
TOCSY ( <i>total correlation spectroscopy</i> )	O TOCSY permite, em princípio, obter subspectros para seqüências diferentes de hidrogênios acoplados em uma molécula.
HMBC ( <i>heteronuclear multiple-quantum correlation</i> )	O espectro de HMBC revela correlações heteronucleares entre os núcleos $^1H$ e $^{13}C$ (ou $^{15}N$ ) separados por duas ou três ligações químicas ( $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ ), permitindo que os usuários detectem fragmentos em torno de um determinado átomo de C, protonado ou não, ou de heteroátomos como N. Não há uma abordagem que permita determinar quais correlações CH estão separados por duas ou por três ligações. Portanto, as informações obtidas no espectro de HMBC são de difícil interpretação. Dados de acoplamento de $^1H$ , $^{13}C$ no HMBC são ainda mais <i>difíceis</i> quando ocasionalmente são observadas correlações $^4J_{CH}$ .
NOESY ( <i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i> )	O NOESY/ROESY revelam acoplamentos dipolares entre átomos de hidrogênio separados no espaço por uma distância $\leq 5\text{\AA}$ , possibilitando, assim, determinar a estereoquímica de uma estrutura, bem como esclarecer posições de alguns substituintes, caso os dados de HMBC e COSY não tenham sido conclusivos.
ROESY ( <i>rotated frame NOE spectroscopy</i> )	

Os experimentos 2D de correlação homonuclear como próton-próton permanecem como uma das principais ferramentas para a elucidação de uma estrutura orgânica, através dos sinais de correlação que aparecem no espectro bidimensional indicando pares de prótons acoplados. O espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (*correlation spectroscopy*) e TOCSY (*total correlation spectroscopy*) ou HOHAHA (*homonuclear hartmann-hahn*) (Pavia *et al.*, 2015) podem ser utilizados para estabelecer o sequenciamento dos átomos ou os sistemas de acoplamento de *spins* por meio de acoplamentos escalares. No experimento COSY, o espectro 1D (RMN de  $^1\text{H}$ ) é exibido ao longo de cada eixo (F1 e F2) com uma projeção de contorno ao longo do eixo diagonal. Os picos fora da diagonal representam correlações de hidrogênios (ou acoplamentos de hidrogênios) (Figura 3). O experimento TOCSY é semelhante ao experimento COSY e correlaciona todos os hidrogênios dentro de um dado sistema de *spin*, independentemente de estarem diretamente acoplados ou não.

Figura 3 – Informações obtidas por meio de um experimento de COSY



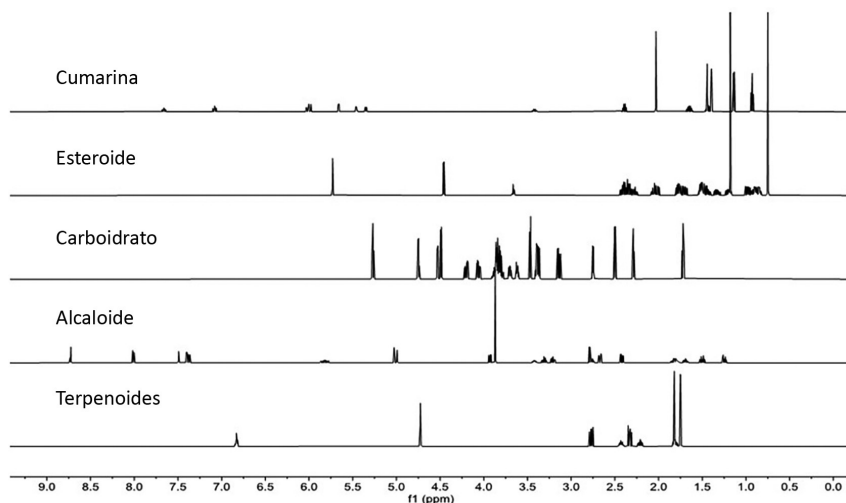
Experimentos 2D de correlação heteronuclear associam, por exemplo, hidrogênios diretamente ligados ou não a carbonos e a heteroátomos. Os experimentos tradicionalmente utilizados para obter esse tipo de informação são, por exemplo, HMQC ou HSQC, que correlacionam átomos que estejam diretamente ligados (Castañar & Parella, 2015; Pavia *et al.*, 2015). Para correlacionar átomos que estejam distantes a duas e/ou três ligações, utiliza-se a

seqüência de pulso HMBC. Esses espectros 2D exibem, em uma dimensão, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (eixo horizontal – dimensão F2) e, na outra dimensão (eixo vertical – dimensão F1), o espectro de RMN de um átomo X ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  etc.). Os picos cruzados no gráfico de contorno definem a qual átomo X está associado um determinado hidrogênio (ou grupo de hidrogênios), segundo a especificidade de cada experimento. Além do sequenciamento dos átomos, essas técnicas 1D e 2D, combinadas, permitem a análise conformacional por meio da medição das constantes de acoplamento escalar  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ( $^3J$ ) e  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  ( $^1J$  até  $^nJ$ ).

### Estratégia de elucidação estrutural de produtos de origem natural por RMN

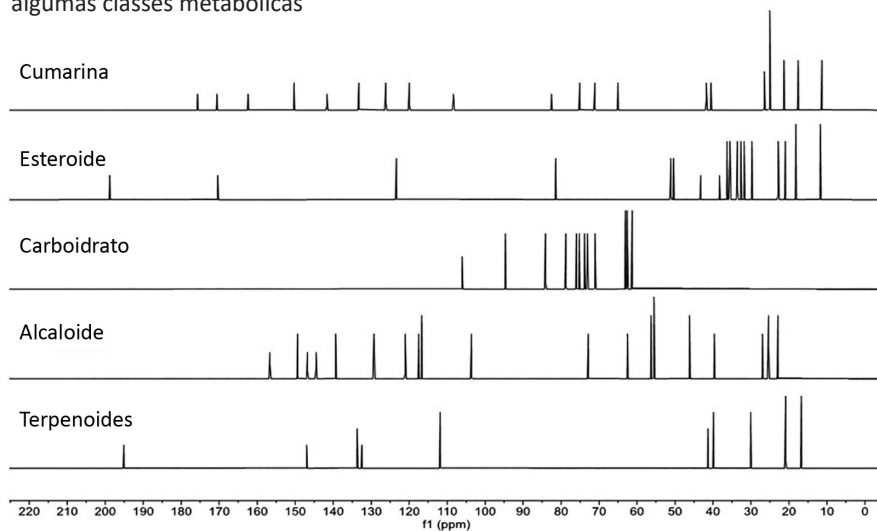
Cada classe de metabólitos tem espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  distintos e bem típicos, de acordo com os respectivos esqueletos básicos que exibem sinais de RMN com frequências características. Nas figuras 4 e 5, mostram-se exemplos de espectros genéricos de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para algumas classes típicas de substâncias naturais.

Figura 4 – Espectros simulados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de exemplos de metabólitos



De cima para baixo: uma cumarina (visnadina), um esteroide (testosterona), um carboidrato (sacarose), um alcaloide (quinina) e um terpenoide (carvona).

Figura 5 – Espectros simulados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de exemplos de algumas classes metabólicas

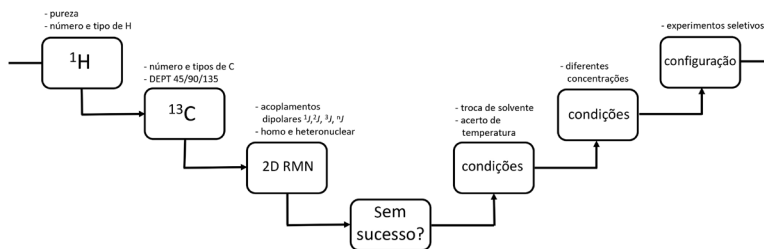


De cima para baixo: uma cumarina (visnadina), um esteroide (testosterona), um carboidrato (sacarose), um alcaloide (quinina) e um terpenoide (carvona).

Para a identificação de substâncias conhecidas existem bancos de dados da web para estruturas orgânicas com seus respectivos espectros, como o NMRShiftDB (Steinbeck, Krause & Kuhn, 2003) e o *Spectral Database for Organic Compounds* (SDBS) (Yamamoto *et al.*, 1988), que podem ser utilizados para comparação com os espectros obtidos dos metabólitos de interesse isolados. A identificação de moléculas conhecidas ou inéditas também pode ser realizada pela simulação de espectros em *softwares* modernos de processamentos de dados de RMN, como o MNovo, que tem algoritmos de previsão de deslocamentos químicos que fornecem espectros com boa precisão (Willcott, 2009). Cálculos assim podem ser úteis quando as informações sobre os metabólitos de interesse não estão nas bases de dados existentes ou são inéditos. No entanto, os usuários devem estar cientes de que tais cálculos são previsões aproximadas, cuja precisão varia de acordo com a complexidade do metabólito.

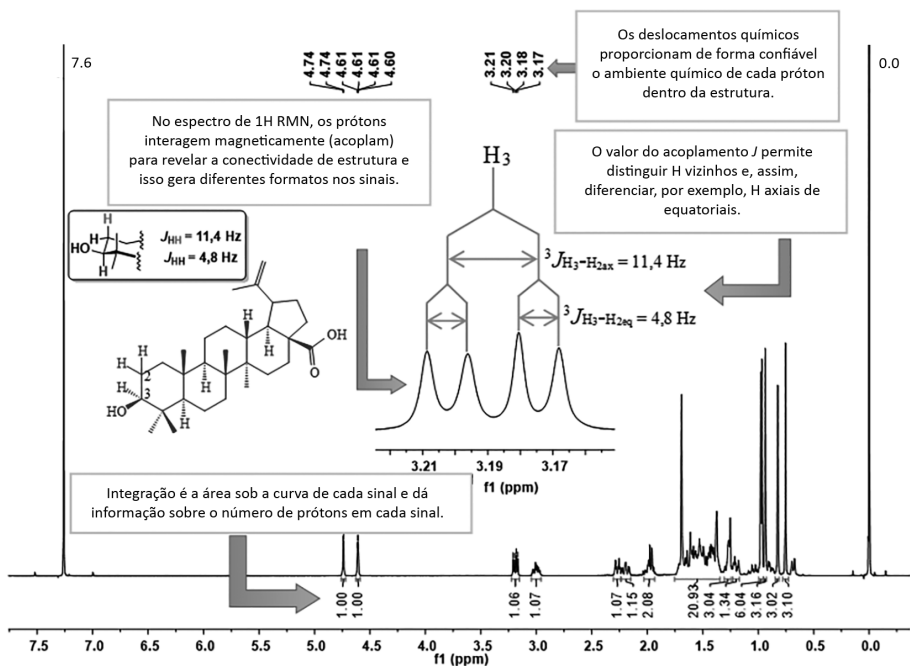
Embora não haja uma rota estratégica definida para determinar uma estrutura, é possível seguir um procedimento padrão (Figura 6). A estratégia para a análise do metabólito isolado requer, inicialmente, a aquisição de espectros unidimensionais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para identificar quantos e que tipo de núcleos estão presentes.

Figura 6 – Fluxo básico de experimentos de RMN para a elucidação da estrutura completa



O primeiro passo é a aquisição de um espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . O sinal no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  fornece informações sobre os tipos (deslocamento químico), quantidade (integral de área) e núcleos vizinhos (multiplicidades), além da distância entre os núcleos observados e a relação angular através das constantes de acoplamento ( $J$ ) medidas em Hertz (Figura 7). As integrais dos sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em conjunto com os sinais de espectros no RMN de  $^{13}\text{C}$  podem ser usadas para a determinação da fórmula molecular.

Figura 7 – Informações estruturais obtidas diretamente da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido betulínico

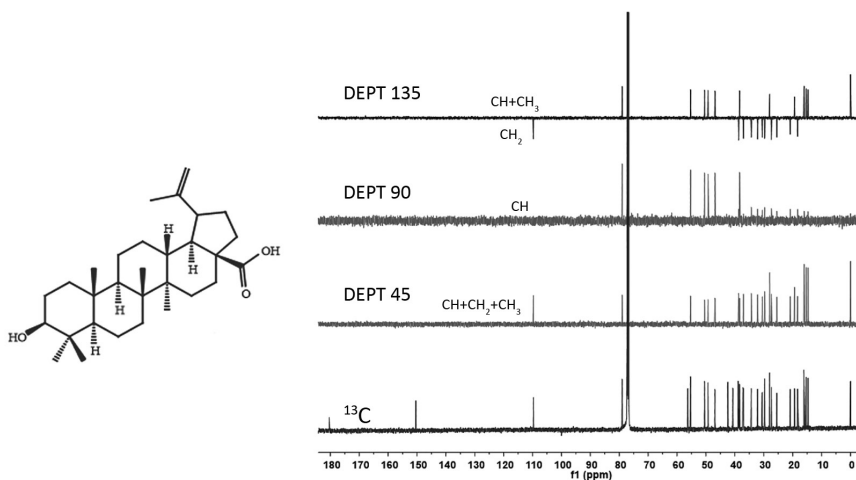


O espectro de  $^{13}\text{C}$  DEPT (*distortionless enhancement by polarization transfer*) é muito empregado para atribuir o tipo de carbonos e diferencia os átomos de carbono metínicos, metilênicos e metílicos em moléculas com porções aromáticas, alifáticas e/ou olefínicas. Nesse contexto, os experimentos de DEPT  $135^\circ$ ,  $90^\circ$  e  $45^\circ$  são muito úteis quando associados ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para obter informações, diferenciar os tipos de núcleos presentes e, então, correlacioná-los com os dados obtidos por outros métodos físicos, como IV e UV.

O próximo passo é a aquisição de espectros 2D de RMN. Para isso, recomenda-se iniciar com um espectro de HSQC, que permite determinar os hidrogênios e carbonos diretamente ligados ( $J_{\text{H},\text{C}}^{1,13}$ ) contribuindo para uma contagem parcial do número e tipos de carbono. O próximo passo é adquirir um espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  que faça as correlações que não excedam a três ligações. Com esse conjunto de espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, é possível começar a montar fragmentos da estrutura em análise que compreendam a sequência de carbonos protonados. Com a fórmula molecular e o HSQC, é possível determinar os sinais relativos a carbonos quaternários no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Então, o espectro de  $^1\text{H}$ -X HMBC (sendo X =  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  etc.) que correlaciona átomos que estejam distantes a duas e/ou três ligações deve ser adquirido, de modo a permitir, em princípio, completar a montagem da estrutura. Se a molécula contém átomos de nitrogênio, o espectro de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC fornece informações cruciais para a elucidação da estrutura em muitos casos. Existem ainda experimentos otimizados para acoplamentos heteronucleares,  $^nJ_{\text{H},\text{C}}^{1,13}$ , à longa distância, com n igual a quatro, cinco, seis ligações (*long range heteronuclear correlations single quantum multiple bond correlation* – LR-HSQMBC) (Williamson *et al.*, 2014 e Williamson, Buevich & Martin, 2014). Há, ainda, correlação de múltiplas ligações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  (H-C-N *multiple-bond correlation* – HCNMBC) por meio de constantes de acoplamento  $^1J_{(\text{C},\text{H})}$  de uma ligação e uma ou múltiplas ligações  $^nJ_{(\text{N},\text{C})}$  (normalmente n = 1–3) (Cheatham; Kline & Kupce, 2015; Cheatham *et al.*, 2014). Espera-se que tais experimentos possam facilitar a elucidação da estrutura de moléculas que contenham nitrogênio, particularmente de compostos heterocíclicos e alcaloides. A depender da configuração espacial, pode-se observar correlações mais longas que as conhecidas como padrão. A presença de nitrogênio nos espectros HMBC e COSY é difícil de detectar e essa questão pode dificultar a análise. Outros experimentos podem ser utilizados para detectar e diferenciar as correlações, bem como acoplamentos com mais de três ligações entre carbono-carbono, essenciais para que estruturas de metabólitos inéditos possam ser assinaladas (Furrer, 2011; Martin, 2011; Martin *et al.*, 2014).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  garante informação sobre o número e o tipo de carbonos presentes na estrutura. O espectro de  $^{13}\text{C}$  DEPT fornece informações sobre a natureza (tipos) dos átomos de carbono e diferencia os átomos de carbono metínicos, metilênicos e metílicos; os sinais dos carbonos quaternários não são observados nesses experimentos. Os espectros DEPT podem ser obtidos com pulsos diferentes, que fornecem informações adicionais: com um pulso de  $45^\circ$  (DEPT-45), todos os sinais de carbono são positivos; um pulso de  $90^\circ$  (DEPT-90) permite a observação de apenas dos carbonos metínicos; e um pulso de  $135^\circ$  (DEPT-135), que faz com que os carbonos metílicos e metínicos apresentem-se como sinais positivos e os carbonos metilênicos como sinais negativos (Figura 8). Os carbonos quaternários não são observados nos espectros DEPT (Pavia *et al.*, 2015).

Figura 8 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos por experimentos de DEPT do ácido betulínico



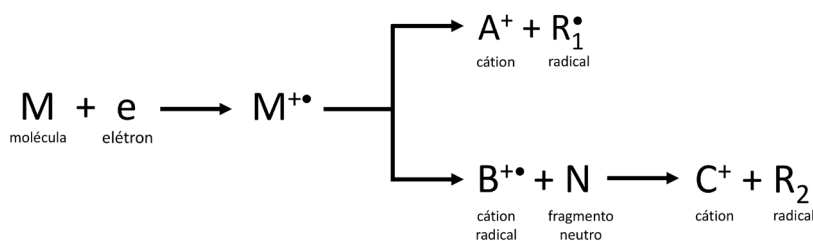
O estabelecimento da estereoquímica relativa e absoluta de centros estereogênicos e da estereoquímica dos isômeros geométricos com base nas constantes de acoplamento não é uma tarefa fácil. A análise configuracional (método de Murata) através da RMN é tipicamente realizada pela medida das constantes de acoplamento escalar através da combinação de experimentos bidimensionais como COSY-45, HSQC e HMBC (Reynolds & Enríquez, 2002).



## Espectrometria de Massa (EM)

A EM é uma técnica analítica que separa partículas ionizadas em fase gasosa, como átomos e moléculas produzidos por um método de ionização, de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ). Para isso, a espécie em análise precisa ser inicialmente ionizada e a extensão dessa ionização, baseada na energia aplicada, pode fazer com que a molécula permaneça íntegra ou seja fragmentada (Figura 9). No primeiro caso, é obtida uma informação que nenhuma das técnicas analíticas já mencionadas é capaz de fornecer: a massa molecular, que é muito preciosa, pois permite, por exemplo, diferenciar substâncias que mostrem espectros na região do UV idênticos. A massa molecular auxilia na identificação, por exemplo, do número de nitrogênios presentes. O número par pressupõe a ausência ou a presença de número par de nitrogênios, ao passo que a massa molecular ímpar pressupõe a existência de número ímpar de nitrogênios. Essa informação é especialmente útil quando se estudam plantas que contenham alcaloides. Quando a ionização é mais enérgica, a molécula é fragmentada e pouca informação é obtida com precisão a respeito de sua massa molecular (Paré & Bélanger, 1997).

Figura 9 – Esquema simplificado de ionização e fragmentação molecular



Os fragmentos observados no espectro de massa auxiliam na montagem de uma estrutura molecular. Diversos fragmentos são característicos de determinados grupos funcionais e eles podem ser vistos diretamente no espectro ou por diferença entre dois sinais. É o caso de hidroxilas, metilas, carbonilas, carboxilas ou anéis aromáticos, entre vários outros (Pavia *et al.*, 2015). Essa informação, em conjunto com as demais obtidas por outras técnicas espectroscópicas, permitirá a identificação da estrutura molecular em análise.

O instrumental de EM é composto dos seguintes módulos: uma fonte de íons, que fragmenta as moléculas da amostra em íons; um analisador de massa, que classifica os íons de acordo com suas massas por meio da aplicação

de campos eletromagnéticos; um detector, que mede o valor de uma quantidade indicadora, fornecendo dados para calcular as abundâncias de cada íon; e *softwares* específicos, que regulam o analisador de massa e gerenciam os dados derivados do detector. Nesses módulos, as técnicas predominantes para a fonte de íons e o analisador de massa têm diversas variações, portanto selecionar sua combinação apropriada é particularmente importante para a EM.

## Componentes do equipamento

Para que os íons sejam promovidos ao estado gasoso, no qual serão analisados, é necessário o emprego de altas temperaturas. As fontes de íons têm o propósito de os levarem ao estado no qual poderão ter identificadas suas massas, que podem ser divididas em dois tipos: de fase gasosa e de dessorção. As fontes de fase gasosa mais comuns são as de impacto de elétrons e a ionização química. A primeira, comumente operada a 70 eV, leva a uma fragmentação extensa das moléculas – se, por um lado, dificulta a observação da massa molecular, por outro permite que a interpretação dos fragmentos leve a conclusões sobre porções da molécula, o que auxilia na determinação da estrutura. A ionização química, por sua vez, é mais branda. No entanto, ambas as fontes não são indicadas para substâncias termicamente instáveis ou que tenham pontos de ebulição acima de 500 °C.

As fontes de dessorção, por sua vez, não exigem a volatilização das moléculas do analito e são aplicáveis a moléculas grandes ( $> 10 \times 10^5$  Daltons, como as macromoléculas). Elas podem ser subdivididas em dessorção por campo, dessorção-ionização assistida por matriz (encontrada na literatura com o acrônimo MALDI), bombardeamento com átomos rápidos (FAB), espectrometria de massa de íons secundários rápidos (SIMS), entre outras (Kuhnert *et al.*, 2015; Cui, Lu & Lee, 2018).

Os analisadores de massa separam os íons com diferentes *m/z*. Quanto maior sua capacidade de distinguir as menores diferenças, mais poderosa será sua capacidade de gerar resultados confiáveis, a capacidade de resolução. Equipamentos de alta resolução permitem, por exemplo, diferenciar isóbaros e moléculas ou fragmentos cuja diferença de massa está nas casas decimais; equipamentos de baixa resolução não diferenciam, por exemplo, N<sub>2</sub> (27,9949) e CO (28,0062) (Kind & Fiehn, 2010). Os analisadores de massa mais comuns são aqueles com setor magnético, os quadrupolos e os de tempo de voo (comumente chamados pelo acrônimo TOF). Além desses, existem os de dupla focalização e os de aprisionadores de íons (*ion clusters*). Os de setor magnético foram os primeiros a

serem produzidos e operados, porém têm sido gradativamente substituídos por outros cuja *performance* é similar, porém de menor custo. Os íons são separados mediante a aplicação de um campo elétrico seguido por um magnético. Existem instrumentos que têm os geradores de campo em ordem inversa. As partículas carregadas são impulsionadas e focalizadas em um feixe pelo uso de lentes eletrostáticas. Os íons, por apresentarem energias cinéticas diferentes devido às suas massas e cargas, viajam a velocidades diferentes e atingem o analisador em momentos diferentes. Comparativamente aos com setor magnético, os quadropolos costumam ser mais robustos e com custo de aquisição e manutenção menor. Por serem de menor porte, são vistos em equipamentos “de bancada” e acoplados a cromatógrafos, devido ao seu tempo de varredura curto (Beck *et al.*, 2015). Os analisadores de tempo de voo, por sua vez, são simples e robustos e permitem analisar faixas de massas praticamente ilimitadas e podem ser úteis em laboratórios multidisciplinares. Contudo, sua sensibilidade e sua resolução são inferiores aos demais analisadores (Senko *et al.*, 2013).

### Espectrometria de massa sequencial

Atualmente, é comum encontrar instrumentos que realizam análises sequenciais, muitas vezes chamadas de EM-EM (ou massa-massa). Por meio dessa técnica, o analista obtém um espectro de massa a partir de um fragmento específico, observado em um espectro de massa anterior. Nesse sentido, a ferramenta permite que sejam identificados picos a partir deste íon, tornando mais fácil a montagem do quebra-cabeças molecular. Um espectro de massa mostra picos, que são plotados sequencialmente a partir de suas relações  $m/z$  e sua altura representa sua intensidade relativa. Um determinado sinal, que representa uma determinada massa, pode ter estruturas e composições químicas diversas. Quanto menor a massa, menores são as chances de variabilidade estrutural; alternativamente, quanto maior a massa, maior será a variação na estrutura desse íon. Assim, ao se obterem fragmentos derivados de algum íon precursor cuja identidade não está clara, maior segurança será garantida na interpretação do espectro (Wolfender *et al.*, 2009; Choudhury *et al.*, 2022).

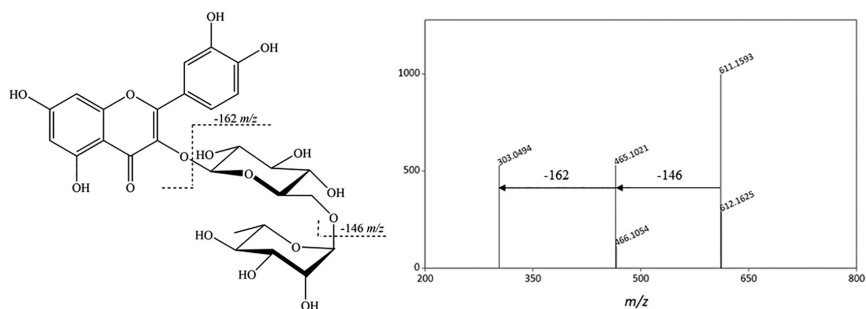
### Íons, picos e o espectro de massa

Resumidamente, um espectro de massa é o registro gráfico dos íons resultantes da fragmentação das espécies químicas introduzidas no espectrômetro, que se apresentam como sinais finos verticais cuja altura é proporcional à sua

estabilidade e abundância relativa. Na Figura 10, mostra-se um exemplo de espectros obtidos da rutina, um flavonoide. Mas como o espectro se relaciona com a aplicabilidade, relevância e as vantagens da técnica?

As moléculas orgânicas, ao serem introduzidas no equipamento, são transformadas em seus íons em fase gasosa. A carga dos íons é resultante da retirada de um ou mais elétrons, que ocorre em virtude da energia empregada na ionização e da estrutura química da molécula. Assim, podem ser gerados íons com uma ou mais cargas positivas. Se a molécula for suficientemente estável e/ou se a forma de ionização não for tão enérgica para ela, pode ser observado o íon molecular – que representa, no espectro, a massa molecular da espécie íntegra. Ele dará origem aos primeiros fragmentos observados no espectro que, por sua vez, gerarão íons com relações  $m/z$  menores. Dessa forma, quanto maior for a molécula ou maior a quantidade de entidades químicas presentes numa amostra, maior será o número de picos observados no espectro e, por conseguinte, mais difíceis serão sua análise e interpretação. Entre os diversos picos em um espectro, podem surgir também aqueles que são originados por rearranjos – algo como uma acomodação física/estrutural e de carga que algumas espécies demonstram. Existem, ainda, os íons metaestáveis, geralmente formados por decomposições de fragmentos carregados entre a fonte de íons e o analisador do instrumento. Outro tipo são os íons secundários, que são formados pelas reações entre íons e moléculas.

Figura 10 – Espectro de massa da rutina e seus principais fragmentos característicos



Fonte: PUBCHEM, 2023.

Os picos que aparecem no espectro são devidos aos fragmentos carregados. Na Figura 10, o pico em  $m/z$  612 corresponde à massa molecular da rutina, acrescida de dois hidrogênios. Os demais picos são provenientes de

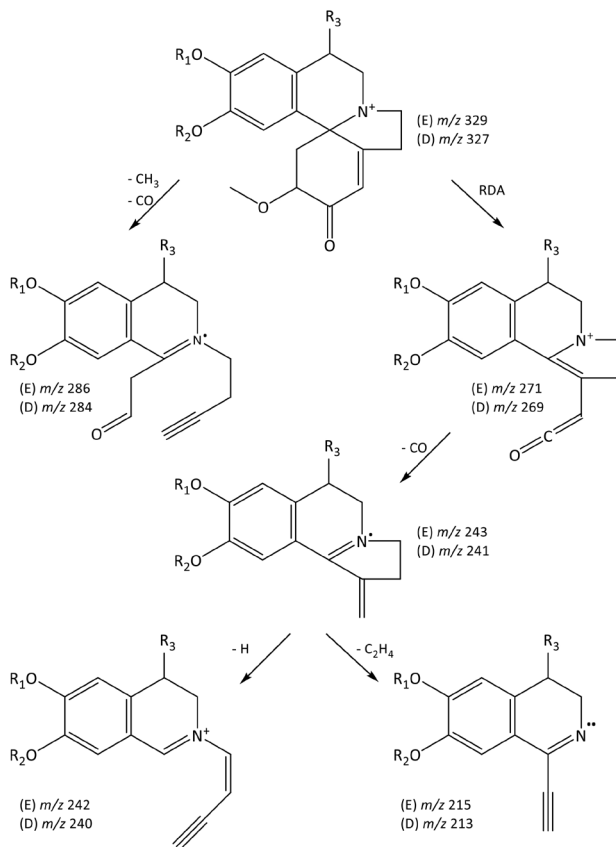
fragmentos produzidos a partir desse, de maior massa. Quanto mais estáveis forem, maiores serão suas sobrevivências durante o experimento e, portanto, aparecerão com maiores intensidades no espectro. Eventuais fragmentos sem carga são invisíveis, e pode-se deduzir sua presença pela diferença entre dois picos, sequenciais ou não. A classificação dos picos segue, didaticamente, a dos íons. Assim, têm-se: o pico molecular, que corresponde à molécula íntegra ionizada e cuja vantagem é indicar a massa molecular do analito; os picos de fragmentos, que auxiliam no estabelecimento da estrutura da molécula em análise; picos normais, que são referentes a todos os íons formados na fonte; picos metaestáveis, que correspondem aos íons formados nas transições metaestáveis; picos de rearranjos, gerados pelos íons que se formaram por troca de posições entre átomos; picos de íons secundários, que representam os fragmentos gerados por reações entre íons e moléculas (o mais importante deles é o pico quase-molecular, representado por  $MH^+$ , resultante da adição de um próton à molécula); picos de isótopos, geralmente satélites a um pico principal que apresenta os átomos com maior abundância (por exemplo,  $^{12}C$ - $^{13}C$  e  $^1H$ - $^2H$ ); pico base, geralmente de baixa intensidade e usado para normalizar as intensidades dos demais picos; picos de íons de cargas múltiplas, que ocorrem quando o fragmento acomoda mais de uma carga positiva; e multipletos, que representam os íons de mesma carga nominal, mas que não são separáveis em instrumentos de baixa resolução (Paré & Bélanger, 1997; Pavia *et al.*, 2015).

### Fragmentações, reações e rearranjos

Como mencionado anteriormente, uma das virtudes da EM, além da possibilidade da identificação da massa molecular, é possibilitar a investigação da estrutura molecular do analito. Para tal, interpretam-se os picos dos fragmentos carregados observados no espectro e os intervalos de massas entre picos, sequenciais ou não, que representam as massas dos fragmentos sem carga (Paré & Bélanger, 1997; Pavia *et al.*, 2015).

A extensão da fragmentação é proporcional à energia empregada na fonte de íons. Comumente, são obtidos espectros de massas por impacto de elétrons a 70 eV, energia que costuma ser suficiente para promover um estilhaçamento extenso, que gera diversos fragmentos a serem interpretados. Na Figura 11, mostra-se a geração dos principais fragmentos obtidos a partir de dois alcaloides de *Erythrina mulungu* Benth., uma espécie da família Fabaceae (Cavallieri, 2019).

Figura 11 – Fragmentação da eritratidinona (D,  $R_1=R_2=Me$  e  $R_3=H$ ) e da 11-hidroxieritratidinona (E,  $R_1=R_2=Me$  e  $R_3=OH$ )



Fonte: Cavallieri, 2019.

A EM insere-se, entre os demais métodos de análise estrutural de moléculas orgânicas de rotina, como a única destrutiva, pois não permite a recuperação da amostra para análises posteriores. No entanto, é capaz de ser acoplada à cromatografia instrumental (com fase gasosa de alta resolução e líquida de alta eficiência, entre outras) como detector, isoladamente ou em linha com outros detectores. Com isso, o analista economiza tempo, e as chances de eventuais degradações das moléculas originais são reduzidas.

Os produtos à base de plantas disponíveis no mercado, apresentam-se como partes de plantas secas (íntegras ou rasuradas), extratos brutos (líquidos ou secos, geralmente padronizados) ou frações semipurificadas. Os insumos

farmacêuticos ativos vegetais (Ifav), obtidos por extrativismo e/ou processos sintéticos ou semissintéticos, tendem a ser mais simples de serem caracterizados.

Outrora considerada uma técnica sofisticada e cara, aplicada nas etapas mais finas da pesquisa, do desenvolvimento e da produção, hoje tem o status de rotineira. Isso se deve, além da redução dos custos de aquisição e manutenção, ao desenvolvimento e ampliação do conhecimento ao longo do tempo, como qualquer técnica, e à sua capacidade de ser miniaturizada, simplificada (porém sem perder seu poder analítico) e conjugada a técnicas de separação de misturas. A popularização fez com que ela passasse a ser de uso rotineiro, desde as etapas prospectivas de um insumo ativo, o que também contribuiu para que aumentasse o número de interessados nos resultados que a técnica é capaz de produzir.

Nos momentos de prospecção inicial e de verificação da composição menos aprofundada de um insumo vegetal bruto, há que se ter em mente que o uso da técnica, isoladamente, provavelmente não será de grande utilidade. A situação torna-se mais favorável quando técnicas de separação cromatográficas são acopladas à EM. Quanto melhor for a separação, menos complexos tendem a ser os espectros, e podem ser obtidas informações mais fiéis a respeito da composição de um extrato. Ainda assim, há que se levar em consideração a natureza das substâncias e o poder de separação que a cromatografia oferece. As rotas biossintéticas dos vegetais, associadas à sua evolução, aos seus cruzamentos e à influência do meio, fazem com que a expressão fenotípica em termos de composição química (em especial, a composição em metabólitos secundários) mostre-se comumente rica em isômeros. Quando se trata de isômeros funcionais ou de posição em relação a substituintes ou grupamentos funcionais, costuma-se obter boa separação cromatográfica e, portanto, espectros de massas de interpretação menos complexa. Alguns exemplos incluem as isomerias entre aldeídos e cetonas e entre álcoois e éteres. Grupamentos metila, metoxila, prenila e resíduos de açúcares, entre outros, costumam ser observados em diversas posições de moléculas naturais. No caso de isômeros geométricos, a separação cromatográfica também facilita ao analista a interpretação dos espectros de massas. Porém, quanto aos isômeros óticos, deve-se considerar os limites das técnicas de separação e a espectrométrica. Nesses casos, técnicas como a RMN costumam ser de grande auxílio na determinação da estereoquímica das moléculas em análise.

Uma vez que já esteja disponível uma quantidade suficiente de estudos sobre a composição e a variabilidade de extratos, a técnica pode ser usada rotineiramente se o intuito for de uma checagem do seu perfil. Uma vez conhecidos os sinais cromatográficos e/ou os picos no espectro de massa que sejam determinantes da qualidade de um extrato, por exemplo, sua identificação e quantificação podem ser acompanhadas com maior precisão. Nesses casos, não é de se esperar que seja realizada uma análise mais aprofundada dos espectros, mas sim uma avaliação comparativa com registros previamente obtidos que refletem a qualidade necessária e desejada para aquele insumo.

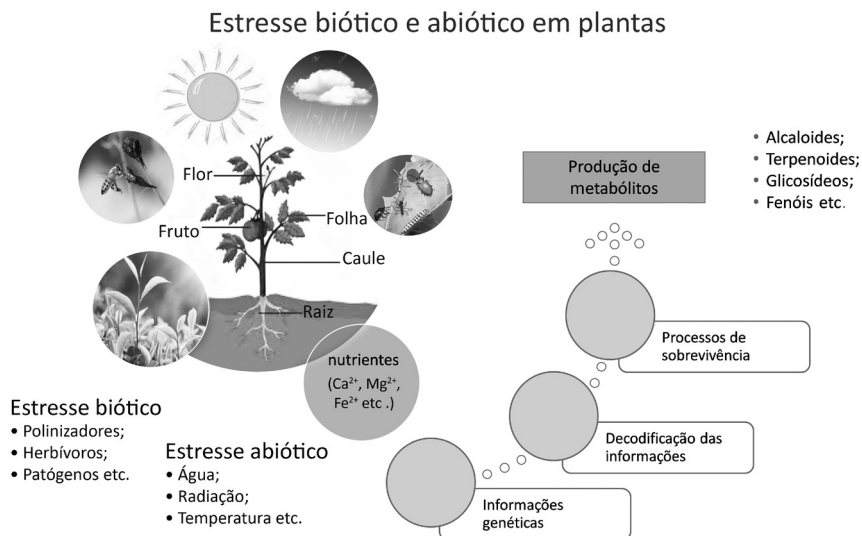
À medida que o insumo vegetal é purificado, em especial durante a fase de pesquisa, os espectros tornam-se mais interpretáveis. A quantidade de picos satélites adjacentes aos picos reais, correspondentes a fragmentos relativos às moléculas originais, vai diminuindo e tornando o espectro mais limpo. Se o processo de ionização for mais brando, como na ionização química, a riqueza de informações sobre a massa molecular dos componentes da amostra aumenta.

## Estratégias de Metabolômica

A metabolômica é o estudo abrangente, qualitativo e quantitativo de todas as pequenas moléculas de um organismo. Por pequenas entendem-se moléculas menores ou iguais a cerca de 1.500 Daltons. Excluem-se, então, polímeros de aminoácidos, como proteínas e polipeptídios, e de açúcares, como os polissacarídeos e os glicosaminoglicanos. Assim, dedica-se aos metabólitos intermediários usados para formar tais macromoléculas e outras pequenas moléculas que têm funções metabólicas e são críticas nas respostas às variações das condições do ambiente com o objetivo de proteger contra estressores ambientais, aumentar as interações competitivas com outros organismos ou agir como um mecanismo de defesa metabólica. Estima-se que o número de metabólitos presentes no Reino Vegetal seja da ordem de, aproximadamente, 30 mil a 200 mil em apenas um organismo (Figura 12). A distribuição de metabólitos secundários em todo o organismo depende de muitos fatores, como espécie, idade, cultivo, genética etc. (Akula & Ravishankar, 2011; Atkinson & Urwin, 2012; Kumar & Verma, 2018).



Figura 12 – Interação da planta com o meio ambiente



Na metabolômica, o entendimento dos organismos advém da comparação de perfis metabólicos entre indivíduos e/ou populações sujeitos às diferentes condições genéticas, ambientais ou patológicas. No entanto, a completa caracterização dessa extensa rede de transformações e interações bioquímicas é ainda muito difícil de ser obtida.

Os avanços tecnológicos dos métodos ou plataformas analíticas e a capacidade de processamento dos dados gerados permitiram ampliar a visão sobre a função dos metabólitos nos seres vivos, bem como a melhoria do rendimento nos cultivos. Inicialmente, havia apenas duas abordagens nos estudos do metaboloma de plantas. A primeira era metabolômica-alvo (do inglês, *targeted*), na qual os metabólitos ou classes metabólicas eram analisados como resposta a um dado estímulo, e a metabolômica não alvo ou global (do inglês, *untargeted*), na qual se analisa toda a amostra e seu conjunto de substâncias de modo indiscriminado. Atualmente, a depender do objetivo do experimento, existem quatro abordagens principais para a análise do metaboloma: a impressão digital metabólica, o perfil metabólico, metabolômica global e a metabonômica (Quadro 3).

Quadro 3 – Principais abordagens utilizadas na análise metabolômica

Análise metabolômica	impressão digital metabólica <i>fingerprint</i>	análise não seletiva
	perfil metabólico <i>metabolomic profiling</i>	análise seletiva
	metabolômica global <i>untargeted metabolomic</i>	análise não seletiva
	metabonômica	análise não seletiva

A impressão digital metabólica é uma abordagem de alto rendimento e normalmente utilizada para uma avaliação rápida, geral e comparativa de tecidos ou análise de discriminação. Por isso, é uma técnica mais simples (preparação, separação e detecção de amostras) em comparação com o perfil metabólico. A impressão digital é uma técnica para classificação de amostras de acordo com sua origem ou sua relevância biológica.

O perfil metabólico é uma abordagem que tem como objetivo os metabólitos previamente selecionados de rotas bioquímicas específicas; porém, isso é feito de forma restrita devido às limitações metodológicas. A extração dos metabólitos de uma amostra depende da solubilidade dos solventes utilizados. Apesar dessa restrição, essa técnica ainda é a que fornece uma visualização mais abrangente do metaboloma .

A metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*), por sua vez, é baseada na análise qualitativa do maior número de metabólitos, pertencentes a diversas classes químicas, presente na espécie analisada. Pode fornecer um panorama das condições ideais do estado fisiológico da planta e ser uma ferramenta para otimização dos cuidados de plantio.

A metabonômica é ainda outro aspecto da metabolômica que se concentra na resposta metabólica de organismos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética (Allwood, Ekkis & Goodacre, 2008). Essa abordagem é geralmente restrita a estudos em microbiologia e outros estudos não botânicos.

### Planejamento experimental para os estudos metabolômicos

No desenho experimental para uma análise metabolômica de plantas, deve-se considerar a população a ser estudada e incluir as etapas de coleta, preparação das amostras, detecção, aquisição, processamento e análise dos dados, levando-se em conta que cada etapa interfere nos resultados e na sua

interpretação. A maioria dos desenhos experimentais dos estudos de metabólica de plantas inicia-se pela determinação do tamanho amostral e do número de variáveis que mais influenciam no processo extrativo e/ou no método de análise a ser empregado. Atualmente, existe uma série de ferramentas capazes de organizar os experimentos, realizar os cálculos e avaliar a relevância estatística de um estudo (Dunn *et al.*, 2011; Sugimoto *et al.*, 2012; Jolliffe & Cadima, 2016).

As principais etapas de um estudo metabólico são o armazenamento e o preparo das amostras (Kim, Choi & Verpoorte, 2010; Powers, 2014), a aquisição e o processamento dos espectros (Broadhurst & Kell, 2006; Craig *et al.*, 2006), a análise de dados estatísticos multivariados (Worley & Powers, 2013) e, finalmente, a pesquisa de metabólitos-chave (quando necessário) em bancos de dados.

#### Obtenção e preparo das amostras

Após a coleta do material, a inibição da atividade enzimática, por meio de solventes orgânicos resfriados (por exemplo, metanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou do congelamento da amostra com nitrogênio líquido ou gelo seco, deve ser imediata para garantir a integridade metabólica. O preparo da amostra para análise envolve, basicamente, três etapas: a secagem, a moagem e a extração.

A secagem é crucial na preparação das amostras, pois a água altera a proporção de solventes para extração preestabelecida e pode afetar seu poder de solvatação. Além disso, a etapa de secagem facilita o armazenamento a longo prazo de amostras por inibir a atividade enzimática e o crescimento microbiano. A presença de água nas amostras pode interferir na etapa analítica, principalmente no caso da RMN, pois traços de água podem distorcer a resolução dos espectros e afetar as colunas nas análises de CG, resultando em perda de reprodutibilidade. Os procedimentos mais comuns para a secagem são aquecimento, usando fornos, micro-ondas ou ar quente, e liofilização. A liofilização é considerada padrão ouro porque pode ser empregada em diferentes tipos de amostras. Na liofilização, as amostras devem ser primeiramente congeladas com nitrogênio líquido e, em seguida, transferidas para um sistema de baixa pressão e baixa temperatura para que a água da amostra seja sublimada. Após esse processo, as amostras devem ser armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e com cuidado para evitar a reidratação. A escolha do método de secagem depende do tipo e da estabilidade dos metabólitos que serão analisados, da velocidade na qual a amostra deve ser seca e do tamanho dos fragmentos da amostra. Há que se considerar a perda dos compostos voláteis (Mushtaq *et al.*, 2014).

O processo de moagem ou trituração é fundamental para garantir uma extração eficaz. O rendimento do processo é inversamente proporcional ao tamanho da partícula: pode-se considerar que quanto menor o tamanho da partícula, menor o tempo necessário para a difusão dos solventes, o que possibilita uma extração mais eficiente. A escolha do método de moagem depende das características físicas do material a ser triturado. Por exemplo, bulbos grandes não podem ser moídos à mão com almofariz e pistilo; portanto, é necessário o uso de moinhos de bolas, criogênicos e homogeneizadores verticais que trituram o material rapidamente e produzem amostras homogêneas até em microescala (Mushtaq *et al.*, 2014). A combinação de moagem e ultrassom tem sido um método amplamente utilizado nos estudos metabolômicos por ser eficaz na extração de diversas classes de metabólitos. A ultrassonicação é um método alternativo a moinhos de bolas e misturadores de alta velocidade, pois usa energia acústica para produzir ondas de baixa e alta pressão em líquidos, levando à formação e colapso de pequenas bolhas devido ao forte cisalhamento hidrodinâmico. Outra técnica usada, especialmente para amostras de tamanho pequeno de partícula, são os ciclos de congelamento-descongelamento. Eles quebram as estruturas celulares permitindo o vazamento dos metabólitos. Entretanto, os ciclos de congelamento-descongelamento de amostras podem afetar os resultados gerais e o perfil metabolômico em estudo. Para obter uma boa homogeneização, as técnicas mencionadas devem ser usadas separadamente ou combinadas (Zu *et al.*, 2012).

Na etapa de extração, o objetivo é obter a maior concentração de metabólitos de forma rápida e simples. Para isso, diferentes tipos de métodos de extração são usados, nos quais se aplicam diferentes combinações de solventes. A escolha do solvente é crucial, pois há uma variedade enorme de metabólitos na matriz vegetal que diferem muito nas propriedades físicas. Não existe um solvente único que seja capaz de dissolver todas as substâncias de uma matriz vegetal. Ao escolher o solvente, devem ser considerados toxicidade, poder de solubilização, seletividade, taxa de dissolução, reatividade química e pH (Mushtaq *et al.*, 2014). Os solventes mais utilizados são o metanol, o ácido perclórico e misturas em diferentes proporções de metanol-clorofórmio, por exemplo. Em razão das diferentes naturezas dos solventes, sempre haverá metabólitos que estarão em nível de saturação no processo extrativo e outros não. O método de extração contínua de material vegetal com mistura de solventes de polaridade crescente (n-hexano, acetona e água, por exemplo) e a coleta de frações em intervalos predeterminados favorecem a obtenção de um número maior de metabólitos.

Existem diversas metodologias para obter perfis representativos do metaboloma vegetal, como maceração, extração por arraste a vapor, em aparelho extrator de Soxhlet, por fluido supercrítico, com líquidos iônicos, extração em fase sólida, e extração assistida por micro-ondas ou ultrassom (Zizovic *et al.*, 2007; Choi & Verpoorte, 2014; Mushtaq *et al.*, 2014). Cada método de extração e solvente utilizados no processo sofrem interferência de solventes e resíduos sólidos que precisam ser removidos apropriadamente de acordo com a plataforma analítica selecionada.

#### Plataformas analíticas empregadas nos estudos de metabolômica

Após o preparo da amostra, inicia-se a etapa de aquisição de dados. A metabolômica necessita de plataformas analíticas sofisticadas para identificação e quantificação dos metabólitos, como EM, RMN e fluorescência induzida por laser (LIF), por exemplo. A EM e a RMN são as mais utilizadas, mas a primeira é a preferida, na maioria dos casos, devido à sua sensibilidade, alta resolução e especificidade estrutural. As técnicas analíticas empregadas no estudo e o processamento dos dados são cruciais na estratégia metabolômica. A maioria dos estudos são realizados por meio de técnicas de separação combinadas com técnicas detecção (técnicas hifenizadas). As mais encontradas na literatura são a CG e a CLAE acopladas a detectores na região do UV ou a EM como, por exemplo, a CLAE-UV, CLAE-EM ou CG-EM (Fichou, Ristivojević & Morlock, 2016; García *et al.*, 2017).

A CG-EM é a plataforma analítica mais utilizada nos estudos de metabolômica de plantas por ser um método reprodutível e relativamente barato. O processo de identificação dos metabólitos está fundamentado na combinação de duas informações: os tempos ou índices de retenção dos analitos e suas informações espectrais, obtidas sob uma energia padronizada de ionização (usualmente 70 eV). Essa ferramenta tem alta sensibilidade, resolução e reprodutibilidade e permite a construção de bibliotecas que funcionam como padrões para identificação estrutural de amostras a partir de sinais cromatográficos. É uma abordagem especialmente adequada para a detecção de substâncias voláteis termoestáveis ou que requeiram processos complexos de preparação da amostra (por exemplo, a derivatização), como os ácidos orgânicos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, esteróis, catecolaminas e outros produtos naturais, fármacos e toxinas. Ela apresenta algumas limitações como, por exemplo, a massa da amostra ( $\approx 650$  Da) e dificuldades para a análise de alguns metabólitos, como fosfatos (bis, di e tri, NADH ou ATP) e aminas biogênicas.

A CLAE é uma técnica analítica com alta robustez, sensibilidade e seletividade, além de ser de fácil operação e poder ser acoplada a diferentes analisadores e detectores. O uso dessa técnica em metabolômica expandiu-se após o acoplamento a fontes de ionização à pressão atmosférica (API), como ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química de pressão atmosférica (APCI). A ESI destaca-se porque permite a formação de diferentes espécies (protonadas, desprotonadas, adutos e íons moleculares). O desenvolvimento de analisadores TOF (tempo de voo) e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR) possibilitou a aquisição de espectros com alta resolução e permitiu a determinação de fórmulas moleculares a partir dos valores de massa/carga dos íons detectados, auxiliando o processo de identificação e quantificação de metabólitos. A CLAE-EM é apropriada para análise de compostos de baixa massa molecular (50-1.500 Da) sem a obrigatoriedade de derivatização e permite a análise de diferentes classes de metabólitos secundários como alcaloides, saponinas, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides, glicosinolatos, poliamidas, terpenos, esteróis e derivados. Essa técnica, no entanto, pode não ser tão útil para a elucidação estrutural, visto que o número de metabólitos secundários disponíveis para comercialização é expressivamente menor do que o número de padrões disponíveis para os metabólitos secundários.

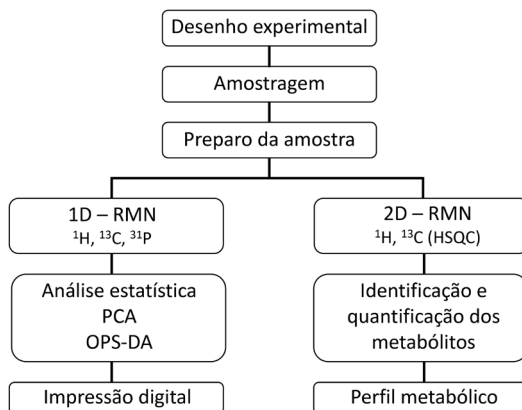
Outras técnicas, como a eletroforese capilar (EC) acoplada à EM, cromatografia em camada delgada de alta eficiência (Audoin *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2018) e a líquida com detector de arranjos de diodos (Leme *et al.*, 2014; Coutinho *et al.*, 2016), dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI-EM) e infusão direta em espectrometria de massa (ID), também são utilizadas na análise de extratos de plantas, com aplicações metabolômicas (Ernst *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2020).

A EC-EM é considerada uma técnica complementar à CG-EM e à CLAE-EM e ideal para a separação de compostos iônicos polares e proteínas. A EC é uma técnica rápida, de relativo baixo custo, que requer mínima quantidade de amostra (faixa de nL) e pouca ou nenhuma preparação. Apresenta alto poder de resolução e separação, o que possibilita a distinção de isômeros e diastereoisômeros. Embora ofereça uma série de vantagens, existem algumas limitações e problemas de repetibilidade e sensibilidade (Dunn *et al.*, 2011; Canuto *et al.*, 2018).

A RMN é empregada tanto para a elucidação estrutural de moléculas previamente isoladas e purificadas quanto para o estudo de frações enriquecidas ou mesmo extratos brutos de alta complexidade e permite a análise de amostras líquidas, sólidas e semissólidas. O método é simples, reproduzível

e tem uma alta capacidade de processamento, já que não requer preparação da amostra e permite a detecção de diferentes metabólitos simultaneamente (Powers, 2014; Markley *et al.*, 2017). Oferece vantagens, como requerer pouca quantidade de amostra e não torná-la inviável após análise e fornecer informações quantitativas, pois a integral de área de um sinal ( $^1\text{H}$ ) é proporcional à concentração molar (Holzgrabe *et al.*, 2005). Na Figura 13, apresenta-se uma abordagem genérica em metabolômica, tendo por base o uso da técnica. A interpretação de dados por RMN pode ser mais simples e direta quando comparada à análise feita pela EM, mas é preciso atenção a alguns problemas na aquisição dos espectros, pois a ressonância é sensível ao pH e, geralmente, são necessárias soluções tamponadas para mantê-lo estável. Uma combinação de metanol e tampão fosfato aquoso (pH 6,0, 1:1 v/v) ou líquidos iônicos, como o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, costuma ser eficaz como uma primeira opção para tentar uma visualização geral da composição da amostra dos metabólitos primários e secundários. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são muito utilizados nos estudos metabolômicos; entretanto, há muita sobreposição de sinais pela complexidade dos metabólitos nos extratos. Muitas vezes é necessário adquirir espectros 2D, como *J*-resolvido, HSQC, HMBC, TOCSY e NOESY, que resolvem o problema da sobreposição de sinais e revelam detalhes da composição da mistura.

Figura 13 – Obtenção de dados da RMN segundo abordagem metabolômica



Legenda: PCA = *primary component analysis*, ou análise de componentes primários; OPLS-DA = *orthogonal partial least squares discriminant analysis*, ou projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes.

## Análise de dados

A análise estatística é usada para extrair as informações mais relevantes obtidas nas plataformas analíticas após o processamento. Como há uma gama grande de dados, eles são avaliados por meio de métodos de análise multivariada e univariada. Nas análises multivariadas, a classificação e a discriminação dos metabólitos nos grupos de amostras são realizadas por meio da avaliação do conjunto da matriz de dados extraídos na etapa de processamento. Há métodos não supervisionados, como a PCA, que fornecem uma visão global do dado, bem como a identificação de padrões ou tendências. O método supervisionado, por sua vez, tem como objetivo identificar, por exemplo, classes metabólicas, e nele utilizam-se diferentes ferramentas, como o PLS-DA (do inglês, *partial least squares discriminant analysis*) e o OPLS-DA (do inglês *orthogonal partial least squares discriminant analysis*). Testes estatísticos, como ANOVA, teste *t* de Student ou teste U de Mann-Whitney são frequentemente utilizados (Kim, Choi & Verpoorte, 2010, 2011; Johnson & Lange, 2015).

## Considerações Finais

O emprego da metabolômica vem crescendo, o que permite a elucidação da estrutura no ambiente de mistura, seja no extrato bruto ou na amostra parcialmente fracionada. Nessa abordagem, RMN e EM destacam-se pela possibilidade de participar de uma variedade de experimentos relacionados à aquisição de espectros de um metabólito em uma mistura.

O advento do acoplamento de técnicas cromatográficas com técnicas espectrométricas ou espectroscópicas trouxe notáveis avanços aos métodos analíticos, que permitiram a solução de problemas analíticos complexos. A hifenização de um método cromatográfico com um método espectroscópico facilita a identificação e a elucidação estrutural de substâncias de uma amostra bruta. Inicialmente, pela maior sensibilidade, a CLAE acoplada à EM foi mais utilizada do que com a RMN. Entretanto, os avanços em *hardware* e *software* e ainda a introdução da extração em fase sólida (EFS), microextração em fase sólida ou injeção em grande volume (IGV) para a técnica CLAE-RMN estão tornando essa técnica hifenizada mais potente.

O potencial da CLAE-RMN na investigação e elucidação estrutural de novos produtos naturais é enorme, visto que é possível usar esquemas de supressão de solventes e combinar com uma série de experimentos 2D de RMN homo e heteronucleares (COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, NOESY etc.). Os dois elementos-chave na pesquisa de produtos naturais são o isolamento e



a purificação de compostos de extratos brutos ou frações obtidas de várias fontes naturais e a identificação inequívoca das substâncias isoladas. Assim, o desenvolvimento de técnicas de hifenização proporcionou o surgimento de novas ferramentas muito poderosas, que forneceram excelente eficiência de separação e a aquisição de dados espectroscópicos complementares para um sinal de interesse de CLAE dentro de uma mistura complexa em menor tempo (Sturm & Seger, 2012).

A metabolômica e suas aplicações alcançaram um papel de destaque na pesquisa de produtos naturais, pois permitiram a investigação dos metabólitos específicos decorrentes do estresse, na qual se avaliam as funções de genes e a relação genótipo-fenótipo em resposta aos fatores bióticos e abióticos.

## REFERÊNCIAS

- AKULA, R. & RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11): 1.720-1.731, 2011.
- ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I. & GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia Plantarum*, 132: 117-135, 2008.
- ATKINSON, N. J. & URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10): 3.523-3.543, 2012.
- AUDOIN, C. *et al.* Development of a work-flow for high-performance thin-layer chromatography data processing for untargeted metabolomics. *JPC - Journal of Planar Chromatography*, 27: 328-332, 2014.
- BECK, S. *et al.* The impact II, a very high-resolution quadrupole time-of-flight instrument (QTOF) for deep shotgun proteomics. *Molecular Cell Proteomics*, 14: 2.014-2.029, 2015.
- BRETON, R. C. & REYNOLDS, W. F. Using NMR to identify and characterize natural products. *Natural Product Reports*, 30: 501-524, 2013.
- BROADHURST, D. I. & KELL, D. B. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics*, 2: 171-196, 2006.
- CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado da arte e aplicações representativas. *Química Nova*, 41(1), 75-91, 2018.
- CASTAÑAR, L. & PARELLA, T. Recent Advances in Small Molecule NMR: improved HSQC and HSQMBC Experiments. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 163-232, 2015.
- CAVALLIERI, K. *Estudo Químico e Avaliação Biológica dos Alcaloides Presentes em Erythrina mulungu (Fabaceae)*, 2019. Dissertação de Mestrado, Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia.

- CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21: 1, 1998.
- CHEATHAM, S.; KLINE, M. & KUPCE, E. Exploiting natural abundance  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  coupling as a method for identification of nitrogen heterocycles: practical use of the HCNMBC sequence. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 53: 363-368, 2015.
- CHEATHAM, S. *et al.* HCNMBC – a pulse sequence for H-(C)-N multiple bond correlations at natural isotopic abundance. *Journal of Magnetic Resonance*, 247: 38-41, 2014.
- CHOUDHURY, F. K. *et al.* GC-MS/MS Profiling of plant metabolites. *Methods in Molecular Biology*, 2.396: 101-115, 2022.
- CHOI, Y. H. & VERPOORTE, R. Metabolomics: what you see is what you extract. *Phytochemical Analysis*, 25(4): 289-290, 2014.
- COUTINHO, I. D. *et al.* Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(21): 4.198-4.206, 2016.
- CRAIG, A. *et al.* Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabolomic data sets. *Analytical Chemistry*, 78: 2.262-2.267, 2006.
- CUI, L.; LU, H. & LEE, Y. H. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrometry Reviews*, 37: 772-792, 2018.
- DIEHL, B. Principles in NMR spectroscopy. In: HOLZGRABE, U.; WAWER, I. & DIEHL, B. (Eds.). *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Berlin: Elsevier Science, 2008.
- DUNN, W. B. *et al.* Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 40(1): 387-426, 2011.
- ERNST, M. *et al.* A metabolomic protocol for plant systematics by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 859: 46-58, 2015.
- FAN, G. *et al.* Quality evaluation and species differentiation of *Rhizoma coptidis* by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 747: 76-83, 2012.
- FICHO, D.; RISTIVOJEVIĆ, P. & MORLOCK, G. E. Proof-of-Principle of rTLC, an Open-Source Software Developed for Image Evaluation and Multivariate Analysis of Planar Chromatograms. *Analytical Chemistry*, 88(24): 12.494-12.501, 2016.
- FUNARI, C. S. *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Química Nova*, 36(10): 1.605-1.609, 2013.
- FURRER, J. Recent developments in HMBC studies. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 74: 293-354, 2011.
- GARCÍA, A. *et al.* Capillary electrophoresis mass spectrometry as a tool for untargeted metabolomics. *Bioanalysis*, 9(1): 99-130, 2017.
- GE, Y. *et al.* Investigation of species and environmental effects on rhubarb roots metabolome using  $^1\text{H}$ -NMR combined with high performance thin layer chromatography. *Metabolomics*, 14: 137, 2018.

- HALABALAKI, M. *et al.* Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 25: 1-7, 2014.
- HOLZGRABE, U. *et al.* Quantitative NMR spectroscopy – applications in drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(5): 806-812, 2005.
- JOHNSON, S. R. & LANGE, B. M. Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3: 22-31, 2015.
- JOLLIFFE, I. T. & CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374: 20150202, 2016.
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H. & VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3): 536-549, 2010.
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H. & VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology*, 29(6): 267-75, 2011.
- KIND, T. & FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, 2: 23-60, 2010.
- KUHNERT, N. *et al.* Differentiation of prototropic ions in regioisomeric caffeoyl quinic acids by electrospray ion mobility mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29: 675-680, 2015.
- KUMAR, A. & VERMA, J. P. Does plant – Microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? *Microbiological Research*, 207: 41-52, 2018.
- LEME, G. M. *et al.* HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes *Analytical Methods*, 6: 7.781-7.788, 2014.
- MAMADALIEVA, N. *et al.* GC-MS and q-NMR based chemotaxonomic evaluation of two *Leonurus* species. *Phytochemical Analysis*, 27: 284-289, 2016.
- MARKLEY, J. L. *et al.* The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43: 34-40, 2017.
- MARTIN, G. E. Using 1,1- and 1, n-ADEQUATE 2D NMR data in structure elucidation protocols, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 74: 215-291, 2011.
- MARTIN, G. E. *et al.* Application of 1, n-ADEQUATE and modified variants to structure elucidation and spectral assignment problems, *Magnetic Resonance*, 3: 215-234, 2014.
- MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the ‘nanomole’ scale. *Natural Product Reports*, 27: 321-329, 2010.
- MUSHTAQ, M. Y. *et al.* Extraction for metabolomics: access to the metabolome. *Phytochemical Analysis*, 25(4): 291-306, 2014.
- OKAZAKI, Y. & SAITO, K. Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 6: 1-15, 2012.
- PARÉ, J. R. J. & BÉLANGER, J. M. R. (Eds.). *Instrumental Methods in Food Analysis*. Amsterdam: Elsevier Science, 1997.
- PAVIA, N. M. *et al.* *Introdução à Espectroscopia*. 5. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- PIASECKA, A.; KACHLICKI, P. & STOBIECKI, M. Analytical methods for detection of plant metabolomes changes in response to biotic and abiotic stresses. *International Journal on Molecular Sciences*, 20(2): 379-401, 2019.

- POWERS, R. The current state of drug discovery and a potential role for NMR metabolomics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(14): 5.860-5.870, 2014.
- PUB C HEM. Mass spectrometry. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805#section=Mass-Spectrometry>>. Acesso em: 23 nov. 2023.
- QUEIROZ, E. F. & HOSTETTMANN, K. A Importância das técnicas acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para procura de princípios ativos. *Revista Fitos Eletrônica*, 2(3): 39-53, 2013.
- REYNOLDS, W. F. & ENRÍQUEZ R. G. Choosing the best pulse sequences, acquisition parameters, post acquisition processing strategies, and probes for natural product structure elucidation by NMR spectroscopy. *Journal of Natural Products*, 65(2): 221-244, 2002.
- ROTH, G. Ultra-high field magnets at Bruker. In: POLENOVA, T. & BUDINGER, T. F. Ultrahigh Field NMR and MRI: science at a crossroads. Bethesda, 2015.
- SENKO, M. W. *et al.* Novel parallelized Quadrupole/Linear ion Trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates. *Analytical Chemistry*, 85: 11.710-11.714, 2013.
- STEINBECK, C.; KRAUSE, S. & KUHN, S. NMRShiftDB constructing a free chemical information system with open-source components. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43(6): 1.733-1.739, 2003.
- STURM, S. & SEGER, C. Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography–mass spectrometry hyphenations: curious option or powerful and complementary routine tool? *Journal of Chromatography A*, 1.259: 50-61, 2012.
- SUGIMOTO, M. *et al.* Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. *Current Bioinformatics*, 7(1): 96-108, 2012.
- WILLCOTT, M. R. MestRe nova. *Journal of the American Chemical Society*, 131: 13.180, 2009.
- WILLIAMSON, R. T.; BUEVICH, A. V. & MARTIN, G. E. Using LR-HSQMBC to observe long-range  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correlations. *Tetrahedron Letters*, 55: 3.365-3.366, 2014.
- WILLIAMSON, R. T. *et al.* LR-HSQMBC: a sensitive NMR technique to probe very long-range heteronuclear coupling pathways. *Journal of Organic Chemistry*, 79(9): 3.887-3.894, 2014.
- WOLFENDER, J. L. *et al.* MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. *Natural Product Communications*, 4(10): 1.417-1.430, 2009
- WORLEY, B. & POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1: 92-107, 2013.
- XU, X. *et al.* Direct infusion-three-dimensional-mass spectrometry enables rapid chemome comparison among herbal medicines. *Analytical Chemistry*, 92(11): 7.646-7.656, 2020.
- ZIZOVIC, I. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root. *Journal of Supercritical Fluids*, 43: 249-258, 2007.
- YAMAMOTO, O. *et al.* An integrated spectral data base system including IR, MS,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ NMR, ESR and Raman Spectra. *Analytical Sciences*, 4: 233-239, 1988.
- ZU, G. *et al.* Ultrasound assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Molecular Science*, 13: 11.027-11.043, 2012.





# 12

## A Química Medicinal e a Síntese Orgânica de Fármacos de Origem Vegetal

*Frederico Silva Castelo Branco e Nubia Boechat*

**A**pós a identificação de uma substância ativa de origem vegetal, grandes quantidades desse composto são necessárias para os testes pré-clínicos em animais e testes clínicos em humanos (Gurib-Fakim, 2006). Assim, novas questões apresentam-se: essa substância é abundante o suficiente na planta para ser extraída em grande quantidade? A coleta do material vegetal é sustentável, ou ela destrói a planta doadora? Em muitos casos as respostas a essas questões não são positivas. Dessa forma, alternativas são estudadas para a obtenção em grande escala desses compostos.

A síntese orgânica é a ciência que trata da obtenção, em laboratório, de substâncias orgânicas, ou seja, daquelas constituídas por cadeias de carbono, um dos elementos básicos da existência da vida. Na síntese orgânica, moléculas simples, abundantes e de baixo custo podem ser gradativamente modificadas, por meio de reações químicas, para que formem intermediários cada vez mais complexos, até o alcance da substância de interesse. Dessa forma, substâncias de origem natural presentes apenas em quantidade-traço nos vegetais podem ser sintetizadas em maior escala nos laboratórios (escala de bancada, até 50 gramas), em plantas-piloto (unidades de pré-produção em escala-piloto, até 2 kg de substância) ou até mesmo nas indústrias farmacêuticas, responsáveis pela síntese, em escala industrial (toneladas), de insumos

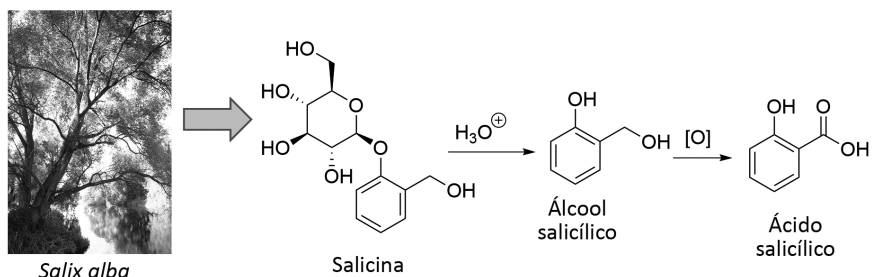
farmacêuticos ativos (IFAs) (Nicolau, 2014). Além disso, na química medicinal, ciência responsável pelo desenvolvimento de novas substâncias com potencial atividade farmacológica, utiliza-se a síntese orgânica como ferramenta, uma vez que esta permite a obtenção dos compostos planejados por meio das mais diversas técnicas de desenho molecular. Assim, os compostos de origem natural podem ser um excelente ponto de partida para o desenvolvimento de novos análogos ainda mais potentes, menos tóxicos e de menor custo de obtenção do que as substâncias em que foram baseados (Bolzani, 2012).

Neste capítulo são apresentados diversos exemplos de alguns dos principais fármacos de origem natural, iniciando-se pelas suas histórias e seus potenciais farmacológicos, bem como a descrição de alternativas sintéticas para suas obtenções. Também é mostrado como a descoberta dessas substâncias foi capaz de estimular o desenvolvimento, através da química medicinal, de novos derivados e análogos desses compostos naturais com otimizações em seu potencial farmacológico e consequentes impactos na saúde da humanidade.

## Ácido Salicílico e seus Derivados

As partes vegetais de espécies de salgueiro (*Salix alba*, *Salix pentandra* e *Salix purpurea*) eram usadas, desde 4.000 anos a.C., pelos assírios, para o tratamento da dor e da febre. A civilização egípcia também se beneficiava das propriedades dessa planta, como reportado em papiros antigos. Esse fato etnofarmacológico levou, em 1928, o químico alemão Johann Andreas Buchner a isolar, dessa mesma planta, o glucosídeo de 2-(hidroximetil)-fenilo, conhecido como salicina, um metabólito vegetal secundário (Figura 1). No ano seguinte, o farmacêutico francês Henri Leroux isolou de forma pura, cristalina e em maior quantidade essa mesma substância. A partir disso, em 1838, o químico italiano Raffaele Piria determinou a estrutura desse composto. Além disso, a partir da salicilina, Piria sintetizou o ácido salicílico, por meio da sua hidrólise ácida, seguida de oxidação (Figura 1) (Jeffreys, 2008).

Figura 1 – Obtenção do ácido salicílico a partir da salicina



A salicina não é a responsável pelas atividades farmacológicas atribuídas ao extrato de salgueiro. Na verdade, ela é metabolizada no trato gastrointestinal, gerando o ácido salicílico, que é o ativo. O ácido salicílico é uma substância anti-inflamatória não esteroideal (AINE) e exerce sua atividade ao inibir duas enzimas relacionadas ao processo inflamatório: as ciclo-oxigenases (COX) tipo I e tipo II. Além disso, devido à sua atividade queratolítica, é usado topicamente para inúmeras afecções dermatológicas, como a acne. Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu-o na Lista de Medicamentos Essenciais (LME), que reúne todos os medicamentos que devem estar disponíveis no sistema básico de saúde de um país (WHO, 2020).

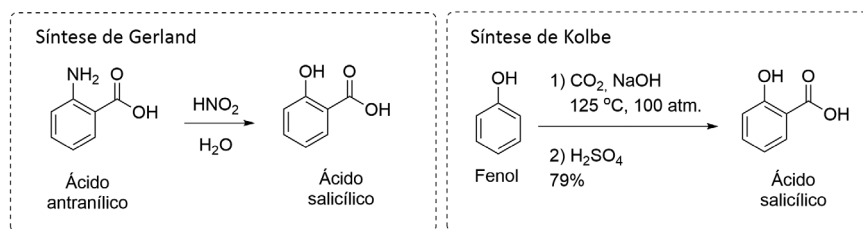
O ácido salicílico também é encontrado na forma livre nas plantas, como na ulmária (*Filipendula ulmaria*, antes conhecida como *Spiraea ulmaria*), que desempenha papel como fito-hormônio, controlando o crescimento, desenvolvimento, fotossíntese, transpiração e transporte/captação de íons (Vlot, Dempsey & Klessig, 2009).

O ácido salicílico sintetizado por Piria pode ser considerado semissintético, pois parte de um produto natural isolado de uma planta. Como as propriedades farmacológicas desse ácido já estavam bem estabelecidas e a sua produção a partir do isolamento proveniente de extratos vegetais era limitada em razão do baixo rendimento e dos altos custos, a obtenção do ácido salicílico por métodos totalmente sintéticos tornou-se de grande interesse. Assim, em 1852, o químico alemão Gerland, então aluno de doutorado de Hermann Kolbe, realizou a síntese do ácido salicílico a partir do ácido antranílico, por meio da reação com ácido nitroso (Figura 2). Em 1860, os químicos alemães Kolbe e Lautemann publicaram o trabalho em que descrevem a síntese dessa substância a partir do fenol, por meio da sua carboxilação com dióxido de carbono sob pressão, com rendimento de 79% (Kolbe, 1860). Essa síntese revolucionou o uso do ácido salicílico, pois viabilizou sua produção em grande



escala, determinando o fim do uso do salgueiro na terapêutica, em benefício do fármaco agora sintético. Esse exemplo mostra a importância da síntese orgânica para a saúde pública. Além disso, exalta a importância da síntese na preservação ambiental, pois substituiu o uso de recursos vegetais. Embora o ácido salicílico tivesse importante efeito farmacológico, seus danos gastrointestinais comuns e potencialmente graves limitavam seu uso oral. Isso se deve à presença do grupo funcional fenólico que tem potencial especialmente irritante à mucosa gástrica.

Figura 2 – Métodos de síntese do ácido salicílico



Em 1890, um grupo de pesquisa foi criado pela empresa Friedrich Bayer & Company (hoje, Bayer), para pesquisar novos medicamentos. Esse grupo era liderado pelo pesquisador Arthur Eichengrün, e mais tarde o químico Felix Hoffmann juntou-se à equipe. Hoffmann tinha um motivo pessoal para pesquisar um substituto que causasse menos irritação gástrica e que tivesse um gosto mais palatável do que o ácido salicílico: seu pai era portador de reumatismo e sofria muito com os efeitos adversos desse fármaco. Por isso, ele iniciou a pesquisa estudando a acetilação do ácido salicílico, chegando ao ácido acetil-salicílico (AAS) (Jeffreys, 2008). Essa substância já havia sido sintetizada antes, porém, em 1893, Hoffmann desenvolveu um método muito eficiente para a sua obtenção, que consistia na reação do ácido salicílico com o anidrido acético, sendo catalisada por ácido com rendimentos superiores a 70%. De posse da substância, Eichengrün enviou uma amostra para ser avaliada farmacologicamente pelo grupo do químico Heinrich Dreser da Bayer. Os resultados foram positivos e, apesar de Dreser não acreditar no potencial dessa nova substância, Eichengrün iniciou um processo paralelo para a avaliação clínica da nova substância. Os resultados mostraram que o AAS apresentava os mesmos efeitos terapêuticos do ácido salicílico, mas com efeitos adversos mais brandos. Esse era o início de um dos fármacos de maior sucesso da história, a aspirina, que começou a ser comercializada pela Bayer em 1899 (Jeffreys, 2008).

O sucesso do AAS pode ser observado por seus números. Por ano, são consumidas cerca de 40 mil toneladas, cerca de cem bilhões de comprimidos, em todo o mundo. Pela sua importância terapêutica, esse IFA está na LME da OMS (WHO, 2019). Farmacologicamente, ele é classificado como um AINE e desempenha sua atividade anti-inflamatória de forma semelhante ao ácido salicílico, ao atuar nas enzimas COX-I e II inibindo a formação de prostaglandinas e tromboxanos na cascata da inflamação. Diferentemente de outros AINEs, o AAS reage de forma covalente com as enzimas COX, transferindo seu grupamento acetila ao resíduo de aminoácido serina, e sua inibição é irreversível. Além de atuar contra a dor, febre e inflamação, o AAS tem atividade anticoagulante pela inibição do fator de agregação plaquetária (PAF), que impede a formação de coágulos que levam a problemas cardiovasculares. Por isso, a aspirina pode ser usada, de forma preventiva e em baixas doses, em pacientes com risco de problemas cardíacos (Vane & Botting, 2003).

Com o advento sintético do ácido salicílico, outros salicilatos importantes foram desenvolvidos. Considerando que o grupo ácido carboxílico se encontra ionizado no pH da pele, o seu uso tópico como anti-inflamatório local não é viável, pois a sua absorção dérmica é prejudicada. Por esse motivo, ésteres do ácido salicílico foram estudados para essa aplicação. O salicilato de metila é o éster salicílico mais simples e pode ser isolado de diversas espécies de planta, especialmente a *Gaultheria procumbens*, conhecida como gualtéria. Essa substância tem atividade anti-inflamatória tópica e pode ser aplicada em formulações de uso local como analgésico. O salicilato de metila pode ser sintetizado em grande escala a partir da esterificação de Fischer do ácido salicílico, com o uso de metanol e ácido sulfúrico (Boullard, Leblanc & Besson, 2012).

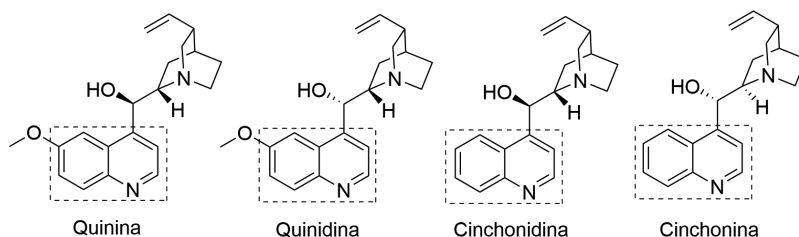
Um outro fármaco desenvolvido a partir do ácido salicílico é o subsalicilato de bismuto que é usado no tratamento de desconfortos gastrointestinais, aliviando sintomas de náusea, diarreia e dores epigástricas. Além de ter propriedade antibacteriana, pode ser usado como coadjuvante no tratamento de gastrite causada pela bactéria *Helicobacter pylori*. Após ingestão, a substância libera o ácido salicílico, que tem atividade anti-inflamatória (Madisch *et al.*, 2008). O bismuto não é absorvido de forma relevante, embora o uso prolongado possa levar à toxicidade pelo metal, e pode ser sintetizado pela reação do ácido salicílico com o hidróxido de bismuto em meio aquoso.

## A Quinina e Derivados Quinolínicos

Segundo a OMS, a malária é a doença parasitária que mais mata em todo o mundo, sendo também uma das principais causas gerais de morte nos países afetados. Ela vitima mais de quatrocentas mil pessoas todos os anos e mais da metade da população mundial está em risco de contrair a doença. Ela é causada por protozoários, os plasmódios (*Plasmodium spp.*), que é vetorizada por mosquitos do gênero *Anopheles* e acomete especialmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento da África, América do Sul e Ásia. A malária foi negligenciada por muitos anos pela indústria farmacêutica, pois ela não tinha interesse em investir numa doença cujo mercado não ofereceria boas perspectivas de retorno financeiro (WHO, 2020).

Embora seja uma doença milenar, reportada por Hipócrates por volta de 400 a.C., a malária permaneceu sem tratamento efetivo durante muito tempo. Somente com a colonização das Américas, século XV, os europeus tiveram contato com um produto natural que tinha atividade contra essa enfermidade: as cascas de árvores do gênero *Cinchona*. Elas já eram usadas, para o controle da febre, por indígenas sul-americanos, da região do Peru, na cordilheira dos Andes, onde a planta cresce. Dessa forma, os colonizadores, por intermédio dos jesuítas, introduziram o tratamento no Velho Mundo. Por volta de 1630, o pó da casca de cinchona foi descrito pela primeira vez como tratamento antimalárico. Este foi incluído na farmacopeia de Londres como tratamento antimalárico em 1677. Naquela época, a casca de cinchona era seca, moída até um pó bastante fino, misturada com um líquido, geralmente vinho, e então ingerida (Achan *et al.*, 2011). A atividade antimalárica da casca de cinchona é atribuída aos alcaloides quinolínicos, entre eles a quinina e seu isômero quinidina, além da cinchonidina e seu isômero cinchonina (Figura 3). No entanto, o alcaloide em maior proporção é a quinina, motivo pelo qual é a principal substância que contribui para a atividade da cinchona contra a malária (Achan *et al.*, 2011).

Figura 3 – Alcaloides com atividade antimalárica presentes na casca de cinchona



Em destaque, o núcleo quinolínicos.

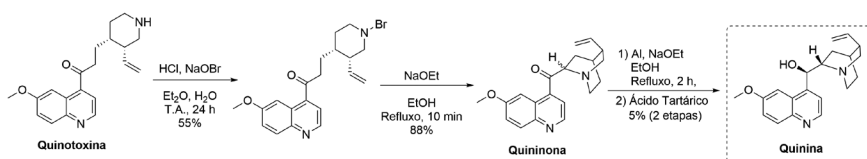
Somente em 1820 a quinina foi isolada da casca de cinchona. Esse feito foi alcançado pelos pesquisadores franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaimé Caventou, que isolaram uma quinolina e nomearam-na quinina, em alusão à palavra quina do idioma inca *quechua*, que significa “casca sagrada” (Achan *et al.*, 2011). A quinina foi isolada, purificada e instituída como o tratamento padrão para a malária. Esta permaneceu como fármaco antimalárico de referência até a Segunda Guerra Mundial, quando foi progressivamente substituída por outros derivados quinolínicos. Muito embora não seja mais considerada um tratamento de primeira escolha, a quinina está presente no guia de tratamento da malária da OMS, sendo usada em casos específicos, como quando houver gravidez ou não houver um derivado de artemisinina disponível (WHO, 2020).

A quinina é um alcaloide com núcleo quinolínico e aril-amino-álcool. Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, mas acredita-se que os derivados quinolínicos atuam no metabolismo da hemoglobina do parasito. Os plasmódios têm um ciclo dentro dos eritrócitos (hemácias); a correta metabolização do grupo heme da hemoglobina, presente nas hemácias, é crucial para a sua sobrevivência (Achan *et al.*, 2011). Com o uso de quinolinas, como a quinina, esse metabolismo se tornaria deficiente, causando o acúmulo de heme citotóxico, o que levaria à morte do parasito.

A estrutura da quinina só foi totalmente elucidada em 1907, pelo químico alemão Paul Rabe. Paul Rabe e Karl Kindler foram responsáveis pela primeira síntese dessa substância, que partiu da quinotoxina (Figura 4) (Rabe & Kindler, 1918). Esse alcaloide já havia sido estudado por Louis Pasteur, que fez o processo inverso, convertendo a quinina em quinotoxina, em 1853.

No método de Rabe e Kindler, a amida secundária da quinotoxina é inicialmente bromada. Em seguida, o intermediário reage com etóxido de sódio (NaOEt), que abstrai o hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico, gerando um carbânio. Esse carbânio ataca o nitrogênio, expulsando o brometo e formando a quininona. A carbonila da quininona é reduzida ao álcool correspondente, formando a quinina. O rendimento global até a quinina é de apenas 2,5% (Rabe & Kindler, 1918).

Figura 4 – Síntese da quinina a partir da quinotoxina por Rabe e Kindler

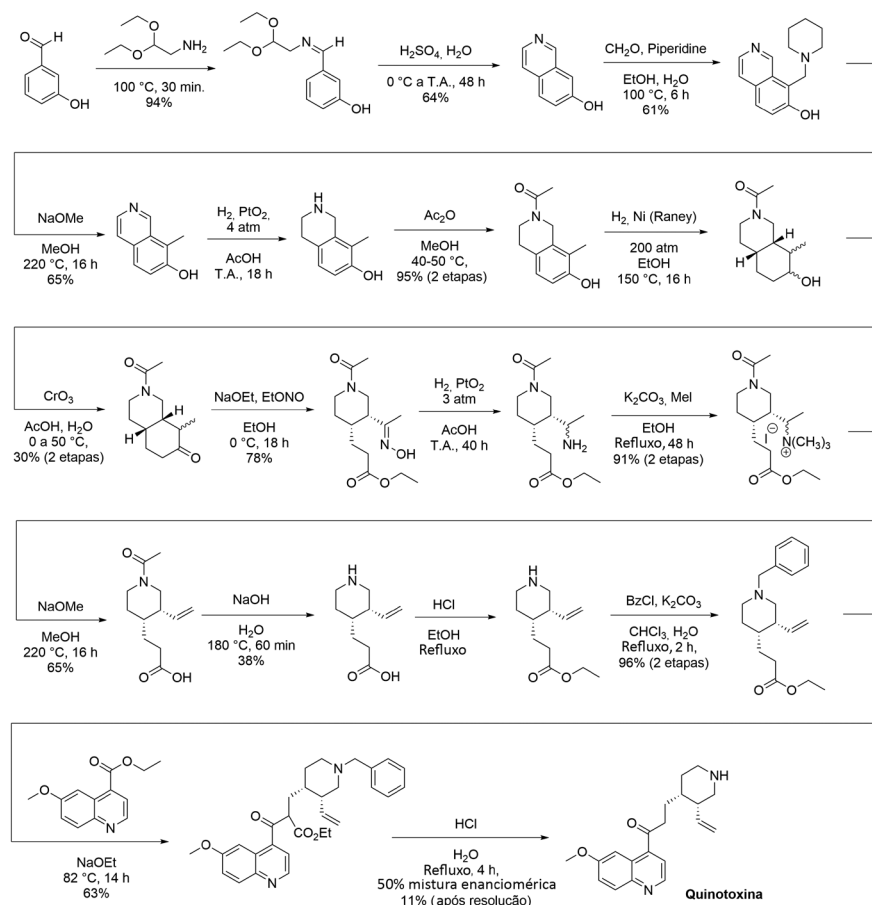


Considerando que a fonte de quinina natural vinha de locais dominados pelas forças inimigas japonesas, o domínio da tecnologia para a síntese dessa substância foi estratégico para os estadunidenses, uma vez que a malária tirava de combate muitos soldados da época. Esse fato histórico mostra, de forma bastante clara, a importância estratégica da síntese orgânica para uma nação. Baseando-se no trabalho de Rabe e Kindler, no qual a quinina é obtida a partir da quinotoxina, os químicos americanos Robert Burns Woodward e William Doering desenvolveram a síntese da quinotoxina (Woodward & Doering, 1944). A síntese da quinina por Woodward e Doering pode ser classificada como formal e não total. Esses dois pesquisadores foram considerados “heróis de guerra” ao terem viabilizado a síntese desse fármaco aplicável em escala industrial e, dessa forma, tornarem os Estados Unidos (EUA) autossuficientes na obtenção do insumo para a produção do medicamento que seria enviado aos soldados em combate.

O método de síntese da quinotoxina de Woodward e Doering é bastante complexo e dispendioso do ponto de vista experimental, compreendendo 17 etapas (Figura 5). Ele parte da reação do 3-hidroxi-benzaldeído com a 2,2-dietoxetilamina para formar a imina correspondente, que é ciclizada formando a 7-hidroxi-isoquinolina. Esta sofre sucessivas transformações até chegar ao intermediário decalínico, que é então oxidado. O anel ciclohexanona é aberto e sucessivas transformações químicas são realizadas até a obtenção do intermediário-chave aminoéster, que é então acoplado ao núcleo quinolínico proveniente do éster etílico da metoxiquinolona por meio da formação do enol com posterior ataque à carbonila. Finalmente, o intermediário formado é descarboxilado para gerar a quinotoxina, que tem sua estereoquímica definida após resolução (Figura 5). O rendimento global é de apenas 0,08% que, considerando a etapa adicional do método de Rabe e Kindler, formaria a quinina em um rendimento global de apenas 0,002% (Woodward & Doering, 1944).

Muito embora a quinina seja usada até os dias atuais na quimioterapia da malária, sua descoberta abriu um novo horizonte para o desenvolvimento de novos antimaláricos quinolínicos que fossem ainda mais eficazes, ativos contra uma maior gama de cepas desse parasito, e que tivessem menor toxicidade. Inspirados pela quinina, em 1924, os pesquisadores alemães Schulemann, Schoenhoeffer e Wlinger, desenvolveram, na Bayer, o primeiro antimalárico quinolínico sintético, a pamaquina (Figura 6), que difere da quinina pela substituição da unidade aminoalcoólico na posição 4 do anel quinolínico por uma diamina alifática mais linear na posição 8 desse núcleo. Essa substância mostrou o seu potencial antimalárico em 1926, sendo usada até o desenvolvimento de novas gerações de antimaláricos quinolínicos, e não está mais em uso clínico atualmente (Roehl, 1926).

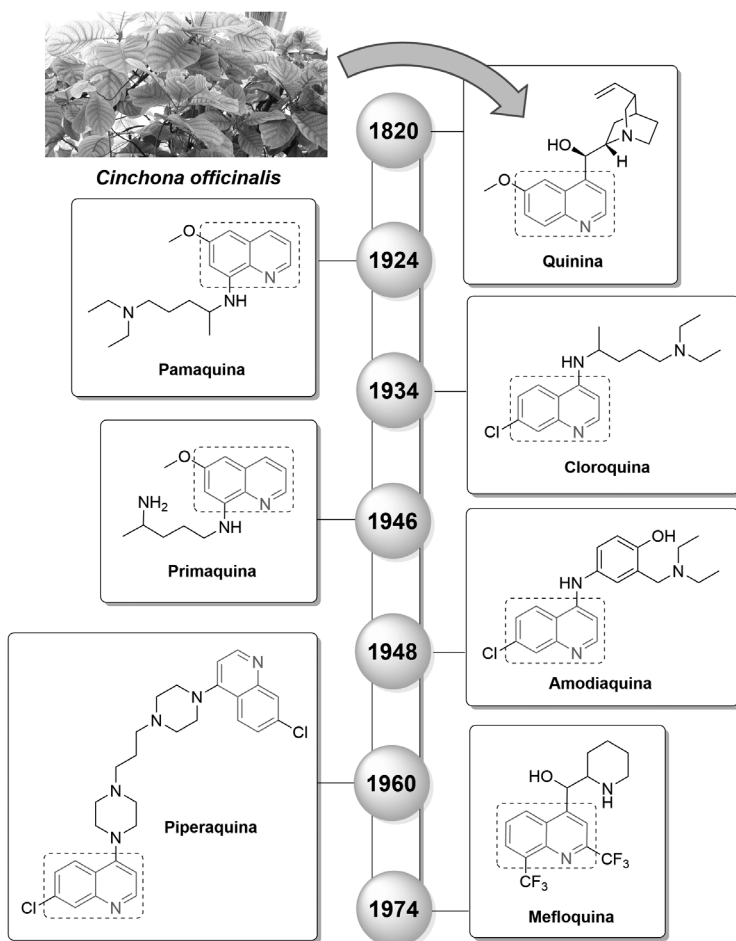
Figura 5 – Rota de síntese da quinotoxina desenvolvida por Woodward e Doering



Durante a Segunda Guerra Mundial, o abastecimento de quinina no mundo ficou comprometido, dado o controle japonês dos locais de produção. Como a síntese da quinina era um processo complexo e caro para a época, o interesse por substâncias alternativas de origem sintética aumentou. O domínio da terapia antimalárica na segunda guerra foi considerado estratégico para as grandes potências. Em 1934, também no laboratório Bayer, o grupo liderado pelo cientista alemão Hans Andersag desenvolveu uma série de derivados quinolínicos sintéticos, entre eles a resoquina, um novo derivado 4-amino-7-cloro-quinolínico. Embora essa substância tenha apresentado atividade muito superior à da quinina contra o plasmódio, seu desenvolvimento foi pausado durante anos, pois foi considerada tóxica para o uso humano. No entanto, na

década de 1940, com o avanço da doença, a resoquina foi revisitada, e mostrou seu potencial terapêutico nos testes clínicos, sendo renomeada de cloroquina (Figura 6), pelo fato de sua estrutura ter uma substituição por um átomo de cloro no núcleo quinolínico. Após mais de setenta anos de sua descoberta, a cloroquina ainda é usada em regiões cujas espécies circulantes são *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*; entretanto, o *P. falciparum* é resistente a esse fármaco (Krafts, Hempelmann & Skórska-Stania, 2012). Dada a sua importância na quimioterapia da malária, a cloroquina integra, assim como a quinina, a LME da OMS.

Figura 6 – Linha do tempo do desenvolvimento de fármacos antimaláricos quinolínicos



Novas substâncias sintéticas foram desenvolvidas no período do pós-guerra. A primeira delas foi a primaquina (Figura 6), desenvolvida em 1946 por Robert Elderfield da Universidade de Columbia, EUA (Edgcomb *et al.*, 1950). Sua estrutura está relacionada à pamaquina, porém com alteração na diamina alifática na posição 8 pela substituição do grupo dietilamino terminal por um grupo amina. Diferente de outras quinolinas, a primaquina parece ter atividade sobre o DNA do parasito. Além disso, é capaz de eliminar as formas reciduais do plasmódio, em especial no fígado, evitando a disseminação da forma eritrocítica (circulante) do parasito, o que impede as recidivas. Esse fármaco é especialmente útil no tratamento da malária causada por *P. vivax* e *P. ovale*, motivo pelo qual também está presente na LME.

Em 1948, a indústria farmacêutica Parke-Davis desenvolveu a amodiaquina (Figura 6), que é uma cloroquinolina análoga à cloroquina, com a substituição de uma amina alifática por uma unidade derivada de anilina. Esse fármaco é útil no tratamento da malária causada por *P. falciparum*. Dessa forma, esteve na LME durante muitas décadas, mas foi removida na década de 1990, devido a problemas de toxicidade. No entanto, logo voltou à LME para o tratamento em combinação com outros fármacos (Olliaro *et al.*, 1996).

Na década de 1960, dentro de esforços do governo chinês para o controle da malária, foi desenvolvida a piperaquina (Figura 6), um fármaco dímero do núcleo 7-cloroquinolina. Devido ao desenvolvimento de resistência parasitária, esse fármaco não é mais usado como monoterapia, mas é recomendado pela OMS em combinações com a artemisinina (Sandeep & Singh, 2014).

Durante a guerra do Vietnã (1955-1975), a malária foi grande inimiga das tropas americanas, dizimando muitos soldados nas frentes de batalha. Novamente, programas de desenvolvimento de medicamentos do exército americano, em especial do Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed, levaram à avaliação de mais de 150 mil substâncias, entre elas a mefloquina (Figura 6). Esta foi descoberta em 1974, pouco antes do final desse conflito. No entanto, a substância não chegou a ter utilidade naquela época, pois seu desenvolvimento só avançou com a parceria público-privada do exército americano com as indústrias Roche e SmithKline. Assim, sua aprovação só ocorreu em meados da década de 1980. Quimicamente, a mefloquina é uma quinolina substituída por dois grupos trifluorometila nas posições 2 e 8 desse núcleo aromático, o que a torna muito lipofílica, gerando um longo tempo de meia-vida no organismo, de até quatro dias. Embora tenha dois centros estereogênicos na cadeia alifática aminoalcoólica, formando um par de diastereoisômeros, seu uso não é estereoespecífico, sendo usada em mistura racêmica dos enantiômeros (*R,S*) e (*S,R*). No entanto, estudos recentes mostram

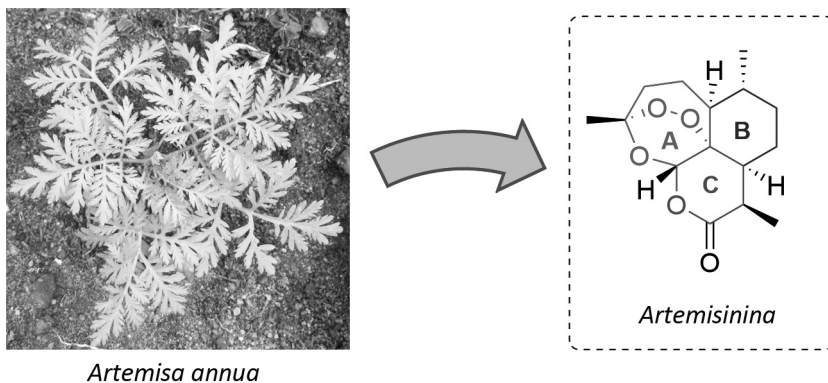


que esses enantiômeros têm farmacocinética e farmacodinâmica distintas, com toxicidades e eficácias distintas. Esse fármaco é usado no tratamento e na profilaxia da malária. Sua relevância na clínica pauta-se pela menor resistência do plasmódio comparada à cloroquina, e é aplicada contra *P. falciparum* e contra *P. vivax*, motivo pelo qual também está na LME. Seu uso é recomendado apenas em combinações, para que seja mitigado o risco de desenvolvimento de resistência (Sandeep & Singh, 2014).

## Artemisinina e seus Derivados

Relatos de mais de dois mil anos na China já descreviam o uso da artemísia (*Artemisia annua*) para o tratamento da febre causada por malária. Assim, o uso dessa planta foi, provavelmente, o primeiro tratamento conhecido para essa doença. No entanto, a sua fitoquímica permaneceu desconhecida durante séculos. Somente na década de 1960, durante a guerra do Vietnã, devido ao avanço da mortalidade por malária resistente à cloroquina no Sudeste Asiático, o governo chinês resolveu concentrar esforços para o desenvolvimento de novos tratamentos. A etnofarmacologia foi um importante ponto de partida nessa busca. Nesse momento, houve a revisitação da artemísia (Miller & Su, 2011).

Em 1973 a equipe liderada pela pesquisadora chinesa Tu Youyou conseguiu identificar a substância de *A. annua* responsável pela atividade antimalárica da planta, à qual deu o nome de *qinghaosu*, que significa o princípio da artemísia. Devido à dificuldade de pronúncia do nome original por línguas ocidentais, essa substância foi renomeada de artemisinina (Figura 7) (Miller & Su, 2011). Pelo desenvolvimento da artemisinina e seus derivados, Youyou foi laureada com o Prêmio Nobel de Medicina de 2015. Quimicamente, a artemisinina é uma lactona de sesquiterpeno, cujo núcleo é composto de três anéis fundidos, sendo o anel A um oxepano em ponte com um sistema endoperóxido, o anel B um cicloexano e o grupo C uma lactona. É importante ressaltar que o endoperóxido é essencial para a atividade antimalárica dessa substância, pois sua remoção acarreta a total inatividade da substância.

Figura 7 – A planta *A. annua* e a estrutura da artemisinina

A artemisinina é um antimalárico de ação rápida e age somente no ciclo eritrocítico da malária, ou seja, mata apenas as formas circulantes internalizadas em hemácias. Além disso, é rapidamente metabolizada e eliminada, seu tempo de meia-vida é de apenas 30 a 45 minutos. Por isso, quando utilizada em monoterapia, a artemisinina tem baixa eficácia, o que faz ser alta a probabilidade de reativação da doença, e seu uso isolado não é recomendado. Outro problema desse fármaco é a solubilidade muito baixa, tanto em água quanto em óleo. Considerando que as substâncias só podem ser absorvidas se estiverem solúveis, a farmacocinética da artemisinina foi um desafio para os químicos medicinais. No entanto, o fato de apresentar pouca resistência cruzada com cepas não sensíveis aos antimaláricos quinolínicos foi o que estabeleceu sua relevância clínica (Straimer & Gnädig, 2016).

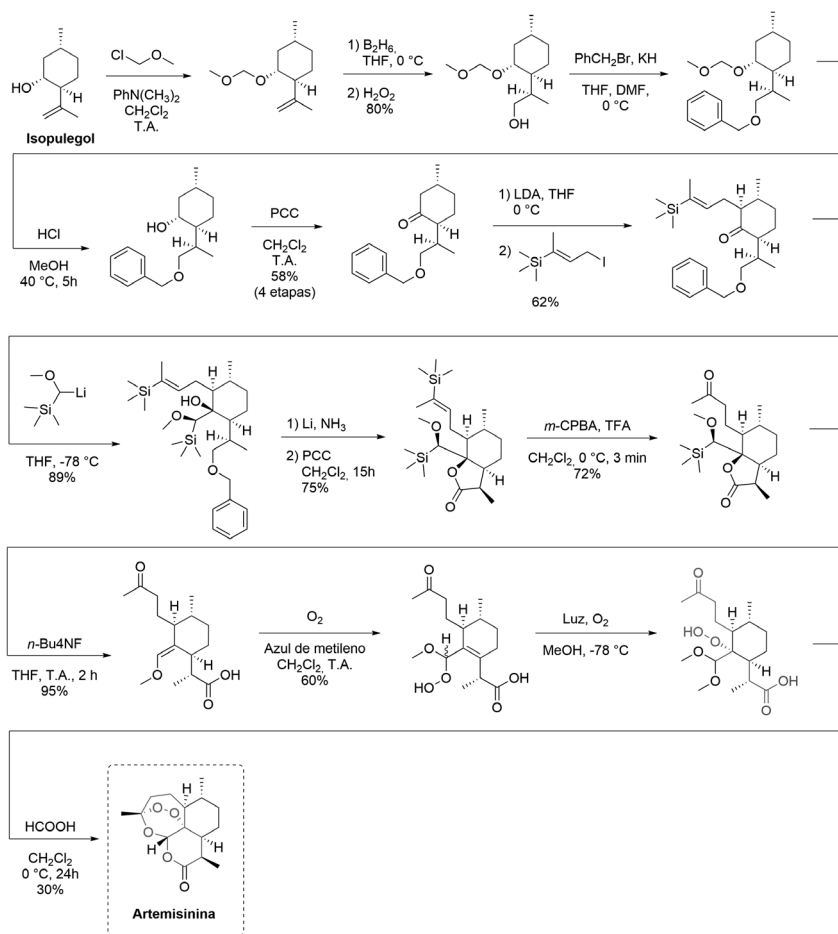
Embora a artemisinina não seja mais tão usada no tratamento da malária, sua produção é de grande interesse, uma vez que ela é usada como material de partida para a síntese de seus derivados, que serão abordados mais à frente. A maior parte da produção mundial de artemisinina vem de processo de extração de *A. annua*, principalmente do Sudeste Asiático, em processos de extração e posterior purificação por cromatografia, que levam a rendimentos na faixa de 0,12% a 0,6% (Krieger *et al.*, 2018). No entanto, também são usados processos biossintéticos que partem do amorfadieno, que é fermentado por leveduras (modificadas com genes de artemísia) até o ácido artemísico, que sofre oxidação até a formação da artemisinina (Ro *et al.*, 2006). Esse processo pode ser usado em larga escala e substituir a extração vegetal, contribuindo para a estabilização do seu preço no mercado, que é bastante flutuante por estar relacionado a variações no cultivo da planta. No entanto,

a obtenção da artemisinina por via totalmente sintética é possível, embora o processo seja complexo e desafiador. Um dos primeiros e mais bem-sucedidos processos foi desenvolvido na indústria Roche por Schmid e Hofheinz. Neste, o monoterpene isopulegol, com estereoquímica definida, é usado como material de partida, que é responsável pelo anel B da artemisinina. O processo de síntese total compreende 13 etapas e o seu rendimento global é de cerca de 5% (Figura 8). A primeira reação da rota consiste na alquilação do isopulegol com cloreto de metoximetila, seguido de hidroboração-oxidação da dupla ligação e posterior alquilação com brometo de benzoíla. Esse intermediário sofre sucessivas transformações químicas, até chegar a um intermediário peróxido ainda não ciclizado. A ciclização deste gera os anéis A e C, o que ocorre em meio ácido, no qual há o ataque do peróxido à carbonila cetônica com posterior ataque intramolecular para a formação do anel lactâmico e oxepânico, gerando a artemisinina (Schmid & Hofheinz, 1983).

Em virtude da relevância terapêutica da artemisina e os seus problemas farmacocinéticos, aumentou o interesse no desenvolvimento de novos derivados para contornar seu problema de solubilidade e, conseqüentemente, sua absorção por via oral ou administração parenteral (intramuscular). Inicialmente, o grupo de Tu Youyou avaliou a diminuição da alta lipofilicidade da artemisinina pela redução da carbonila lactâmica para uma hidroxila (Figura 9). Essa redução leva à formação da di-hidroartemisinina, com maior potência e eficácia do que a substância natural de origem, e foi aprovada para o tratamento da malária em combinação com a piperaquina. No entanto, essa nova substância ainda tinha baixa biodisponibilidade oral, além de ter se mostrado instável quimicamente, o que dificulta sua formulação farmacêutica (Ansari *et al.*, 2013).

A partir da obtenção da di-hidroartemisinina, um leque de possibilidades foi aberto, uma vez que a sua hidroxila pode sofrer reações de alquilação. Dessa forma, o mesmo grupo de pesquisa avaliou a sua eterificação catalisada por eterato de trifluoreto de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) com o uso de metanol, que forma o arteméter, ou etanol, que gera o arte-éter. Os epímeros  $\beta$  foram formados em maior proporção do que os  $\alpha$ , sendo a separação desses realizada por cromatografia. A lógica da eterificação pautou-se no aumento de lipofilicidade, com o objetivo de alcançar maior solubilidade em óleo e, assim, possibilitar sua administração por via parenteral intramuscular. Esses dois derivados etéreos mostraram atividade e farmacocinética superior à artemisinina e di-hidroartemisinina. O primeiro é usado em combinação com a lumefantrina, e essa combinação é integrante da LME.

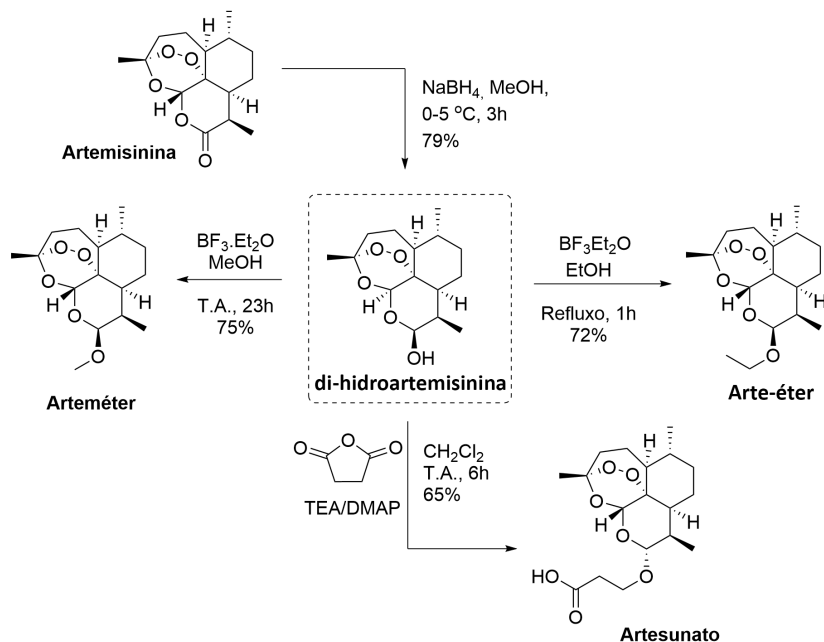
Figura 8 – Rota de síntese da artemisinina desenvolvida por Schmid e Hofheinz



Apesar dos avanços dos derivados de di-hidroartemisinina, o problema da baixa biodisponibilidade oral permanecia sem solução, pois tais substâncias careciam de uma melhor solubilidade em meio aquoso (Morris *et al.*, 2011). Considerando tal limitação, foi avaliada a alquilação da di-hidroartemisinina com anidrido succínico, por meio da qual se forma o ácido artesúnic, mais comumente conhecido como artesunato (Figura 9). O único produto para essa reação é o epímero  $\alpha$ , que é menos impedida estericamente do que a da  $\beta$ -di-hidroartemisinina para reagir com o anidrido succínico. Dessa forma, apenas a  $\alpha$ -hidroartemisinina reage, levando à formação de um produto único. O ácido artesúnic pode ser convertido no seu sal, o que aumenta muito sua

solubilidade aquosa. O artesunato mostrou melhor perfil farmacodinâmico e farmacocinético do que todos os demais derivados de artemisinina, e é hoje um grande aliado na quimioterapia da malária, na qual é usado em associação com a mefloquina, no tratamento da malária causada por *P. falciparum*.

Figura 9 – Rotas de síntese dos derivados de artemisinina



## Paclitaxel (Taxol®)

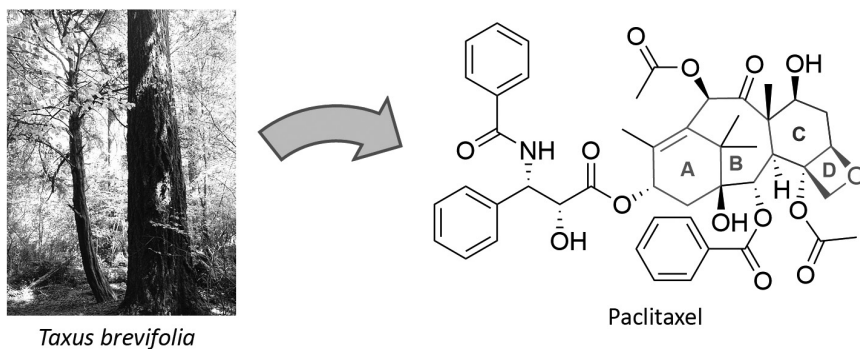
O câncer é um espectro de doenças que se caracterizam, em linhas gerais, por um crescimento anormal de células de um determinado tecido do organismo de um indivíduo, que podem espalhar-se para diferentes partes do organismo do paciente, originando as metástases. A taxa de divisão celular de células neoplásicas é muito maior do que das células normais, o que compromete a função do tecido afetado, levando o paciente à morte se não tratado a tempo (Avendaño & Menendez, 2015).

Dentre as diversas abordagens terapêuticas do câncer, a quimioterapia tem especial destaque. Os fármacos anticâncer são substâncias citotóxicas que interferem na divisão celular (mitose); como as células tumorais têm uma taxa

acelerada, elas são mais susceptíveis a estas substâncias. Logo, tecidos com alta taxa de divisão celular, como a medula óssea e os folículos pilosos, são especialmente afetados pela quimioterapia (Avendaño & Menendez, 2015).

O paclitaxel (Figura 10), conhecido pelo nome comercial de Taxol®, é um dos fármacos anticâncer com maior impacto em todo o mundo, usado para diversos tipos de câncer, como de ovário, útero, pulmão, mama, pâncreas e até mesmo o sarcoma de Kaposi, relacionado com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Sida, ou do inglês AIDS). Seu mecanismo de ação envolve a polimerização da tubulina, responsável por diversos processos celulares, incluindo a mitose (Horwitz, 1994). É um dos fármacos que fazem parte da LME. O paclitaxel é um diterpeno de origem vegetal que pode ser extraído das cascas do teixo-do-Pacífico (*Taxus brevifolia*) (Figura 9). Sua estrutura química é bastante complexa, possuindo 11 centros quirais. Seu núcleo pode ser dividido em quatro ciclos fundidos, sendo o A um cicloexeno, o B um ciclo-octano, o C um cicloexano e o D um oxetano (Figura 10) (Fu *et al.*, 2009).

Figura 10 – A estrutura química do paclitaxel e o teixo-do-Pacífico, de onde foi originalmente isolado



Sua descoberta ocorreu na década de 1960, através de um programa de triagem de novas substâncias com potencial atividade anticâncer realizado com financiamento do National Institute of Cancer (NIC) nos EUA. Na década anterior, extratos da casca do teixo-do-Pacífico já haviam mostrado atividade promissora contra algumas linhagens de células tumorais, o que despertou interesse no estudo de sua composição química (Cragg, 1998). No entanto, sua estrutura e os dados de avaliação farmacológica só foram publicados em

1971. Em 1989, a indústria farmacêutica americana Bristol-Myers Squibb foi selecionada num acordo de cooperação de pesquisa e desenvolvimento e obteve exclusividade para o desenvolvimento pré-clínico e clínico do paclitaxel, sendo, em seguida, garantida a exclusividade de exploração comercial desse fármaco durante cinco anos. Um dos grandes desafios do uso clínico do paclitaxel é sua obtenção. Na extração de material vegetal, o rendimento é extremamente baixo, uma vez que, para a obtenção de 10 g de substância pura, é necessário mais uma tonelada de casca de teixo-do-Pacífico. Isso gera grande impacto ambiental sobre essa espécie, como torna o processo economicamente inviável, devido aos altos custos de produção, uma vez que para cada paciente tratado seriam necessárias oito árvores com, ao menos, 60 anos de idade (Walsh & Goodman, 1999). Assim, novos métodos de obtenção do paclitaxel foram estudados. Devido à sua estrutura química extremamente complexa, com estereoquímica definida em diversos centros quirais, a síntese total do paclitaxel foi de grande interesse de diversos grupos de pesquisa em síntese orgânica de todo o mundo.

Em 1994, o grupo do professor Robert A. Holton, da Universidade da Flórida, publicou a primeira síntese total do paclitaxel (Holton *et al.*, 1994). A rota envolvia 46 etapas, com rendimento global de 1,9%, e iniciava-se pelo óxido de patchouleno, que pode ser sintetizado a partir do patchoulol, um sesquiterpeno da planta patchouli (*Pogostemon cablin*). Esse material de partida já apresenta estereoquímica definida e é responsável pela fixação da configuração de alguns dos centros assimétricos da substância-alvo. Por isso, essa é uma síntese total genuína, pois não é totalmente verticalizada. O método é uma rota linear, ou seja, os intermediários são modificados ao longo do processo numa via única. Nesse método, o óxido de patchouleno é modificado, através de seis etapas, com rendimento acumulado de 64%, para formar os anéis A e B do núcleo do paclitaxel. O anel C é construído por meio das 15 etapas seguintes, com rendimento de 29%. Após mais 14 etapas, com rendimento de 19%, é realizada a formação do anel D. O paclitaxel é obtido com rendimento global de 1,9% após mais 11 etapas, as quais compreendem, ainda, a inclusão de sua cadeia lateral assimétrica (Figura 11).

Embora diversos outros métodos de síntese total tenham sido desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa, a síntese total dessa substância era economicamente desfavorável, pela sua complexidade e número elevado de etapas sintéticas. Dessa forma, um método de obtenção do paclitaxel usado em escala industrial consiste em uma semissíntese. Essa via foi desenvolvida pela Bristol-Myers Squibb e compreende basicamente

três etapas com 38% de rendimento global. Essa rota consiste apenas na inclusão da cadeia lateral fenilisoerina (Figura 12) e de um grupo acetila na hidroxila do anel B. Essa via tem como material de partida a 10-desacetilbacatina III, um terpeno de origem natural isolado do teixo (*Taxus baccata*), que está presente, principalmente, na folha e não na casca da planta, o que proporciona uma extração não destrutiva e mais sustentável (Imseng *et al.*, 2014).

Figura 11 – Rota de síntese simplificada do paclitaxel por Robert A. Holton e colaboradores

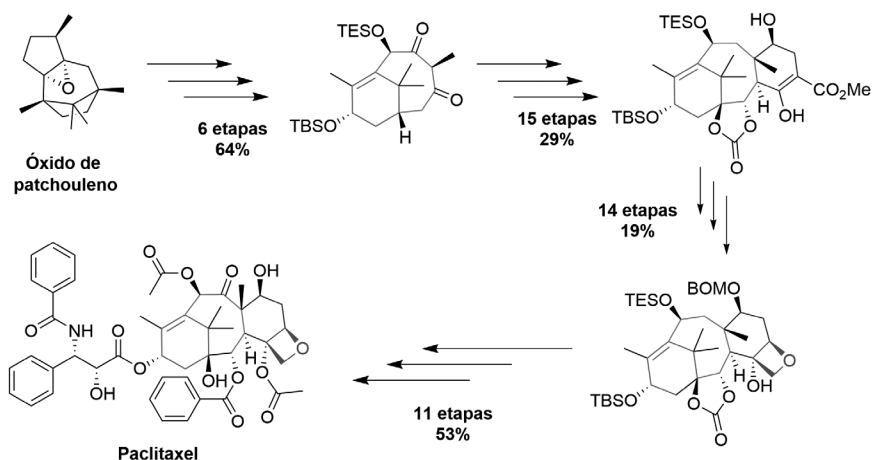
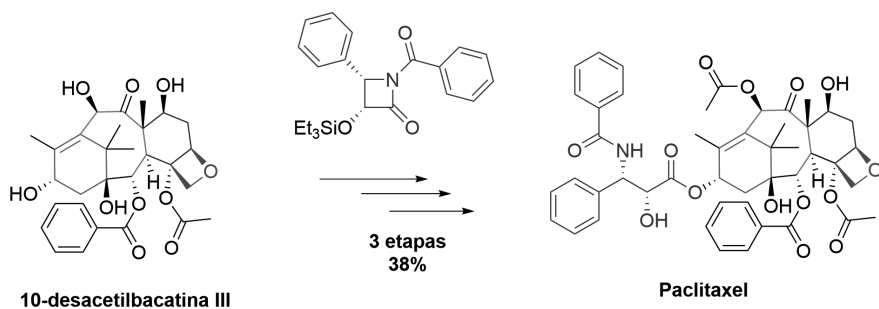


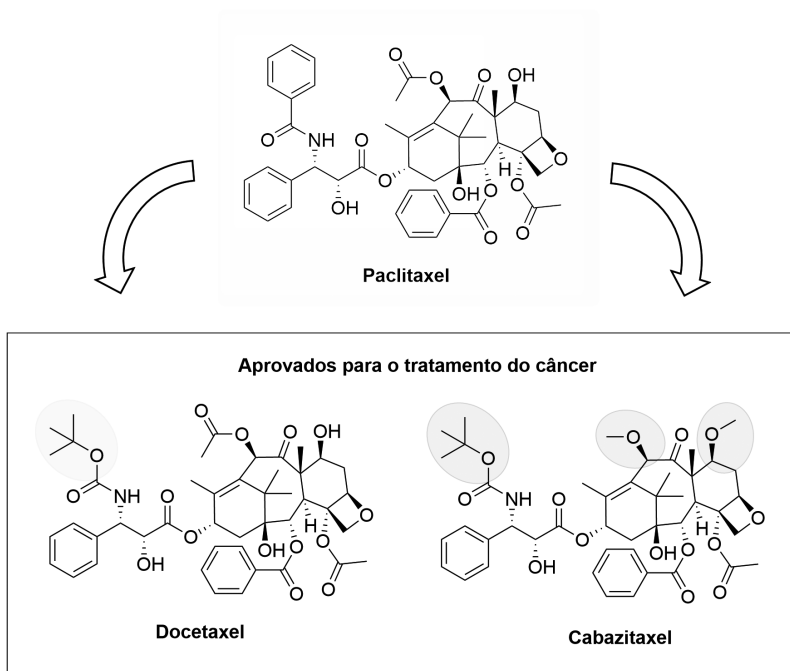
Figura 12 – Método semissintético do paclitaxel desenvolvido pela indústria Bristol-Myers Squibb





A partir do desenvolvimento do paclitaxel, diversas alterações em seu núcleo foram realizadas, para estudar a sua relação entre estre estrutura e atividade (SAR). Foi observado que apenas a manutenção dos anéis A, B, C e D intactos não era suficiente para explicar a atividade antiproliferativa dessa classe de substâncias, conhecidas como taxanos. A cadeia lateral feniliososerina, chamada de cauda, é crucial para a atividade, que pode ser modificada ou funcionalizada para melhorar a solubilidade em água. No entanto, a hidroxila desse grupo deve ser mantida livre. Outros grupamentos são essenciais para a atividade e não podem ser alterados: o grupo benzoíla no anel B e o grupo acetil no anel C. Além disso, a quebra do sistema fundido dos anéis A, B, C e D leva à perda da atividade. Com base na estrutura do paclitaxel, outros análogos taxanos semissintéticos foram sintetizados. O docetaxel (Taxorene®), desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisa Científica, na França, durante estudos de otimização do paclitaxel foi patenteado em 1986 (Guénard, Géritte-Voegelein & Potier, 1993). A pesquisa foi transferida para a indústria Rhône-Poulenc Rorer, incorporada pela Sanofi, que desenvolveu o medicamento até seu lançamento no mercado, em 1995. Essa substância é obtida por semissíntese a partir da desacetilbacatina III e difere do paclitaxel apenas pela substituição, na cadeia lateral, do éster benzílico pelo carbamato *terc*-butílico. Esse fármaco é usado no tratamento do câncer de mama, de estômago e de pulmão. Além do docetaxel, a Sanofi desenvolveu o cabazitaxel, que foi aprovado em 2010 para o tratamento do câncer de próstata (Galsky, 2010). Este fármaco difere do paclitaxel por alterações em três pontos em diferentes regiões da molécula: na cadeia lateral foi substituído o éster benzílico pelo carbamato *terc*-butílico, no anel B o grupo acetila foi substituído por uma metoxila e, no anel C, a hidroxila foi alterada para outra metoxila (Figura 13).

Figura 13 – O paclitaxel e seus análogos taxanos



## Opiáceos: morfina e codeína

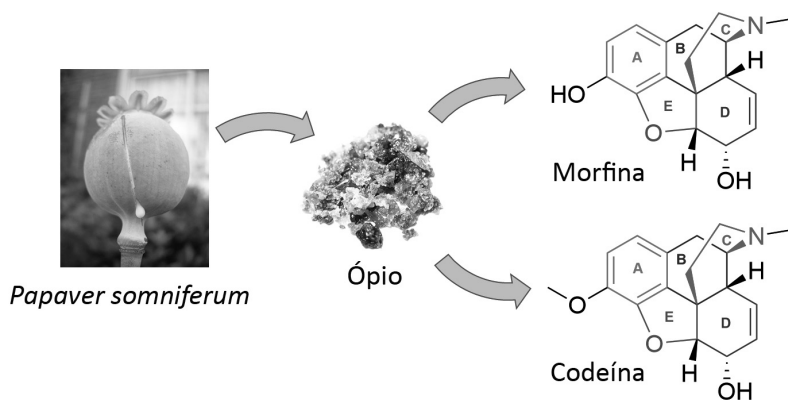
O ópio é uma das primeiras preparações terapêuticas de que se tem notícia. Seu uso é reportado há milhares de anos antes de Cristo. Trata-se do látex seco extraído da papoula (*Papaver somniferum*) (Figura 14). Seu uso histórico consistia no tratamento da asma, problemas estomacais, como anestésico, em procedimentos cirúrgicos rudimentares e em rituais religiosos no Antigo Egito (Booth, 2013). Seu uso terapêutico teve maior relevância pelo alquimista suíço Paracelsus, que, no século XVI desenvolveu o láudano, uma preparação líquida composta de ópio, vinho branco, açafrão, cravo e canela. O láudano tinha diversas propriedades, incluindo atividade sedativa e analgésica, usado, entre outras aplicações, para o tratamento da dor (Booth, 2013).

Somente em 1804 a primeira substância ativa do ópio foi isolada pelo farmacêutico alemão Friedrich Sertürner. O composto isolado foi seis vezes mais potente do que o ópio, e, por isso, foi necessária uma dose muito menor para atingir os efeitos farmacológicos desejados. Esse novo fármaco foi comercializado por Sertürner a partir de 1817, e sua principal aplicação terapêutica era o combate à dor. A essa nova substância Sertürner deu o

nome de *morphium*, em homenagem a Morfeu, deus da mitologia grega associado ao sono, pelo efeito hipnótico (indutor do sono) que essa substância também proporciona. Mais tarde esse composto foi renomeado de morfina (Booth, 2013).

Quimicamente, a morfina é um derivado de alcaloide benzilisoquinolínico, cuja estrutura foi totalmente elucidada em 1925 pelo químico alemão Robert Robinson. Seu núcleo é composto de cinco anéis fundidos, sendo o A uma fenila (Figura 14), o B um cicloexeno, o C uma piperidina, o D outro cicloexeno e o E um furano (Manske & Holmes, 2014). Ela é o principal alcaloide do ópio, correspondendo a cerca de 8 a 26% do peso do látex seco, de acordo com a forma de cultivo da papoula. No entanto, a morfina não é a única substância ativa do ópio. Em 1832, o químico francês Pierre Robiquet isolou outro alcaloide do látex, que recebeu o nome de codeína, em alusão à palavra grega *kódeia*, que significa “cabeça de papoula” (Drobnik & Drobnik, 2016). A codeína difere da morfina apenas pela presença de uma metila no oxigênio fenólico e está em menor concentração no ópio, cerca de 1% a 3% do peso do látex seco da planta (Frick *et al.*, 2005).

Figura 14 – A papoula, da qual se extrai o ópio e deste a morfina e a codeína



Farmacologicamente, a morfina e a codeína são classificadas como opiáceos. Essa classe compreende substâncias de origem natural, extraídas do ópio, que ativam os receptores opioides, do sistema nervoso, dentre os quais se destacam o *kappa* ( $\kappa$ ) e o *delta* ( $\delta$ ). A ativação desses receptores gera um bloqueio do estímulo da dor, conferindo atividade analgésica a esses fármacos.

As substâncias que agem em receptores opioides recebem o nome de opioides, mas apenas as que são extraídas do ópio. A morfina é o mais potente dos opiáceos, tem afinidade quarenta vezes maior no receptor opioide *mi* ( $\mu$ ) do que a codeína e, diferentemente desta, também é capaz de ativar os receptores *kappa* ( $\kappa$ ) e *delta* ( $\delta$ ). Dessa forma, é necessária uma dose sete vezes maior de codeína para que seja alcançado o mesmo efeito da morfina. No entanto, apesar de poder interagir diretamente no receptor opioide *mi* ( $\mu$ ), a codeína funciona, na verdade, como um pró-fármaco, uma vez que é convertida em morfina após desmetilação metabólica, e esta é a última a substância que irá promover a analgesia (Ogura & Egan, 2013). Devido aos maiores efeitos adversos e ao risco de parada respiratória, o uso da morfina é restrito aos casos mais extremos de dor, sempre com supervisão médica. O uso da codeína, por sua vez, é mais amplo; é encontrada em formulações associada com o paracetamol, um analgésico não opioide (Ogura & Egan, 2013). A morfina e a codeína são integrantes da LME.

Embora possa ser extraída em larga escala do ópio, a síntese da morfina e da codeína foi objeto de estudo de diversos grupos de síntese orgânica. A obtenção dessas substâncias por via totalmente sintética é altamente desafiadora, pois têm cinco centros quirais com estereoquímica definida, além de ter uma conexão complexa entre os anéis B, C e D, sendo um dos carbonos assimétricos integrante simultaneamente dos três ciclos.

A primeira síntese total da morfina e da codeína foi realizada na mesma rota pelo químico americano Marshall D. Gates Jr. em 1952, na Universidade de Rochester (Gates & Tschudi, 1952). Ela foi importante pois permitiu a confirmação da estrutura da morfina postulada décadas antes por Robinson. É uma rota linear de 27 etapas, cujo rendimento global até a codeína de 0,003% e até a morfina de 0,001% (Figura 15).

Esse método parte do 2,6-di-hidroxinaftaleno, que já tem o esqueleto dos anéis A e B. Após 13 etapas, a formação no anel D é alcançada por uma reação de cicloadição de Diels-Alder com o 1,3-butadieno. Logo na etapa seguinte, o anel C é gerado por meio do ataque no nitrogênio do grupo ciano ao enol no anel B, que forma, após rearranjo, a amida cíclica de interesse. Após mais dez etapas adicionais é formado o anel E, por meio da bromação do carbono  $\alpha$ -carbonílico do anel C e posterior ciclização via ataque intramolecular da hidroxílica fenólica do anel A e eliminação do brometo. Após a redução da carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada com hidreto de lítio e alumínio, é formada a codeína. Esta é finalmente desmetilada com o uso de cloreto de piridínio para a formação da morfina (Figura 16).

Figura 15 – Rota de síntese da codeína e da morfina realizada por Gates e colaboradores

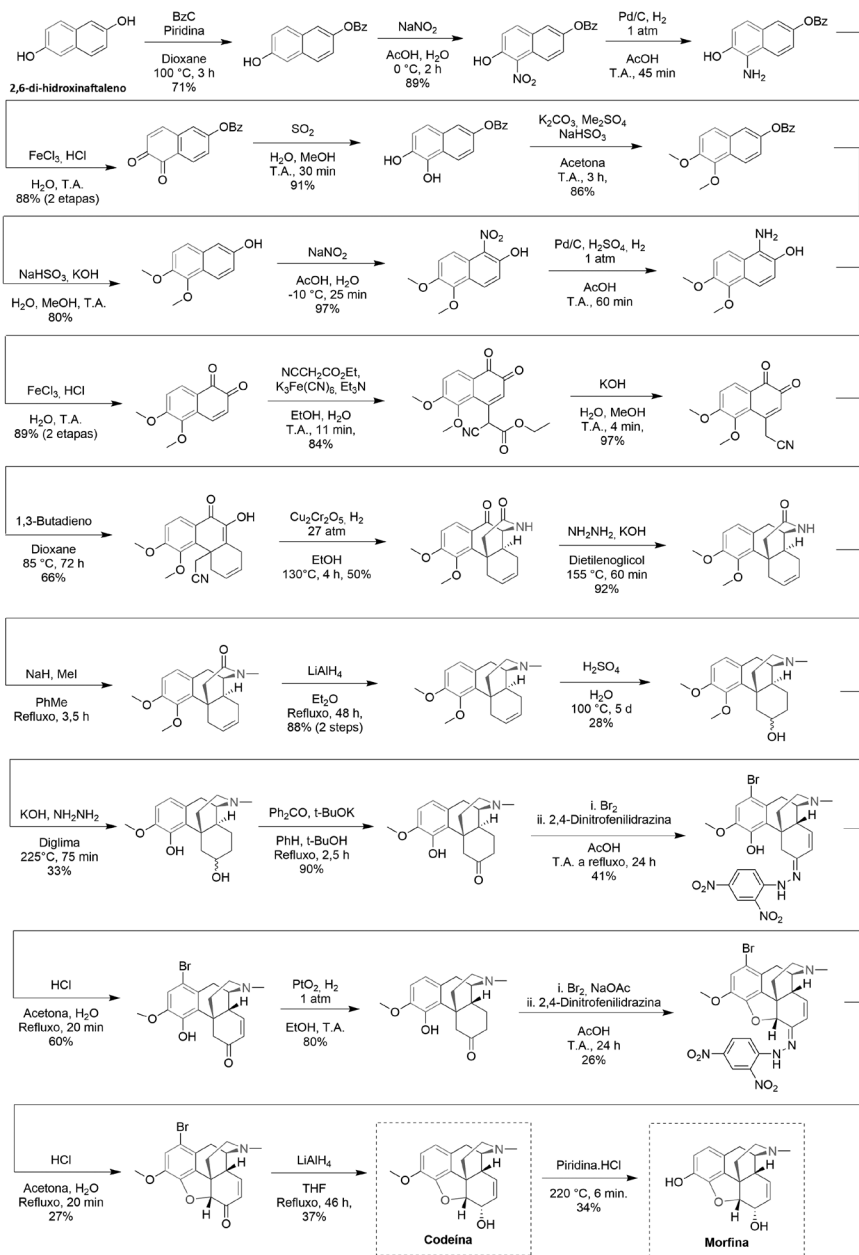
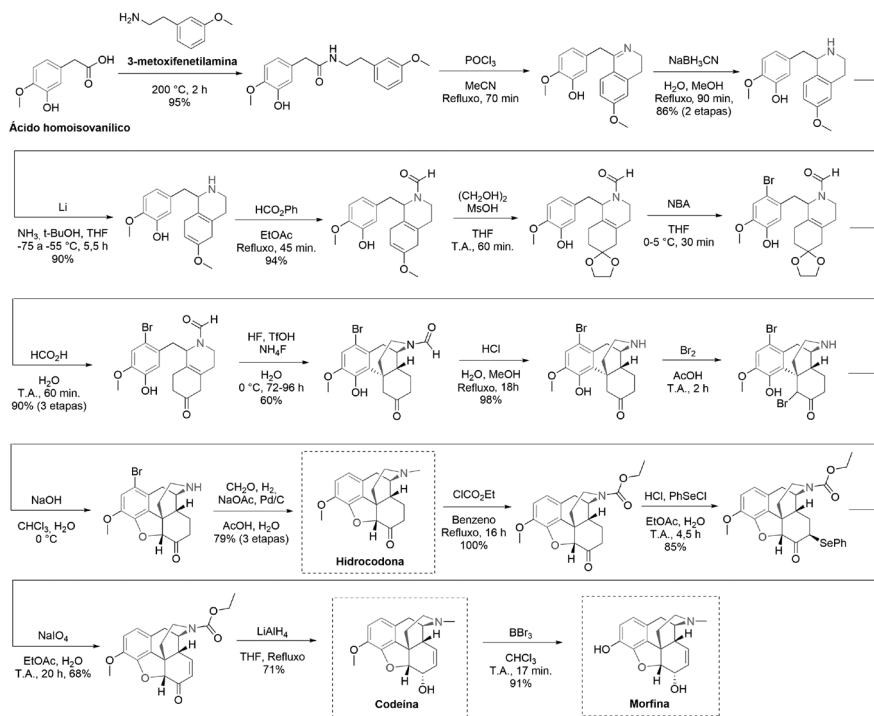


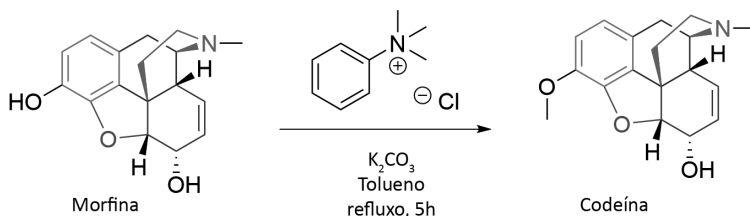
Figura 16 – Rota de síntese da codeína e da morfina realizada por Rice e colaboradores



Devido aos baixos rendimentos do método de Gates, buscaram-se novas vias sintéticas de obtenção desses opiáceos. Em 1980, o grupo de Kenner C. Rice, do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), desenvolveu uma nova rota linear, de 18 etapas (Figura 15) (Rice, 1980). Esta oferece como vantagem um rendimento global muito superior à rota de Gates, de 12% até a codeína e de 11% até a morfina. Outro opioide pode ser sintetizado por essa via, a hidrocodona com rendimento global de 29%, após 14 etapas. A síntese total de Rice parte da reação entre o ácido homoisovalínico, responsável pelo anel opiáceo A, com a 3-metoxifenetilamina, que integra o anel D. Na etapa seguinte é formado o anel C, por meio da ciclização de Bischler-Napieralski, na qual a carbonila amídica é clorada com POCl<sub>3</sub> e, em seguida, sofre ataque do anel C, em uma reação de substituição eletrofílica aromática intramolecular. Após sete etapas, é formado o anel B, por meio da reação do ataque do anel A à dupla dos carbonos cabeça de ponte entre os anéis C e D, formando o centro quiral que será comum a todos os ciclos do núcleo opiáceo. Por meio da realização de três etapas adicionais o anel E é finalmente gerado por uma

reação de substituição nucleofílica aromática intramolecular, que, após mais uma etapa, forma a hidrocodona, que é submetida a mais quatro etapas para a obtenção da codeína, que é, em seguida, convertida em morfina pela desmetilação com tribrometo de boro (Figura 15). O método de Rice é até hoje um dos mais eficientes para a síntese de opiáceos e é aplicado em escala industrial. Embora a codeína possa ser obtida por via totalmente sintética, um método de menor custo global pode ser empregado. Trata-se da sua semissíntese a partir da morfina que, por estar presente em quantidade muito superior no ópio, pode ser usada como material de partida, sendo necessária apenas uma etapa de metilação da hidroxila fenólica. Diversos métodos estão disponíveis para essa etapa, sendo um dos mais eficientes a metilação com cloreto de trimetilfenilamônio, que proporciona a formação da codeína em rendimento de 99% (Figura 17). Esse método usa reagentes de custo muito baixo e pode ser facilmente aplicado em reatores industriais para a produção em larga escala.

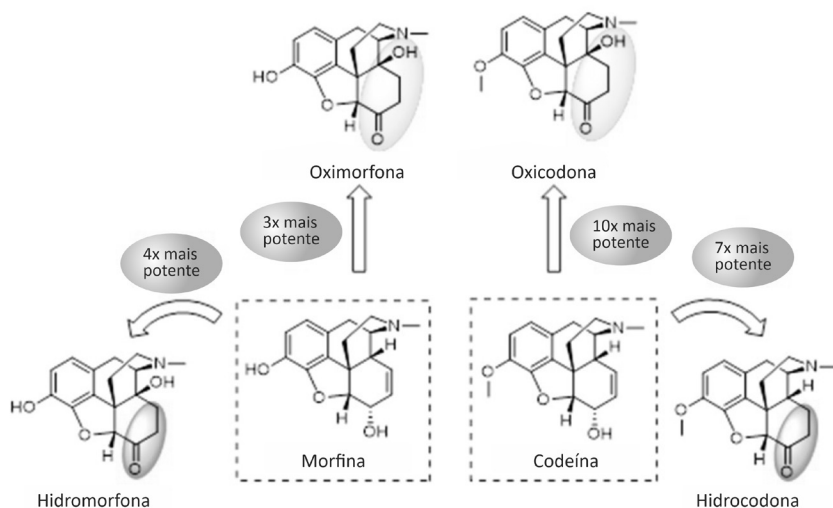
Figura 17 – Rota de síntese da codeína a partir da morfina



Com a descoberta da morfina e codeína, foi aberto um novo campo para o desenvolvimento de novos opioides semissintéticos, os quais são usados na clínica até os dias atuais (Abraham, McCurdy & Prisinzano, 2021). A partir da morfina, no fim do século XIX foi desenvolvida a di-hidromorfina através da redução do anel cicloexeno que foi capaz de aumentar em 20% a potência desse opioide comparado à morfina. De forma similar, em 1911 a codeína foi reduzida à di-hidrocodeína, que também promoveu um ganho de 20% na potência dessa substância comparada ao fármaco de origem, e seu uso foi aprovado em 1948 (Figura 17). Seguindo a lógica contrária ao desenvolvimento da di-hidromorfina, na qual fora realizada uma redução, em 1921 uma nova substância foi desenvolvida pela indústria alemã Knoll (atual Abbott) a partir a oxidação dessa substância. O novo derivado carbonílico recebeu o nome hidromorfona (Figura 18) e apresentou atividade cerca de quatro vezes

mais potente do que a da morfina. Essa indústria também realizou o mesmo com a di-hidrocodeína para gerar a hidrocodona, a qual mostrou potência sete vezes superior à da codeína. A partir da hidromorfona e da hidrocodona, uma nova modificação foi realizada por meio da inclusão de uma hidroxila em um dos carbonos cabeça de ponte entre os anéis B e D. Essa modificação foi capaz de aumentar a potência da morfina e da codeína em três e dez vezes, respectivamente (Figura 18).

Figura 18 – Modificações das estruturas dos opiáceos morfina e codeína e seus incrementos em potência



## Considerações Finais

Conforme demonstrado neste capítulo, a biodiversidade vegetal é uma fonte incomensurável de substâncias com diversas atividades biológicas, desde o tratamento de doenças infecciosas à quimioterapia do câncer. Os metabólitos vegetais, muitas vezes, têm estrutura química bastante complexa e desafiadora, demandando anos de estudos para que sua síntese ou semissíntese possam ser reproduzidas em laboratório. A interação entre as potencialidades dos produtos naturais e as técnicas de síntese orgânica permitiram que diversos fármacos sintéticos mais potentes fossem desenvolvidos com a inspiração da natureza. Dessa forma, a continuidade do estudo da constituição química dos extratos vegetais com atividade biológica, o isolamento das substâncias ativas e



o seu desenvolvimento sintético, com o auxílio da química medicinal, podem continuar gerando imensas contribuições para o tratamento de diversas enfermidades que vêm, há séculos, acometendo a humanidade.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D. J.; MCCURDY, C. R. & PRISINZANO, T. E. Opioid receptor ligands. In: ABRAHAM, D. J. (Ed.). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2021.
- ACHAN, J. *et al.* Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10: 144, 2011.
- ANSARI, M. T. *et al.* Malaria and artemisinin derivatives: an updated review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13: 1.879-1.902, 2013.
- AVENDAÑO, C. & MENENDEZ, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Amsterdam: Elsevier Science, 2015.
- BOLZANI, V. *et al.* Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 84: 1.837-1.846, 2012.
- BOOTH, M. *Opium: a history*. New York: St. Martin's Griffin, 2013.
- BOULLARD, O.; LEBLANC, H. & BESSON, B. "Salicylic Acid". *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012
- CRAGG, G. M. Paclitaxel (Taxol®): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Medicinal Research Reviews*, 18: 315-331, 1998.
- DROBNIK, J. & DROBNIK, E. Timeline and bibliography of early isolations of plant metabolites (1770-1820) and their impact to pharmacy: a critical study. *Fitoterapia*, 115: 155-164, 2016.
- EDGCOMB, J. H. *et al.* Primaquine, SN 13272, a new curative agent in vivax malaria; a preliminary report. *Journal of the National Malaria Society*, 9: 285-292, 1950.
- FRICK, S. *et al.* (May). Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *Journal of Natural Products*, 68: 666-673, 2005.
- FU, Y. *et al.* Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues. *Current Medicinal Chemistry*, 16: 3.966-3.985, 2009.
- GALSKY, M. D. *et al.* Cabazitaxel. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9: 677-679, 2010.
- GATES, M. & TSCHUDI, G. The synthesis of morphine. *Journal of the American Chemical Society*, 74: 1.109-1.110, 1952
- GUÉNARD, D.; GUÉRITTE-VOEGELEIN, F. & POTIER, P. Taxol and taxotere: discovery, chemistry, and structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research*, 26: 160-171, 1993.

- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1-93, 2006.
- HOLTON, P. A. *et al.* First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*, 116: 1.597-1.598, 1994
- HORWITZ, S. B. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 5: S3-6, 1994.
- IMSENG, N. *et al.* Suspension culture of plant cells under heterotrophic conditions. In: MEYER, H. P. & SCHMIDHALTER, D. R. (Eds.). *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2014.
- JEFFREYS, D. *Aspirin: the extraordinary story of a wonder drug*. London: Bloomsbury, 2008.
- KOLBE, H. "Ueber Synthese der Salicylsäure" [On the synthesis of salicylic acid]. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 113: 125-127, 1860.
- KRAFTS, K.; HEMPELMANN, E. & SKÓRSKA-STANIA, A. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology Research*, 111: 1-6, 2012.
- KRIEGER, J. *et al.* Total synthesis and biological investigation of (-)-artemisinin: the antimalarial activity of artemisinin is not stereospecific. *Angewandte Chemie*, 57: 8.293-8.296, 2018.
- MADISCH, A. *et al.* Investigational treatment options in microscopic colitis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(12): 1.829-1.837, 2008.
- MANSKE, R. H. F. & HOLMES, H. L. *The Alkaloids: chemistry and physiology*. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- MILLER, L. H. & SU, X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell*, 146: 855-858, 2011.
- MORRIS, C. A. *et al.* Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malaria Journal*, 10: 263, 2011.
- NICOLAU, K. C. Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. *Proceedings of the Royal Society A*, 470: 20130690, 2014.
- OGURA, T. & EGAN, T. D. Opioid agonists and antagonists. In: HEMMING, H. C. & EGAN, T. D. (Eds.). *Pharmacology and Physiology for Anesthesia: foundations and clinical application*. Philadelphia: Elsevier, Saunders, 2013.
- OLLIARO, P. *et al.* Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *The Lancet*, 348: 1.196-1.201, 1996.
- RABE, P. & KINDLER, K. Über die partielle Synthese des Chinins. Zur Kenntnis der China-Alkaloide XIX. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 51: 466, 1918.
- RICE, K. C. Synthetic opium alkaloids and derivatives. A short total synthesis of (+,-)-dihydrothebainone, (+,-)-dihydrocodeinone, and (+,-)-nordihydrocodeinone as an approach to a practical synthesis of morphine, codeine, and congeners. *Journal of Organic Chemistry*, 45: 3.135-3.137, 1980.

- RO, D. K. *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440: 940-943, 2006.
- ROEHL, W. Die Wirkung of Plasmochins auf die Vogel malaria. *Naturwissenschaften*, 14: 1.156-1.159, 1926.
- SANDEEP, K. & SINGH, S. S. A Brief History of quinoline as antimalarial agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25: 295-302, 2014.
- SCHMID, G. & HOFHEINZ, W. Total Synthesis of qinghaosu. *Journal of the American Chemical Society*, 105: 624-625, 1983.
- TILLEY, L.; STRAIMER, J. & GNÄDIG, N. F. Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, 32: 682-696, 2016.
- VANE, J. R. & BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research*, 110: 255-258, 2003.
- VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A. & KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177-206, 2009.
- WALSH, V. & GOODMAN, J. Cancer chemotherapy, biodiversity, public and private property: the case of the anti-cancer drug Taxol. *Social Science & Medicine*, 49: 1.215-1.225, 1999.
- WOODWARD, R. B. & DOERING, W. E. The total synthesis of quinine. *Journal of the American Chemical Society*, 66: 849-849, 1944.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Health Organization Model List of Essential Medicines: 21st list 2019*. Geneva: World Health Organization, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Malaria Report 2020*. Geneva: World Health Organization, 2020.



# 13

## Produção Industrial de Medicamentos Fitoterápicos

*Emeli Moura de Araújo, Andrea Bezerra da Nobrega, Samanta Cardozo Mourão, Maria Carolina Anholeti, Deborah Quintanilha Falcão e Mêriane Lourdes de Paiva Brandão*

Os fitomedicamentos são constituídos de substâncias ativas de origem vegetal. Eles incluem os fitoterápicos cujo registro é regulamentado pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 26/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (Brasil, 2014a), que os define como um produto com finalidade profilática, curativa ou paliativa obtido de matéria-prima vegetal, excetuando-se as substâncias isoladas. Sua cadeia produtiva envolve diferentes áreas do conhecimento, como botânica, etnobotânica, agronomia, farmacognosia e fitoquímica, além da tecnologia farmacêutica e controle da qualidade, e, de modo geral, seu ponto de partida é o conhecimento popular. A partir da identificação e seleção da espécie e da parte vegetal, a comprovação da eficácia terapêutica e segurança devem ser avaliadas pelos estudos farmacológicos, e a composição, pelos estudos fitoquímicos. A ideia de uma produção industrial implica estudos agrônômicos de cultivo, colheita e processamento, para garantir a composição e teor das substâncias ativas. Os derivados vegetais deverão ser incorporados às formas farmacêuticas definitivas. A atividade farmacológica das plantas medicinais resulta do sinergismo e antagonismo das substâncias no extrato vegetal, formando um fitocomplexo. Os processos tecnológicos envolvidos na produção de medicamentos devem ser realizados para garantir a integridade das moléculas. Desse modo, as etapas de produção dos extratos até a obtenção da forma farmacêutica definitiva

devem ser otimizadas, e o processo, controlado, a fim de garantir a reprodutibilidade, o teor e a estabilidade do produto final, conforme as especificações técnicas (Bassani, Gonzales & Petrovick, 2005).

Em relação ao registro do produto, na RDC n. 26/2014 dividem-se os fitoterápicos em duas categorias: medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos (Brasil, 2014a). Os medicamentos fitoterápicos são obtidos com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas. Os produtos tradicionais fitoterápicos são também obtidos com o emprego exclusivo de matérias-primas vegetais, porém com a segurança e efetividade baseadas em dados da literatura técnico-científica, ou seja, na tradição do seu uso; não necessitam da vigilância do profissional médico para fins de diagnóstico, prescrição ou monitoramento. Apesar das diferenças para registro ou notificação, os requisitos para a garantia da qualidade dos processos e produtos são os mesmos. Algumas resoluções e suas atualizações que normatizam o desenvolvimento e a produção de fitoterápicos são comuns aos demais medicamentos. Como exemplos, pode-se citar as resoluções da Anvisa que abordam as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos (Brasil, 2022), a validação de métodos analíticos (Brasil, 2017), a farmacovigilância (Brasil, 2020) e os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos (Brasil, 2019a). Embora existam especificidades para os fitoterápicos, essas resoluções demonstram que, em termos regulatórios, a produção de fitoterápicos segue os mesmos cuidados exigidos para os medicamentos sintéticos.

Apesar da diversidade de espécies vegetais no Brasil, o número de fitoterápicos registrados é relativamente pequeno quando comparado com o de outros países. Em um levantamento realizado até setembro de 2016, Carvalho e colaboradores (2018) identificaram, na base de dados da Anvisa, 359 produtos fitoterápicos registrados, dos quais 27 são feitos em associação e 332 são monodrogas. Os pesquisadores observaram que ocorreu uma redução de 31% em relação aos dados levantados em 2008. Entre as 101 espécies de plantas licenciadas como ativo, apenas 27 são nativas. Contudo, alguns esforços têm sido feitos para a inclusão de fitoterápicos especialmente em razão do custo mais acessível, da efetividade e menores efeitos colaterais em comparação com os insumos sintéticos (Toledo *et al.*, 2003). A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), criada com o decreto federal n. 5.813/2006, bem como outras políticas públicas, tem como objetivo garantir o acesso seguro e o uso racional das plantas medicinais e fitoterápicos, por meio da promoção do uso sustentável da biodiversidade, desenvolvimento

da cadeia produtiva e da indústria nacional (Brasil, 2006). A ampliação das opções ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), com garantia de acesso às plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, é uma importante estratégia para melhoria da atenção à saúde da população. Nesse sentido, o conhecimento técnico e específico sobre os processos industriais para obtenção dessa categoria de medicamentos faz parte da política de melhoria do acesso da população a opções terapêuticas com qualidade assegurada.

## Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal (Ifav)

O insumo farmacêutico ativo vegetal (Ifav) pode ser uma droga vegetal ou um derivado vegetal (Brasil, 2014b). Droga vegetal é o nome dado à planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem; pode ser usada íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada e ser comercializada sem processamento adicional, como, por exemplo, chá medicinal para uso em preparações extemporâneas (Brasil, 2019b). Por sua vez, o derivado vegetal é o produto da extração da planta medicinal *in natura* ou da droga vegetal, que contenha as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, e pode ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros (Brasil, 2014b).

## Caracterização da matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal pode apresentar variações devido à sazonalidade, estágio de desenvolvimento, índice pluviométrico, temperatura, altitude, nutrientes do solo, estímulo mecânico ou de patógenos, entre outros. Portanto, é necessário um estudo detalhado das condições ideais de cultivo e coleta para obter uma matéria-prima de qualidade, que contenha as substâncias de interesse farmacológico nas quantidades desejadas para produção do fitomedicamento (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Na caracterização da matéria-prima são estabelecidos métodos de identificação qualitativa e quantitativa com análises macro e microscópicas, físico-químicas, químicas e microbiológicas. Os diferentes lotes são avaliados para estabelecer os parâmetros utilizados no controle de qualidade. A identificação e a avaliação de pureza da droga vegetal são indispensáveis àqueles que buscam produzir fitomedicamentos de boa qualidade. Deve-se estar atento à adulteração

e falsificação, pois muitas vezes os fornecedores misturam espécies vegetais e/ou órgãos diferentes, por descuido ou por interesse em aumentar o lucro. Algumas espécies têm sua monografia disponível em compêndios oficiais, mas, caso a espécie escolhida ainda não a tenha, é necessário desenvolvê-la e validar as técnicas analíticas.

A qualidade microbiológica da matéria-prima vegetal é muito importante, pois esta pode conter fungos e bactérias do microbioma natural ou ainda microrganismos que são introduzidos durante a sua manipulação; portanto deve-se sempre avaliar se a matéria-prima vegetal está dentro dos limites aceitáveis para microrganismos patogênicos, tais como *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Migliato *et al.*, 2007; Brasil, 2019b). Os ensaios macro e microscópicos fazem parte da identificação da espécie e precisam da avaliação de um taxonomista para confirmar se as características observadas condizem à espécie, gênero e família de escolha.

Em alguns compêndios oficiais, descrevem-se os métodos físico-químicos gerais para espécies vegetais, como, por exemplo: determinação de material estranho, teor de umidade, cinzas totais, cinzas sulfatadas e índice de intumescência (Brasil, 2019b). Os ensaios que irão compor a monografia da matéria-prima vegetal e os limites de aceitação poderão variar de acordo com a espécie, parte da planta, processo usado para obtenção do extrato e produto final desejado. Destaca-se, a seguir, a importância de alguns ensaios físico-químicos na caracterização da matéria-prima vegetal:

- determinação de material estranho – a inspeção do material vegetal é importante para que seja isento de insetos ou partes de insetos, impurezas de origem mineral, outros órgãos da espécie que não sejam de interesse, partes de diferentes espécies e outros materiais contaminantes. A porcentagem de elementos estranhos não deve ser superior a 2% (p/p) (Brasil, 2019b). Deve-se avaliar também se apresenta o aspecto ou odor anormal, descoramento ou qualquer indício de deterioração;
- teor de umidade – esse parâmetro é muito importante, visto que amostras de pós de matéria-prima vegetal com elevado teor de água residual podem propiciar o desenvolvimento de microrganismos, insetos, hidrólises e atividade enzimática, reduzindo sua qualidade e possibilitando a deterioração do material vegetal (Oliveira, Akisue & Akisue, 1991). O percentual de umidade baixo é um indicativo de eficiência da secagem e do correto armazenamento, o que mostra que o material está estável. Estudos devem ser feitos para avaliar a faixa de teor de umidade ideal para cada espécie vegetal, para manter a integridade física, química e microbiológica da matéria-prima e do produto acabado;

- teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido – representa a proporção do conteúdo inorgânico no material vegetal, de origem fisiológica da própria planta (carbonatos, fosfatos, cloretos, óxidos) ou não fisiológica (areia, pedra, gesso, terra). Quando a amostra é calcinada à alta temperatura, a sua matéria orgânica transforma-se em CO<sub>2</sub>, restando apenas substâncias minerais em cinzas. As cinzas insolúveis em ácido são obtidas pelo tratamento das cinzas totais para verificação da presença de conteúdo inorgânico que não são de origem fisiológica (Brasil, 2014a);
- tamanho da partícula – o tamanho de partícula da matéria-prima vegetal triturada está diretamente relacionado ao processo extrativo e sua eficiência. As partículas de material pulverizado com tamanho superior à classificação de fino são mais apropriadas para processos extrativos, pois um pó muito fino pode resultar em empacotamento da amostra, o que impede o fluxo adequado do líquido extrator, ao passo que um pó muito grosso pode favorecer formação de canais preferenciais para a passagem do líquido extrator, fazendo com que a extração não seja homogênea (Mendez *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2012; List & Schmidt, 2000);
- índice de intumescência – esse parâmetro indica que as mucilagens, pectinas e hemiceluloses estão presentes, pois absorvem água fazendo com que o material vegetal aumente o seu volume quando em contato com o solvente (WHO, 2011). Em processos extrativos, de escala industrial, ele auxilia na determinação do volume de solvente a ser adicionado durante a extração e na escolha das dimensões do recipiente extrator a ser utilizado (Couto *et al.*, 2009);
- perfil fitoquímico – a identificação de marcadores químicos é indispensável para o controle da qualidade da matéria-prima vegetal, o planejamento e o monitoramento das ações de transformação tecnológicas aliados a estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final. As metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas e validadas para estudar o perfil qualitativo e o teor dos constituintes químicos de interesse na matéria-prima vegetal, nos produtos intermediários e no produto final. Essas análises acontecem por meio de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, que têm especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica, e, por isso, são usados em estudos de estabilidade que têm como objetivo de permitir a detecção de produtos da degradação das substâncias ativas ou dos marcadores químicos.



## Extratos vegetais

A padronização de extratos de plantas medicinais tem como objetivo estabelecer os parâmetros de controle da qualidade da matéria-prima vegetal (extratos e seus constituintes) e do produto final (forma farmacêutica) com rigoroso controle de todas as etapas envolvidas no processamento (Souza, 2007). O princípio da padronização envolve a análise das substâncias químicas relacionadas ao grupo de metabólitos secundários que estão presentes na droga vegetal de maneira mais expressiva em quantidade ou potência farmacológica, que podem ser os marcadores analíticos ou ativos. A padronização do extrato é considerada condição em que a eficácia do produto é garantida através da constância no teor de seus princípios ativos.

Para efetivar a análise quantitativa dos marcadores, é preciso superar duas dificuldades: carência de padrões analíticos que possam ser utilizados rotineiramente em controle de qualidade; existência de plantas que, embora conhecidas, ainda não têm isolados e identificados seus ativos principais ou cujas substâncias isoladas não estão disponíveis comercialmente, o que dificulta ou inviabiliza a dosagem por marcador. Situam-se nesse grupo plantas como o guaco, a espinheira-santa ou a catuaba-vermelha, e são praticados, em alternativa ao doseamento dos marcadores, os doseamentos de grupos como taninos, flavonoides ou cumarinas.

Na padronização de extratos, outro critério a ser observado é a relação entre a droga e o extrato, isto é, quanto em peso foi inicialmente utilizado da planta seca para fornecer uma quantidade de extrato seco. Normalmente, uma planta seca após extração e filtração fornece um extrato líquido que, se levado a resíduo por evaporação, fornece uma quantidade de extrato em pó (sem adição de excipientes) na proporção de cerca de 30%, havendo casos em que a variação vai de 5-50% segundo a solubilidade dos ativos. No caso dos 30%, a relação droga/extrato é de 3:1, o que representa que foram necessários 3 quilos da planta seca para fornecer 1 quilo do extrato em pó; para a planta que fornece 50% de resíduo, a proporção é de 2:1, e no caso da planta com 5% a proporção é dez vezes maior, portanto, de 20:1.

A adição de excipientes nos processos de extração e/ou secagem pode aumentar a estabilidade do extrato seco, diminuindo a absorção de umidade no produto final. No caso do *Ginkgo biloba*, cujas folhas passam por processo longo e complexo e produzem um extrato padronizado mundialmente conhecido como EGB761, a proporção entre as folhas e o extrato final é na faixa de 50:1. Essa relação demonstra quão concentrados são os ativos e a diferença entre estes e as folhas inicialmente utilizadas. As folhas do *Ginkgo biloba* são

contraindicadas na terapêutica por sua ineficácia e risco de alergias, mas o extrato EGB761 tem dezenas de indicações terapêuticas muito bem estudadas e fundamentadas (Rocha, 2006; Caieiro & Marcucci, 2010). Sua padronização ocorre com a análise quantitativa das lactonas terpênicas (~ 6%) e dos flavonoides (~ 24%). Um extrato hidroalcolólico simples, preparado de forma distinta da metodologia patenteada que origina o EGB761, fornece um extrato com 0,2% de lactonas e 4% de flavonoides, ou seja, de composição final diferente daquele com o qual foram realizados os estudos farmacológicos e clínicos e, portanto, sem condições de garantir a reprodutibilidade de tais efeitos (Rocha, 2006; Caieiro & Marcucci, 2010).

De forma similar, outras espécies de plantas situam-se nessa condição em que o emprego dos extratos padronizados é condição essencial para os efeitos terapêuticos, como os produtos à base da kava-kava (*Piper methysticum*), do hipérico (*Hypericum perforatum*), da centela (*Centella asiatica*), do *saw palmetto* (*Serenoa repens*), da cimicífuga (*Cimicifuga racemosa*), do trevo (*Trifolium pratense*), entre outras (British Herbal Pharmacopeia, 1983).

O uso de espécies vegetais precisa ser muito bem planejado para não haver a destruição de flora nativa, que pode levar plantas características de biomas à extinção como ocorre com o jaborandi, mama-cadela, catuaba-vermelha, marapuama e tantas outras.

Os extratos são as formas mais simples de derivados vegetais. A partir deles obtém-se e desenvolve-se um fitomedicamento. Podem ser divididos em:

- extratos fluidos – preparações líquidas nas quais uma parte do extrato, em massa ou volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca, utilizada na sua preparação (Brasil, 2005; Brasil, 2019b). Neles, podem ser adicionados conservantes. Devem apresentar especificações quanto ao teor de marcadores e resíduo seco. No caso dos extratos padronizados, a proporção entre a droga vegetal e o extrato pode ser modificada, a fim de obter o teor de constituintes ativos especificado na monografia (Brasil, 2019b);
- extratos moles – preparações de consistência pastosa obtidas por evaporação parcial do solvente utilizado na extração. São obtidos utilizando-se como solvente unicamente álcool etílico, água ou misturas álcool etílico/água de proporção adequada. Apresentam, no mínimo, 70% de resíduo seco (p/p). Aos extratos moles podem ser adicionados conservantes para inibir o crescimento microbiano (Brasil, 2005, 2019b);

- extratos secos – obtidos por evaporação dos solventes, com baixa umidade residual (Feltrin & Chorilli, 2010). Os extratos secos padronizados têm o teor de seus constituintes ajustado pela adição de materiais inertes adequados ou pela adição de extratos secos obtidos com a mesma droga utilizada na preparação. Quando necessário, a monografia poderá prescrever realização de ensaio limite para o solvente utilizado na preparação (Brasil, 2005).

O extrato seco padronizado é o mais utilizado pelas indústrias (Ferreira & Leite, 2009; Oliveira & Petrovick, 2010) e o desenvolvimento de novas tecnologias para sua obtenção é um importante objeto de estudo. Uma de suas vantagens é o menor custo de armazenamento, alta concentração e estabilidade dos constituintes ativos; ele pode, até mesmo, ser usado como insumo para qualquer forma farmacêutica, como cápsulas, comprimidos, suspensões, soluções, xaropes, o que garante sua versatilidade como Ifav.

Na obtenção dos extratos secos eliminam-se aproximadamente 96,5-99% da fase líquida (Toledo *et al.*, 2003). As operações de secagem garantem a qualidade final do produto e sua consequente estabilidade. A secagem considerada vantajosa deve ter capacidade produtiva elevada, equipamentos compactos que promovam um melhor aproveitamento da planta industrial e baixo consumo energético. Não há uma operação de secagem única que atenda às características de cada extrato, pois deve-se considerar tempo, temperatura e pressão para evitar degradação ou alteração na sua composição das substâncias de interesse. Os processos mais utilizados são: liofilização, atomização e o leito de jorro.

Na secagem por liofilização, a matriz é previamente congelada e a quantidade de solvente (geralmente água) é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção (Marques, 2008). De acordo com Fellows (2009), é necessário o uso de baixa pressão extrema para atingir um estado de vácuo, e são necessárias temperaturas de congelamento para remover a água dos produtos sem a utilização de uma temperatura elevada. Além disso, requer um longo tempo, de cerca de 4-12 horas, mais do que os outros métodos convencionais. Entre as principais vantagens estão: a geração de produtos com estrutura inalterada, fáceis de transformar em pó, dissolver e reidratar; a redução de alterações nos nutrientes, cor, aroma e gosto (alimentos) e mínima perda de atividade em materiais sensíveis ao calor (micro-organismos); e a presença de água residual baixa (1% a 3%) (Leite, 2018). Como em todo processo, existem também as desvantagens, como o custo dos equipamentos, a dificuldade de se atingir a temperatura de liofilização (abaixo de -60 °C), a

necessidade de bombas de vácuo potentes e a demora no processo de secagem (mais de 24 horas). Além disso, determinados produtos obtidos durante o processo podem apresentar facilidade de hidratação e, por isso, necessitar de maiores cuidados na embalagem e armazenamento (Leite, 2018).

A secagem por atomização, nebulização, aspersão, ou, ainda, como popularmente conhecida no meio da indústria pelo termo em inglês *spray drying* – o equipamento usado é chamado de *spray dryer* – é um método de produção de pó seco a partir de um líquido ou suspensão por secagem rápida com um gás quente (Oliveira & Petrovick, 2010). Entre os métodos convectivos de secagem com ar, a atomização é considerada interessante pelo tempo curto de secagem, sendo amplamente utilizada em várias áreas da indústria, incluindo a de alimentos, medicamentos e extratos vegetais (Azeredo, 2005). O emprego dessa técnica possibilita o controle preciso das características do produto final em operação aplicável a produtos termossensíveis com elevada produtividade e fácil escalonamento. No entanto, elevados custos de operação e de instalação e a considerável área ocupada pelo equipamento na planta fabril tem estimulado a pesquisa de técnicas alternativas de secagem (Schutyser, Perdana & Boom, 2012). As propriedades do produto formado dependem de variáveis que devem ser controladas como: propriedades do líquido de alimentação, *design* do equipamento e parâmetros do processo (Lachman, Lieberman & Kanig, 2001).

Os extratos secos por *spray dryer* têm elevada qualidade em relação à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade e forma, que podem alterar-se durante o processo ou a cada lote produzido se as etapas não forem bem definidas e validadas, ou seja, a qualidade do extrato seco obtido será baseada a uma série de propriedades dependentes das variáveis do processo (Sosnik & Seremeta, 2015). Geralmente, os extratos nebulizados são mais solúveis e têm maior concentração das substâncias de interesse. A grande vantagem é que o processo de secagem ocorre em condições assépticas, evitando possíveis contaminações do produto final. Algumas substâncias termossensíveis precisam de atenção especial nesse processo, pois geralmente são utilizadas temperaturas elevadas.

O uso de adjuvantes na secagem de extratos pode melhorar o produto final. De Paula (1998) utilizou combinações de três adjuvantes – dióxido de silício, celulose microcristalina e  $\beta$ -ciclodextrina – na secagem de extratos de macela (*Achyrocline satureioides*). Esses extratos foram incorporados em bases de pomadas, e avaliou-se a influência do uso dos adjuvantes nas características do produto final, quanto a espalhabilidade, índice de oleosidade, viscosidade e pH. Todas as pomadas apresentaram comportamento plástico; as que continham somente dióxido de silício apresentaram baixo índice de oleosidade e

uma área de espalhabilidade intermediária, e, quando houve substituição do dióxido de silício por celulose microcristalina ou  $\beta$ -ciclodextrina, observou-se o aumento do índice de oleosidade e uma melhora na espalhabilidade da pomada.

A secagem por leito de jorro promove o íntimo contato entre um fluido e partículas relativamente grandes (acima de 1,0 mm), que têm fluidização de baixa qualidade. Essa técnica é recomendada para a secagem de materiais granulares, pastas e suspensões, granulação e revestimento de partículas. Ela tem sido difundida devido às características de alta taxa de circulação de partículas inertes e da uniformidade da temperatura no leito. Também apresenta baixo custo de construção, manutenção e operação do equipamento. Nessa secagem, o custo é, aproximadamente, a metade do custo de um secador *spray dryer*, além de ocupar um espaço menor (Patel *et al.*, 1986).

## Tinturas

As tinturas são preparações alcoólicas ou hidroalcoólicas resultantes da extração por maceração ou percolação de drogas vegetais no estado seco ou através da diluição ou dissolução do extrato, usando etanol. São classificadas em simples ou compostas, quando preparadas a partir de uma ou mais espécies vegetais. A proporção tradicional indicada pela *Farmacopeia Brasileira* equivale a 1g de droga vegetal para 10 mL de tintura simples. Outras proporções podem ser indicadas nas monografias individuais (Anvisa, 2011). O teor alcoólico faz das tinturas as formulações consideradas estáveis dos pontos de vista físico e microbiológico. O teor alcoólico da solução extratora depende da solubilidade das substâncias extraídas, variando de 25% na tintura de bardana (*Arctium lappa* L.) até 90% na tintura de calêndula (*Calendula officinalis* L.) (Brasil, 2021).

Na maceração, a droga vegetal reduzida a um tamanho de partícula apropriado, é misturada com o solvente extrator e deixada em repouso em um recipiente fechado durante um tempo determinado, podendo haver agitação ocasional da mistura. Após a extração o resíduo da droga vegetal é separado da solução extrativa e, por vezes, prensado. Neste caso, o líquido resultante é adicionado à solução extrativa, e o volume/massa do produto é ajustado. No processo de percolação, a droga vegetal passa por um período de maceração antes que a percolação seja iniciada. A solução extrativa é chamada de percolado. Por constituir uma forma farmacêutica de preparo simples de uma grande variedade de drogas vegetais, as tinturas são muito utilizadas na fitoterapia. Além disso, podem servir de matéria-prima para a elaboração de outras formas farmacêuticas.

A primeira edição do *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (FFFB) contemplou 17 monografias referentes a tinturas (Anvisa, 2011). Com a publicação do primeiro suplemento do FFFB em 2018, esse número subiu para quarenta (Brasil, 2018). Em 2021 foi aprovada a segunda edição do FFFB, na qual se incluíram cinco monografias referentes a tinturas vegetais e se excluíram outras nove (Brasil, 2021). Alguns exemplos de tinturas cujas monografias estão descritas na segunda edição do FFFB são apresentados Quadro 1.

Quadro 1 – Exemplos de tinturas descritas na segunda edição do *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*

Nome científico/ Família	Nome popular	Componentes da fórmula*	Indicações
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC./ Asteraceae	carqueja	Caule alado rasurado – 10 g Álcool etílico 70% q.s.p.** 100 mL	Dispepsias
<i>Calendula officinalis</i> L. / Asteraceae	calêndula	Inflorescência rasurada – 10 g Álcool etílico 70-90% q.s.p. 100 mL	Afecções inflamatórias da pele, boca e garganta
<i>Curcuma longa</i> L. / Zingiberaceae	cúrcuma	Rizoma – 10 g Álcool etílico 70% q.s.p. 100 mL	Dispepsias, colagogo, colerese e inflamação
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill./ Myrtaceae	eucalipto	Folha – 20 g Álcool etílico 68-80% q.s.p. 100 mL	Tosse associada ao resfriado comum
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. / Apiaceae	funcho	Fruto – 10 g Álcool etílico 40% q.s.p. 100 mL	Dispepsias, espasmos e flatulência
<i>Lippia sidoides</i> Cham. / Lamiaceae	Alecrim-pimenta	Folha – 20 g Álcool etílico 70% q.s.p. 100 mL	Inflamação, infecções da cavidade oral

Quadro 1 – Exemplos de tinturas descritas na segunda edição do *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira* (cont.)

Nome científico/ Família	Nome popular	Componentes da fórmula*	Indicações
<i>Melissa officinalis</i> L.	melissa	Folha – 20 g Álcool etílico 45-53% q.s.p. 100 mL	Ansiedade e insônia leves; sintomas gastrintestinais leves
<i>Passiflora incarnata</i> L.	maracujá	Folha – 10 g Álcool etílico 45% q.s.p. 100 mL	Ansiedade e insônia leves

\*Nas fórmulas do *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*, quando não especificado, deve-se utilizar o material vegetal seco.

\*\* A abreviatura q.s.p. equivale a “quantidade suficiente para”, usada quando um veículo líquido ou sólido é utilizado para completar um volume ou massa determinados.

Fonte: Brasil, 2021.

## Estudos de Pré-Formulação

Os estudos de pré-formulação são investigações das propriedades físico-químicas de um extrato que serão a base de conhecimento para desenvolver uma forma farmacêutica (Allen, Popovich & Ansel, 2007; Lachman, Lieberman & Kanig, 2001). O desenvolvimento dessas formas contendo extratos vegetais, geralmente, envolve problemas tecnológicos maiores do que os encontrados para os fármacos isolados. Tais problemas estão relacionados à matriz complexa de diferentes substâncias do extrato vegetal; além de conhecer os fatores físico-químicos, é preciso identificar os tipos de marcadores, a existência ou não de padrões e as referências farmacopeicas.

Outro aspecto relevante é a garantia de que existam fornecedores capacitados e com conhecimentos técnicos sobre a melhor forma de plantar, proteger e colher. Nesse contexto incluem-se profissionais que cuidam da manutenção da qualidade do vegetal até os primeiros procedimentos de transformação, na sua chegada à planta industrial.

## Fatores físico-químicos relevantes ao estudo de pré-formulação

- Higroscopicidade – é a capacidade de absorção de água do ambiente, que influencia a estabilidade do insumo ou produto vegetal. Os extratos secos são geralmente higroscópicos, e, com frequência, sofrem deliquescência. O uso de dessecantes, como o dióxido de silício coloidal, na secagem do extrato ou na formulação, reduz a higroscopicidade e melhora seu escoamento. O revestimento de comprimidos com polímeros (acetato de celulose ou polivinilpirrolidona) também previne a higroscopia (Sharapin *et al.*, 2000; Nóbrega, 2017).
- Solubilidade das substâncias de interesse farmacológico – a solubilidade é uma das principais características avaliadas na pré-formulação, dada a sua relação com a biodisponibilidade da substância que terá atividade farmacológica. Muitos fatores afetam a solubilidade do extrato, ou da/s substância/s de interesse farmacológico do extrato. Portanto, caso a solubilidade não seja adequada, utilizam-se adjuvantes ou tecnologias para viabilizar sua disponibilidade. A encapsulação de ativos vegetais é uma das técnicas empregadas para protegê-los de fatores externos e solucionar problemas na estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade. Os métodos de encapsulação podem acontecer por processos físicos de nebulização ou químicos de polimerização interfacial.
- Tamanho de partículas do pó da planta que serão utilizadas na extração – o tamanho das partículas da matéria-prima vegetal ou do insumo farmacêutico pulverizado está diretamente relacionado ao processo extrativo e sua eficiência. As partículas que são consideradas finas podem favorecer o processo de extração, pois quanto menor o tamanho da partícula, maior é a superfície de contato, o que facilita a extração. Da mesma forma, partículas muito finas podem formar aglomerados de partículas no fundo dos tanques de extração, formando uma camada compacta que dificulta o fluxo do solvente extrator, o que leva ao baixo rendimento de extração. Portanto, o ideal é realizar testes de extração com diferentes tamanhos de partículas, e assim definir o tamanho de partícula ideal para a espécie vegetal de trabalho (Sharapin *et al.*, 2000; Lachman *et al.*, 2001).
- Compatibilidade extrato-excipientes – a compatibilidade extrato-excipientes é uma propriedade fundamental que está relacionada às interações físico-químicas das formulações de fitomedicamentos. Os estudos de compatibilidade são realizados por meio de misturas binárias (1:1)



extrato-excipiente; essa proporção pode ser alterada conforme a necessidade do protocolo. Essas misturas podem ser avaliadas por análise térmica (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria), na qual será avaliada a interação do/s marcador/es e/ou princípio/s ativo/s do extrato com os excipientes. Técnicas complementares podem ser utilizadas, como: difração de raios X de pó, espectroscopia no infravermelho, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e microscopia, para a confirmação das interações identificadas pela análise térmica. As misturas podem ser avaliadas em estudos de estabilidade em condições aceleradas de temperatura e umidade em diferentes materiais de embalagem. Esses estudos evitam futuras incompatibilidades entre extrato-excipiente, que podem promover degradação das substâncias de interesse farmacológico (Nóbrega, 2017).

## Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos

A produção de fitoterápicos segue a resolução da Anvisa que trata das diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos (BPF) (Brasil, 2022), cujo objetivo é assegurar que o produto farmacêutico seja fabricado de modo homogêneo e seguro. Os processos de produção devem ser definidos, validados e revisados periodicamente e devem estar pautados em procedimentos, normas ou instruções redigidos em linguagem clara. Tudo deve ser registrado durante o processo produtivo, como fichas de uso de equipamentos, de limpeza, de pesagem e ordem de produção, que são gerenciados pelo setor de garantia da qualidade. Os funcionários devem ser treinados sobre as BPF, higiene e sanitização, uso de equipamentos de proteção individual (EPI), controle de contaminação e operação de equipamentos ou realizar atividades específicas.

Para a produção de medicamentos não estéreis, as áreas de produção não são áreas limpas, então não é necessária a classificação quanto a contagem de partículas viáveis e não viáveis; no entanto, essas áreas devem sempre ser projetadas e mantidas como áreas controladas que tenham condições e procedimentos definidos, controlados e monitorados para prevenir degradação e contaminação dos produtos produzidos, de modo que atendam a grau D nas condições em repouso (Anvisa, 2013).

A fim de limitar a entrada de contaminantes na produção de produtos não estéreis, as áreas produtivas devem normalmente ser mantidas a uma pressão positiva em relação ao ambiente exterior. Produtos na forma sólida,

como comprimidos e cápsulas, exigem sistemas de contenção de pós e o corredor deve ser mantido em pressão superior à da sala de produção, que é superior a pressão atmosférica. Para medicamentos líquidos ou semissólidos os requerimentos de diferenciais de pressão são menos críticos, porém são necessários fluxos adequados para evitar contaminação cruzada (Anvisa, 2013). O controle microbiológico das áreas produtivas é essencial, logo são necessárias instalações que previnam a entrada de microrganismos pelo ar e procedimentos de paramentação de operadores e descontaminação de materiais para controlar a quantidade de microrganismos introduzidos nas áreas produtivas (Anvisa, 2013).

## Formas Farmacêuticas Sólidas

As formas farmacêuticas sólidas são as mais utilizadas, pois têm maior estabilidade, pelo baixo teor de umidade; são de fácil transporte e armazenagem por ocupar menor volume do que as formas líquidas; mascaram o sabor desagradável que um fármaco possa ter; possibilitam obter formas gastroresistentes ou de liberação prolongada; proporcionam facilidade de administração pelo paciente por serem unitárias; oferecem facilidade no escalonamento; e possibilitam transposição de escala, permitindo uma produção industrial utilizando tecnologias convencionais (Aulton & Taylor, 2016).

As formas farmacêuticas sólidas incluem os pós, granulados, *pellets*, drágeas, cápsulas e comprimidos, revestidos ou não, de liberação convencional ou modificada (Patel, Kaushal & Bansal, 2006). No caso dos medicamentos fitoterápicos industrializados, destacam-se como formas farmacêuticas as cápsulas, os comprimidos e os comprimidos revestidos. Um levantamento do número de fitoterápicos com registro ativo no Brasil, realizado em 2011, mostrou que a maioria dos registros era de sólidos. Dos 382 fitoterápicos (357 medicamentos simples e 25 compostos) registrados naquele ano, 42% eram cápsulas e 25% eram comprimidos (Perfeito, 2012), diferença que se explica pela complexidade de obter comprimidos quando as características de fluxo e de compressibilidade do material são limitantes.

Apesar de todas as vantagens, o desenvolvimento e a produção de sólidos fitoterápicos a partir de extrato seco vegetal é um desafio complexo e extenso, e um dos primeiros desafios é obtenção do extrato seco. A depender da técnica empregada e dos parâmetros dos equipamentos, o produto pode apresentar diferentes características, como granulometria, morfologia, higroscopicidade e fluxo, que impactam diretamente no processamento desses materiais para a

obtenção da forma farmacêutica final. As mudanças desses parâmetros afetam a reologia, e a estabilidade dos pós é importante para a produção industrial de formas farmacêuticas sólidas.

De modo geral, os extratos secos vegetais são pós finos, leves, higroscópicos e pouco compressíveis. A dimensão reduzida (baixa granulometria) acarreta problemas de fluxo e causa aumento da superfície específica, originando um comportamento desfavorável quanto à umidade. Adicionalmente, muitos constituintes vegetais são sensíveis ao calor (Oh *et al.*, 2019). Desse modo, a seleção de tipo e constituintes da forma farmacêutica e as etapas do processo devem ser aprimoradas de modo a garantir a estabilidade e eficácia do medicamento fitoterápico.

### Aspectos gerais da produção de formas farmacêuticas sólidas

O ponto inicial para a produção de cápsulas e comprimidos fitoterápicos é o material particulado. O Ifáv é misturado com os adjuvantes farmacotécnicos (excipientes) e submetido aos processos de granulação, seguida ou não de encapsulação ou compressão; ou encapsulação; ou compressão.

Os adjuvantes podem ser usados com finalidades tecnológicas, biofarmacêuticas, para estabilização ou relacionadas às características organolépticas. Como excipientes específicos de formas sólidas, pode-se citar os diluentes, aglutinantes, desintegrantes, lubrificantes e materiais de revestimento (Allen, Popovich & Ansel, 2007). No Quadro 2 apresentam-se os principais adjuvantes empregados, finalidades e exemplos.

A primeira etapa do processo produtivo comum a todas as formas sólidas é a etapa de mistura, que leva à distribuição ao acaso das diferentes partículas do sistema. De modo geral, a mistura de pós dá-se pela movimentação das partículas pela combinação de um ou mais mecanismos, a depender do tipo de misturador utilizado. As principais variáveis que interferem nas forças de movimento e inércia das partículas são a distribuição de tamanho, a densidade e a morfologia. Em especial, a diferença de tamanho entre as partículas pode levar a um processo de segregação que consiste na desmistura. A rugosidade e as diferenças na morfologia podem levar a um aumento do atrito e a uma redução do movimento de escoamento, que também causam ineficiência na mistura. Nos extratos secos, com elevada higroscopicidade, pode ocorrer agregação das partículas que alteram a distribuição do tamanho, interferem nas forças coesivas e interparticulares, o que prejudica o movimento e o processo de mistura.

Quadro 2 – Excipientes usados em formas farmacêuticas sólidas

Tipo de adjuvantes	Finalidade	Exemplos
Diluentes	Produzir volume, melhorar o fluxo e favorecer a compressibilidade.	Lactose, manitol, celulose microcristalina, amido, sorbitol
Desintegrante	Desintegrar o comprimido em partículas menores.	Amido, lactose, crospovidona
Aglutinante	Promover a adesão de partículas/granulados destinados a compressão.	Gelatina, amido, derivados da celulose
Deslizante	Melhorar as propriedades de fluxo.	Sílica coloidal, talco
Lubrificante	Reduzir a fricção e a adesão durante a compressão.	Estearato de magnésio, estearato de cálcio
Agente de revestimento	Proteger contra oxidação ou umidade, modificar liberação, e mascarar o sabor ou a estética.	Invólucro que é constituído de diversas substâncias, como sacarose (drágea); etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose (pelicular)

Fonte: Allen, Popovich & Ansel, 2007.

Os misturadores (equipamentos) são móveis ou fixos com elementos de agitação. Os móveis, como os misturadores cúbicos de tipos V ou Y, fazem um movimento de rotação no seu próprio eixo que promove o contínuo escoamento do material particulado em planos de deslocamento que se sobrepõem de maneira aleatória. Os misturadores de cuba fixa, como os misturadores sigma, espiral e planetário, têm um elemento de agitação que promove a movimentação das partículas e garante a mistura. Esses misturadores têm, como desvantagem, pontos mortos, os quais o elemento de agitação não alcança, e as dificuldades de limpeza, em razão das diversas reentrâncias. Entretanto, são úteis na mistura úmida, na qual se forma uma massa densa e pesada que necessita de uma força motriz (Aulton & Taylor, 2016).

A mistura úmida é uma das etapas do processo de granulação, que consiste na agregação ordenada das partículas de modo a melhorar o fluxo, padronizar o tamanho (evitando a segregação) e otimizar as propriedades de compressão. No processo clássico de granulação via mistura úmida, é formada uma massa a partir da mistura seca dos pós, pela adição de um líquido de granulação com ou sem agente aglutinante. Essa massa é desagregada em grânulos que são

secos e calibrados quanto ao tamanho (Couto, Ortega & Petrovick, 2000). Utilizam-se diferentes equipamentos, podendo haver um para cada etapa ou equipamentos multifuncionais. Dentre eles destaca-se o *high shear* (granulação por alto cisalhamento), formado por uma cuba fixa, uma pá agitadora que promove a mistura úmida e um cortador que vai formando os grânulos. O leito fluidizado também pode ser considerado um equipamento multifuncional, no qual os grânulos são produzidos pelo mecanismo de agregação a partir da aspersão do líquido de granulação sobre as partículas em movimento e da secagem dos grânulos pelo fluxo de ar quente, que é também o agente responsável pela mistura (Aulton & Taylor, 2016).

O outro processo de granulação é por via seca. A mistura seca de pós é submetida a uma pressão que leva à agregação das partículas. Esse material é desagregado (granulado) e calibrado. Utiliza-se um rolo compactador. A mistura seca é forçada a passar entre dois cilindros rotativos que se ajustam de forma a compactar as partículas em placas. Ainda no mesmo equipamento, o material é desagregado por moagem, e as partículas resultantes são calibradas em um tamanho definido (Qiu, Chen & Zhang, 2009). As vantagens da granulação seca consistem na ausência de líquido e na dispensa de aquecimento para a secagem, que pode levar à decomposição. Entretanto, é um reprocesso no qual o produto é submetido, por duas vezes, à deformação por força de compressão. Soares e colaboradores (2005) avaliaram a influência de parâmetros da granulação por via seca em rolo compactador e em máquina de compressão nas propriedades de grânulos e comprimidos contendo extrato de *Maytenus ilicifolia*. A recompactação do material resultou em um produto com maior resistência à deformação e à compressão. Os grânulos são considerados uma forma farmacêutica definitiva ou podem ser encapsulados ou comprimidos. A compressão é um dos principais objetivos do processo de granulação.

## Cápsulas

Cápsulas são preparações farmacêuticas constituídas de um invólucro de natureza, forma e dimensões variadas, que contêm substâncias medicamentosas. Normalmente, o envoltório é de gelatina e podem ser classificadas como duras ou moles. As cápsulas duras são as principais formas farmacêuticas sólidas para fitoterápicos. As partes do envoltório (corpo e tampa) são produzidas em uma dispersão de gelatina (hidroxipropilmetilcelulose, carragenana ou pullulan) e de outros componentes, tais como conservantes,

corantes e/ou opacificantes em água. As cápsulas duras são usadas para a encapsulação de materiais sólidos e apresentam uma flexibilidade de formulação maior do que os comprimidos, tendo em vista que não é necessária a compactação das partículas. Entretanto, a homogeneidade da mistura e as propriedades de fluxo e de escoamento são críticas, pois o encapsulamento industrial implica o escoamento livre do pó para o interior das cápsulas alinhadas no equipamento (Allen, Popovich & Ansel, 2007). No Quadro 3, exemplificam-se produtos fitoterápicos registrados na Anvisa sob a forma de cápsula dura.

Quadro 3 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados sob a forma de cápsula dura

Nomes científicos e populares	Composição
<i>Cynara scolymus</i> L. (alcachofra)	Extrato seco de folhas de <i>C. scolymus</i> – 300 mg (equivalente a 6 mg de derivados do ácido cafeoilquínico expressos em ácido clorogênico). Excipientes: amido, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, maltodextrina.
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench (equinácea)	Extrato seco de <i>E. purpurea</i> – 200 mg [6 mg (3%) de fenóis totais]. Excipientes: celulose + lactose, álcool isopropílico, lactose, dióxido de silício, estearato de magnésio e croscarmelose sódica.
<i>Polypodium leucotomos</i> Poirlet (samambaia)	Extrato seco de <i>P. leucotomos</i> – 50 mg (equivalente a 1,65 mg de conteúdo de fenóis). Excipiente: amido.
<i>Senna alexandrina</i> Mill. (sene)	Extrato seco de <i>S. alexandrina</i> Mill. – 100 mg (equivalente a 10 mg de derivados hidroxiantracênicos). Excipiente: amido.
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn. (cardo-mariano)	Extrato seco de frutos de <i>S. marianum</i> – 254mg (equivalente a 148,21mg de silimarina). Excipientes: lactose, celulose microcristalina e dióxido de silício.

As cápsulas moles têm, na sua composição, material plastificante e são empregadas para a encapsulação de materiais líquidos, geralmente oleosos. Poucas indústrias dispõem de tecnologia para a obtenção desse produto e existem poucos medicamentos fitoterápicos registrados na Anvisa sob essa apresentação (Quadro 4).

Quadro 4 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados sob a forma de cápsula mole

Nomes científicos e populares	Composição
<i>Borago officinalis</i> L. (borracha-chimarrona)	Óleo de <i>B. officinalis</i> – 900 mg (equivalente a 180 mg de ácido gama-linolênico). Excipientes: óleo de gérmen de trigo e acetato de dl- $\alpha$ -tocoferol.
<i>Hypericum perforatum</i> L. (hipérico)	Extrato seco de <i>H. perforatum</i> L. – 300 mg (0,3% de hiperquinas totais). Excipientes: óleo e lecitina de soja.
<i>Valeriana officinalis</i> L. (valeriana)	Extrato seco de <i>V. officinalis</i> L. – 215mg (padronizado em 0,8% de ácidos sesquiterpênicos). Excipientes: óleo e lecitina de soja, cera branca e aroma de menta.

## Comprimidos

Os comprimidos são formas farmacêuticas sólidas obtidas por compactação de uma formulação com substâncias ativas preparadas com adjuvantes que auxiliam no processo de fabricação e melhoram as propriedades do produto. Eles variam no tamanho, forma, peso, dureza, espessura, desintegração e dissolução, a depender do uso e método de fabricação. São produzidos por meio de compressão direta ou após a granulação (por via úmida ou por via seca). A compressão direta é o método de escolha para obtenção de comprimidos por envolver o menor número de etapas (mistura e compressão). Os processos de granulação melhoram as propriedades de fluxo e adesão interparticular e, por isso, favorecem a compressão. Após a formação e secagem dos grânulos ocorre a mistura com adjuvantes, como, por exemplo, os lubrificantes e, por vezes, desintegrantes, e então o material é comprimido (Lachman, Lieberman & Kanig, 2001).

A apresentação de fitoterápicos na forma de comprimidos simples não é muito comum, devido à alta higroscopicidade e às dificuldades em relação à homogeneidade da cor entre os lotes de extrato seco. No Quadro 5 apresentam-se exemplos de medicamentos fitoterápicos na forma de comprimidos simples.

Quadro 5 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados sob a forma de comprimido simples

Nomes científicos e populares	Composição
<i>Cynara scolymus</i> L. (alcachofra)	Extrato seco de <i>C. scolymus</i> L. – 200 mg [padronizado em 4,5 mg (2,25%) de derivados de ácido cafeoilquínico]. Excipientes: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, dióxido de silício, talco e estearato de magnésio.
<i>Pinus pinaster</i> Aiton (pinheiro-bravo)	Extrato seco de <i>P. pinaster</i> Aiton – 50 mg (equivalente a 35 mg de procianidinas). Excipientes: amido de milho, celulose microcristalina, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, lauril sulfato de sódio, amidoglicolato de sódio.
<i>Valeriana officinalis</i> L. (valeriana)	Extrato seco de <i>V. officinalis</i> L. – 40 mg [padronizado em 0,32 mg (0,8%) de ácidos sesquiterpênicos].
<i>Crataegus oxyacantha</i> L. (biancospino)	Extrato seco de <i>C. oxyacantha</i> L. – 30 mg [padronizado em 0,54 mg (1,8%) de flavonoides].
<i>Passiflora incarnata</i> L. (maracujá)	Extrato seco de <i>P. incarnata</i> L. – 50mg [padronizado em 0,0575mg (0,115%) de vitexina e 2mg (4%) de flavonoides totais]. Excipientes: dióxido de silício, croscarmelose, celulose microcristalina + lactose, estearato de magnésio.

### Comprimidos revestidos

O revestimento de comprimidos tem diferentes motivações, como mascaramento das características organolépticas (sabor, odor ou cor), proteção física e química do ativo contra fatores externos e contra a natureza do trato gastrointestinal (como comprimidos gastrorresistentes), melhora do aspecto e *marketing*. Considerando os produtos fitoterápicos, o revestimento melhora as características de higroscopicidade do extrato seco e, portanto, a sua estabilidade. Os extratos secos podem variar ligeiramente na coloração por ser um produto natural e não necessariamente uniforme. O revestimento garante homogeneidade e padronização de cor da forma.

O revestimento pode ser do tipo drageamento, quando é açucarado. Esse processo é realizado em várias etapas que incluem a aplicação de diferentes camadas de xarope. No outro tipo, o peliculado, utilizam-se materiais poliméricos. Esse processo é mais simples que a formação de drágeas e, muitas vezes, mais funcionais, pois empregam polímeros com finalidades específicas (Zaid, 2020; Allen, Popovich & Ansel, 2007).



Apesar de adicionar outra etapa na produção de comprimidos, os benefícios do revestimento para os fitoterápicos são evidentes em relação à estabilidade físico-química do produto final. No Quadro 6 apresentam-se exemplos de medicamentos fitoterápicos registrados na Anvisa sob a forma de comprimidos revestidos.

Quadro 6 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados sob a forma de comprimido revestido

Nomes científicos e populares	Composição
<i>Actaea racemosa</i> L. (erva-de-são-cristóvão)	Extrato seco de <i>A. racemosa</i> L. – 160 mg (padronizado em 2,5% de glicosídeos triterpênicos). Excipientes: celulose microcristalina, talco, hipromelose e polietilenoglicol, dióxido de titânio, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, dióxido de silício, etilcelulose, amarelo quinoleína.
<i>Cynara scolymus</i> L. (alcachofra)	Extrato seco padronizado de alcachofra (3:1) – 335 mg [equivalente a 2,1% ou 7 mg de derivados cafeoilquínicos]. Excipientes: amido, lactose, carbonato de cálcio, estearato de magnésio, ácido esteárico, Eudragit®, cera de carnaúba.
<i>Ginkgo biloba</i> L. (ginkgo)	Extrato seco hidroalcoólico das folhas de <i>G. biloba</i> – 120 mg (padronizado em 28,8 mg (22-27%) de ginkgoflavonoides determinados como quercetina, kaempferol e isorhamnetina e 7,2 mg de terpenolactonas [ginkgolídeos A, B, C, J e bilobalídeos]). Excipientes: celulose microcristalina, estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal, lactose e Opadry®.
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn. (cardo-mariano)	Extrato seco do fruto de <i>S. marianum</i> (L.) Gaertn. – 120 mg (equivalente a 70 mg de silimarina). Excipientes: amido, dióxido de silício, estearato de magnésio, lactose, croscarmelose sódica, corante óxido de ferro marrom, dióxido de titânio, hipromelose, macrogol, álcool etílico.

### Controle da qualidade de fitoterápicos sob a forma farmacêutica sólida

Além da avaliação do teor do marcador, conforme a monografia específica do fitoterápico, realizam-se, nas formas sólidas, os ensaios de peso médio e de desintegração para cápsulas e comprimidos, dureza e friabilidade para comprimidos. A investigação da umidade também é um parâmetro importante para comprimidos revestidos.

Os estudos de dissolução, preconizados para medicamentos sintéticos em formas farmacêuticas sólidas, são um ensaio de controle da qualidade que contribui para o desenvolvimento de formulações e pode ser relacionado com a biodisponibilidade. As especificações desse ensaio devem estar descritas na monografia do medicamento, o que não é comum para fitoterápicos. Apesar de importante, o uso dos testes de dissolução em fitoterápicos na avaliação de produtos naturais ainda é incipiente. Alguns estudos têm como objetivo desenvolver e validar ensaios de dissolução, como, por exemplo, o estudo o estudo de comprimidos contendo extrato seco de *Ximenia americana* (Santana *et al.*, 2018).

## Formas Farmacêuticas Líquidas

Desde o início das práticas de saúde com plantas medicinais, as preparações líquidas de drogas vegetais desempenham um papel importante no cenário terapêutico. Os chás medicinais estão entre as formas mais simples de preparo e uso dessas drogas, obtidos a partir da extração dos componentes ativos das plantas com água quente como solvente, por infusão ou decocção. Além da água, outras substâncias são historicamente empregadas como solventes na obtenção de preparações vegetais de uso tradicional, como, por exemplo, vinagres e bebidas alcoólicas. Tradicionalmente, vinho e cachaça, constituindo as chamadas garrafadas, sempre estiveram presentes na cultura popular brasileira até os dias de hoje. De acordo com as características de cada droga vegetal e sua finalidade, as soluções extrativas vegetais podem ser administradas por via oral ou tópica (como banhos e compressas).

As drogas vegetais tornaram-se matéria-prima da farmácia magistral e da indústria farmacêutica para a elaboração de medicamentos sob diversas formas farmacêuticas. As soluções são as formulações mais antigas e ainda constituem uma importante forma de apresentação para fitoterápicos. Por definição, solução é a forma farmacêutica líquida, límpida e homogênea, que contém um ou mais princípios ativos dissolvidos em um solvente adequado ou numa mistura de solventes miscíveis (Brasil, 2012). Podem ser administrados por diversas vias e diferem quanto à composição, o que as faz receberem outros nomes, como xarope, elixir, espírito e tintura (Murdan, 2016). Elas oferecem vantagens em relação às formas sólidas, como rápida absorção após administração oral, já que o fármaco está dissolvido, e a fácil administração, principalmente para idosos e crianças, que apresentam maior dificuldade de deglutição (Murdan, 2016).

No que diz respeito às suas desvantagens, destaca-se a instabilidade de alguns fármacos quando em solução, principalmente se o solvente for a água. Além disso, os líquidos são mais volumosos e mais caros para transporte, quando comparados com as formas farmacêuticas sólidas. A água é o veículo mais usado nas soluções por ser atóxica e ter baixo custo. Na fabricação de fitoterápicos, é utilizada água purificada, de acordo com a legislação específica vigente (Murdan, 2016; Brasil, 2021).

Em razão da natureza dos constituintes, as soluções são susceptíveis ao crescimento microbiano, o que requer o uso de conservantes para prevenir sua degradação. Os mais usados são benzoato de sódio, sorbato de potássio e metilparabeno em concentrações que variam na faixa de 0,1 a 0,2% (p/p) (Boukarim *et al.*, 2009).

Nas soluções de uso oral, podem ser empregados ingredientes para melhorar a palatabilidade, os flavorizantes, que podem ser naturais (por exemplo, óleos essenciais) ou artificiais (álcoois aromáticos, aldeídos, bálsamos, fenóis, terpenos) (Balbani, Stelzer & Montovani, 2006). Outros excipientes podem estar presentes para atender aos requisitos específicos de cada formulação, como cossolventes, corantes, edulcorantes, antioxidantes, quelantes, acidificantes, alcalinizantes, tampões e doadores de viscosidade (Murdan, 2016). No Quadro 7, apresentam-se exemplos de fitoterápicos registrados sob a forma de solução.

Quadro 7 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados como soluções

Nomes científicos e populares	Composição (cada 1 mL contém)
<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul. (mama-cadela)	Seiva de <i>B. gaudichaudii</i> – 200 mg, equivalente a um mínimo de 10 mg de psoraleno e 12 mg de bergapteno. Excipientes: fenol cristalizado e álcool purificado.
<i>Passiflora incarnata</i> L. (maracujá)  <i>Crataegus oxyacantha</i> L. (crataego)  <i>Salix alba</i> L. (salgueiro-branco)	Extrato fluido de <i>P. incarnata</i> – 0,10 mL, alcoolato de <i>C. oxyacantha</i> – 0,07 mL, extrato mole de <i>S. alba</i> – 0,05 g. Excipientes: açúcar, glicerina, metilparabeno, propilparabeno, ácido cítrico, água e corante caramelo.

Quadro 7 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados como soluções (cont.)

Nomes científicos e populares	Composição (cada 1 mL contém)
<i>Pelargonium sidoides</i> DC. (kaloba ou gerânio sul-africano)	Extrato de raízes de <i>P. sidoides</i> – 825 mg. Veículo: glicerol.
<i>Peumus boldus</i> Molina (boldo-do-chile)  <i>Rhamnus purshiana</i> D.C. (cáscara sagrada);  <i>Rheum palmatum</i> L. (ruibarbo)	206 mg de extrato fluido composto de boldo, cáscara-sagrada e ruibarbo – 206 mg, calculado para conter: boldina (0,016 mg, cascarosídeo 2,26 mg, reína 0,006 mg). Excipientes: sorbitol, ácido benzoico, propilenoglicol, ácido ascórbico, sacarose, ácido cítrico, metabissulfito de sódio, essência de mentoliptus, caramelo, álcool etílico.

### Aspectos gerais da produção de formas farmacêuticas líquidas

Assim como na produção de qualquer medicamento, não se pode negligenciar os procedimentos que influenciam a qualidade final de um produto fitoterápico. A formulação de soluções, embora seja um processo mais simples em comparação com outras formas farmacêuticas e dependa essencialmente da escolha do solvente mais adequado para uma determinada matéria-prima ativa, impõe muitos problemas técnicos para o farmacêutico industrial, uma vez que alguns ativos são instáveis, e essa característica aumenta quando está em solução. Os problemas mais comuns encontrados em fitoterápicos líquidos são alterações das propriedades organolépticas, como cor e odor, que estão relacionadas com a exposição à luz, ao calor e ao oxigênio atmosférico. Também é comum a precipitação – neste caso, pode haver influência do sistema de solventes (Yano *et al.*, 2014).

Muitas substâncias naturais são termossensíveis, e, por isso, é fundamental o controle da temperatura durante a produção e o armazenamento. Esse controle é particularmente importante para xaropes. Caso a espécie utilizada tenha substâncias termolábeis ou voláteis, devem ser evitados métodos de preparo que envolvam aquecimento.

A incorporação de tintura a um sistema de solventes que apresente solubilidade muito diferente da sua leva à precipitação do soluto. Soluções com menor teor alcoólico são indicadas para espécies vegetais ricas em substâncias

hidrossolúveis. No caso de substâncias pouco solúveis em água, deve ser usado álcool de maior graduação. Outra questão a ser observada quando se usa água como solvente é a possibilidade de degradação de substâncias por hidrólise.

Os fitoterápicos sob a forma líquida devem ser acondicionados em frascos bem fechados, para evitar exposição ao ar, e preferencialmente escuros, para evitar a degradação pela luz.

## Xaropes

Os xaropes são soluções que contêm pelo menos 45% (p/p) de sacarose (ou outros açúcares) em sua composição (Brasil, 2011). Têm elevada viscosidade e sabor doce, tendo papel edulcorante em formulações. Podem ser adicionados a eles flavorizantes e conservantes (Balbani, Stelzer & Montovani, 2006; Anvisa, 2011).

Para pessoas com restrição ao consumo de açúcar, como os diabéticos, é possível recorrer a formulações com substâncias não glicogênicas. Nesse caso, podem ser empregados polímeros para dar viscosidade à formulação, como o alginato de sódio, Carbopol® 934P, carboximetilcelulose sódica e goma xantana. O sabor doce será conferido pelo uso de edulcorantes artificiais como sacarina e sorbitol (Lubi, Sato & Gaensly, 2003). No Quadro 8 apresentam-se exemplos de fitoterápicos registrados na Anvisa sob a forma de xaropes e sua composição.

Os xaropes podem ser obtidos por mais de um método, que varia conforme as características físico-químicas dos componentes. Entre as possibilidades estão: dissolução dos componentes sob aquecimento, não indicado para drogas vegetais com substâncias termolábeis; dissolução da matéria-prima sem aquecimento, no caso de ser um extrato seco, ou mistura dos componentes líquidos, no caso de matéria-prima líquida, como as tinturas; acréscimo de sacarose a um líquido medicinal já preparado, como infuso ou decocto da droga vegetal; percolação, pela passagem do solvente através da sacarose e recolhimento do xarope à medida em que este açúcar é solubilizado na água (Castro *et al.*, 2002).

Quadro 8 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados sob a forma de xarope

Nomes científicos e populares	Composição (cada 1 mL contém)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (alcaçuz)	Extrato seco das raízes de <i>G. glabra</i> – 108 mg (equivalente a 6 mg de ácido glicirrizínico). Excipientes: água, glicerol, xarope de sacarose, sacarina, aromas e sorbato de potássio.
<i>Hedera helix</i> L. (hera)	Extrato seco de folhas de <i>H. helix</i> – 15 mg (equivalente a 1,5 mg de hederacosídeo C). Excipientes: sorbitol, benzoato de sódio, sorbato de potássio, ácido cítrico, goma xantana, glicerol, aromas e água deionizada.
<i>Mikania glomerata</i> Spreng. (guaco)	Extrato hidroalcoólico de folhas de <i>M. glomerata</i> – 0,1 mL (equivalente a 0,035 mg de cumarinas). Excipientes: sorbato de potássio e xarope de sacarose.
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench (equinácea)	Extrato seco de inflorescências de <i>E. purpurea</i> – 40 mg, padronizado em 1,2 mg (3%) de fenóis totais, expressos em ácido chicórico. Excipientes: glicerol, metilparabeno, aroma de caramelo, aroma de framboesa, água.
<i>Mikania glomerata</i> Spreng. (guaco)  <i>Polygala senega</i> L. (polígala)  <i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stoves (ipecacuanha)	Extrato de <i>M. glomerata</i> – 0,00833 mL; extrato de <i>P. senega</i> – 0,00833mL; extrato de <i>P. ipecacuanha</i> – 0,00043 mL. Excipientes: alcoolatura de <i>Nasturtium officinale</i> W.T. Aiton, soluto de <i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms, extrato de <i>Aconitum napellus</i> L., sacarose, mel, etanol, benzoato de sódio, metilparabeno e água.

## Elixires

O termo elixir é atribuído a soluções alcoólicas líquidas edulcoradas; entretanto, frequentemente, é utilizado comercialmente em soluções orais com quantidade significativa de álcool como solvente, mas não edulcoradas (Murdan, 2016). No Quadro 9 são apresentados exemplos de fitoterápicos registrados na Anvisa sob a forma de elixires e sua composição.

Quadro 9 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro apresentados sob a forma de elixir

Nomes científicos e populares	Composição
<i>Salix alba</i> L. (salgueiro-branco)	Extrato seco de 5 a 6% de cascas de <i>S. alba</i> – 600 mg [padronizado em 30 (5%) a 36 mg (6%) de salicina]. Excipientes q.s.p 15 mL [metilparabeno, propilparabeno, corante caramelo, etanol (8%), propilenoglicol, sacarose e água].
<i>Solanum paniculatum</i> L. (jurubeba)  <i>Peumus boldus</i> Molina (boldo-do-chile)	Extrato fluido de <i>S. paniculatum</i> – 0,75 ml; extrato fluido de <i>P. boldus</i> – 0,25 ml. Excipientes: elixir simples q.s.p 5 mL.

Outras formas de apresentação das soluções farmacêuticas fitoterápicas

Os *sprays* são formados a partir de soluções acondicionadas em frascos nebulizadores. Assemelham-se aos aerossóis, entretanto o diâmetro das microgotas é maior e não usam um gás propelente. Podem ser considerados *nevoeiros molhantes*. Em fitoterapia os *sprays* são utilizados para administrar antissépticos usados na cavidade oral, como o de romã (*Punica granatum* L.), indicado como aromatizante bucal para combater o mau hálito.

Controle da qualidade de fitoterápicos sob a forma farmacêutica líquida

No *Guia de Orientação para Registro de Medicamento Fitoterápico e Registro e Notificação de Produto Tradicional Fitoterápico* (Brasil, 2014c), ficam estabelecidos os testes necessários para fitoterápicos apresentados sob várias formas farmacêuticas. Para a forma farmacêutica líquida, são exigidos descrição (avaliação de cor, odor, sabor etc.), pH, teor (análise do marcador), uniformidade de doses unitárias e, quando aplicáveis, devem ser realizados testes de viscosidade, densidade relativa e conteúdo de sacarose.

## Formas Farmacêuticas Semissólidas

As formas farmacêuticas semissólidas constituem uma proporção significativa das formas farmacêuticas e, apesar da aplicação de substâncias medicinais na pele ser uma prática antiga, são as menos encontradas em fitoterápicos industrializados (Maqbool *et al.*, 2017). Elas são de fácil aplicação e destinam-se ao uso dérmico ou em mucosas, para exercer efeito local. Entretanto, podem também apresentar efeito sistêmico e devem ser usadas com cautela por gestantes e nutrizes devido à possibilidade de absorção do ativo e distribuição para a circulação geral (Allen, Popovich & Ansel, 2007). Os fitoterápicos encontrados nessas formas têm sido desenvolvidos para o tratamento principalmente de dermatites, dor e inflamação (Maqbool *et al.*, 2017; Couto, Vitorino & Silva, 2010).

O Brasil tem uma das mais ricas floras do mundo, o que facilita a busca de plantas medicinais e seus insumos com aplicabilidade em formulações dérmicas. O anti-inflamatório tópico baseado em *C. verbenacea* foi o primeiro medicamento 100% nacional e resultou em menos efeitos colaterais quando comparado ao creme de diclofenaco (Mendes & Freitas, 2014).

As preparações semissólidas constituem as seguintes formas farmacêuticas: cremes, géis, pomadas ou pastas, cada qual com suas características, contendo um ou mais ingredientes ativos dissolvidos ou uniformemente dispersos (Maqbool *et al.*, 2017). É importante que tenham capacidade de adesão no local de aplicação para exercer seus efeitos.

### Aspectos gerais da produção de formas farmacêuticas semissólidas

Os semissólidos costumam ser formulações complexas. Além dos excipientes mais comuns, como conservantes, antioxidantes e solubilizantes, os seus constituintes básicos são os emulsionantes, emolientes, doadores de viscosidade, gorduras, óleos, ceras e umectantes. A escolha dos excipientes depende da forma farmacêutica, das características de solubilidade e da estabilidade do material vegetal, da estabilidade da formulação, da necessidade de oclusão da pele e de penetração e da permeação ou absorção do ativo (Maqbool *et al.*, 2017).

Os fitoterápicos semissólidos são elaborados a partir da incorporação de produtos como tinturas, extratos fluidos, extratos moles, extratos secos, alcoolaturas, óleos essenciais e outros que, devido às suas características e solubilidades, serão incorporados na forma de suspensão, solução ou emulsão à base semissólida hidro ou lipofílica (Couto, Vitorino & Ortega, 2010; Simões *et al.*, 2010). Em razão da pouca solubilidade de alguns compostos na



base, os extratos podem ser levigados com cossolvente, como propilenoglicol, polietilenoglicol, etanol, glicerina, antes da incorporação em bases como géis e cremes baseados na emulsão de ativos oleosos em base aquosa (Couto, Vitorino & Ortega, 2010).

As propriedades físicas dos semissólidos dependem do tamanho das partículas dispersas, da tensão interfacial entre as fases, do coeficiente de partição do ingrediente ativo entre as fases e da reologia do produto. Esses fatores combinados determinam as características de liberação do fármaco, assim como a viscosidade (Maqbool *et al.*, 2017). Por exemplo, o estado físico do extrato a ser adicionado pode alterar a viscosidade do produto final: extratos fluidos tendem a diminuir a viscosidade do produto, enquanto os secos tendem a aumentá-la. É importante verificar se tais alterações são desejáveis, pois afetam a espalhabilidade do produto e a fluidez (Simões *et al.*, 2010).

Os semissólidos não se misturam com facilidade. Os materiais que se depositam em cantos mortos do misturador permanecerão retidos nesses locais. Portanto, o ideal é que o misturador tenha pouco espaço entre os elementos rotatórios e as paredes do recipiente de mistura, assim como produza um alto grau de cisalhamento na mistura. Muitas vezes, após a mistura primária, o material passa por um moinho para as partículas serem transformadas em pasta ou pomada, ou reduzir o tamanho das gotas da fase interna de um creme, devido ao grau de cisalhamento gerado pelos equipamentos (Twitchell, 2016).

Alguns parâmetros da fabricação, como a ordem de adição dos insumos, o método utilizado, o tempo e a velocidade de mistura e os controles de temperatura, influenciam a estabilidade e o desempenho de um produto tópico (Maqbool *et al.*, 2017). A seguir, discutem-se esses parâmetros:

- ordem de adição dos insumos – a maior parte dos excipientes tem um método de incorporação numa formulação. Em geral, as formulações tópicas compreendem uma ou mais fases. As emulsões, por exemplo, compreendem uma fase aquosa e outra oleosa. Nesse caso, a adição dos componentes deve ocorrer na fase em que são solúveis, e muitos devem ser previamente solubilizados ou dispersos para garantir a estabilidade global. Os conservantes, como os parabenos, devem ser adicionados imediatamente antes da emulsificação para reduzir o tempo em contato com tensoativos solúveis em água sob temperaturas elevadas. Alguns polímeros devem ser dispersos e hidratados antes da adição de outros ingredientes, como as gomas (xantanas) e os carbômeros, que devem ser adicionados lentamente para evitar a formação de grumos e garantir a hidratação completa do material.

Tais problemas podem ser evitados pelo uso de misturadores ou pela mistura prévia do carbômero num óleo ou da goma em glicerina ou outro umectante (Maqbool *et al.*, 2017);

- método, tempo e velocidade de mistura – é essencial determinar a quantidade necessária de cisalhamento e o melhor método e velocidade de mistura em todas as fases da produção e escala industrial. A emulsificação requer elevado cisalhamento ou homogeneização para a obtenção do tamanho de gotícula ótima e a dispersão, ao passo que a mistura de um gel geralmente requer baixo cisalhamento, a fim de preservar características físicas, como viscosidade; no entanto, a hidratação do polímero depende do grau de cisalhamento para dispersá-lo no meio. Se o processo necessitar de cisalhamento muito baixo, o polímero pode não ser completamente disperso e hidratado, o que resulta em uma viscosidade fora de especificação. A alteração de parâmetros ótimos na produção de um medicamento, como a viscosidade, acarreta alterações na sua eficiência (Maqbool *et al.*, 2017). A otimização do tempo de mistura requer a identificação do tempo mínimo necessário para dissolver os ingredientes e do tempo máximo de mistura antes de ocorrer algum problema, como a diminuição da viscosidade. O carbômero, polímero do ácido acrílico reticulado, tem alto peso molecular, portanto o excesso de mistura de alto cisalhamento pode quebrar a sua estrutura, diminuindo assim a viscosidade do gel. Em uma emulsão, o excesso de mistura pode fazer com que o produto se separe prematuramente, resultando numa diminuição drástica da viscosidade. A melhor taxa de fluxo, por sua vez, envolve a determinação da quantidade de cisalhamento ou da taxa de transferência necessária. Por exemplo, uma emulsão oleosa pode necessitar de uma velocidade de adição mais lenta do que uma emulsão tradicional, e a taxa de fluxo deve ser modificada de forma adequada (Maqbool *et al.*, 2017);
- controle da temperatura – a temperatura correta é um parâmetro crítico para o sucesso da produção. O excesso de calor na fabricação, por um lado, pode causar degradação química e precipitação de componentes solubilizados; por outro, o uso de calor insuficiente pode conduzir a falhas de lote. A falta de controle de temperatura na produção de emulsões é crítica se a temperatura da fase aquosa estiver mais fria do que a da fase oleosa: os componentes previamente fundidos da fase oleosa podem-se solidificar ao serem misturados na fase aquosa, e, assim, a emulsão não se formará adequadamente, resultando possivelmente em

matéria sólida no lote (Maqbool *et al.*, 2017). Na formulação de géis, é necessária a aplicação de baixas temperaturas na hidratação do material, e, muitas vezes, o baixo cisalhamento evita a degradação do polímero e a perda da estrutura, o que poderia afetar a viscosidade do produto final (Eccleston, 2016). As taxas de aquecimento e de refrigeração durante a produção devem ser estritamente controladas. À medida em que o aquecimento muito lento pode gerar rendimentos baixos pela perda por evaporação, quando ele ocorre de forma acelerada, algumas regiões do lote podem queimar em contato com a superfície de aquecimento, aumentando o risco de degradação e podendo resultar em precipitação ou cristalização de componente/s ou aumento da sua viscosidade (Maqbool *et al.*, 2017).

### Crems e pomadas

As pomadas e os cremes têm características plásticas e são destinadas à aplicação sobre a pele. As matérias-primas vegetais incorporadas abrangem as sólidas, como extratos secos e pós, e as líquidas, como soluções extrativas nos mais diversos sistemas solventes (Simões *et al.*, 2010). Exemplos de fitoterápicos registrados na Anvisa sob a forma de creme ou pomada estão no Quadro 10.

As emulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis, constituindo fases aquosa e oleosa. Uma fase está distribuída na forma de gotas (fase dispersa) dentro do outro líquido (fase contínua). Quando a fase oleosa está dispersa na fase aquosa (óleo em água – O/A), têm-se emulsões aquosas; quando a fase aquosa está dispersa na fase oleosa (água em óleo – A/O), têm-se emulsões oleosas. Por se tratar de sistemas termodinamicamente instáveis, é necessária a adição de emulsificadores (surfactantes ou tensoativos) para estabilizar e evitar a separação das fases (Eccleston, 2016). Os cremes são emulsões semisólidas usados para incorporar fármacos e cosméticos de uso tópico na pele ou mucosas (Mendes & Freitas, 2014), podem conter uma ou mais ativos dissolvidos ou dispersos e devem conter conservantes antimicrobianos devido à presença de água na formulação (Kumadoh & Ofori-Kwakye, 2017).

Quadro 10 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro registrados na Anvisa apresentados sob a forma de creme ou pomada

Nomes científicos e populares	Composição (1 grama contém)
<i>Cordia verbenacea</i> DC. (erva-baleeira)	<i>C. verbenacea</i> DC. (óleo essencial) – 5,0 mg (equivalente a 0,130 mg de alfa-humuleno). Excipientes: álcool cetosteárilico, ceteth, éter dicaprílico, esqualeno, carbonato de dicapríllil, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, edetato dissódico e água.
<i>Symphytum officinale</i> L. (confrei)	Extrato hidroalcoólico de raiz de <i>S. officinale</i> L. – 350 mg. Excipientes: Fenonip, álcool cetosteárilico, monoestearato de glicerila, lauril sulfato de sódio, óleos de amendoim, lavanda, pinheiro e água.
<i>Matricaria recutita</i> L. (camomila)	Extrato seco de <i>M. recutita</i> – 10 mg (equivalente a 0,1 mg de apigenina). Excipientes: água, álcool cetosteárilico etoxilado, óleo mineral, álcool de lanolina, vaselina sólida, estearato de octila, propilenoglicol, fosfato de amido, fenoxietanol, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, etilparabeno e edetato dissódico.
<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert (camomila)	Extrato fluido de <i>C. recutita</i> (L.) Rauschert – 100 mg. Excipientes: glicerol, álcoois de lanolina e cetosteárilico, vaselina branca, petrolato sólido, goma xantana, metilparabeno, essência de menta, tintura de mirra, óleo mineral, sacarina sódica, água.
<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul. (mama-cadela)	Seiva de <i>B. gaudichaudii</i> Trécul – 200 mg (equivalente a um mínimo de 10 mg de psoraleno e 12 mg de bergapteno). Excipientes: glicerina bidestilada, estearina branca tripla pressão, amônia e água destilada.

Na produção de cremes, a taxa do ciclo de aquecimento e resfriamento, a ordem de adição dos componentes e a extensão da mistura podem causar variações na consistência e no perfil reológico das emulsões resultantes (Eccleston, 2016). Para a produção de cremes contendo extratos vegetais, são usados os métodos de emulsificação, com a dissolução ou suspensão de extratos líquidos, concentrados ou secos. Após a mistura inicial das fases aquosa e oleosa, a emulsão pode ter seu tamanho das gotículas da fase interna reduzido por meio de homogeneizadores, misturadores do tipo turbina ou moinhos coloidais que geram grande tensão de cisalhamento. É importante manter a agitação contínua durante o resfriamento para evitar a demulsificação. Compostos voláteis, como óleos essenciais, devem ser adicionados após

o resfriamento da emulsão. Extratos ou tinturas alcoólicas podem influenciar na estabilidade da emulsão e devem ser diluídos ao máximo antes de serem adicionados, de forma lenta e sob agitação constante (Aulton & Taylor, 2016).

Alguns extratos podem apresentar atividade tensoativa pela presença de taninos, saponinas e polifenóis, que são anfífilos e podem proporcionar a quebra da emulsão ou inversão de fases. Tais problemas podem ser evitados utilizando tensoativos não iônicos em vez de iônicos (Simões *et al.*, 2010).

As pomadas são preparações semissólidas destinadas à aplicação na pele ou nas membranas mucosas e contêm ativos solubilizados ou dispersos em uma base (Brasil, 2011) que geralmente apresenta propriedades protetoras, emolientes e lubrificantes (Allen, Popovich & Ansel, 2007). As bases das pomadas são classificadas em quatro grupos:

- bases de hidrocarbonetos ou hidrofóbicas – quando aplicadas sobre a pele, produzem efeito emoliente, protegem contra a perda de umidade e agem como agentes oclusivos, não incorporam água. Exemplo: petrolato, vaselina;
- bases de absorção – substâncias gordurosas, como lanolina e petrolato hidrofílico, que permitem absorção de água, formando assim emulsão O/A. As emulsões oleosas também fazem parte dessa classificação;
- bases removíveis pela água – emulsões O/A;
- bases hidrofílicas – são hidrossolúveis, não contêm componentes oleosos, portanto não são oclusivas. Exemplo: polietilenoglicol (Allen, Popovich & Ansel, 2007).

Em linhas gerais, as pomadas são obtidas pela fusão da base ou processo de emulsificação em caso de emulsões A/O ou O/A e posterior incorporação do ativo, que pode estar solubilizado ou disperso. Elas são relativamente estáveis em comparação com as formas farmacêuticas líquidas; no entanto, a presença de materiais vegetais pode levar à rápida deterioração do produto, por isso é importante estabelecer a melhor condição de armazenamento (Kumadoh & Ofori-Kwakye, 2017).

As pastas são pomadas que contêm, pelo menos, 25% de pós dispersos na base (Brasil, 2011), que geralmente é gordurosa, mas também pode ser aquosa se for de uso tópico na cavidade oral, como é o caso das pastas dentais fitoterápicas, que devem conter apenas materiais seguros. A estabilidade dependerá do tipo de base e da natureza do material vegetal incorporado (Kumadoh & Ofori-Kwakye, 2017).

## Géis

Géis são sistemas semissólidos que consistem em suspensões de partículas inorgânicas ou grandes moléculas orgânicas que formam uma matriz polimérica tridimensional interpenetrada por um líquido, normalmente a água. São geralmente claras e homogêneas, e o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no gel (Williams, 2016). Apresentam melhor potencial como veículo para administrar um fármaco topicamente em comparação com os cremes e pomadas porque não são pegajosos, têm maior apelo cosmético, requerem baixa energia durante a produção e são estáveis (Bhagyasri, Gonzales & Petrovick, 2018). No Quadro 11 mostram-se exemplos de fitoterápicos registrados sob a forma de gel.

Quadro 11 – Exemplos de fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro registrados na Anvisa apresentados sob a forma de gel

Nomes científicos e populares	Composição (cada 1 grama contém)
<i>Arnica montana</i> L. (arnica)	<i>A. montana</i> – 2 mg (equivalente a 0,16-0,20 mg de lactonas sesquiterpênicas). Excipientes: água, propilenoglicol, carbômero, trolamina, imidazolidinilureia, edetato dissódico, metil e propilparabenos.
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (aroeira-vermelha)	Extrato aquoso de <i>S. terebinthifolius</i> – 0,666 mL. Excipientes: carbonato de sódio, carbopol, metilparabeno, butil-hidroxitolueno (BHT), álcool etílico, água de osmose reversa.
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) DC. (unha-de-gato)	Extrato de <i>U. tomentosa</i> – 50 mg (equivalente a 0,03-0,045 mg de alcaloides oxindólicos). Excipientes: água, fosfato de trilauro macrogol-4, ésteres de sorbitol, derivados do óleo de colza, copolímero do ácido sulfônico acriloilmetiltaurato e vinilpirrolidona, ácido cítrico, palmitato de isopropila; glicerina vegetal, óleo de rosa-mosqueta, metil e propilparabenos, edetato de sódio e tetradibutil pentaeritritil.
<i>Matricaria chamomilla</i> L. (camomila)	Extrato seco de <i>M. chamomilla</i> L. (0,03% de apigenina 7-glicosídeo) – 25 mg. Excipientes: hipromelose, metilparabeno, propilparabeno, sacarina sódica, dimeticona, propilenoglicol, aroma e água deionizada.

Os géis fitoterápicos para uso interno são denominados geleias; alguns destes apresentam na sua composição polpa de frutas, mas são registrados na Anvisa como medicamentos e têm indicação específica (Quadro 12).

Quadro 12 – Exemplos de medicamentos fitoterápicos no mercado farmacêutico brasileiro registrados na Anvisa apresentados sob a forma de geleia

Nomes científicos e populares	Composição (cada 1 grama contém)
<i>Senna alexandrina</i> Mill. (sene)	Extrato seco de <i>S. alexandrina</i> Mill. – 9 mg (45% senosídeos). Excipientes: polpas de ameixa e maçã, aroma de ameixa preta, celulose microcristalina, benzoato de sódio, carboximetilcelulose, corante caramelo, açúcar granulado, metil e propilenoglicol, água purificada.
<i>Cassia angustifolia</i> Vahl. (sene) <i>Tamarindus indica</i> L. (tamarindo) <i>Cassia fistula</i> L. (canafístula) <i>Coriandrum sativum</i> L. (coentro) <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (alcaçuz)	<i>C. angustifolia</i> Vahl. – 80 mg, <i>T. indica</i> L. – 4,7 mg, <i>C. fistula</i> L. – 4,7 mg, <i>C. sativum</i> L. – 2,2 mg, <i>G. glabra</i> L. – 0,96 mg. Excipientes: sacarose, ácido cítrico, hidróxido de sódio, sorbato de potássio, metilparabeno sódico, aroma, polpas de ameixa e maçã, água purificada.
<i>Senna alexandrina</i> Mill. (sene) <i>Cassia fistula</i> L. (canafístula)	<i>S. alexandrina</i> Mill., extrato ácido – 5,8 mg, <i>C. fistula</i> L., extrato seco – 3,9 mg. Excipientes: tamarindo, coentro, alcaçuz, ácido cítrico anidro, metilparabeno, sorbato de potássio, pectina, petrolato líquido, ameixa descarçada e aroma, sorbitol e água.

### Controle da qualidade de fitoterápicos sob a forma farmacêutica semissólida

Na rotina diária do controle de semissólidos podem ser feitos ensaios para determinação de peso médio, viscosidade, tamanho de partícula, uniformidade de dose, controle microbiológico, pH, aspectos visuais e sensoriais, como presença de sedimento, homogeneidade da cor e grau de espalhamento (Maqbool *et al.*, 2017).

As formulações fitoterápicas frequentemente sofrem degradação durante o armazenamento por oxidação, hidrólise, cristalização, quebra de emulsão, deterioração enzimática e reações químicas com os excipientes. A temperatura e a umidade são os principais fatores que afetam a qualidade e a estabilidade de um produto à base de plantas medicinais. A umidade absorvida na superfície da droga sólida geralmente aumenta a taxa de decomposição, se for suscetível à hidrólise. A presença de enzimas no produto também aumenta a taxa de degradação (Thakur *et al.*, 2011).

Na produção de medicamentos fitoterápicos em grande escala, existe a necessidade de que tais produtos tenham tempos de armazenamento maiores, mas deve-se atentar à possível deterioração do produto. Por essa razão, estudos de estabilidade são essenciais para determinar o seu prazo de validade. No ensaio de estabilidade para semissólidos fitoterápicos, testes de mudança de cor, odor, homogeneidade, pH, consistência, avaliação dos constituintes fitoquímicos, contaminação microbiana e toxicidade são recomendados (Kumadoh & Ofori-Kwakye, 2017).

## Estudos de Estabilidade

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a estabilidade como a capacidade do produto farmacêutico de manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante seu prazo de validade (WHO, 1996). A perda da estabilidade pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação (Kommanaboyina & Rhodes, 1999). Ela depende de fatores ambientais, como temperatura, umidade, luz (fatores extrínsecos), e de outros fatores relacionados ao próprio produto (fatores intrínsecos), como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens (Brasil, 2005).

Entre os fatores extrínsecos, a temperatura é o fator mais importante envolvido na degradação dos produtos farmacêuticos, pois o seu aumento promove também o aumento da degradação química (Kommanaboyina & Rhodes, 1999). Essa influência pode ser diminuída com o correto armazenamento e com o controle da temperatura em todo processo.

A umidade relaciona-se com os efeitos da temperatura e representa um importante fator que afeta a estabilidade do produto, uma vez que a água na superfície do fitoterápico altera seu estado físico e sua reatividade, o que gera degradação indireta por hidrólise, um dos fatores intrínsecos mais comuns. O acondicionamento adequado e o uso de excipientes dessecantes diminuem esse efeito (Mirco & Rocha, 2015). A luz pode desencadear ou afetar a velocidade da degradação, como, por exemplo, as reações de redução e oxidação. As reações de oxidação são catalisadas tanto pela luz e presença de  $O_2$  como pela temperatura e podem ser minimizadas por embalagens resistentes à luz e  $O_2$  ou pelo uso de adjuvantes (Mirco & Rocha, 2015).



Durante o desenvolvimento de medicamentos, são feitos testes de estresse que induzem à degradação forçada e ajudam a identificar reações que causam a degradação do produto farmacêutico. Esses testes auxiliam na validação de métodos analíticos e na detecção de produtos de degradação formados durante a fabricação, armazenagem ou na vida útil do medicamento (Blessy *et al.*, 2014).

O fitomedicamento tem uma matriz complexa, o que torna inviável identificar e quantificar todas as substâncias e seus produtos de degradação; logo, o estudo pode ser realizado pelo perfil fitoquímico com base nos limites de variação do teor do/s marcador/es permitidos ao final do estudo de estabilidade, que é de, no máximo 10%, do valor de liberação do lote. Tal variação, somada à permitida na liberação do lote, só será aceita se permanecer dentro da faixa terapêutica segura e eficaz/efetiva estabelecida em documentação técnico-científica durante sua validade (Brasil, 2014c).

O estudo de degradação forçada deve ser feito em paralelo com os marcadores isolados para prever os possíveis produtos de degradação e servir de modelo comparativo para o estudo com o extrato e/ou fitomedicamento (Singh & Rehman, 2013). Esses testes são feitos sob diferentes condições, das quais as mais comuns são: temperaturas elevadas ( $\geq 50$  °C), degradação oxidativa, hidrólise ácida e básica, fotodegradação e degradação por umidade (Blessy *et al.*, 2014).

As indústrias de medicamentos só precisam realizar os estudos de estresse durante o desenvolvimento do produto. Para o registro, são exigidos os estudos de estabilidade acelerada, de longa duração e de acompanhamento, conforme critérios estabelecidos pela Anvisa, que preconiza a realização do ensaio de identificação e quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente no estudo de estabilidade para todos os produtos a serem registrados (Brasil, 2019a).

## O Futuro da Produção de Fitoterápicos

O uso da nanotecnologia, que aumenta a eficácia terapêutica da formulação e redução dos efeitos colaterais, representa o futuro da produção de fitoterápicos. Essa nova tecnologia envolve uma série de técnicas e ferramentas que exploram as características especiais dos materiais em escala nanométrica e permite criar produtos com propriedades físico-químicas novas, especiais e melhoradas. Ela está presente em várias áreas do conhecimento e promove avanços nos diferentes campos. Na saúde, ela tem grande potencial de aplicação na promoção de novas estratégias terapêuticas.

Na área farmacêutica, os nanocarreadores, os nanossistemas ou os nanofármacos modificam o comportamento farmacocinético, permitem a liberação gradual e controlada do ativo, entregam-no em sítios específicos, otimizam sua biodisponibilidade e reduzem seus efeitos colaterais (Onoue, Yamada & Chan, 2014; Alexander *et al.*, 2016). Adicionalmente, os nanossistemas previnem a degradação, encapsulam substâncias com diferentes características (hidrofílicas e lipofílicas), reduzem a dose terapêutica e a posologia, facilitando, assim, a adesão do paciente ao tratamento (Chen *et al.*, 2015). Embora muitos fitocosméticos nanotecnológicos estejam à disposição do consumidor brasileiro há bastante tempo, não existem, até o momento, fitoterápicos comercializados.

O encapsulamento de drogas vegetais (óleos voláteis e extratos vegetais) tem sido estudado em diferentes nanossistemas, tais como complexos moleculares em ciclodextrinas, nanopartículas (poliméricas, sólido-lipídicas e magnéticas), micelas poliméricas, emulsões submicrônicas (microemulsão e nanoemulsão) e lipossomas, com diferentes objetivos (Falcão *et al.*, 2018). No entanto, apesar dos grandes avanços no planejamento e desenvolvimento de formulações nanoestruturadas, não existem padrões regulatórios ou compendiais preconizados para esse tipo de produto.

Os nanossistemas devem ser caracterizados física e quimicamente por diferentes técnicas e veiculados em formulações farmacêuticas convencionais, tais como comprimidos, suspensões, emulsões etc., dando origem ao produto final, e tal desenvolvimento apresenta muitos desafios. O desenvolvimento de nanossistemas fitoterápicos é ainda mais complexo, pois o ativo encapsulado é uma mistura complexa, o que torna imperativa a padronização de ensaios de caracterização *in vitro* a fim de garantir a segurança e a qualidade dos fitomedicamentos nanotecnológicos (Janas *et al.*, 2017; Falcão *et al.*, 2018).

Assim como a maioria das formas farmacêuticas, a qualidade e a eficácia devem ser verificadas através de experimentos *in vitro* e *in vivo*. A cinética de liberação *in vitro* fornece informação sobre o comportamento da forma farmacêutica e é um parâmetro-chave usado para prever a segurança e a eficácia dos produtos. Compreensivelmente, para formulações complexas como sistemas nanoparticulados, o ensaio de liberação *in vitro* assume importância ainda maior (D'Souza, 2014; Janas *et al.*, 2017).

A pesquisa multidisciplinar desenvolvida nos campos da nanotecnologia farmacêutica e da química de produtos naturais tem crescido muito nos últimos anos, com o objetivo de solucionar desafios no desenvolvimento de fitomedicamentos nanoterápicos para que, num futuro próximo, estejam disponíveis no mercado.

## Considerações Finais

O mercado e a sociedade vêm demandando, de forma crescente, medicamentos e cosméticos compostos de substâncias de origem natural, e o Brasil apresenta uma extensa biodiversidade. Por isso, desperta o interesse do mundo inteiro na pesquisa de novas substâncias biologicamente ativas. Muitos extratos de plantas medicinais e óleos essenciais e seus efeitos farmacológicos têm sido descritos na literatura com menor toxicidade. Apesar de todas as vantagens de se usar um material vegetal, o desenvolvimento e a produção de fitoterápicos é um desafio, e muitos ensaios de controle de qualidade exigidos para medicamentos de origem sintética não são descritos em monografias farmacopeicas para fitoterápicos. Por isso, muitos estudos objetivam desenvolver e validar métodos de controle de qualidade, o que é de suma importância para garantir a qualidade do produto final.

Outro grande desafio na produção industrial é a degradação dos produtos vegetais, por isso muitas investigações têm sido conduzidas para melhorar a estabilidade e a eficácia desses compostos por meio do uso de sistemas carreadores nanotecnológicos. As políticas para a inclusão de fitoterápicos têm crescido, especialmente em razão do custo mais acessível para a população mais carente, da efetividade e dos menores efeitos colaterais em comparação com os insumos sintéticos. Assim, apesar dos desafios encontrados, esse tipo de produto tem grande apelo comercial, e a oferta no mercado aumenta cada vez mais.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*. Brasília: Anvisa, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

ALEXANDER, A. *et al.* Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extract and bioactives. *Journal of Controlled Release*, 241: 110-124, 2016.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G. & ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

- AULTON, M. E. & TAYLOR, K. M. G. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- AZEREDO, H. M. C. *Fundamentos de Estabilidade de Alimentos*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004.
- BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B. & MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 72(3): 400-406, 2006.
- BASSANI, V. L.; GONZALES, O. G. & PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. *Revista Fitos*, 1(1): 14-17, 2005.
- BHAGYASRI, Y.; PRATHYUSHA, C. H. & SUBRAMANIAN, N. S. Formulation and evaluation of polyherbal transdermal gel for anti-fungal activity. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 5(3): 1-10, 2018.
- BLESSY, M. *et al.* Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3): 159-165, 2014.
- BOUKARIM, C. *et al.* Preservatives in liquid pharmaceutical preparations. *Drug Test Analysis*, 1: 146-148, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 222 de 29 de julho de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos*. Brasília: Anvisa, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira*. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n. 26, de 13 maio 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014a.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 69 de 8 dez. 2014. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. Brasília, Ministério da Saúde, 2014b.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n. 4. Determina a publicação do Guia de Orientação para Registro de Medicamentos Fitoterápicos e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014c.
- BRASIL. Resolução n. 166, de 24 jul. 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada no 318, de 6 nov. 2019. Estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2019a.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. v. 1. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 406, de 22 jul. 2020. Dispõe sobre as boas práticas de farmacovigilância para detentores de registro de medicamento de uso humano, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2020.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 658, de 30 mar. 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2022.
- BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. *British Herbal Pharmacopoeia*. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1983.
- CAIEIRO, D. M. & MARCUCCI, M. C. Composição química e atividade antioxidante de formulações comerciais contendo Ginkgo biloba L. *Revista Fitos*, 5(3): 64-72, 2010.
- CARVALHO, A. C. B. *et al.* The Brazilian market of herbal medicine products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 212: 29-35, 2018.
- CASTRO, A. D. *et al.* Considerações sobre o processo de obtenção de dispersões moleculares. *Infarma*, 14: 54-58, 2002.
- CHEN, Y. *et al.* Polymeric micelles encapsulating fisetin improve the therapeutic effect in colon cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7: 534-542, 2015.
- COUTO, R. O. *et al.* Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, 6(3): 59-69, 2009.
- COUTO, A. G.; ORTEGA, G. G. & PETROVICK, P. R. Granulação. *Caderno de Farmácia*, 16(1): 13-20, 2000.
- COUTO, A. G.; VITORINO, J. C. & SILVA, R. M. L. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. *In: BRESOLIN, T. M. B. & CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Medicamentos uma Abordagem Multidisciplinar*. São Paulo: Santos, 2010.
- D'SOUZA, S. A Review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014(304757): 1-12, 2014.
- DE PAULA, I. C. *et al.* Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray dried extracts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(3), 234-41, 1998.
- ECCLESTON, G. M. Emulsões e cremes. *In: AULTON M. E. & TAYLOR, K. M. G. Aulton Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- FALCÃO, D. Q. *et al.* Nanotechnology in phytotherapy: current challenges of lipid-based nanocarriers for the delivery of natural products. *In: GRUMEZESCU, A. M. (Org.). Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. Oxford: Elsevier, 2018.
- FELLOWS, P. J. *Food Processing Technology: principles and practice*. 3. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009.
- FELTRIN, E. P. & CHORILLI, M. Extratos secos padronizados: tendência atual em fitoterapia. *Revista Lusófona de Ciência e Tecnologia da Saúde*, 7(1): 109-115, 2010.

- FERREIRA, L. A. & LEITE, J. P. V. *Desenvolvimento de Formulações Fitoterápicas*. São Paulo: Atheneu, 2009.
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-381, 2007.
- JANAS, C. *et al.* The dispersion releaser technology is an effective method for testing drug release from nanosized drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115: 73-83, 2017.
- KOMMANABOYINA, B. & RHODES C.T. Trends in stability testing, with Emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25 (7): 857-868, 1999.
- KUMADOH, D. & OFORI-KWAKYE, K. Dosage forms of herbal medicinal products and their stability considerations-an overview. *Journal of Critical Reviews*, 4(4): 1-8, 2017.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A. & KANIG, J. L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- LEITE, J. C. S. *Processos de Desidratação de Hortaliças: um estudo de caso da cenoura*, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química, Ijuí: Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.
- LIST, P. H. & SCHMIDT, P. C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- LUBI, N. C.; SATO, M. E. O. & GAENSLY, F. Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral, isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel - Asteraceae (guaco). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(1): 43-46, 2003.
- MAQBOOL, M. A. *et al.* Semi solid dosage forms manufacturing: tools, critical process parameters, strategies, optimization and recent advances. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 7(11): 882-893, 2017.
- MARQUES, G. S. *et al.* Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. *Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada*, 33(1): 57-62, 2012.
- MARQUES, L. G. *Liofilização de Frutas Tropicais*, 2008. Tese de Doutorado, São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.
- MENDES, M. C. S. & FREITAS, R. M. Challenges in research and development of phytomedicines in semisolid pharmaceutical forms. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(33): 819-823, 2014.
- MENDEZ, A. S. L. *et al.* Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32(1): 105-111, 2011.
- MIGLIATO, K. F. *et al.* Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 17(1): 94-101, 2007.
- MIRCO, J. & ROCHA, M. S. Estudo estabilidade de medicamentos. *Revista Acadêmica – Oswaldo Cruz*, 2(7), 2015.
- MURDAN, S. Soluções. In: AULTON, M. E. & TAYLOR, K. M. G. (Eds.). *Aulton Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- NÓBREGA, A. B. *Obtenção de um Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal a Partir de Folhas de Eugenia Florida DC para o Desenvolvimento de um Antitumoral*, 2017. Tese de Doutorado, Niterói: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense.

- OH, E. *et al.* Multivariate statistical optimization of tablet formulations incorporating high doses of a dry herbal extract. *Pharmaceutics*, 11(2): 79, 2019.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. & AKISUE, M. K. *Análise de Drogas*. São Paulo: Atheneu, 1991.
- OLIVEIRA, O. W. & PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais; bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4): 641-650, 2010.
- ONOUÉ, S.; YAMADA, S. & CHAN, H. K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 1.025-1.037, 2014.
- PATEL, K. *et al.* Spouting behavior of wet solids. In: MUJUMDAR, A. S. & ROQUES, M. A. (Eds.). *Drying'86*. New York: Hemisphere Publishing Corporation, 1986.
- PATEL, S.; KAUSHAL, A. M. & BANSAL, A. K. Compression physics in the formulation development of tablets. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 23(1): 1-65, 2006.
- PERFEITO, J. P. S. *O Registro Sanitário de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento*, 2012. Dissertação de Mestrado, Brasília: Universidade de Brasília.
- QIU, Y.; CHEN, Y. & ZHANG, G. G. Z. *Developing Solid Oral Dosage Forms: pharmaceutical theory and practice*. New York: Elsevier, 2009.
- ROCHA, L. M. Cuidados na preparação de medicamentos com extratos padronizados de *Ginkgo biloba*. *Infarma*, 18(11): 33-36, 2006.
- SANTANA, C. P. *et al.* Dissolution and uniformity of content of tablets developed with extract of *Ximenia americana* L. *Plos One*, 24: 1-18, 2018.
- SCHUTYSER, M. A. I.; PERDANA, J. & BOOM, R. M. Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 27: 73-82, 2012.
- SHARAPIN, N. *et al.* *Fundamentos da Tecnologia de Produtos Fitoterápicos*. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello, 2000.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010.
- SINGH, R. & REHMAN, Z. Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. *Journal of Pharmaceutical Education Research*, 3(1): 54-63, 2012.
- SOARES, L. A. L. *et al.* Dry granulations and compression of spray-dried plants extracts. *AAPS PharmSciTech*, 6(3): E359-E366, 2005.
- SOSNIK, A. & SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223: 40-54, 2015.
- SOUZA, C. R. F. *Estudo Comparativo da Produção de Extrato Seco de Bauhinia forficata pelos Processos spray dryer e Leito de Jorro*, 2007. Dissertação de Mestrado, Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- THAKUR, L. *et al.* Novel approaches for stability improvement in natural medicines. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9): 48-54, 2011.
- TOLEDO, A. C. O. *et al.* Fitoterápicos: abordagem farmacotécnica. *Revista Lecto*, 21(1): 7-13, 2003.

TWITCHELL, A. M. Mistura. *In*: AULTON M. E. & TAYLOR, K. M. G. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

WILLIAMS, A. C. Liberação tópica e transdérmica de fármacos. *In*: AULTON M. E. & TAYLOR, K. M. G. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *International Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms*. Geneva: WHO, 1996. (WHO Technical Report Series, 863, Anex 5)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Quality Control Methods for Herbal Materials*. Geneva: WHO, 2011.

YANO, H. M. *et al.* Alterações no aspecto e odor de medicamentos: indicativos de desvio de qualidade. *Boletim do Instituto Adolfo Lutz*, 24(1):13-15, 2014.

ZAID, A. N. A Comprehensive review on pharmaceutical film coating: past, present, and future. *Drug Design, Development and Therapy*, 14: 4.613-4.623, 2020.







# 14

## Controle Físico-Químico e Microbiológico da Qualidade de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

*Leonardo Lucchetti Caetano da Silva  
e Joseli Rocha Nogueira*

O processo de descoberta de um insumo farmacêutico ativo vegetal (Ifav) é baseado em estudos multidisciplinares. Da mesma forma, o caminho para tornar esse insumo um medicamento tecnologicamente elaborado também o é. Nesse contexto, a análise e o controle desse insumo durante as etapas de transformação configuram-se como um dos pontos-chave para garantir a segurança e a eficácia de seu uso.

Para a verificação da identidade e da segurança de um produto, é necessário que seu grau de contaminação microbiana seja também avaliado. Produtos à base de plantas não são estéreis e nem precisam sê-lo; no entanto, alguns determinados micro-organismos não podem estar presentes – pois indicam más condições sanitárias de cultivo e/ou produção – e outros podem ocorrer, porém dentro de limites determinados.

Com relação à sua composição química, é desejável que o maior número possível de substâncias presentes e suas proporções sejam determinados – idealmente, todas as responsáveis pela ação biológica daquele produto. Para isso, utilizam-se técnicas consagradas de análises físico-químicas apresentadas como métodos oficiais presentes em compêndios reconhecidos e validados pela legislação sanitária.

## Fundamentos do Controle da Qualidade

Quando se pensa a respeito da qualidade de qualquer produto que se utiliza no dia a dia, algumas preocupações surgem: a adequação de suas propriedades ao uso a que se destina, a durabilidade, a resistência à degradação, a manutenção das características ao longo do tempo e, naturalmente, o preço. Com exceção da questão financeira, esses pontos são também levados em consideração ao submeter um produto farmacêutico ao controle da qualidade.

A presença de substâncias que caracterizem o insumo e que possam ser indicativas de sua ação, o prazo durante o qual sua atividade mantém-se dentro de níveis previamente estabelecidos para sua eficácia e sua resistência a fatores ambientais são itens fundamentais que levam a que se considere que determinado produto tem qualidade. A aferição desses parâmetros é baseada em métodos estabelecidos por meio de técnicas consagradas, instrumentais ou não, mas de alta capacidade resolutive, repetitiva e reprodutiva. Porém, antes disso, outras características do produto devem ser avaliadas.

## O Controle Físico-Químico da Qualidade

O controle da qualidade de um produto, de um modo geral, engloba diversas abordagens que, em conjunto, têm como objetivo atestar a adequação ao uso do produto em questão. No caso de medicamentos, tal como a legislação brasileira regulamenta os fitoterápicos, o controle físico-químico guarda bastante semelhança com os procedimentos comumente observados para os medicamentos sintéticos. Porém, por serem produzidos a partir de fontes vegetais, algumas peculiaridades são encontradas para esse tipo de produto. A seguir, são discutidas algumas das principais análises a serem realizadas para medicamentos à base de plantas medicinais.

### O aspecto

O primeiro parâmetro a ser avaliado e, também, o que mais chama atenção tanto do analista quanto do consumidor é o aspecto dos medicamentos. O estado geral da planta, seu grau de uniformidade e a ausência de sujidades e contaminantes (tudo aquilo que está presente no produto que não seja a planta em questão), a homogeneidade de um extrato, a uniformidade de aspecto de formas farmacêuticas sólidas (como cápsulas, comprimidos e drágeas) e a inviolabilidade da embalagem são os parâmetros observados no início do processo de aferição de sua qualidade.

Comumente, nos produtos à base de plantas medicinais provenientes de pequenos produtores, pode-se constatar fraudes, que podem ser aleatórias ou intencionais. Por vezes, o cultivo e a coleta das plantas são feitos de forma não criteriosa e, com isso, a embalagem trará, além da planta indicada no rótulo, um sem-número de outros componentes. Além do risco no consumo pela presença de substâncias estranhas cujas ações possam ser até mesmo danosas ao consumidor, a ocorrência de material exógeno pode também fazer com que a porção tomada para o preparo de um chá, por exemplo, não contenha a quantidade ideal de planta para que aquela dose surta o efeito desejado. As inspeções macro e microscópica fazem-se importantes, principalmente na avaliação do insumo antes de tornar-se medicamento. Essa inspeção também é útil na identificação de uma possível contaminação microbiana. A presença de colônias de fungos ou bactérias, a alteração de cor, a presença de odor diferente e o estado físico da planta podem ser indicativos de problemas dessa natureza.

### A rotulagem

Os rótulos dos fitoterápicos, que muitas vezes são negligenciados pelos consumidores, são de extrema relevância. Não é raro identificar a utilização de planta diferente daquela prevista pela legislação sanitária para o tratamento de uma determinada doença. Além disso, a própria nomenclatura botânica pode-se mostrar equivocada. Dessa forma, podem ocorrer casos em que a planta indicada no rótulo não é aquela contida na embalagem e vice-versa. Ainda, o prazo de validade – o período durante o qual o produto mantém sua qualidade e, portanto, mostra-se próprio para o uso – é obrigatório e deve sempre ser observado. Esta análise é realizada pelos órgãos sanitários oficiais e leva em consideração a legislação específica.

### Parâmetros físicos para sólidos e líquidos

Após a análise da rotulagem, são iniciados os trabalhos laboratoriais de avaliação do conteúdo, ou do produto propriamente dito. No caso de formas sólidas, notadamente comprimidos revestidos, cápsulas ou drágeas, o peso médio deve estar compreendido entre as variações percentuais admitidas pela *Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2019). O não atendimento a esses limites pode fazer com que a unidade farmacêutica contenha mais ou menos ativos do que o indicado no rótulo, podendo fazer com que sua ação não seja a desejada para o tratamento. Além disso, o conteúdo de cada unidade deve também

ser uniforme. Há ainda outros parâmetros que se relacionam diretamente ao conteúdo ativo ingerido e absorvido, como:

- dureza, que, como o próprio nome indica, reflete o quão mecanicamente resistente uma forma é. Caso seja dura demais, por um lado, pode apresentar problemas na liberação do ativo. Por outro, se for pouco resistente, fragmenta-se ainda na embalagem levando à inutilização daquela unidade;
- desintegração, que se relaciona diretamente à capacidade que aquela forma tem de perder sua integridade após sua ingestão, fazendo com que a redução a partículas cada vez menores facilite a liberação do/s ativo/s da matriz;
- friabilidade, aplicada às formas que possam desprender pó, relaciona-se a possíveis perdas de conteúdo ativo durante o contato com a embalagem primária (blíster ou frasco, por exemplo) ou mesmo com as mãos;
- dissolução, um dos parâmetros mais importantes, pois permite avaliar o desprendimento do ativo da forma farmacêutica no local onde foi projetado para que ela se desintegre (estômago ou intestino). A dissolução apresenta relação direta com a quantidade de ativo que atinge a corrente sanguínea e será distribuído pelo organismo para produzir seu efeito farmacológico.

Analogamente, as formas líquidas – xaropes, soluções, elixires, tinturas – também devem ser avaliadas com relação às suas apresentações. Para tais, são avaliados o volume médio e a variação de volume, que se relacionam com a quantidade de ativo ofertada por dose consumida. Outra análise relevante é determinação do pH. Uma maior acidez ou basicidade em relação ao valor originalmente previsto pode levar a incômodos na ingestão da dose (como irritação de mucosas ou azia) e fazer com que as substâncias ativas originais venham a ser transformadas em outras ao longo do tempo, podendo levar à perda da atividade ou mesmo a desenvolver potencial tóxico.

### A identificação do ativo

Uma vez atendidos os parâmetros gerais, é chegado o momento de verificar se aquele medicamento apresenta o ativo que consta em seu rótulo. Como a diversidade de substâncias presentes nos medicamentos é muito

grande, principalmente naqueles de origem vegetal que se caracterizam por apresentar misturas de substâncias, de naturezas químicas altamente diversas, nos compêndios oficiais (as farmacopeias) apresentam-se alguns procedimentos relativamente simples para identificar a presença do ingrediente ativo.

Entre esses procedimentos, os mais comuns são aqueles que indicam reações específicas que promovam o aparecimento de uma coloração característica para determinado/s componente/s, o surgimento de algum precipitado ou o desprendimento de gás. Uma vez que tais testes não permitem que se afirme conclusivamente tratar-se do ativo em questão, normalmente é indicada a realização de análises cromatográficas (em camada delgada ou em coluna – por meio da cromatografia líquida de alta eficiência ou com fase gasosa, geralmente pelos mesmos métodos aplicados à determinação quantitativa) ou de análise de espectros (na região do ultravioleta/visível ou do infravermelho, na grande maioria dos casos).

Assim, a soma das informações obtidas para cada procedimento leva à conclusão sobre a identidade do ativo presente naquela formulação. A etapa seguinte é a verificação da quantidade presente na forma farmacêutica e da sua adequação ao rótulo.

### A determinação do teor

Para a verificação da quantidade de ativo presente em um produto, são utilizados os métodos baseados em técnicas de análise química, instrumentais ou não, de uso corrente e tradicionalmente confiáveis. Os procedimentos em química analítica podem ser simples ou altamente complexos; de alto custo ou relativamente baratos; de fácil execução ou que requeiram alto grau de treinamento devido à sua complexidade. Evidentemente, quanto mais moderno e atualizado for um procedimento analítico, maior será seu grau de confiabilidade de seus resultados. As farmacopeias, referência mundial para a análise de medicamentos, tentam levar em consideração a realidade diferente que os laboratórios farmacêuticos apresentam. Há laboratórios mais bem equipados e também aqueles com capacidade financeira mais limitada, o que faz com que seus parques tecnológicos tenham diferenças notáveis. Contudo, os produtos analisados devem ser distribuídos aos consumidores com os requisitos mínimos de qualidade plenamente atendidos. Assim, os métodos presentes nas farmacopeias tentam ser simples o suficiente para que qualquer laboratório, com um mínimo de condições de operação, consiga executar. A prática, no entanto, mostra que os métodos descritos nesses compêndios

devem sempre ser verificados antes de sua aplicação, pois é muito comum ser necessário adaptá-los e, posteriormente, validá-los.

A maior parte dos métodos descritos nas farmacopeias para a análise de medicamentos, seja de origem sintética, seja de fontes naturais, baseiam-se nas técnicas descritas a seguir.

### *Volumetria*

Também conhecida como titulometria ou titrimetria, a volumetria é a técnica mais simples e direta de determinação do teor de uma substância, sendo também uma das mais antigas a constar nos compêndios. Entretanto, a cada nova edição, o número de monografias que apresentam essa técnica vem sendo reduzido. A principal vantagem dessa técnica é prescindir do uso de padrões, um dos gargalos mais relevantes no controle da qualidade de fitoderivados. Todavia, apresenta como desvantagem o baixo poder de compreensão da complexidade da amostra: é baseada em reações, e, assim, quaisquer impurezas ou eventuais produtos de degradação não são observados. Dessa forma, mesmo que o teor do ativo presente esteja dentro dos limites preconizados, a técnica não permite avaliar variações na composição química da amostra analisada. Mesmo assim, nas farmacopeias em vigor, ainda se apresentam métodos baseados nessa técnica.

### *Espectrofotometria*

Outra forma relativamente simples e tradicional de aferir o teor de um determinado ativo é por meio da espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) ou do visível do espectro eletromagnético. Para isso, a amostra deve, obrigatoriamente, absorver energia luminosa em uma ou outra, ou ainda em ambas as regiões (Skoog, Holler & West, 2014). Dessa forma, o espectrofotômetro mede a diferença entre a intensidade da luz absorvida e da emitida, e essa diferença, proporcional à concentração da amostra diluída em uma cubeta (geralmente de quartzo e com 1 cm de caminho ótico), será utilizada para o cálculo do teor, segundo a lei de Lambert-Beer. Em termos conceituais, essa lei vem da combinação das Leis de Beer (1852), que estabelece que a intensidade de um feixe de luz monocromática cai exponencialmente à medida que a concentração da substância em análise na solução submetida à radiação aumenta aritmeticamente, e de Lambert (1870), que determina que a intensidade da luz emitida por uma amostra cai exponencialmente à medida que a espessura do meio que a contém aumenta aritmeticamente.

Essa técnica torna desejável o uso de um padrão com o teor determinado – preferencialmente, uma substância química de referência (SQR) – para ser comparada à mesma entidade química presente na amostra a ser analisada ou, ainda, alguma com cromóforo semelhante para, assim, ter sua concentração estabelecida. A farmacopeia norte-americana, por exemplo, sempre indica o uso de SQR por ela disponibilizada, e as análises espectrofotométricas devem ser realizadas com a referência e a amostra em concentrações bem próximas. A farmacopeia europeia, por sua vez, não exige o uso de solução padrão e indica, na monografia do produto, o valor do coeficiente de extinção molar ( $\mu$ ) verificado para um padrão a uma determinada concentração. A vantagem que um laboratório pode ter, ao usar método preconizado por esta farmacopeia, consiste em não precisar adquirir um padrão pois utiliza-se o  $\mu$  para cálculo de sua concentração. Contudo, não se sabe em que condições (equipamento, analista, tempo de uso, desgastes etc.) chega-se aos valores oficiais do compêndio.

Outras variações na técnica espectrofotométrica são as realizadas na região do infravermelho ou com fluorescência. Ambas se fundamentam, também, na absorção e emissão de luz, porém trazem características adicionais. Não são muito utilizadas isoladamente, mas são bastante úteis quando associadas às técnicas de separação, como a cromatografia.

A radiação infravermelha, além de permitir a quantificação, traz uma vantagem adicional, que é possibilitar a identificação de grupamentos funcionais diversos presentes em moléculas orgânicas, como hidroxilas, carbonilas, anéis aromáticos etc. A radiação UV permite identificar a presença apenas de grupos que têm elétrons capazes de fazer determinadas transições eletrônicas, mais notadamente aqueles em carbonilas, carboxilas, heteroátomos, ligações  $\pi$  e anéis aromáticos. Quanto maior a conjugação desses sistemas, mais as substâncias absorverão luz em determinados comprimentos de onda. O infravermelho, por sua vez, tem a capacidade de identificar não apenas esses grupamentos como também todos os outros cujas ligações interatômicas possam se alongar, contrair e torcer, alterando momentaneamente seus ângulos e distâncias. Nesse sentido, o infravermelho torna-se uma ferramenta mais útil na interpretação da presença de determinada molécula orgânica. No entanto, sua operação é mais complexa, cara e deve ser feita sob total ausência de água.

Assim como para os métodos volumétricos, as farmacopeias sempre terminam suas monografias com a demonstração de uma fórmula matemática que correlaciona as absorções do padrão e da amostra e a concentração do padrão, o que permite que seja determinada a concentração da amostra.



### *Cromatografia*

As técnicas abordadas anteriormente são aplicadas para amostras simples, cujos componentes podem ser determinados em conjunto. Porém, quando se faz necessária a identificação e a quantificação de um componente específico, torna-se imprescindível utilizar alguma estratégia que possibilite sua detecção e quantificação de forma isolada e inequívoca. O isolamento de uma substância (ou mesmo uma classe) é um processo longo, custoso e que, invariavelmente, leva a perdas de massa. Com isso, parte das premissas do controle da qualidade perdem-se e o tempo pode levar a degradações da amostra original.

Em todo processo analítico que envolva a determinação de uma substância no meio de várias outras, deve-se buscar características específicas que somente ela tenha ou, pelo menos, que se consiga diferenciá-la de outras semelhantes. Aqui encontra-se um dos pilares fundamentais da cromatografia, seja no modo planar, seja em coluna: a retenção diferencial de substâncias em uma fase estacionária quando perpassada por uma fase móvel. O tempo e o fator de retardamento são característicos, porém não específicos, para determinada substância quando analisada sob determinadas condições. Diversas substâncias podem apresentar comportamentos cromatográficos semelhantes, porém a análise de outros parâmetros leva à sua determinação de forma inequívoca, salvo problemas específicos, como a presença de isômeros e substâncias com baixo limite de detecção/quantificação ou mesmo aquelas invisíveis às técnicas ópticas (Skoog, Holler & West, 2014; Gil, 2010).

Basicamente, as monografias apresentam os procedimentos para a realização das cromatografias em camada delgada, líquida de alta eficiência e com fase gasosa. Na descrição dos métodos, são informados o tipo de fase estacionária e seu suporte, a composição da fase móvel, a programação de eluição, o modo de detecção e, para os casos de determinação quantitativa, a fórmula a ser aplicada para correlacionar as concentrações e as leituras dos detectores para a amostra e para o padrão.

A cromatografia em camada delgada, mais simples, barata, rápida e de mais fácil execução quando comparada às citadas técnicas em coluna, permite uma inspeção visual da amostra. No entanto, sua capacidade de gerar informação é relativamente limitada.

Como, normalmente, os insumos à base de plantas medicinais baseiam-se em extratos hidroalcoólicos, é muito mais frequente encontrar métodos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Para que seja utilizada a cromatografia com fase gasosa, é necessária a volatilização da amostra nas condições operacionais, o que não é muito comum para extratos. Nesse tipo de cromatografia, de forma diferente da realizada em camada

delgada, observa-se o tempo de retenção, que se mostra sempre característico, porém não específico para a substância em análise, sob determinadas condições. Também de forma análoga à cromatografia em camada delgada, existe ainda o papel da detecção. Os detectores são selecionados em função da necessidade analítica e das características dos analitos.

Além da capacidade analítica e da possibilidade de análise de soluções muito diluídas, outra vantagem relevante das cromatografias instrumentais é a capacidade da determinação quantitativa (limitada na variação planar da cromatografia). As cromatografias instrumentais se mostram bem mais precisas quando se dispõe de padrões analíticos – idealmente, SQR de marcadores químicos. A título de comparação, assim como para as monografias com métodos baseados em espectrofotometria, na farmacopeia norte-americana utilizam-se suas próprias substâncias químicas de referência, também por ela disponibilizadas para venda. Na farmacopeia britânica, por sua vez, indicam-se os valores de concentrações a serem utilizados nas fórmulas para o cálculo do teor. A questão aqui é que as condições sob as quais esses valores foram determinados serão, sempre, diferentes daquelas encontradas em outros laboratórios e, por isso, mostram-se menos precisas (British Pharmacopoeia, 2018).

Medicamentos baseados em um ou dois ativos são dominantes no mercado e seus processos analíticos são relativamente simples. As monografias farmacopeicas dispõem de métodos que têm como objetivo apenas determinar os fármacos e, mais atualmente, suas substâncias relacionadas. Todas essas entidades químicas têm suas estruturas moleculares conhecidas e, portanto, suas características químicas e físicas são também previstas. Quando o ativo é um extrato de planta, mesmo o/s marcador/es sendo também conhecido/s, há ainda uma grande parcela de componentes presentes que não consegue ser determinada por meio do procedimento de controle destinado ao ativo por apresentar natureza química diferente.

O perfil cromatográfico (ou *fingerprint*) é previsto na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 26/2014, e é considerado obrigatório apresentá-lo à autoridade sanitária para fins de registro, notificação ou renovação do registro do fitomedicamento. Sua obtenção, sob condições que permitam a aquisição do melhor cromatograma possível, torna mais fácil a avaliação da composição da matéria-prima ou do produto acabado lote a lote, auxiliando na inspeção não só dos possíveis ativos como também de eventuais substâncias indesejadas. Com isso, pode-se avaliar também a repetibilidade e a reprodutibilidade das condições de obtenção do insumo ativo (Brasil, 2014).

O formato (largura, altura e inclinação) dos sinais cromatográficos é um forte indicativo da qualidade da amostra. Da mesma forma, a presença ou

ausência de determinados sinais pode, também, apontar para a conformidade ou não conformidade dessa mesma amostra.

## As Determinações Legais

Os protocolos de análise, conforme mencionado anteriormente, podem ser encontrados nas monografias disponíveis nas farmacopeias. A legislação brasileira atual prevê quais delas podem encontrar amparo legal para seu uso (resolução n. 37, de 6 de junho de 2009), sempre em suas versões mais atualizadas: são as farmacopeias alemã, norte-americana, argentina, britânica, europeia, francesa, internacional (publicada pela Organização Mundial da Saúde – OMS), japonesa, mexicana e portuguesa (Brasil, 2009). No entanto, há que se considerar que tais farmacopeias contemplam as plantas nativas dos países que as publicam e que, por isso, não dispõem de monografias de plantas nativas do Brasil. Apenas aquelas que foram introduzidas no país é que podem, eventualmente, ser encontradas em alguma farmacopeia estrangeira. Contudo, a regulamentação brasileira admite que os métodos gerais possam ser utilizados legalmente no país. Além dos métodos de análise, seja para a matéria-prima vegetal (a grande maioria), seja para o medicamento acabado, esses compêndios apresentam ainda uma série de outras determinações que devem ser observadas em função da previsão legal do seu país de origem.

No caso da *Farmacopeia Brasileira*, sua sexta edição relaciona as análises que devem ser realizadas para as matérias-primas vegetais, sem mencionar produtos acabados. Antes, porém, as monografias trazem informações sobre as drogas vegetais, como seu nome e sua sinonímia científica e popular, sua constituição (normalmente, a parte da planta e seu conteúdo percentual de marcador, que expressará o teor que o método de controle deverá ser capaz de determinar), características organolépticas (cor e sabor, por exemplo) e descrição macro e microscópica (cuja análise será tão dificultada quanto maior for o grau de divisão do insumo) – incluindo as tábuas para identificação comparada.

Em sequência, apresentam-se os métodos utilizáveis para a identificação da matéria-prima, geralmente baseados em cromatografia em camada delgada ou em reações químicas específicas para determinado/s componente/s da planta. Os ensaios de pureza trazem os percentuais máximos permitidos para material estranho, água, cinzas (totais, insolúveis e/ou sulfatadas) e alguns índices (como acidez ou saponificação), entre outros. Tais percentuais variam de acordo com a planta. Por fim, surgem os métodos para o doseamento dos marcadores químicos de qualidade; geralmente, estes são também responsáveis

pela atividade farmacológica preconizada para aquela planta, porém não obrigatoriamente. O resultado para determinação dos marcadores químicos será para dado componente específico ou para uma classe de substâncias específicas. Para os óleos voláteis, são indicados os parâmetros para análise por cromatografia com fase gasosa; para os componentes fixos, as determinações são feitas por volumetria, espectrofotometria na região do UV ou do visível ou cromatografia líquida de alta eficiência. Por fim, orienta-se a forma de acondicionamento do insumo, que deve ser feita em frascos bem vedados, com ausência de umidade e ao abrigo da luz. Porém, nem sempre foi assim. O Brasil já contou com cinco versões anteriores da farmacopeia atualmente em vigor.

### A evolução da *Farmacopeia Brasileira*

Em sua primeira versão, editada em 1926 e escrita pelo farmacêutico Rodolpho Albino Dias da Silva, podem ser encontradas monografias para 280 gêneros botânicos, nativos ou introduzidos. Era um compêndio que se propunha a demonstrar o uso e as formas de preparo das drogas vegetais. O mais próximo que chega de protocolos para o controle da qualidade são os métodos de caracterização (Brasil, 1929).

Trinta anos depois, em 1959, é publicada sua segunda edição. Nessa, percebe-se um declínio da relevância das plantas medicinais pelo número de monografias dedicadas a elas: apenas 71 gêneros botânicos. Isso reflete o momento histórico do pós-guerra e o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos. Porém, os métodos de doseamento de ativos (ou o que se entendia como ativos à época) surgem pela primeira vez, com descrições para análises gravimétricas e volumétricas, procedimentos para extração e cálculo de rendimento e estabelecimento de índices farmacognósticos de qualidade para essências, quantificação por fluorescência e colorimetria, ensaios-limite e até mesmo avaliação biológica. Além disso, ainda trazia a receita de como preparar determinadas formas farmacêuticas líquidas (Brasil, 1959).

Quase vinte anos depois, em 1976, é publicada a terceira edição da *Farmacopeia Brasileira*. Dessa vez, estão presentes métodos de identificação e doseamento para apenas 26 plantas (Brasil, 1977).

A sua quarta edição é apresentada em partes, publicadas entre 1996 e 2005. Nessa versão observa-se um aumento no número de monografias dedicadas às plantas medicinais e uma maior riqueza nos ensaios de maneira geral. Além dos métodos de identificação e doseamento, encontram-se também os procedimentos para a realização da amostragem, para a determinação dos

teores de umidade, cinzas e matéria estranha, além de outros índices farmacognósticos. Aqui já podem ser observados os métodos baseados em cromatografia instrumental (gasosa e líquida) (Brasil, 1988, 1996-2005).

Em 2010 é publicada a quinta edição, na qual encontram-se pouco mais de sessenta monografias de plantas ou produtos derivados, que contemplam nome (popular e científico), características, descrição macro e microscópica (incluindo pranchas), métodos para identificação, ensaios de pureza, forma de doseamento e embalagem e acondicionamento. Os métodos, atualizados, ainda se baseiam em reações químicas e/ou cromatografia para a identificação da droga e métodos volumétricos, espectrofotométricos ou cromatográficos instrumentais para o doseamento (Brasil, 2010).

A sexta edição chega em 2019, e, nela, constam 83 monografias de plantas medicinais – um aumento de cerca de 30% sobre a quantidade disponível na edição anterior. Além dessas, a publicação ainda disponibiliza 22 monografias sobre tinturas, 19 sobre extratos fluidos e 25 sobre óleos. Nelas, o leitor encontra a forma de preparo, as características dos líquidos, testes de verificação de autenticidade e como deve ser feito o doseamento de seus marcadores. Para todos os produtos, são indicados as condições e os resultados esperados para a cromatografia em camada delgada. Para os óleos, adicionalmente, são mostrados os cromatogramas obtidos em fase gasosa e as condições de análise.

## A evolução da regulamentação

A legislação sanitária específica para produtos à base de plantas teve seu início com a portaria n. 22 do Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia, em 1967. Nela, consta a definição de produto fitoterápico e a obrigatoriedade de concessão de licença para produção e venda. Para que houvesse a licença, era obrigatória a apresentação de relatório em que constassem, além das informações detalhadas sobre o produto, a caracterização botânica e farmacognóstica das drogas e os parâmetros para o controle da qualidade do produto através de suas características físico-químicas, ensaios de doseamento e atividade. Na hipótese de essas informações constarem na *Farmacopeia Brasileira*, bastava que fosse apresentada sua monografia correspondente (Brasil, 1967).

A partir de 1995, observa-se certa regularidade na edição de regulamentações para o registro de produtos derivados de plantas, e, em todas elas, existe um espaço dedicado ao controle de sua qualidade (Brasil, 1995). Naquele ano foi publicada a portaria n. 6, que introduz conceitos e determina requisitos

tecnológicos e terapêuticos. Obriga o produtor a garantir a qualidade do produto por meio de ferramentas de controle de produção e, nesse sentido, é a primeira a introduzir dois conceitos relevantes para o controle da qualidade, que serão discutidos no próximo item deste capítulo: marcador e princípio ativo. Como ferramentas de controle, essa portaria estabelece a caracterização farmacognóstica, os testes farmacopeicos para matérias-primas vegetais, a análise dos princípios ativos (quando possível) e uma análise fitoquímica qualitativa dos constituintes da espécie. Nos requisitos para o produto, exige a apresentação de metodologia de controle físico-químico ou farmacológico (quando fosse o caso), além de ensaios de estabilidade com a determinação do prazo de validade. Dessa forma, estabelece-se algum grau de rastreabilidade desde a planta fresca até o produto final, com o objetivo de garantir a qualidade do produto acabado (Brasil, 1995). Outro ponto relevante é a inclusão, pela primeira vez, da exigência de validação das metodologias de controle da qualidade.

Após o surgimento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), as RDCs passam a normatizar o tema. A primeira delas foi a RDC n. 17, em 2000 (Brasil, 2000). Nela, foram mantidos os requisitos tecnológicos referentes ao controle da portaria n. 6, porém com algumas modificações. Para a planta fresca, a identificação farmacognóstica é possível quando houver especificações para tanto; quando se tratar de planta nativa, deve-se apresentar certificado de origem e documentação comprovando a origem do material. Com a supressão da definição de “preparado fitoterápico intermediário”, passaram a vigorar os derivados de droga vegetal, conceito sem definição até então; neste caso, a diferença em relação à portaria n. 6, no que diz respeito ao preparado fitoterápico intermediário, era a exigência de apresentação de um relatório do controle da qualidade. Para os medicamentos, as mudanças constituíram na reunião de vários requisitos de produção e controle agrupados em um único item e, agora, mais bem organizados na forma de um relatório.

Quatro anos depois, a RDC n. 48, entra em vigor. Segundo esta norma, o registro do produto fitoterápico deve, entre os diversos outros aspectos, trazer o relatório de controle da qualidade com descrição e validação das metodologias utilizadas. Para a droga vegetal, as mudanças são a requisição de metodologias validadas, a retirada de testes de autenticidade e pureza e a exigência de comprovação da origem quando a planta fosse nativa.

Em 2010, surge a RDC n. 10. Nessa norma, a autoridade sanitária determina que os fabricantes devem apresentar metodologias, especificações e resultados de determinados testes de identidade e qualidade da droga vegetal, quando de sua notificação, entre eles: descrição da droga vegetal em farmacopeias reconhecidas pela Anvisa, ou, em sua ausência, em publicação

técnico-científica indexada ou laudo de identificação emitido por profissional habilitado; prospecção fitoquímica, cromatografia em camada delgada ou outro método cromatográfico, acompanhada da respectiva imagem em arquivo eletrônico reconhecido pela Anvisa, com comparação que possa garantir a identidade da droga vegetal; características organolépticas; granulometria da droga; teor de cinzas totais; teor de umidade/perda por dessecação; contaminantes macroscópicos; e teste-limite para metais pesados (Brasil, 2010). Para isso, o fabricante deveria utilizar metodologia disposta na *Farmacopeia Brasileira* ou, em sua ausência, em outras farmacopeias reconhecidas pela Anvisa ou, nos guias referentes ao controle de qualidade de espécies vegetais publicados pela OMS, ou ainda métodos próprios validados.

A RDC n. 10 foi revogada, em 2014, pela RDC n. 26 (Brasil, 2014). Essa norma, em vigor até o momento da publicação deste livro, mostra-se a mais abrangente em termos de definições, juntamente com seu guia, a instrução normativa n. 4, publicada no mesmo ano (Brasil, 2014). Ela, assim como as demais que a antecederam, também prevê a exigência de apresentação do relatório técnico por parte do fabricante, no que se refere especificamente ao controle da qualidade para a droga vegetal, derivado vegetal e produto acabado. Naturalmente, as exigências desses relatórios variam caso a caso, pois há determinadas análises aplicáveis e não aplicáveis a cada insumo.

Para a droga vegetal e seus produtos derivados, por exemplo, na resolução vigente se estabelece a necessidade de laudo de controle da qualidade de um lote do fitoterápico para cada um dos fornecedores qualificados, sendo aceitos, no máximo, três fornecedores de Ifav por forma farmacêutica a ser registrada; laudo de análise de todas as matérias-primas utilizadas e do produto acabado, contendo o método utilizado, especificação e resultados obtidos; referências farmacopeicas consultadas e reconhecidas pela Anvisa para o controle dos Ifav e produto acabado; controle dos excipientes utilizados na produção do medicamento fitoterápico ou do produto tradicional fitoterápico por método estabelecido em farmacopeia reconhecida. Na hipótese de o método não ser estabelecido em farmacopeia reconhecida pela Anvisa, deve-se descrever detalhadamente os procedimentos usados no controle. Caso não haja método oficial, deve ser apresentada descrição detalhada de todas as metodologias utilizadas no controle da qualidade e ser enviada cópia de toda a documentação técnico-científica utilizada para embasar os métodos analíticos aplicados que devem ser validados de acordo com a RDC n. 166/2017 (Brasil, 2017a).

Para o derivado vegetal, entre outras determinações, por exemplo, a norma exige que sejam realizados testes de pureza e integridade, incluindo: determinação de metais pesados; determinação de resíduos de agrotóxicos e afins; e

determinação de resíduos de solventes (para extratos que não sejam obtidos com etanol e/ou água).

Para o produto acabado, na RDC n. 26 (Brasil, 2014) se estabelece que seja obtido o perfil cromatográfico, acompanhado da respectiva imagem em arquivo eletrônico reconhecido pela Anvisa, com comparação que possa garantir a identidade das matérias-primas, além da análise quantitativa dos marcadores específicos de cada espécie ou controle biológico. A opção por marcadores ativos ou analíticos deve ser tecnicamente justificada.

No caso de associações de espécies vegetais em que a determinação quantitativa de um marcador por espécie não é possível, poderão ser apresentados os perfis cromatográficos que contemplem, ao menos, um marcador específico para cada espécie na associação. Para associações de espécies vegetais em que a identificação de marcadores não seja possível para algum dos ingredientes do produto acabado, devem ser apresentados:

- a justificativa da impossibilidade técnica de identificação na associação de um marcador específico de determinada espécie;
- a documentação comprobatória de que os métodos analíticos normalmente aplicados em diferentes comprimentos de onda para a identificação na associação foram investigados;
- a identificação dos marcadores nas espécies vegetais, durante o controle em processo, quando a identificação ainda for possível;
- a identificação realizada imediatamente antes da introdução do Ifav no produto acabado;
- os estudos de desenvolvimento do produto e dos lotes-piloto, incluindo os perfis analíticos identificados durante a adição gradual dos Ifav.

Essas e outras exigências são, pela primeira vez numa única norma, aplicáveis também aos produtos importados.

## A evolução do conceito de marcador

Idealmente, os ativos de uma planta medicinal deveriam ser totalmente conhecidos e servirem de parâmetro para a aferição de sua qualidade. Da mesma forma, deveriam também ser comercialmente disponíveis na forma de substância química de referência, com teor e estabilidade garantidas. Porém, tal situação é inatingível devido à complexidade química de uma planta e à possibilidade de substâncias com estruturas diferentes poderem exercer sua ação biológica em sistemas e tecidos também diferentes.



Nesse sentido, foi introduzido o conceito de marcador químico, que pode ser uma molécula definida ou um conjunto de moléculas que pode/m ou não estar relacionada/s à ação farmacológica produzida por uma planta medicinal. Essas substâncias são características do vegetal em questão e sua determinação analítica permite que, com grau elevado de confiabilidade, estabeleçam-se padrões mínimos que garantam que uma determinada amostra está apta a ser consumida para o propósito a que se destina. São comercialmente disponíveis e apresentam propriedades físico-químicas bem definidas na literatura específica, fazendo com que sua rastreabilidade possa ser obtida.

A Anvisa, desde sua criação, vem editando normas específicas para plantas medicinais e seus produtos derivados e, também, atualizando o conceito de marcador. A primeira menção ao termo apareceu na RDC n. 17, que o define como um componente presente no insumo vegetal, preferencialmente o próprio princípio ativo, utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

Na RDC n. 48, esse conceito tornou-se mais amplo e passou a considerar a possibilidade de haver mais de um marcador por planta. Em seu texto, se estabelece que seria um componente, ou classe de compostos químicos (alcaloides, flavonoides, ácidos graxos etc.), presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico. Em 2010, na RDC n. 14, manteve-se essa fundamentação, apenas ampliando sua aplicação como referência ao controle da matéria-prima e do medicamento fitoterápico.

Na RDC n. 26/2014, atualmente em vigor, explica-se sua aplicação pela instrução normativa n. 4/2014. Nela, o conceito de marcador é aplicável também para a determinação do prazo de validade, cujo conteúdo pode admitir variação de, no máximo, 10% do valor obtido quando da análise para liberação do lote. Seu conceito não foi alterado em sua essência e permanece como descrito na RDC n. 17; nessa instrução normativa, no entanto, especifica-se o que deve ser entendido como marcador ativo e como marcador analítico, quando correlacionados ao efeito terapêutico. Para o caso do marcador ativo, não há correlação entre sua presença e teor aos efeitos farmacológicos observados para a planta em questão. Quando o marcador é considerado ativo, admitem-se até 15% a mais em seu teor; para o caso do analítico, essa variação é de, no máximo, 20%.

Estabelece-se, na instrução normativa n. 4/2014, que os marcadores devem conectar as etapas do processo produtivo e do controle da qualidade. Além disso, que seu teor deve manter-se estável tanto na matéria-prima quanto no produto final. Tal aspecto é especialmente relevante nos casos em que há

o marcador ativo, uma vez que a variação de seu teor implica diretamente a alteração no perfil de atividade biológica do produto.

O caso do marcador analítico encontra, nessa instrução normativa, uma referência indireta à RDC n. 166/2017. O marcador selecionado deve permitir calcular a quantidade de Ifav no produto acabado. Para tal, os parâmetros de validação de métodos analíticos devem ser atendidos (linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez). No Quadro 1, reproduzido da instrução normativa n. 4/2014, comparam-se os marcadores ativo e analítico e indicam-se suas variações permitidas, com exemplos. Nessa mesma instrução normativa, determina-se a publicação do *Guia de Orientação para Registro de Medicamento Fitoterápico e Registro e Notificação de Produto Tradicional Fitoterápico*.

Quadro 1 – Classificação de marcadores e sua variação permitida no produto acabado

Tipo de marcador	Correlação com efeito terapêutico	Exemplos – marcador (extratos)	Variação permitida do marcador
Ativo	Sim	Senosídeos ( <i>Senna alexandrina</i> ); silimarina ( <i>Silybum marianum</i> ); kavalactonas ( <i>Piper methysticum</i> ); escina ( <i>Aesculus hippocastanum</i> ); hipericinas ( <i>Hypericum perforatum</i> ); flavonoides ( <i>Crataegus oxyacantha</i> e <i>Ginkgo biloba</i> )	15%
Analítico	Não	Ácidos valerênicos ( <i>Valeriana officinalis</i> ); echinacosídeos ( <i>Echinacea purpurea</i> ); derivados do ácido cafeoilquínico ( <i>Cynara scolymus</i> )	20%

Fonte: Brasil, 2014.

## Demais Determinações Previstas pela Regulamentação: testes de pureza e integridade

Além da inspeção visual, rotulagem, avaliação de volumes e massas e a determinação dos ativos e/ou marcadores, na regulamentação também se determina que mais análises sejam realizadas, uma vez que os riscos ao

consumo ou a baixa eficiência terapêutica não são, necessariamente, relacionados apenas aos fatores já mencionados.

As matérias estranhas à droga vegetal, já abordadas anteriormente neste capítulo, constituem uma das avaliações mais primárias, porém requerem prática e treinamento por parte do analista. Cores, morfologia e consistência de elementos presentes nas amostras botânicas e, por vezes, carregados ao produto final por sua não eliminação ao longo do processo produtivo, podem causar confusão durante uma inspeção pouco atenta. O excesso de matérias estranhas pode fazer com que a dose final, obtida após o preparo no laboratório fabricante ou mesmo pelo consumidor, em sua casa, seja menor do que a prevista como suficiente para mostrar-se eficaz em um determinado tratamento. Igualmente arriscada é a presença de contaminantes biológicos nessas matérias estranhas, como fungos e bactérias.

O teor de umidade em quantidades acima do permitido pode levar a alterações químicas em determinadas substâncias na amostra por meio do fenômeno da hidrólise, geralmente facilitada quando a temperatura ambiente está elevada. Da mesma forma, também favorece a proliferação de micro-organismos, que levam a uma aceleração da degradação do produto.

Na rotina laboratorial de análise físico-química de produtos como os fitoderivados, em sequência à avaliação da umidade vem a determinação das cinzas. Nessa etapa é avaliada a presença do material inorgânico que não foi destruído após a incineração da matéria orgânica. Nesse resíduo ficam sais, compostos de cátions e ânions que podem ser provenientes da sua bioquímica e do ambiente natural onde a planta foi cultivada ou das matérias estranhas já discutidas. Quando se trata dos sais mais comuns, sua determinação pode ser realizada por meio de técnicas convencionais, como a espectrofotometria de absorção atômica e a volumetria. Testes qualitativos podem ser realizados mediante a reação com reagentes específicos, quando necessário. Parte dessas cinzas, no entanto, poderá ser insolúvel quando submetida à diluição por ácido mineral, geralmente usado previamente à identificação e quantificação dos componentes. Durante o processamento, más práticas de produção e conservação do maquinário industrial podem fazer com que haja a presença de vidro ou metal na amostra. Pedacos de pedras também podem ser encontrados em amostras vegetais, além de contaminantes do solo de onde a planta tenha sido coletada.

Dentro da amostra para a determinação de componentes inorgânicos, especial atenção é dada aos metais pesados. Sua origem na planta é, geralmente, decorrente de fertilizantes e pesticidas. Além disso, a contaminação ambiental também pode mostrar-se relevante, principalmente se o cultivo for

em áreas próximas a rodovias ou indústrias geradoras de efluentes que venham a contaminar lençóis freáticos.

Outra preocupação demonstrada na regulamentação é a determinação de resíduos de pesticidas. Sua presença advém de pulverização, fumigação e do tratamento do solo e podem acumular-se nos tecidos vegetais, ocorrendo então juntamente com as demais substâncias naturais da planta. Tais agrotóxicos são proibidos em lavouras de plantas destinadas a serem matrizes para a produção de fitoterápicos.

Por fim, a presença de radioatividade deve também ser pesquisada. Plantas expostas a um ambiente não controlado são, inevitavelmente, submetidas à radiação ionizante proveniente de radionuclídeos de ocorrência natural. Porém, o que a regulamentação específica considera é o risco de uma efetiva contaminação radioativa nas proximidades do local de cultivo.

## Controle Microbiológico da Qualidade

A preocupação com a qualidade microbiológica de plantas medicinais não pode ser dissociada da mesma inquietação relacionada aos produtos farmacêuticos em geral. Esse tema vem sendo desenvolvido com o passar dos anos e abrange aspectos inerentes às matérias-primas, ao consumidor e ao fabricante. As legislações pertinentes, em constante reformulação, norteiam o que deve ser considerado adequado ou aceitável, de acordo com o tipo de produto a ser analisado.

Inicialmente exercido somente sob a forma de fiscalização sobre o produto final, o controle da qualidade tinha conotação negativa devido à elevada perda de mercadorias, que levava a ocultar falhas em vez de resolvê-las. Com o advento da amostragem estatística e das boas práticas de fabricação, foi introduzido o conceito de confiabilidade nos produtos, evidenciando que sua qualidade não é atestada apenas com base na inspeção final do produto, mas em todo o processo de produção.

Ferramentas surgidas no Oriente e incorporadas posteriormente ao processo auxiliaram na qualidade total, influenciando diretamente no controle microbiano de produtos. Dois exemplos dessas ferramentas são o diagrama de Ishikawa (causa-efeito) para o controle e a solução de problemas e o conceito dos 5S, que engloba não só organização e disciplina, mas também limpeza e asseio, itens importantes na minimização da contaminação microbiana.

Surge, então, a ideia da garantia da qualidade, que incorpora os conceitos de gerenciamento ao controle da qualidade e estabelece a confiabilidade do

produto final. Com base nesses preceitos, surgem regras internacionais ligadas ao tema, apoiadas pela normatização técnica da organização internacional de padronização, mais conhecida como ISO (International Organization for Standardization), particularmente as séries ISO 9.000 e 9.001. Essas normas, que já sofreram várias reformulações, estabelecem requisitos que ajudam na melhoria dos processos internos, na maior capacitação dos colaboradores, no monitoramento do ambiente de trabalho e na verificação da satisfação dos clientes, colaboradores e fornecedores, em um processo sucessivo de melhoramento do sistema de gestão e do controle da qualidade.

Com base na necessidade de um modelo que concilie as normas nos diferentes mercados internacionais, a agência regulatória norte-americana, a Food and Drug Administration (FDA), compatibilizou seu sistema de boas práticas (GMP) com a ISO série 9.000. No Brasil, o modelo ISO, por sua abrangência e objetividade, atualmente é utilizado também em outros setores (NBR ISO 9.000 e BR ISO 9.001). Dependendo do segmento, as legislações no Brasil são também amparadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) e pela Anvisa.

A qualidade microbiológica constitui um dos atributos primordiais para o desempenho adequado de produtos farmacêuticos, principalmente em relação à segurança, eficácia e aceitabilidade. Falhas nas medidas preventivas e de controle no processo de fabricação podem resultar em produtos inadequados. A Anvisa exige que as empresas produtoras implantem as normas de boas práticas de fabricação, conforme as normas técnicas oficialmente estabelecidas. Entre as exigências, está a necessidade da realização de ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo de manufatura. Essas normas são dinâmicas e devem ser atualizadas para acompanhar a evolução tecnológica dos processos, novos equipamentos e gerenciamento da qualidade (Pinto *et al.*, 2015).

Atualmente, as normas recomendadas para fabricação e inspeção da qualidade de medicamentos são coincidentes às normas adotadas pelo Mercosul (Asociación Mercosur de Normalización – AMN). Contudo, outros grupos de produtos ainda estão em diferentes estágios de compatibilização.

Entretanto, como o controle de qualidade microbiológico referente às plantas medicinais ainda não está totalmente regulamentado, muitas das preparações que as utilizam ainda necessitam de estudos científicos mais detalhados, incluindo padronização química, testes biológicos *in vitro*, *in vivo* e avaliação clínica.

No Brasil, apesar da grande utilização de derivados de plantas, os produtos comercializados e consumidos até o fim do século passado ainda não estavam

sujeitos a nenhum tipo de controle. Em 1995, o Ministério da Saúde instituiu a portaria n. 6/MS/SNVS, que regulamentava o registro de produtos fitoterápicos para fins comerciais; posteriormente, em 2000, foi criada a RDC n. 17, substituída em 2004 pela RDC n. 48, que reafirmou, definitivamente, que fitoterápicos são medicamentos e, assim, resgatou a necessidade de estudos de segurança, eficácia e qualidade, prévios aos seus registros.

### Contaminação microbiológica

A contaminação microbiana de um produto não estéril (como as plantas medicinais) pode conduzir não somente à sua deterioração, com as mudanças físicas e químicas associadas, mas também ao risco de infecção e toxi-infecção para o usuário. As matérias-primas de origem natural têm maior suscetibilidade à contaminação microbiana, muitas vezes patogênica, sobretudo por bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, ou por fungos, principalmente *Aspergillus* e *Penicillium*.

Os fatores como poluição da água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem e estocagem são importantes e devem ser considerados. Algumas matérias-primas, devido às suas características, podem-se manter livres de contaminação, mas outras podem-se tornar substrato adequado ao crescimento microbiano, podendo ser utilizadas como fontes de nutrientes. As preparações de plantas medicinais, comumente, são provenientes de vegetais coletados, secos e embalados, muitas vezes em condições precárias de higiene e controle sanitário. Os produtos destinados às farmácias de manipulação, por serem distribuídos em pequena escala, ainda são fracionados, o que pode aumentar muito mais a carga microbiana. Além disso, o acondicionamento de produtos e sua estocagem também pode oferecer riscos.

A interação dos micro-organismos com a formulação também é fundamental para sua sobrevivência, portanto deve-se considerar o sistema conservante, o pH, a disponibilidade de nutrientes, a pressão osmótica, a presença de oxigênio, a atividade de água e tudo o mais que possa levar à deterioração ou não do produto.

Além disso, é importante não negligenciar as infecções microbianas que podem ocorrer por contaminação em produtos sem alterações sensoriais aparentes, principalmente considerando o tipo e a quantidade de agente microbiano, as vias de administração e a condição imunológica do indivíduo. Portanto, os limites microbianos devem ser ajustados às diferentes categorias

de produtos conforme o tipo de contaminação mais provável de ocorrer, tanto durante a fabricação como durante a administração, e o consumidor final (mais notadamente neonatos, crianças, idosos, debilitados, usuários de imunossuppressores ou de corticosteroides, entre outros fatores). Ao avaliar os resultados dos testes microbiológicos, o número e os tipos de micro-organismos presentes devem ser analisados no contexto do uso do produto proposto.

## Legislação

A Anvisa, em 2015, com base no consolidado de normas da Coordenação de Medicamentos Fitoterápicos e Dinamizados (Cofid, versão V), definiu que o controle de fitoterápicos deve abranger as avaliações da matéria-prima vegetal, tanto a droga como derivado, e do produto final (Brasil, 2015). Na RDC n. 26/2014, definiu-se que a produção de fitoterápicos deve seguir as boas práticas de fabricação e controle, regulamentadas pela RDC n. 17/2010 ou pela RDC n. 13/2013 para os produtos tradicionais fitoterápicos (PTF), conforme explicado na instrução normativa n. 04/2014.

Atualmente, todos os testes de controle microbiológico devem seguir a orientação da sexta edição atualizada da *Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2023). Os produtos de origem vegetal devem ser testados rotineiramente, não só pela avaliação microbiológica da matéria-prima, do processo de fabricação e da formulação do produto, mas também, quando necessário, pela determinação da atividade de água (*Aw*).

A determinação de água em drogas vegetais pode ser realizada por meio de três diferentes métodos: o gravimétrico (dessecação), o azeotrópico (destilação com tolueno) e o de Karl Fischer. O primeiro, tecnicamente mais rápido e simples, não se aplica a drogas com substâncias voláteis. O método azeotrópico é o preconizado para drogas vegetais contendo óleos voláteis. O método de Karl Fischer, por sua vez, é baseado na oxidação do dióxido de enxofre pelo iodo em uma solução de metanol e envolve técnicas mais complexas que necessitam de equipamentos especiais para sua execução (Brasil, 2023).

## O controle microbiológico

Como já explicado, na avaliação microbiológica de quaisquer formas farmacêuticas não estéreis, é importante avaliar a *Aw*, a presença de micro-organismos totais e dos patógenos.

Resultados de *Aw* igual ou inferior a 0,75 medidos a 25 °C, pH altos ou baixos, ausência de nutrientes e a adição de conservantes auxiliam na prevenção da contaminação microbiana.

Para a contagem total de micro-organismos em materiais vegetais, o método mais aceito mundialmente é o recomendado pela OMS, baseado na técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*) ou, alternativamente, de espalhamento em superfície.

Outra metodologia preconizada pela OMS é a filtração da amostra previamente diluída, em membrana de filtro de 0,45 mm de diâmetro (filtros de nitrato de celulose são usados para soluções aquosas, oleosas e fracamente alcoólicas, enquanto os de acetato de celulose são melhores para soluções fortemente alcoólicas). Após filtração, a membrana é colocada em meio de cultura apropriado e, após a incubação, é determinado o número total de micro-organismos (WHO, 2011).

Na sexta edição da farmacopeia atualizada (Brasil, 2023), a filtração em membrana é preconizada como técnica mais adequada, todavia sugere ainda o antigo método dos tubos múltiplos utilizando a avaliação do número mais provável (NMP), para as determinações bacterianas que não possam ser realizadas por um dos outros métodos e quando se espera que o produto apresente baixa densidade bacteriana.

Para todos os ensaios de contaminação microbiana, é necessário utilizar técnicas assépticas na amostragem e na execução dos testes. A análise deverá ser realizada, preferencialmente, em cabine de segurança biológica de classe II. Se a amostra tiver atividade antimicrobiana, ela deve ser removida ou inativada. Meios de cultura e soluções indicadas para tais ensaios estão descritas na sexta edição da *Farmacopeia Brasileira*; todavia, a própria publicação oficial permite a utilização de outros meios que tenham propriedades nutritivas e seletivas similares para as espécies microbianas pesquisadas. Métodos microbiológicos alternativos, inclusive os automatizados, também podem ser empregados desde que sua correspondência com o procedimento farmacopeico tenha sido validada.

A análise primária do controle de qualidade microbiano de fitoterápicos e plantas medicinais referida no segmento de ensaios microbiológicos para os produtos não estéreis da *Farmacopeia Brasileira* deve determinar o número total de bactérias mesófilas e fungos existentes por grama ou mililitro e deve definir se o produto satisfaz às exigências.

Além da edição mais recente da *Farmacopeia*, outras publicações associadas a ela ainda estão disponíveis para consulta, entre elas a segunda edição do *Formulário Homeopático da Farmacopeia Brasileira* a ser utilizado nas farmácias de manipulação, com 107 monografias associadas a plantas medicinais (Brasil, 2019).



Entre os micro-organismos preconizados para análise, deve-se considerar que, apesar de a família Enterobacteriaceae ser encontrada na natureza, ela tem valor indicativo de contaminação fecal, sugerindo condições de higiene inadequadas; portanto, uma alta contagem dessas bactérias é sempre indesejável em qualquer produto. Por sua vez, quando se pensa em bactérias Gram-positivas indicadas para análise, o *Staphylococcus aureus*, apesar de não ser contaminante comum de material vegetal e ser relativamente raro ser encontrado, pode fornecer quantidades importantes de enterotoxinas que, a depender da via de administração e das condições do usuário, pode ser prejudicial.

Além disso, o resultado de contagem de bactérias e fungos dentro dos limites aceitáveis não exclui a necessidade da pesquisa de potenciais patógenos. A presença de bactérias esporulantes deve ser fortemente considerada, já que alguns desses micro-organismos (por exemplo, *Bacillus* e *Clostridium* spp.) produzem esporos que são resistentes ao processamento severo e a condições de calor e seca elevadas, podendo sobreviver por um longo tempo no produto em um estado inativo. Embora os endosporos bacterianos e os esporos fúngicos possam ser considerados contaminantes comuns associados a plantas medicinais, não se pode descartá-los como potencialmente patogênicos, a depender da forma de utilização do produto contaminado.

Os fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, por exemplo, são muito importantes do ponto de vista micotóxicológico. A deterioração causada por fungos afeta a composição química das matérias-primas, diminuindo a sua potência medicinal. Sob condições favoráveis, alguns fungos podem sintetizar metabólitos tóxicos chamados de micotoxinas. Entre elas, a aflatoxina, sintetizada por espécies de *Aspergillus* e um pequeno número de outros fungos, já foi detectada várias vezes em plantas medicinais.

Parâmetros um pouco variados são preconizados por outros órgãos reguladores e farmacopeias ao redor do mundo. A OMS utiliza os parâmetros da *The International Pharmacopoeia*. A especificação para micro-organismos aeróbicos totais é que não haja crescimento superior a  $10^7$  UFC/g para o material vegetal para uso como chás e infusões e, no máximo,  $10^5$  UFC/g para uso interno. A especificação da OMS para leveduras e bolores é de, no máximo,  $10^4$  UFC/g para o material vegetal para uso como chás e infusões e, no máximo,  $10^3$  UFC/g para uso interno.

Tanto a *Farmacopeia Brasileira* quanto a norte-americana (Brasil, 2023; USP, 2018), elaboram as seguintes especificações para produtos para uso oral:  $10^4$  bactérias aeróbias/g ou mL,  $10^2$  fungos/g ou mL e ausência de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *S. aureus*.

Na *farmacopeia* europeia, os limites de contaminação microbiana indicados para os medicamentos à base de plantas, aos quais é adicionada água em ebulição antes da utilização, são para bactérias aeróbias totais de  $10^7$  UFC/g e para fungos de  $10^5$  UFC/g; para aqueles obtidos sem o acréscimo de água fervente antes da utilização, o parâmetro para bactérias aeróbias totais muda para  $10^5$  UFC/g e nos fungos para  $10^4$  UFC/g (European Pharmacopoeia, 2018). Para micro-organismos Gram-negativos o parâmetro é  $10^3$  UFC/g, porém *E. coli* e *Salmonella* sp. devem estar ausentes. Em geral, os testes de verificação da presença de micro-organismos em drogas vegetais e limites microbianos não mostram variação significativa e seguem as recomendações utilizadas para produtos farmacêuticos não estéreis (Quadro 2).

Quadro 2 – Diferentes limites microbianos internacionais recomendados para drogas à base de plantas (valores em UFC/g)

	<i>Farmacopeia norte-americana</i> <sup>a</sup>	<i>Farmacopeia europeia</i> <sup>b</sup>	OMS <sup>c</sup>	<i>Farmacopeia brasileira</i> <sup>d</sup>
Bactérias aeróbicas	$10^5/10^4/10^2$	$10^7/10^5$	$*/10^7/10^5$	$10^7/10^5/10^4$
Fungos	$10^3/10^2/10$	$10^5/10^4$	$10^5/10^4/10^3$	$10^4/10^3/10^2$
Gram-negativos	$10^3/*/*$	$*/10^3$	$*/10^4/10^3$	$10^4/10^3/10^2$
<i>Escherichia coli</i>	ausência	$10^3$ /ausência	$10^4/10^2/10$	ausência
Salmonella	ausência	$*/$ ausência	$*/$ ausência/ ausência	ausência

Fonte: atualizado e adaptado de Araújo & Bauab, 2012.

Notas: <sup>a</sup>Farmacopeia norte-americana (USP): o primeiro valor representa produtos botânicos secos ou em pó a serem tratados com água fervente antes do uso; o segundo valor representa tinturas, extratos botânicos em pó, extratos fluidos e suplementos nutricionais com plantas; e o terceiro valor representa infusões/decoções; <sup>b</sup>Farmacopeia europeia: medicamentos à base de plantas com uma ou mais drogas à base de plantas (inteiros, reduzidos ou em pó): o primeiro e o segundo valor representam medicamentos aos quais se adiciona água em ebulição antes do uso ou não, respectivamente; <sup>c</sup>OMS: o primeiro valor representa a contaminação de material vegetal *bruto* destinado a processamento posterior; o segundo valor representa os materiais vegetais que foram pré-tratados (p. ex.: por ebulição, como chás e infusões de ervas) ou que são usados de forma tópica; e o terceiro valor representa outros materiais vegetais para uso interno; <sup>d</sup>Farmacopeia brasileira: o primeiro valor representa as drogas à base de plantas em que se adiciona água em ebulição antes do uso; o segundo valor representa drogas herbáceas para as quais o processo de extração ocorreu na temperatura fria; e o terceiro valor representa os produtos finais para uso oral; \*Limites não são especificados.

O Conselho Internacional para a Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH) (ICH, 2023) é um projeto que reúne especialistas e autoridades reguladoras da indústria farmacêutica de diversos países, incluindo a Anvisa no Brasil. Atualmente com 21 membros e 37 observadores, tem como objetivo de discutir aspectos científicos e técnicos de registro de produtos farmacêuticos. Esse conselho recomenda que os limites aceitáveis de micro-organismos em produtos não estéreis (incluindo plantas) e as metodologias dos testes microbiológicos para sua detecção devam ser intercambiáveis entre essas regiões. Assim sendo, diferentes farmacopeias estão, na atualidade, ajustando seus critérios e uniformizando seus parâmetros para definição da qualidade microbiológica. Isso também, possivelmente, ocorrerá com a OMS e, no futuro, espera-se que ocorra maior uniformidade em todo o mundo para esses critérios.

Em síntese, a contaminação microbiana de drogas e produtos de origem vegetal pode levar a um desempenho final prejudicado pela diminuição ou perda da estabilidade da formulação, à modificação de características físicas e à inativação dos ingredientes ativos e excipientes na formulação, o que causa também a redução da confiabilidade do produto. Os manipuladores devem ser treinados nas boas práticas de fabricação, boas práticas de colheita e manuseio e armazenamento seguros de medicamentos à base de plantas. O controle microbiológico da qualidade desses produtos, juntamente com o controle de qualidade físico-químico garantem não só a sua integridade, mas também a segurança no seu uso, sua eficácia e aceitabilidade.

## Considerações Finais

Por mais que as técnicas e o conhecimento a respeito da química e farmacologia de plantas medicinais sejam constantemente aprimorados, ainda está longe a capacidade de se conhecer a real e total composição de uma planta. Os compêndios apresentam os processos de identificação e doseamento das substâncias mais características, porém não necessariamente as mais ativas. Há que se levar em consideração, também, as sinergias entre substâncias presentes em um mesmo insumo, que podem concorrer para o aumento ou diminuição dos efeitos desejados de uma planta medicinal. Se, além disso, levam-se em conta as associações industriais e, principalmente, aquelas feitas de forma magistral ou doméstica, não há condições técnicas para que a avaliação química seja realizada de forma minimamente aprofundada. Com isso, os riscos no consumo, seja curto ou mais prolongado, tornam-se maiores. De forma semelhante, a

contaminação microbiana também pode ser assumida como um fator de risco maior ainda, principalmente se não forem bem observadas as condições de cultivo, estocagem e beneficiamento primário.

A legislação considera, corretamente, que antes de ser considerado efetivo, um produto destinado à saúde não deve apresentar riscos que se sobreponham a um eventual benefício causado por seu consumo. Com a evolução das técnicas analíticas e a observação da ocorrência ou não de efeitos farmacológicos e toxicológicos, a produção de derivados de plantas medicinais nunca foi tão conhecida, dominada e previsível. O diagnóstico microbiológico antes, durante e depois do processo farmacotécnico segue o mesmo caminho.

O controle da qualidade, em seus diversos aspectos, é fundamental para que a segurança e a eficácia sejam garantidas e, idealmente, deve ter suas metodologias desenvolvidas e validadas desde o processo de pesquisa e desenvolvimento até o acompanhamento rotineiro dos produtos lote a lote. Em relação ao analista, é desejável que seu conhecimento englobe desde os fundamentos e aplicações de técnicas até de informações mais aprofundadas sobre a natureza química e microbiana do insumo e do produto final. Dessa forma, poderá compreender o produto de maneira abrangente e não simplesmente reproduzir procedimentos descritos em compêndios.

## REFERÊNCIAS

- ARAUJO, M. G. F. & BAUAB T. M. *Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. Latest research into quality control* Isin Akyar. s.l.: Isin Akyar, 2012. Disponível em: <[www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/microbial-quality-of-medicinal-plant-materials](http://www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/microbial-quality-of-medicinal-plant-materials)>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BRASIL. *Farmacopeia Brasileira*. Brasília: Anvisa. 1929. Disponível em: <[https://fitoterapiabrasil.com.br/sites/default/files/documentos-oficiais/farmacopeia\\_brasileira\\_1a\\_edicao.pdf](https://fitoterapiabrasil.com.br/sites/default/files/documentos-oficiais/farmacopeia_brasileira_1a_edicao.pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Farmacopeia Brasileira*. 2. ed. Brasília: Anvisa, 1959. Disponível em: <[https://fitoterapiabrasil.com.br/sites/default/files/documentos-oficiais/farmacopeia\\_brasileira\\_2a\\_edicao.pdf](https://fitoterapiabrasil.com.br/sites/default/files/documentos-oficiais/farmacopeia_brasileira_2a_edicao.pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2023.
- BRASIL. Portaria n. 22 de 30 out. 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas, de 30 de outubro de 1967. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1967.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Farmacopeia Brasileira*. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Farmacopeia Brasileira*. 4. ed. Parte I. Brasília: Anvisa, 1988. Disponível em: <[www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8036json-file-1](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8036json-file-1)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 6/MS/SNVS, de 31 jan. 1995. Instituir e normatizar o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Farmacopeia Brasileira*. 4. ed. Parte II (Fascículos 1-6). Brasília: Anvisa, 1996 a 2005. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documentos/33832/260748/4\\_edicao\\_parte2.pdf](http://antigo.anvisa.gov.br/documentos/33832/260748/4_edicao_parte2.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 17, de 24 fev. 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2000. Disponível em: <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2000/rdc0017\\_24\\_02\\_2000.html](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2000/rdc0017_24_02_2000.html)>. Acesso em: 13 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 48, de 16 mar. 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2004. Disponível em: <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2004/rdc0048\\_16\\_03\\_2004.html](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2004/rdc0048_16_03_2004.html)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 37 de 6 jul. 2009. Trata da admissibilidade de farmacopeias internacionais. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2009. Disponível em: <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2009/res0037\\_06\\_07\\_2009.html](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2009/res0037_06_07_2009.html)>. Acesso em: 9 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 10, de 9 mar. 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2010a. Disponível em: <[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2010/res0010\\_09\\_03\\_2010.html](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html)>. Acesso em: 9 nov. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010b. Disponível em: <[www2.fcfa.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/principiosativosnaturaisetoxicologianovo/farmacognosia/5-edicao---volume-2.pdf](http://www2.fcfa.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/principiosativosnaturaisetoxicologianovo/farmacognosia/5-edicao---volume-2.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 26, de 13 maio 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014. Disponível em: <[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau delegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf)>. Acesso em: 9 nov. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Consolidado de Normas da Cofid (Versão V)*. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <[www.gov.br/sau/pt-br/composicao/sectics/daf/pnmpf/publicacoes/consolidado-de-normas-da-cofid-versao-5](http://www.gov.br/sau/pt-br/composicao/sectics/daf/pnmpf/publicacoes/consolidado-de-normas-da-cofid-versao-5)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2017. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Homeopático da Farmacopeia Brasileira 2. ed. Brasília: Anvisa, 2019. Disponível em: <[www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-homeopatico/arquivos/8095json-file-1](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-homeopatico/arquivos/8095json-file-1)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 6. ed. atual. Brasília: Anvisa, 2023. Disponível em: <[www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira)>. Acessado em: 10 nov. 2023.

*BRITISH Pharmacopoeia*. London: Medicines and Health Care Products Regulatory Agency, 2018.

*EUROPEAN Pharmacopoeia (Ph. Eur.)*. 9 ed. s.l: Council Of Europe, 2018.

GIL, E. S. *Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos*. 3. ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2010.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). Site. Disponível em: <<https://www.ich.org/>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

PINTO, T. J. A. *et al. Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos Correlatos e Cosméticos*. 4. ed. Barueri: Manole, 2015.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & WEST, D. M. *Fundamentos de Química Analítica*. 9. ed. Boston: Cengage Learning, 2014.

*UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP)*. 46. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Quality control methods for herbal materials, 2011. Disponível em: <[www.who.int/publications-detail-redirect/9789241500739](http://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241500739)>. Acesso em: 10 nov. 2023.





# 15

## Estudos Farmacológicos Não Clínicos e Clínicos com Plantas Medicinais

*Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues, Christina Gaspar Villela e Raquel Elisa da Silva López*

No Brasil, o uso de fitoterápicos e de plantas medicinais na Atenção Primária à Saúde foi estimulado por movimentos sociais, diretrizes de várias conferências nacionais de saúde e recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). A portaria do Ministério da Saúde n. 971, de 3 de maio de 2006, e o decreto-lei n. 5.813, de 22 de junho de 2006, que regulamentaram a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, respectivamente, foram passos decisivos para a introdução do uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no grandioso Sistema Único de Saúde (SUS), patrimônio da sociedade brasileira. Hoje sabemos que o desenvolvimento de fitoterápicos requer investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D) em diversas áreas do conhecimento, como agroecologia, química analítica, farmacologia e pesquisa clínica.

Áreas estratégicas do processo de inovação são permanentes e imprescindíveis, como a avaliação da viabilidade técnico-econômica, da propriedade intelectual, do regulatório, da comunicação, dos riscos e do modelo de negócio. Essas áreas interdisciplinares atuam em uma infraestrutura tecnológica de ponta e necessitam de uma estrutura sólida de trabalho em rede e com grande capacidade de aprimoramento nos processos de gestão. Sendo assim, inovar impõe significativo investimento no portfólio de empresas e de institutos,



acrescido de fomento e de políticas públicas em saúde. Há modelos recentes para o desenvolvimento de medicamentos oriundos da biodiversidade, que vão desde a bioinformática até o conhecimento tradicional de plantas (Ben-Shabat *et al.*, 2020).

O objetivo deste capítulo é abordar etapas farmacológicas na cadeia de desenvolvimento de fitoterápico de forma não exaustiva. A etapa não clínica, usualmente, inicia-se com estudos exploratórios de descobrimento e prospecção, a fim de otimizar métodos de extração, identificação e caracterização, em seguida estabelece a prova de conceito, da eficácia terapêutica em modelos *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Nessa etapa, é possível compreender o mecanismo de ação (farmacodinâmica) do medicamento fitoterápico. Uma vez estabelecida a eficácia terapêutica, a segurança do produto é avaliada por meio de estudos de toxicologia. Os estudos não clínicos são muito relevantes pelas informações preditoras que oferecem aos estudos clínicos em humanos, como prova de conceito, regime de dose, segurança adequada e critérios de inclusão e exclusão (Eupati, 2015). A transição dos estudos não clínicos para os clínicos requer autorização da vigilância sanitária.

## Normas e Guias Terapêuticos

O estudo farmacológico em ensaios não clínicos prediz a dose, a frequência e a via de administração nos ensaios clínicos. A segurança farmacológica é um dos pilares na cadeia de desenvolvimento de fármacos, logo guias nacionais e internacionais foram desenvolvidos como referências para o uso dos melhores métodos e rotinas e como instrumento regulatório.

A portaria n. 22, de 30 de outubro de 1967, foi o primeiro ato normativo voltado para preparações fitoterápicas. O marco legal foi a portaria n. 6, de 31 de janeiro de 1995, da Secretaria de Vigilância Sanitária, influenciado pela OMS. Somente em 1999 foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) por meio da lei n. 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e sua finalidade institucional é promover a proteção da saúde da população pelo controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras. Um avanço relevante foi a introdução do conceito de medicamento de uso tradicional e histórico das plantas medicinais, nomeado medicamento fitoterápico tradicional (Brasil, 2000).

Atualmente, é possível registrar um produto na modalidade de medicamento fitoterápicos (MF) e produtos tradicionais fitoterápicos (PTF), regulamentados pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 26/2014. Segundo essa resolução, são considerados MF aqueles obtidos com uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia são baseadas em evidências clínicas e caracterizados pela constância de sua qualidade. Os PTF, por sua vez, são obtidos com uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade são baseadas em dados seguros e publicados na literatura técnico-científica e concebidos para serem usados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Quanto ao registro, os MF são passíveis de registro ou registro simplificado (especificações da instrução normativa n. 2/2014) (Brasil, 2014b). Este último representa as espécies vegetais que são amplamente difundidas na literatura técnico-científica. Os PTF são sujeitos a registro, registro simplificado ou notificação. A notificação é uma comunicação prévia à Anvisa sobre a intenção de fabricar, importar e/ou comercializar PTF, e é considerada um processo simplificado e sem análise prévia da Anvisa sobre a comprovação da qualidade, segurança e eficácia. Os aspectos relacionados à qualidade estão padronizados nas farmacopeias, e os relacionados à segurança e à eficácia estão padronizadas por meio do formulário de fitoterápicos da *Farmacopeia Brasileira*. Toda orientação para MF e PTF estão documentadas na Anvisa, no *Guia de Orientação para Registro de Medicamento Fitoterápico e Registro e Notificação de Produto Tradicional Fitoterápico* (Brasil, 2014a, 2014c) e no *Consolidado de Normas de Registro e Notificação de Fitoterápicos* (Brasil, 2018). A segurança e a eficácia de estudos não clínicos são orientadas pelo guia de *Estudos não Clínicos Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos* (Brasil, 2019). Não há guias para orientar ensaios de eficácia nos estudos não clínicos, porque dependem do modelo específico da doença, da área terapêutica e da classe de fármaco.

Os guias internacionais foram usados como referência para construção dos guias nacionais, até mesmo a definição de que o insumo farmacêutico ativo vegetal (*Ifav*) enquadra-se como fitoterápico ou fitofármaco. Neste caso, é recomendado o guia da *European Medicines Agency* (EMA, 2010). Assim, o guia de orientação para registro de MF e registro e notificação de PTF da Anvisa foi elaborado a partir dos guias sobre fitoterápicos publicados pela OMS e por órgãos reguladores da Austrália (*Therapeutic Goods Administration*), do Canadá (*Health Canada*) e da Comunidade Europeia (*European Medicines Agency*).

No guia para condução dos estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos (Brasil, 2019), recomendam-se os mesmos estudos básicos do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). Essa organização, iniciada em 1990, tem como missão alcançar a harmonização mundial para garantir a segurança, efetividade e alta qualidade de medicamentos. Como partícipes reúne autoridades reguladoras e indústrias farmacêuticas para discussão técnica e científica do registro de medicamentos. A princípio, o conselho iniciou com agências de medicamentos dos Estados Unidos, da Europa e do Japão, além dos membros das indústrias. Atualmente, apresenta-se com 11 membros reguladores, incluindo a Anvisa, que tem como vantagem o fortalecimento do mercado nacional de medicamentos, além de promover cooperação entre os países-membros.

## Estudos Farmacológicos

A investigação de novos medicamentos segue fases convencionalmente estabelecidas. A princípio, o fármaco com efeito demonstrado experimentalmente é submetido a testes de toxicidade e teratogenia em diferentes espécies animais (Fuchs, 2017). Aprovado nessa etapa, o fármaco é submetido a uma sequência de fases até a produção do medicamento, forma farmacêutica terminada que contém o fármaco, geralmente em associação com adjuvantes farmacotécnicos, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (lei n. 5.991, de 17 de dezembro de 1973).

Os aspectos farmacológicos de um fármaco constituem a base para sua aplicação clínica. Para uma melhor compreensão das etapas envolvidas na indústria farmacêutica e nas agências reguladoras é fundamental conhecer dois ramos da farmacologia, a farmacocinética (PK, sigla em inglês para *pharmacokinetics*) e farmacodinâmica (PD, sigla em inglês para *pharmacodynamics*), pois a relação PK/PD fornece o racional para o surgimento de novos medicamentos e para a otimização de estratégias de tratamento.

## Farmacocinética (PK)

A farmacocinética constituiu a análise quantitativa da absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e eliminação (excreção) dos fármacos no organismo por meio de modelos matemáticos.

### Absorção

Os fármacos são administrados por diversas vias, por exemplo, oral, intramuscular ou intravenosa, alcançando a corrente sanguínea, exceto quando o objetivo terapêutico esperado seja gerar um efeito local. Fatores químicos, relacionados ao fármaco, e fisiológicos, relacionados ao indivíduo, influenciam a absorção do fármaco, que depende de movimentos transmembranas. No Quadro 1, apresentam-se as propriedades químicas e variáveis fisiológicas que interferem na absorção dos fármacos.

Quadro 1 – Importantes propriedades químicas e variáveis fisiológicas que interferem na absorção dos fármacos através das membranas celulares

Propriedades químicas	Natureza química; peso molecular; lipossolubilidade/hidrossolubilidade; grau de ionização do fármaco – $pK_a$ versus pH do meio; tamanho das partículas; forma farmacêutica
Variáveis fisiológicas	Motilidade gástrica; pH e fluxo sanguíneo no sítio de absorção; área de superfície disponível para absorção; fluxo sanguíneo no mesentério; tempo de esvaziamento gástrico (ingestão com ou sem alimento); alterações na fisiologia gastrintestinal, em virtude da idade ou doença, por exemplo, diminuição da área de absorção como consequência de gastrectomias; eliminação pré-sistêmica

A maioria dos fármacos são substâncias anfotéricas, e o pH do meio determinará a fração disponível na forma não ionizada que poderá difundir-se através das membranas celulares. Essa fração depende da natureza química do fármaco, do seu  $pK_a$  e do pH local. O  $pK_a$  é o valor de pH no qual 50% das moléculas em solução sofrem ionização. Os ácidos (HA) ionizam-se liberando prótons ( $H^+$ ) e ânions ( $A^-$ ) quando dissolvidos em água. A absorção de um fármaco poderá variar segundo o ambiente do indivíduo no qual ele se encontra. O ácido acetilsalicílico tem  $pK_a$  de 4,4, e, no estômago, onde o pH é de aproximadamente 2,0, existirá maior proporção da forma não ionizada, capaz de difundir-se rapidamente através do estômago para a corrente sanguínea. Contudo, os fármacos são, em sua maioria, absorvidos no intestino devido à grande área de absorção (fator que influencia positivamente a velocidade de difusão por uma membrana biológica – lei de Fick).

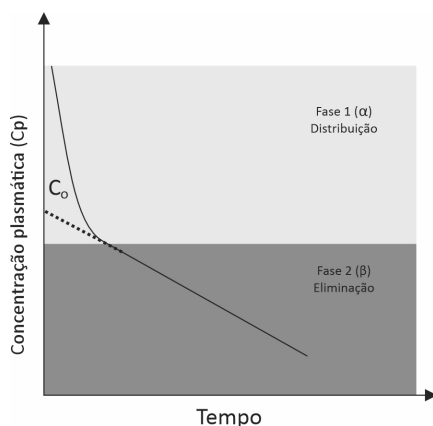
O coeficiente de difusão de uma molécula não ionizada na membrana é inversamente proporcional à raiz quadrada de seu peso molecular. Essa relação indica que, na ausência de outras influências, a molécula difunde-se mais rapidamente através da membrana quanto menor for seu tamanho; porém, a propriedade mais importante para a permeabilidade de uma molécula através da membrana é a lipossolubilidade, que influencia a difusão através do coeficiente de partição lipídeo/água: quanto maior a lipossolubilidade da molécula, maior é seu coeficiente de partição, e mais rápida será a difusão.

### *Distribuição*

De acordo com a via de administração, o fármaco alcança a circulação sistêmica, quer por administração direta (via intravenosa – IV) ou após absorção a partir do sítio de aplicação (via oral – VO; via intramuscular – IM, etc.). Uma vez na circulação, o fármaco pode atravessar a membrana celular por transporte passivo – difusão simples e difusão por poros – e especializado, que envolve componentes da membrana – difusão facilitada, difusão por troca, transporte ativo etc. Logo, o fármaco pode ligar-se aos componentes intracelulares, ou ser sequestrado pelas organelas, a depender do gradiente de pH e do potencial elétrico da bicamada lipídica. O fármaco que atinge a circulação sistêmica torna-se suscetível a outros processos farmacocinéticos, como metabolismo, excreção e redistribuição (Fuchs, 2017).

A Figura 1 representa a concentração plasmática do fármaco *versus* o tempo, e nela são observadas duas regiões distintas: no início há alta concentração no plasma (compartimento central), que diminui rapidamente em razão da distribuição do fármaco para os tecidos (compartimento periférico), o que é representado pela fase 1 ou fase alfa (cinza claro), medida pela meia-vida alfa ( $T_{1/2}$  de distribuição); após ocorrer equilíbrio entre os compartimentos central e periférico, a diminuição na concentração plasmática dependerá da eliminação por biotransformação ou excreção, o que é representado pela fase 2 ou fase beta (cinza escuro), medida pela meia-vida beta ( $T_{1/2}$  de eliminação).

Figura 1 – Representação gráfica da concentração plasmática de um fármaco administrado intravenosamente em dose única, pelo tempo



A fase 1 (cinza claro) ou alfa ( $\alpha$ ) reflete a distribuição do fármaco nos tecidos, enquanto a fase 2 (cinza escuro) ou beta ( $\beta$ ) reflete a biotransformação e a eliminação do fármaco.  $C_0$  corresponde à concentração plasmática hipotética do fármaco, se a distribuição ocorresse instantaneamente.

Os fármacos distribuem-se para os tecidos por meio dos líquidos corporais totais (60% do peso corporal), representados pelos volumes intracelular e extracelular. O intracelular corresponde a mais da metade do líquido total ( $\pm 66\%$ ) e resulta da soma do conteúdo líquido de todas as células do corpo, enquanto o extracelular é constituído de plasma e líquido intersticial (Guyton & Hall, 2021). Um homem de 70 kg tem um volume corporal total de cerca de 40 L, sendo 14 L de volume extracelular e 28 L de volume intracelular.

Os fármacos que têm pesos moleculares baixos deixam facilmente a circulação por filtração capilar. Entretanto, a extensão da sua distribuição depende da lipossolubilidade, ionização em pH fisiológico, grau de ligação às proteínas plasmáticas e teciduais, e diferenças no fluxo sanguíneo regional.

### *Metabolismo*

Os animais desenvolveram sistemas complexos para desintoxicar ou eliminar substâncias químicas estranhas ou xenobióticos (que incluem os fármacos). O metabolismo não pode ser considerado como sinônimo de degradação, mas como o conjunto de reações químicas fortemente aliadas à expressão gênica e mediadas por enzimas, que convertem um fármaco num composto diferente do originalmente administrado (biotransformação).

De acordo com o tipo de enzima, a biotransformação pode ser classificada em reação de fase I e reação de fase II, que podem ou não ocorrer de modo sequencial. Ambas as fases diminuem a lipossolubilidade, aumentando, assim, a eliminação renal.

- Fase I – envolve as reações de oxidação, redução e hidrólise, que fornecem um grupo funcional que aumenta a polaridade (e geralmente a hidrossolubilidade) do fármaco; o grupo funcional também fornece um sítio adequado para o metabolismo da fase II.
- Fase II – envolve a conjugação ou reações sintéticas, nas quais um grupamento químico grande é ligado à molécula, o que geralmente aumenta a solubilidade em água e facilita a excreção do metabólito pelo organismo.

A biotransformação modifica a estrutura do fármaco e, portanto, seus efeitos farmacológicos. Ocorre em vários órgãos, sobretudo no fígado, e consiste em carregar eletricamente o fármaco para que, ao passar pelos túbulos renais, não seja reabsorvido (Fuchs, 2017). Alguns fármacos são biotransformados em metabólitos inertes, porém a maioria é biotransformada em metabólito com atividade parcial. Além disso, um fármaco pode se tornar farmacologicamente ativo após a biotransformação (profármacos) e, até mesmo, tóxico (paracetamol → NAPQI).

Um número crescente de agentes necessita de ativação química para exercer seu efeito terapêutico. Os benzodiazepínicos, por exemplo, produzem metabólitos ativos de longa duração e resultam na persistência da sedação mesmo depois de o fármaco original ter sido eliminado. Além disso, a metabolização do fármaco pode aumentar o risco de toxicidade comparado ao fármaco original, como é o caso do risco de hepatotoxicidade associada ao uso crônico do paracetamol. A principal via de metabolização do paracetamol é hepática, por três mecanismos distintos: conjugação com ácido glicurônico (glicuronização), sulfatação e oxidação. A via oxidativa produz um metabólito altamente tóxico (n-acetil-p-benzoquinonimina – NAPQI), que, em condições terapêuticas, une-se ao glutatona, formando conjugados de cisteína e ácido mercaptúrico. A glicuronização e a sulfatação, principais vias de metabolização, produzem metabólitos atóxicos. Porém, a administração do paracetamol em doses elevadas satura as enzimas principais de metabolização. A oxidação do excesso de paracetamol gera maior quantidade de NAPBQI, que excede a capacidade de desintoxicação da glutatona, resultando em hepatotoxicidade (Rowden *et al.*, 2005).

As enzimas da metabolização de fármacos apresentam uma multiplicidade de formas, e diferenças interindividuais na expressão genética (polimorfismo) contribuem para as diferenças no metabolismo de fármacos. Algumas enzimas são constitutivamente expressas, enquanto outras são expressas apenas quando ativadas pela presença de um exógeno químico. Mutações genéticas podem resultar em deficiência ou ausência da expressão de uma enzima em particular, e uma toxicidade inesperada da droga pode ocorrer pela administração de uma dose tipicamente segura do fármaco.

A síntese enzimática elevada, como resultado da presença de um composto exógeno, é referida como indução, que pode ser decorrente da combinação de alterações na transcrição e na regulação da tradução e pós-tradução. A indução pode ser produzida por certos fármacos e constituintes alimentares, álcool e tabagismo. Quando cronicamente administrados, eles induzem seu próprio metabolismo. A indução enzimática é um fenômeno importante da interação medicamentosa que envolve ação de superfamílias enzimáticas, como o citocromo P450 envolvido nos processos de oxidação.

As enzimas do citocromo P450 são hemeproteínas que abrangem superfamílias de enzimas relacionadas (cada uma, chamada de CYP, é seguida por um conjunto de números e uma letra). Os diferentes membros da família apresentam especificidades de substratos distintas, mas que frequentemente se sobrepõem. Em humanos, foram descritos 57 genes putativamente funcionais e 58 pseudogenes, dos quais três principais (CYP1, CYP2 e CYP3) estão envolvidos no metabolismo de fármacos no fígado humano. A maioria dos genes, divididos em 18 famílias e 44 subfamílias com base em suas similaridades de sequência, está envolvida no metabolismo de ácidos biliares, eicosanoides e esteroides.

Algumas vezes, dois fármacos competem pela mesma enzima para o metabolismo, resultando num decréscimo na velocidade de metabolismo. Esse processo é referido como inibição e explica as arritmias cardíacas ou convulsões produzidas pela teofilina em pacientes que fizeram uso da eritromicina. O metabólito da eritromicina diminui a depuração da teofilina por inibição do citocromo P450 (Rieder & Spino, 1988).

### *Excreção*

Os fármacos são removidos para o meio externo por meio da excreção. Fármacos hidrossolúveis e carregados ionicamente são filtrados nos glomérulos ou secretados nos túbulos renais, não sofrendo reabsorção tubular, pois têm dificuldade de atravessar membranas. Além dos rins, os sítios de excreção incluem pulmões, fezes, secreção biliar, suor, lágrima, saliva e leite materno. A excreção pulmonar é essencial para fármacos gasosos ou voláteis.



O fígado é capaz de excretar ativamente fármacos por meio da bile para a luz intestinal, onde podem ser reabsorvidos pela circulação êntero-hepática ou excretados pelas fezes. Vários conjugados de substâncias hidrofílicas (particularmente glicuronídeos) concentram-se na bile e são transportados até o intestino, onde o glicuronídeo é hidrolisado, liberando a substância ativa. Essa liberação tem como resultado a formação de um reservatório de substância recirculante, que pode atingir cerca de 20% da substância total no corpo, além de prolongar a sua ação. Por essa via são excretados fármacos de alto peso molecular, os polares e os ativamente englobados em micelas de sais biliares, colesterol e fosfolípidios.

Os rins representam a principal via de eliminação de fármacos. Todos os compostos na forma livre no plasma estão no filtrado glomerular. Os compostos polares tendem a permanecer no túbulo renal durante a fase de reabsorção na formação da urina, enquanto os lipossolúveis difundem-se de volta para a circulação sistêmica. A eliminação de fármacos pelos rins é mais bem quantificada pela depuração (*clearance*), definida como o volume de plasma que contém a quantidade da substância removida pelos rins na unidade de tempo. Na insuficiência renal, fármacos e metabólitos ativos excretados pelos rins podem acumular-se e produzir efeitos tóxicos. Para evitar tal ocorrência, ajustes nos esquemas posológicos tornam-se imperativos.

### Farmacodinâmica (PD)

A ação de um fármaco acarreta efeitos benéficos (ação terapêutica) ou maléficos (ação tóxica) que resultam de suas interações com moléculas alvos no organismo de forma a alterar as atividades destas macromoléculas. Os fármacos não conferem uma função nova a sistema, órgão ou célula, mas alteram qualitativa ou quantitativamente as suas funções já existentes.

A PD estuda a atividade biológica dos fármacos em sistemas vivos, ou seja, seus efeitos bioquímicos, fisiológicos e moleculares no corpo, incluindo a ligação ao receptor, transdução de sinal deflagrada e as interações químicas. Os termos ação e efeito de um fármaco são característicos da PD. O primeiro corresponde à série de alterações bioquímicas ou fisiológicas que modificam funções celulares; efeito, por sua vez, é o termo relativo à resposta, observável e mensurável, e é clinicamente expresso pela redução de sintomas (objetivo terapêutico) ou aparecimento de reações adversas (Fuchs, 2017).

### Ação de um fármaco

A maior parte dos fármacos tem sua ação determinada pelo tipo de macromolécula a que se liga no organismo. A estrutura química da molécula tem afinidade pelo fármaco, que é ditada pelas interações químicas convencionais (por exemplo, iônicas, covalentes, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de van der Waals). Essa ideia está incluída no conceito de receptor, que em farmacologia constitui uma entidade molecular específica, e, portanto, o componente biológico que interage com um fármaco, responsável por modificar as funções celulares, seja diretamente (agonista), seja indiretamente (antagonista) (Brunton, 2012). Em se tratando de sítio alvo dos fármacos, destacam-se os canais iônicos (alvo dos anestésicos locais), as proteínas transportadoras de membrana (alvo dos antidepressivos inibidores seletivos de recaptação); as enzimas (alvo dos anti-inflamatórios não esteroides) e os receptores.

A maior parte dos receptores tem um ou mais domínios extracelulares para a interação com ligantes (agonistas ou antagonistas); esses domínios estão unidos, por um ou mais segmentos transmembrana lipofílicos, a um domínio efetor, frequentemente localizado na face citoplasmática da membrana, gerando uma transdução de um sinal extracelular numa resposta intracelular (Alberts *et al.*, 2017). Existem quatro classes de receptores, descritas no Quadro 2.

Quadro 2 – Classe de receptores de fármacos, mecanismos de transdução de sinal e exemplos de agonistas

Classe de receptor	Mecanismo de transdução de sinal	Exemplo
1. Ionotrópico ou canais iônicos	Despolarização ou hiperpolarização da membrana.	A nicotina ativa canais iônicos (receptores), despolarizando a membrana.
2. Metabotrópico ou acoplados à proteína G	Liberação das subunidades da proteína G, aumento ou diminuição de AMPc ou GMPC, ativação da PLC e $PLA_2$ , e modulação de canais iônicos.	A adrenalina ativa receptores $\beta$ -adrenérgicos do pulmão e leva à broncodilatação pelo aumento da permeabilidade de $K^+$ (hiperpolarização).

Quadro 2 – Classe de receptores de fármacos, mecanismos de transdução de sinal e exemplos de agonistas (cont.)

Classe de receptor	Mecanismo de transdução de sinal	Exemplo
3. Acoplados a enzimas	Fosforilação em tirosina de proteínas citoplasmáticas e ativação ou inibição proteica.	Insulina promove a dimerização de seu receptor e, ativação do da tirosina-quinase.
4. Intracelulares	Alteração da transcrição gênica e, em última instância, da síntese de novas proteínas.	Substâncias lipofílicas, atravessam as membranas, ativam receptores intracelulares e associam-se ao DNA.

AMPC: adenosina 3'5'-monofosfato cíclico; GMPc: guanosina monofosfato cíclica; PLC: fosfolipase C; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; DNA: ácido desoxirribonucleico.

### *Efeito de um fármaco*

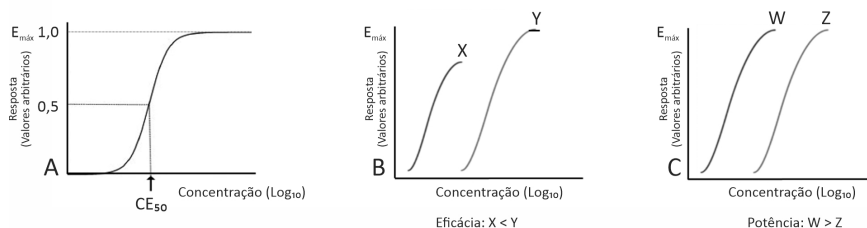
O estudo da PD baseia-se no conceito de interação fármaco-receptor, formando um complexo estável (Brunton, 2012). Contudo, caracteriza-se pela reversibilidade, como consequência da dispersão da concentração original do fármaco no sítio de ligação ou das forças de ligação, que podem ser mais fracas. Raramente há ligações covalentes que confirmam irreversibilidade. Quando a ligação é covalente, o fármaco e o receptor formam um complexo inativo, ou seja, para o receptor ativar-se, a célula precisa sintetizá-lo *de novo* para substituir a proteína receptora (Fuchs, 2017).

A ideia de que a resposta à interação fármaco-receptor depende da existência de número suficiente de receptores ocupados, proposta por Alfred Clark (1933), foi revista por Stephenson (1956), que introduziu o conceito de eficácia intrínseca, na qual a ocupação de receptores não é condição suficiente para produção de efeito. Além disso, Stephenson (1956) distinguiu as duas propriedades farmacodinâmicas fundamentais: a capacidade de ligar-se ao receptor (afinidade) e de ativá-lo (atividade intrínseca ou eficácia). Agonistas com eficácia elevada podem produzir a resposta máxima possível mesmo ocupando uma proporção relativamente baixa dos receptores.

A curva dose-resposta ilustrada na Figura 2 destaca dois importantes parâmetros farmacodinâmicos: a potência e a eficácia. Um agonista é o fármaco que tem afinidade pelo receptor e capacidade de deflagrar uma resposta (Figura 2a). Na Figura 2b, os fármacos X e Y são agonistas, uma vez que têm eficácia, mas o fármaco X não alcança o efeito máximo ( $E_{máx.}$ ),

caracterizando um agonista parcial, enquanto o fármaco Y é um agonista pleno ( $E_{\text{máx.}} = 100\%$ ). O antagonista tem afinidade pelo receptor, porém não deflagra uma ação e tem eficácia = 0. Em C, o fármaco W demonstra maior potência que o fármaco Z, uma vez que o valor de  $CE_{50}$  é menor (Noël, 2017). As diferentes conformações que os receptores são capazes de adotar podem ser estabilizadas por diferentes ligantes, produzindo diferentes efeitos funcionais pela ativação de vias distintas de transdução de sinal. Atualmente, prevalece o modelo de seleção de conformações, em que é possível uma conformação ativa na ausência de ligante, descartando definitivamente um mecanismo de ajuste induzido.

Figura 2 – Ilustrações demonstrativas de curvas dose-resposta



Em A: efeito máximo ( $E_{\text{máx.}}$ ) concentração eficaz média ( $CE_{50}$ ). Em B: agonistas (X e Y) com eficácias diferentes. Em C: agonistas (W e Z) com potências diferentes. Eixo Y = resposta; eixo X = concentração do agonista (escala logarítmica).

## Relação PK/PD

A PK descreve o que o corpo faz com um fármaco, ou seja, sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção, que afetam sua concentração plasmática; enquanto a PD descreve o que uma droga faz ao corpo, ou seja, trata dos receptores com os quais a droga interage e da ação deflagrada (efeito). A relação “concentração do fármaco *versus* efeito farmacológico” constitui a base da farmacologia e o princípio da terapia medicamentosa racional (Currie, 2018). Estudos baseados em modelagem PK/PD vêm sendo conduzidos em “sistema de entrega controlada de fármacos” e desenvolvem novas técnicas para manipular a absorção e a disponibilidade de fármacos que favoreçam determinado efeito (Zou *et al.*, 2020). A modelagem PK/PD permite quantificar a relação entre a exposição e a resposta ao medicamento e caracterizar as influências de parâmetros específicos do sistema fisiológico e da patologia, do medicamento e do sistema de distribuição.

## Estudos Toxicológicos

Os estudos toxicológicos servem para avaliar o grau de toxicidade dos fármacos em órgãos-alvo e a reversibilidade deste efeito e estabelecer a relação entre dose e efeito adverso (Unicef, 2002; EMA, 2009). Nesses estudos são considerados aspectos relacionados à dose, via de administração, modelos experimentais *in vitro* e espécie animal utilizada, tecido-alvo e tempo de exposição. Tais informações são cruciais para estimar as doses transponíveis para os ensaios clínicos, a fim de certificar que estes estejam seguros para administração humana. Para os fitoterápicos, o instrumento orientativo da Anvisa é o *Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos* (Brasil, 2013), que foi baseado em diferentes documentos de agências e instituições, como a agência europeia European Medicine Agency (EMA), que tem cinquenta guias orientativos para ensaios não clínicos de toxicologia e mais cinco para farmacocinética e farmacologia de segurança (Langhof *et al.*, 2018). A Anvisa também utilizou as recomendações da *Food and Drug Administration* (FDA), *International Conference on Harmonization* (ICH), *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), *World Health Organization* (WHO) e *National Cancer Institute* (NCI). Antes de iniciar os estudos toxicológicos, é imperioso que a qualidade da matéria-prima vegetal seja avaliada por meio do perfil cromatográfico (*fingerprint*) do Ifav padronizado e que os marcadores químicos e/ou ativos sejam identificados e quantificados; e que seja produzido lote único, ou seja, quantidade de matéria-prima suficiente para realização de todos os testes toxicológicos indicados. Igualmente importante para os ensaios toxicológicos é: definir a via de administração; estabelecer a espécie animal mais apropriada a ser utilizada para extrapolação para humanos; realizar alguns testes com a formulação final ou Ifav caracterizado; se houver a inclusão de novos excipientes cuja toxicidade não seja conhecida, realizar estudos não clínicos de segurança (Brasil, 2013, 2019); garantir excelente qualidade sanitária dos animais de experimentação, ou seja, animais livres de patógenos específicos, designados *specific pathogen free* (SPF), com idade e peso adequados; conduzir os testes de acordo com as boas práticas de laboratório (BPL). Em conjunto, esses parâmetros garantem a qualidade e credibilidade dos resultados. Uma reflexão necessária refere-se ao uso dos animais de experimentação de forma racional: deve-se evitar a duplicidade e a utilização desnecessária de animais, a fim de reduzir o número de animais de experimentação e o sofrimento animal ao mínimo possível e aumentar a utilização

de métodos alternativos ao ensaio *in vivo* (Cazarin *et al.*, 2004). Em 2014, a Anvisa reconheceu 17 métodos alternativos que foram previamente validados pela OECD (Astrogildo & Tréz, 2018).

### Avaliação toxicológica não clínica de fitoterápicos

A seguir são abordados os testes específicos descritos no *Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos* aplicáveis à categoria de medicamento fitoterápico.

#### *Toxicidade aguda*

Historicamente, o teste de toxicidade aguda é feito com apenas uma dose, mas doses escalonáveis são mais apropriadas para definir a dose máxima tolerada. Vale ressaltar que o estudo de letalidade não é mais exigido. A definição da dose e da frequência de administração é estabelecida a partir do conhecimento adquirido no estudo de farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação). No entanto, para fitoterápicos esse estudo não é exigido pela Anvisa, em virtude de ser uma mistura de substâncias naturais complexas. O fitoterápico deve ser administrado pela mesma via pretendida em humanos e em uma ou mais doses por um período não superior a 24 h, e a observação continua por 14 dias após administração. Quando a via oral é a escolhida, a administração nos animais é por gavagem. São preconizados animais de duas espécies de mamíferos e pelo menos uma roedora. Com relação à dose, deve ser considerado o limite de 2.000 mg/kg/dia em roedores e 1.000 mg/kg/dia em não roedores. Os testes englobam avaliação de mortalidade, patologia clínica, alteração de peso corporal e observação clínica e finalizam com a necropsia, fase na qual são obtidas informações que são úteis para prever as consequências em situações de superdosagem em humanos e que auxiliam os estudos clínicos de fase III.

#### *Toxicidade de doses repetidas*

A duração recomendada para os estudos de toxicidade de doses repetidas está vinculada à duração da indicação terapêutica e ao escopo proposto no ensaio clínico (Quadro 3). Os ensaios são conduzidos em duas espécies de mamíferos, das quais uma é não roedora. As doses escolhidas são baseadas nas informações dos estudos de toxicidade aguda. Em geral, são escolhidas três

doses, das quais a mais alta dose refere-se àquela com expectativa de observar efeito tóxico, mas sem causar sofrimento ao animal, respeitando o limite máximo de 1.000 mg/kg/dia. Com a utilização de doses variáveis, é possível determinar a dose que não causa efeito adverso (NOAEL, sigla em inglês para *no observed adverse effect level*, nível máximo de dose sem observação de efeito adverso), que é mandatário.

Quadro 3 – Recomendação da duração dos ensaios de toxicidade em doses repetidas

Duração máxima nos ensaios clínicos	Duração máxima recomendada nos ensaios não clínicos	
	Roedor	Não roedor
Até duas semanas	Dois semanas	Dois semanas
Entre duas semanas e seis meses	Semelhante ao estudo clínico	Semelhante ao estudo clínico
Acima de seis meses	Seis meses	Nove meses

Nos ensaios de toxicidade, são avaliados os seguintes parâmetros: mortalidade, sinais clínicos, peso corporal, consumo de água e ração, patologia clínica, duração de reversibilidade da toxicidade e investigação anátomo-histopatológica, incluindo avaliação de órgão reprodutores masculinos e femininos (toxicidade reprodutiva).

#### *Tolerância local*

O estudo de tolerância local avalia o efeito das substâncias que entram em contato com diferentes locais do corpo como resultado da administração mesmo acidental. Esse ensaio é realizado como parte dos estudos de toxicidade, a fim de reduzir o número de animais e distinguir os efeitos físicos e químicos ocasionados pela administração local propriamente (traumas) dos efeitos toxicológicos locais. Os estudos *in vivo* somente serão realizados quando não houver ensaios *in vitro* validados ou quando estes forem inconclusivos ou não estiverem disponíveis nos estudos toxicológicos realizados. A frequência e o tempo de administração nos animais devem ser os mesmos para a aplicação terapêutica e não devem ultrapassar duas semanas. Outros métodos de avaliação serão discutidos para cada via de administração, de acordo com os aspectos anatômicos e fisiológicos (EMA, 2015):

- dérmica – serão necessários ensaios completos de tolerância em doses repetidas e avaliação do potencial efeito de sensibilização. Os testes de irritação podem ser realizados em coelho ou miniporco, porquinho-da-índia, porque suas peles são consideradas semelhantes às de humanos. Os parâmetros avaliados são grau de eritema, edema, descamação, surgimento de sarna e outras lesões. O tempo de observação dependerá das alterações e com limites até 72 h após a administração. Se as alterações persistirem serão feitas observações diárias até oito dias e análises histopatológicas;
- parenteral – os testes incluem aqueles cuja administração seja pelas vias intravenosa, intramuscular, intracecal e subcutânea. A dose respeitará o volume máximo tolerável para cada espécie animal. A frequência da administração é única e em alguns casos repetidas e com observações contínuas no período de 48 h/96 h. São realizadas análises macroscópicas e potencialmente histopatológicas, conforme o caso;
- ocular – quando não for possível a realização do ensaio *in vitro* ou se este for inconclusivo é necessário utilizar o teste de tolerância ocular em uma única dose, normalmente em coelhos. A extensão e o tipo de teste de tolerância dependerão do contexto em que o produto será aplicado. Outras áreas deverão ser analisadas, como cristalino, corpo vítreo e fundo ocular. Análises histológicas serão analisadas caso a caso;
- vaginal – na ausência de estudos *in vitro*, são utilizadas ratas, coelhas e cadelas. A dose deverá estar no volume máximo aplicável para cada espécie, e a administração de acordo com a utilização clínica. Os parâmetros avaliados são: sinais clínicos e secreção vaginal;
- retal – na ausência de estudos *in vitro*, as espécies utilizadas são coelhos ou cães. A dose deverá estar no volume máximo aplicável para cada espécie, e a administração de acordo com a utilização clínica. Os parâmetros avaliados são: sinais clínicos, observação da região anal e esfíncter anal, e fezes.

### *Genotoxicidade*

Os testes de genotoxicidade são idealmente realizados nas fases iniciais do desenvolvimento de fitomedicamentos, para identificar danos na molécula de DNA que podem manifestar-se tardiamente nos estudos de carcinogenicidade e teratogenicidade. Nem todo efeito carcinogênico ou teratogênico dá-se por alteração genética, nem toda alteração genética será um risco



humano. Os testes são realizados em células procariontes e eucariontes em modelos *in vivo* e *in vitro* e são avaliadas alterações cromossômicas e mutações gênicas. No teste de Ames, desenvolvido por Bruce Ames em 1973, é verificada a mutação gênica reversa em uma bateria de diferentes cepas de bactérias e com ativação metabólica (normalmente sobrenadante de fígado de rato S9 – fração microsossomal, contendo enzimas metabolizadoras de drogas): *Salmonella typhimurium* de cepas específicas para detectar substituições de pares de base (TA100, TA1535); e *Salmonella typhimurium* TA 102, *Escherichia coli* WP2 uvrA ou *Escherichia coli* WP2 uvrA [pKM101] para identificar deslocamentos, inserções e deleção (TA1537 ou TA 97, ou TA97a, TA98) e para avaliar indutores de dano oxidativo. Nesse ensaio é investigado se a substância teste é capaz de reverter as mutações e restaurar a capacidade funcional das bactérias em sintetizar os aminoácidos. O resultado é considerado Ames negativo quando todas as linhagens de cepas testadas forem negativas (bactérias não cresceram formando colônias na placa), tanto na ausência quanto na presença da ativação metabólica. É importante fazer vários controles negativos e, positivos por causa das características específicas de cada cepa, que pode variar em função das diferentes condições de ativação metabólica. Igualmente importante é realizar faixas de concentração da substância teste para que não produza efeito citotóxico às cepas. Os resultados serão avaliados estatisticamente e, se não forem claros, serão necessários testes adicionais em células de linfoma de camundongos (EMA, 2008). Neste teste são geralmente usadas células L5178Y que serão expostas à substância teste e é detectada a mutação no gene timidina quinase. Assim, com esses resultados, é possível confirmar ou refutar os dados positivos obtidos no teste de Ames. Outra possibilidade em células de mamíferos é o ensaio de micronúcleo, por meio do qual se avaliam quebras no cromossoma e aneuploidias em células sanguíneas e da medula óssea, após a administração (via apropriada) da substância teste.

No guia de avaliação de genotoxicidade de substâncias ou de preparações de plantas da EMEA (*Guideline on the Assessment of Genotoxicity of Herbal Substances/Preparations*), encontra-se um modelo de estratégias de ensaios, que está transcrito no *Guia de Estudos não Clínicos Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos* (Brasil, 2019).

### *Farmacologia de segurança*

No estudo de farmacologia de segurança, identificam-se os possíveis efeitos adversos em funções fisiológicas, ou seja, investiga-se o efeito farmacodinâmico não desejável em faixa de doses terapêuticas de uma substância.

Os sistemas fisiológicos críticos mais importantes são: cardiovascular, respiratório e nervoso central. Outros sistemas, como o renal e o gastrointestinal, não são avaliados de forma imediata e têm importância particular em populações de pacientes específicos (doença de Crohn, hipertensão renal, pacientes imunocomprometidos). Assim, o estudo deve ser desenhado e conduzido com base em aspectos específicos, como a classe terapêutica, potencial indicação de toxicidade nos ensaios de doses repetidas, assim como suspeita de evento adverso descrito na literatura científica.

Determinados parâmetros correlacionados às funções fisiológicas podem ser analisados nos ensaios de toxicologia, de farmacocinética e estudo clínico. Em relação à dose, deve ser feita correlação entre a dose que causa o efeito adverso e a dose do efeito terapêutico, e deve ser feito com uma única dose em duas espécies animais (roedor e não roedor). Os parâmetros avaliados no sistema nervoso central são atividade motora, coordenação, comportamento e temperatura corporal. No sistema cardiovascular, são avaliados pressão sanguínea, frequência cardíaca, eletrocardiograma. No sistema respiratório, mede-se a taxa e a função respiratória. Outros parâmetros são passíveis de análise, sendo avaliados caso a caso, como aprendizado e memória, exames eletrofisiológicos, audição e visão (sistema nervoso central); contractilidade ventricular, resistência vascular (sistema cardiovascular) e complacência e resistência das vias aérea e pressão da artéria pulmonar (sistema respiratório). Os estudos de farmacologia de segurança não são necessários para as seguintes situações: compostos de aplicação local, quando a substância ativa é bem caracterizada e quando foi demonstrado que a exposição sistêmica em órgãos e tecidos é muito baixa (EMA, 2001).

#### *Toxicidade reprodutiva*

No *Guia de Estudos não Clínicos Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos* (Brasil, 2019), menciona-se que é possível não realizar o estudo de toxicidade reprodutiva desde que esteja indicada na bula a proibição de uso por mulheres grávidas e lactantes por meio da seguinte informação: “Não foram realizados estudos em animais (machos ou fêmeas) relativos à toxicidade reprodutiva. Portanto, mulheres grávidas ou amamentando não devem utilizar este produto, já que não há estudos que possam garantir a segurança nessas situações” (Brasil, 2014a, 2014c). Contudo, estudos de toxicidade reprodutiva garantem maior segurança quando da administração de produto medicinal durante a gravidez, reduzindo anomalias, assim como direciona formas de tratamento médico em situações diversas na prática clínica.

Durante o desenvolvimento de medicamento, deve-se considerar avaliação de risco a partir da análise integrada dos estudos não clínicos e clínicos. Quanto aos não clínicos, levam-se em consideração propriedades da PK, PD, toxicologia, principalmente estudo de dose repetida para avaliação da reprodução, sobretudo em machos (libido, produção e transporte do gameta). Entretanto, os estudos clínicos ganham relevância à medida que o fitomedicamento é utilizado. Na toxicidade reprodutiva, avaliam-se:

- fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial – os estudos toxicológicos durante o período da fertilidade não são necessários, salvo quando houver indicação, por exemplo, evidências na literatura sobre efeito em hormônios ou em outros sistemas endócrinos (EMA, 2020). Normalmente são utilizados ratos (e coelhos como segunda opção) para o estudo de toxicidade embriofetal. A dose deve ser determinada a partir da não observação de efeito tóxico (NOAEL). Os períodos de avaliações para as fêmeas correspondem ao fértil, implantação e desenvolvimento embrionário, e os parâmetros avaliados são comportamento no acasalamento, fertilidade, estágios de pré-implantação e implantação embrionárias, consumo de ração, alteração de peso corpóreo e mortalidade. Ao fim, analisam-se as estruturas macro e microscópicas dos tecidos reprodutores;
- desenvolvimento pré e pós-natal – as fêmeas são expostas à substância teste desde a implantação até o fim da lactação. Os parâmetros avaliados são fêmeas não prenhas, mortalidade pré e pós-natal, crescimento e desenvolvimento alterados, incluindo comportamento, puberdade e reprodução. Da mesma forma, ao final são analisadas estruturas macroscópicas e microscópicas dos tecidos reprodutores;
- desenvolvimento embriofetal – as fêmeas são submetidas à eutanásia para avaliação dia antes da parição e os fetos analisados por histopatologia. Para as lactantes (quando expostas à substância teste durante o período da lactação) é avaliada a quantidade absorvida e a permanência da substância teste no leite e desenvolvimento dos filhotes lactentes.

## Carcinogenicidade

Os estudos de carcinogenicidade não são necessários caso não haja suspeita de potencial carcinogênico. Alguns preceitos devem ser levados em consideração como: observação de suspeitas de potencial efeito carcinogênico

em estudos de genotoxicidade, como evidências de lesões pré-neoplásicas nos estudos de toxicidade de doses repetidas, e verificação em ensaios de genotoxicidade *in vivo*; suspeitas baseadas em mecanismos epigenéticos; qualidade dos dados científicos (não clínico, clínico, epidemiológico, farmacovigilância). É importante frisar que, com a atualização dos guias, o estudo clínico de longa duração não pressupõe estudos de carcinogenicidade (EMA, 2009). O objetivo desse estudo é investigar o potencial tumorigênico da substância teste em animais de experimentação. Para tal, são verificados o início, a localização, as dimensões, as aparências e a progressão de cada tumor de forma visível ou apalpável. Os estudos são geralmente conduzidos em ratos durante 24 meses, e são analisadas a hematologia e a necropsia ao final do estudo.

## Considerações sobre a Pesquisa Clínica em Produtos Naturais

Os estudos clínicos são modelos usados no desenvolvimento de medicamentos, vacinas, técnicas cirúrgicas, procedimentos diagnósticos e na avaliação de tratamentos médicos. Constituem pesquisas translacionais focadas em transferir o conhecimento da experimentação de bancada para uma situação clínica. São conduzidas em seres humanos com os objetivos de descobrir e confirmar os efeitos clínicos e/ou farmacológicos experimentais, identificar qualquer reação adversa e estudar sua farmacocinética para verificar sua segurança e eficácia de uma substância teste (Dainesi & Goldbaum, 2012). É uma ferramenta essencial para melhorar a qualidade de vida da sociedade, beneficiando homem e animais, e, para que esses objetivos sejam atingidos, regras e princípios devem ser seguidos.

A ética é o princípio básico e primordial da pesquisa clínica e tem sua origem no juramento de Hipócrates (século V a.C.), que visa a proteção, o respeito, a justiça e o bem para todos os seres humanos. Contudo, muitos estudos clínicos desrespeitaram tal princípio e muitos pacientes sofreram abusos, alguns fatais. Os horrores da experimentação humana durante a Segunda Guerra Mundial chocaram a comunidade científica, levando à criação, em 19 de agosto de 1947, do Código de Nuremberg, que foi elaborado após o Tribunal de Nuremberg julgar 23 pessoas, das quais vinte eram médicos, consideradas criminosas de guerra pelos brutais experimentos realizados em humanos (Oliveira & Anjos Filho, 2006). Esse documento, um conjunto de normas, tornou-se um marco na história da humanidade, pois, pela primeira vez, foram estabelecidas recomendações internacionais sobre os

aspectos éticos envolvidos na pesquisa em seres humanos, que deram subsídios aos tribunais nos julgamentos dos crimes contra a humanidade que aconteceram nos campos de concentração contra os prisioneiros de guerra. Entre as normativas têm-se que:

- o consentimento voluntário é absolutamente essencial e deve ser informado e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Nesse documento são explicitadas, de forma escrita, todas as informações necessárias sobre a pesquisa, em linguagem clara e objetiva, de fácil entendimento, para o mais completo esclarecimento aos participantes ou a seu responsável legal. Os participantes devem ser legalmente capazes de dar consentimento e ter o livre direito de escolha sem qualquer intervenção de elementos de força, fraude, coação ou outra forma de restrição posterior, além disso, devem ter conhecimento suficiente do estudo para tomarem uma decisão. Isso exige que sejam informados aos participantes da pesquisa a natureza, a duração e o propósito do experimento, os métodos que serão usados, os riscos esperados e os possíveis efeitos sobre a sua saúde. O dever e a responsabilidade de garantir a qualidade do consentimento repousam sobre o pesquisador que conduz o experimento clínico;
- a pesquisa deve produzir resultados vantajosos para a sociedade, que não possam ser buscados por outros métodos de estudo;
- o experimento deve ser baseado em estudos pré-clínicos com animais e no conhecimento da evolução da doença ou das condições em estudo, logo os resultados já conhecidos justificam a condição do experimento;
- o experimento deve ser conduzido de maneira a evitar sofrimento e danos desnecessários, quer físicos, quer materiais;
- a pesquisa não deve ser conduzida quando existirem possibilidades de morte ou invalidez permanente ou qualquer dano importante à saúde do participante;
- o grau de risco aceitável deve ser limitado pela importância do problema que o pesquisador propõe-se a resolver;
- cuidados especiais devem ser tomados para proteger o participante de qualquer possibilidade de dano, invalidez ou morte, mesmo que remota;
- o experimento deve ser conduzido por pessoas cientificamente qualificadas;

- o participante deve ter a liberdade de se retirar no decorrer do experimento;
- e o pesquisador deve suspender os estudos em qualquer estágio, se ele acreditar que sua continuidade pode causar dano, invalidez ou morte dos participantes.

Em 1962 foi criada pelo FDA nos Estados Unidos uma lei federal chamada de Emenda de Kefauver-Harris ou Emenda de Eficácia de Drogas, que passou a exigir a necessidade de ensaios clínicos bem desenhados para o desenvolvimento e a aplicação de novos fármacos em seres humanos que comprovassem a eficácia e a segurança de medicamentos antes de sua comercialização. A emenda foi uma resposta à tragédia da talidomida, que foi usada para tratar os enjoos matinais durante a gravidez e causaram defeitos congênitos em milhares de crianças (Greene & Podolsky, 2012).

Em 1964, a associação médica mundial criou a Declaração de Helsinque, que apresentou os princípios gerais e as orientações sobre o uso de seres humanos na pesquisa clínica. Esse documento vem sofrendo atualizações, e a última em foi 2013. Nessa declaração os cinco princípios básicos são: 1) O estudo deve adaptar-se aos princípios morais e científicos que justificam a pesquisa médica e ser baseado em experiências de laboratório e com animais ou em outros fatos cientificamente determinados; 2) A pesquisa deve ser conduzida somente por pessoas cientificamente qualificadas e sob a supervisão de alguém medicamente qualificado; 3) O estudo não pode ser legitimamente desenvolvido, a menos que a importância do objetivo seja proporcional ao risco inerente à pessoa exposta; 4) Todo projeto de pesquisa clínica deve ser precedido de cuidadosa avaliação dos riscos inerentes, em comparação aos benefícios previsíveis para a pessoa exposta ou para outros; e 5) Precaução especial do médico ao realizar a pesquisa na qual a personalidade da pessoa exposta é passível de ser alterada pelas drogas ou pelo procedimento experimental. É importante destacar que o livre consentimento, como é norma, deve ser dado por escrito, em caso de incapacidade legal e deve ser concedido pelo responsável legal. O paciente da pesquisa clínica deve estar em estado mental, físico e legal que o habilite a exercer plenamente seu poder de decisão. O médico pode combinar a pesquisa clínica com o cuidado profissional, desde que o objetivo represente a aquisição de uma nova descoberta médica, apenas na extensão em que a pesquisa clínica é justificada pelo seu valor terapêutico para o paciente (Diniz & Corrêa, 2001).

No Relatório de Belmont, publicado em 1978, concluiu-se que os princípios éticos numa pesquisa clínica era a beneficência (o pesquisador é responsável pelo bem-estar físico, mental e social do participante com o mínimo de riscos); o respeito (reconhecer a capacidade de escolha e poder de decisão dos participantes); e a justiça (nenhum grupo de participantes deve ser colocado em risco em benefício de outrem). Em 1990, as agências regulatórias e as indústrias do Japão, Estados Unidos e de países da Europa através da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) elaboraram um documento para padronizar (harmonizar) os procedimentos de produção, testes e comercialização de novas drogas para garantir a segurança, eficácia e qualidade de medicamentos e reunir autoridades reguladoras e indústrias farmacêuticas para discussão técnica e científica do registro de medicamentos. Mais tarde, em 2007, outros países, como Austrália, Brasil, China, Singapura, Coreia, Índia, Rússia e Tailândia foram incluídos na ICH (Lindström-Gommers & Mullin, 2019).

Esses e outros documentos têm como objetivo proteger o participante da pesquisa clínica, que é um voluntário. Eles estão fundamentados nos quatro princípios da bioética, que são a autonomia, que é a capacidade de deliberar sobre os seus objetivos pessoais; a justiça, que se refere à equidade dos indivíduos; a beneficência, que é fazer o bem; e a não maleficência, que é evitar o sofrimento do participante. Além desses princípios, deve-se considerar o critério da vulnerabilidade que, segundo a resolução n. 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), refere-se ao estado de pessoas ou grupo de indivíduos que tenham a capacidade de autodeterminação reduzida ou impedida, ou estejam impedidos de opor resistência, sobretudo no que se refere ao TCLE. Entre eles, estão os prisioneiros, indivíduos com baixa escolaridade, doentes psiquiátricos, pessoas pobres, crianças e mulheres quando a cultura impõe submissão aos homens. Tais normativas também garantem condutas médicas referentes às boas práticas clínicas.

No Brasil, a pesquisa clínica teve início após a criação da primeira normativa de 1988. Em 1996 foi publicada a resolução normativa (RN) n. 196/96, que representou os primeiros passos na regulamentação e na normatização, com a criação da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) e a obrigatoriedade do TCLE. Desde então, a Anvisa regulamenta o registro de medicamentos no Brasil e, em 2003 e 2007, publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 136 e a RDC 17/07, que normatizam o registro de novos fármacos após pesquisas que comprovem sua eficácia e segurança, além de estudos controlados para medicamentos similares e genéricos.

O desenvolvimento de um novo medicamento inicia-se com a descoberta de uma molécula ou produto que tenha potencial farmacológico e prova de conceito. Após seus estudos pré-clínicos em modelos animais, o produto deve ser aprovado para testes em humanos. No caso de fitoterápicos, os registros são feitos de acordo com a RDC n. 26/2014. Os próximos passos são: o delineamento dos estudos clínicos, o processo de mascaramento, o desenvolvimento do protocolo, a definição de variáveis e do desfecho clínico, a submissão do projeto ao CEP e Conep para ser registrado, a seleção dos participantes, a uniformização dos grupos, os tipos de controle, a condução do estudo, as avaliações clínicas e laboratoriais, a determinação dos eventos adversos, a análise dos dados obtidos e os relatórios que devem ser entregues em todas as fases da pesquisa clínica antes do relatório final. O estudo oferece completa assistência clínica, jurídica e garante a locomoção dos participantes até os centros médicos e de pesquisa onde serão realizados os estudos e a coleta do material para as análises.

Os participantes da pesquisa clínica são alocados em grupos de maneira mais homogênea possível para evitar a introdução de uma variável que pode levar a um erro. Esses grupos são o de intervenção, que utilizam o tratamento proposto, e o grupo controle, cujos resultados são avaliados pela comparação dos desfechos clínicos obtidos em ambos os grupos, conforme o objetivo do estudo. Com isso, pode-se ter: estudo em paralelo (o mais usado) – uma vez que o participante tenha sido alocado num grupo, ele seguirá neste mesmo grupo até o final; estudos sequenciais simples – o participante será exposto a dois tratamentos em diferentes fases da pesquisa; estudos sequenciais cruzados – os voluntários são divididos em grupos que, ao atingirem um determinado período (pode ser a metade do estudo), invertem os medicamentos.

Outra decisão importante no delineamento do estudo clínico é o caráter de cegamento ou mascaramento, que se dividem em: 1) Estudos abertos: não há cegamento. O pesquisador, sua equipe e o participante sabem qual medicamento está sendo administrado e em qual grupo está alocado; 2) Estudo simples cego: neste tipo de mascaramento o participante não sabe qual fármaco está sendo administrado, e nem em qual grupo ele foi alocado; 3) Estudo duplo-cego: nem o pesquisador, nem o participante sabem o que está sendo administrado; 4) Estudo duplo-cego comparativo: o medicamento estudado será comparado com fármaco análogo ou placebo, porém médico e paciente não terão conhecimento de quem está em qual grupo de estudo; 5) Estudo triplo-cego: os participantes, o pesquisador e o estatístico que faz as análises dos dados não sabem qual é o grupo controle e os experimentais.



A pesquisa clínica é dividida em quatro principais fases, que se caracterizam pelo número de participantes, seus objetivos básicos, o tempo para cumprir tais objetivos e seus custos (Zago, 2004). Os estudos clínicos de fase I são os primeiros estudos em seres humanos e seu principal objetivo é avaliar a segurança e a tolerabilidade do medicamento para os participantes, ou seja, definir a maior dose tolerável e monitorar os efeitos adversos. Nessa fase estudam-se a PK e a PD do medicamento em indivíduos sem a doença do estudo, determinando se humanos e animais absorvem, distribuem, metabolizam e excretam o medicamento de maneira semelhante. O tamanho amostral é de vinte a cem participantes sadios, e os critérios de inclusão e exclusão são estabelecidos para afastar a possibilidade de doenças prévias, ou de limitações/restrições que possam representar um risco à integridade do participante da pesquisa. É a fase mais curta da pesquisa clínica, que vai de 6 a 12 meses, com custo aproximado de cinquenta milhões de dólares. Se o medicamento for um fitoterápico, os estudos de PK serão de difícil análise e interpretação, pois ele é um conjunto de substâncias e não um composto isolado, e, por isso, os resultados devem ser analisados com muito cuidado porque serão estimativas. Cada composto terá, ou não, uma atividade farmacológica distinta e sinérgica, na maioria das vezes, e farmacocinéticas diferentes. Para os estudos clínicos com plantas medicinais é mandatório seguir a farmacopeia vigente, que estabelece que todas as espécies vegetais têm que ter identificação botânica, com exsicata depositada em herbários de instituição fiel depositária, como os jardins botânicos, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), universidades, entre outros; cultivá-las seguindo as práticas de cultivo mínimo, adubação verde, uso de compostagem e consorciação de espécies; conter as informações sobre coleta como período do dia, local (cidade, estado e sistema de posicionamento global), fase de desenvolvimento (floração, frutificação, maturação), cultivo espontâneo; e seguir as metodologias preconizadas para a obtenção da classe química responsável pela atividade farmacológica da planta (Alonso, 2016).

Nos estudos clínicos de fase II são avaliados os critérios de eficácia e segurança. Dessa participam entre cem a mil indivíduos portadores da doença em estudo, e é muito importante que os pacientes não apresentem outras alterações clínicas além da doença que está sendo avaliada. Em sua grande maioria, utilizam-se estudos aleatorizados, mascarados, com grupo controle usando a medicação padrão ou placebo e um grupo com o medicamento em estudo (delineamento clássico em paralelo). Essa fase da pesquisa clínica pode ser dividida em fase IIA e fase IIB. Na fase IIA ou fase 2 inicial, estuda-se a prova de conceito em humanos, ou seja, realizam-se os ensaios de eficácia

em humanos com a doença, para avaliar a utilidade do novo medicamento. Nessa etapa participa um pequeno número de pacientes, e uma única dose do medicamento é administrada. A monitorização de segurança é proativa e direcionada aos órgãos-alvo, detectados na fase pré-clínica. O tempo previsto para a fase IIA é de 9 a 12 meses. Na fase IIB ou tardia, definem-se a dose terapêutica e o intervalo terapêutico, que é a menor dose eficaz e a maior dose segura. Essa fase é planejada para determinar as doses que serão utilizadas no estudo de fase III. Além disso, aumenta-se o nível de conhecimento sobre o medicamento em desenvolvimento, ou seja, estudos investigativos para descobrir novos aspectos importantes sobre o medicamento. Desta participam um número maior de indivíduos, visto que existem mais informações sobre a segurança do medicamento em estudo e a duração é de 12 a 16 meses e custo aproximado de setenta milhões de dólares. Os critérios de inclusão e exclusão dos participantes são restritos e rigorosos e os estudos são multicêntricos, realizados em mais de um centro de pesquisa (Chen *et al.*, 2018).

Os estudos clínicos de fase III são confirmatórios e de validação dos resultados de segurança, eficácia e comparação com tratamento padrão obtidos na fase II. Envolvem entre mil e trinta mil participantes, têm duração de 14 a 20 meses e custo de 180 milhões de dólares. Nessa fase utiliza-se a faixa posológica eficaz que não provocou reações adversas graves. Além disso, avaliam-se os eventos adversos raros que não se manifestaram nas fases I e II, as interrupções do estudo por motivos externos, as falhas terapêuticas, as interações medicamentosas, o uso correto da medicação, a morbidade e a mortalidade relacionada ao tratamento que não foram observados nos estudos anteriores. O tipo de delineamento dos estudos clínicos de fase III é em paralelo, onde há formação de pelo menos dois grupos, e sempre utiliza cegamento (Lockett *et al.*, 2019). No cegamento, os envolvidos não conhecem em que grupo, controle e experimental, foi realizada a intervenção. Os detalhes da pesquisa clínica ficam no anonimato para evitar tendências. Os estudos do tipo paralelo são considerados como padrão ouro para evidenciar a eficácia da intervenção em investigações na área médica e são também os mais comumente utilizados nos ensaios clínicos. Os estudos podem ser mono, duplo e triplo-cegos. No mono-cego, o observado ou observador não conhece a intervenção nos grupos; no duplo-cego o observado e o observador não conhecem a intervenção nos grupos; e no triplo-cego o observado, o observador e o estatístico, que analisa os dados, não conhecem a intervenção nos grupos (Vasconcelos, 2016). Os critérios de inclusão devem simular as condições clínicas na prática. Esses estudos fornecem as principais informações para a geração das bulas, como as indicações terapêuticas, dosagem, reações adversas mais comuns que

acompanharão o produto. Neles, também se avaliam a eficácia do medicamento a longo prazo e a segurança a médio e longo prazos. Os resultados finais dos estudos clínicos de fase III permitem comprovar a segurança, a qualidade e a eficácia do medicamento e sua apreciação pelas instituições responsáveis pelo registro de medicamentos, como a Anvisa, no Brasil, e o FDA, nos Estados Unidos. Entretanto, os estudos de fase III não garantem a segurança de todos os efeitos adversos relacionados ao medicamento, pois, em algumas situações, como nas comorbidades, a incidência desse evento adverso ou inesperado é tão baixa que seria necessário utilizá-lo em milhares de indivíduos para a sua identificação (Lockett *et al.*, 2019).

Após a concessão do seu registro, o medicamento pode ser comercializado e distribuído para uso da população; essa fase de pós-registro ou de estudo pós-comercialização é denominada de estudos clínicos de fase IV, e é exigida pela agência reguladora. É desenhada de forma a estabelecer o valor terapêutico, verificar como uma intervenção funciona no mundo real, já que podem ocorrer novas reações adversas, ocasionadas por uso mais prolongado ou interações medicamentosas com uso clínico em larga escala (farmacovigilância), além de determinar as estratégias de tratamento. Tais estudos são aplicáveis em uma amostra muito grande, o que permite achados relevantes para as novas indicações do fármaco. Nessa fase os estudos confirmam os resultados da fase III. São realizados pela empresa responsável pelo produto em conformidade com as respectivas normas sanitárias, e é esta que também responde pelo *marketing*, segurança e farmacovigilância (Reis *et al.*, 2011).

Os benefícios da pesquisa clínica vão além dos resultados clínicos que as inovações oferecem à população. Sua condução é um processo complexo e multidisciplinar que envolve pesquisadores de áreas da saúde, estatísticos, economistas, agências regulatórias, comitês de ética, participantes e patrocinadores. Nesse ecossistema criam-se inúmeras oportunidades de ganhos em termos de infraestrutura do sistema de saúde, processos de tratamento, recursos humanos, capital intelectual e atividade econômica para o país. Os estudos clínicos atraem investimentos, movimentam a economia do país, são grandes impulsionadores da produção científica e inovação, aumentam o acesso à saúde e o padrão de tratamento de pacientes participantes dos estudos clínicos, impactam positivamente a qualidade de vida da população, fortalecem o sistema de saúde do país, incrementam a infraestrutura física de atendimento e cuidado ao paciente usada em centros de pesquisa, proporcionam acesso e conhecimento mais ágil de novas tecnologias por equipes de tratamento, estabelecem times multidisciplinares em centros de excelência para teste e entrega de inovações, melhoram a atualização

e treinamento profissional e reforçam a cultura de medicina baseada em evidências (Truong *et al.*, 2019).

A condução da pesquisa clínica de medicamentos baseados em plantas medicinais segue os mesmos protocolos padronizados para outros medicamentos e são empregados em todo o mundo. O Brasil possui um conjunto de características para ser referência na realização desses estudos porque: apresenta grande biodiversidade; tem alta demografia e importante economia; é um dos maiores países em termos de volume de vendas de medicamentos, com elevado número de indústrias farmacêuticas instaladas; possui composição étnica diversificada; os seus profissionais envolvidos possuem alto nível de qualificação; e suas instituições, agências reguladoras e comitês de ética são muito capacitados. Todos os envolvidos nessa cadeia têm suas ações fundamentadas em padrões definidos em normas e leis nacionais e diretrizes internacionais, além de serem monitorados durante todo o estudo pelos órgãos sanitários e de ética em pesquisa (Almeida *et al.*, 2020).

## Considerações Finais

A pesquisa e a produção de medicamentos a partir das plantas impõem desafios diversos. Os ensaios preditivos não clínicos de farmacodinâmica e segurança envolvem o uso de animais. Contudo, novas ferramentas tecnológicas têm sido desenvolvidas como alternativas ao uso de animais, como os ensaios *in silico*, a farmacogenômica, a identificação de biomarcadores, a cultura de tecidos, o sistema microfluídico com células tridimensionais que simulam atividades fisiológicas de órgãos, entre outros. Desde a publicação da RDC n. 26 pela Anvisa, os medicamentos fitoterápicos devem ser testados e receber concessão de registro para serem comercializados e, para isso, devem comprovar sua eficácia e segurança, cumprindo as exigências por meio dos estudos não clínicos e clínicos. Portanto, as fases de estudo para os medicamentos fitoterápicos são quase as mesmas exigidas para um fármaco sintético, mas a aprovação do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) é exclusiva das pesquisas com plantas medicinais. Além disso, os usos populares, ou seja, o conhecimento tradicional associado, direcionam o planejamento do desenvolvimento de um fitoterápico e suas possíveis indicações clínicas a serem avaliadas nos estudos com seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALBERTSON, T. E. Cloroquina e outras aminoquinolinas. In: OLSON, K. R. *Manual de Toxicologia Clínica*. 6 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- ALBUQUERQUE, A. Para uma ética em pesquisa fundada nos Direitos Humanos. *Revista de Bioética*. 21: 412-422, 2013.
- ALEXANDER, J. C. & SALAZAR, D. E. Modern drug discovery and development. In: ROBERTSON, D. (Ed.). *Clinical and Translational Science: principles of human research*. London: Academic Press, 2009.
- ALMEIDA, E. M. *et al.* Therapeutic potential of medicinal plants indicated by the Brazilian public health system in treating the collateral effects induced by chemotherapy, radiotherapy, and chemoradiotherapy: a systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 49: 102293, 2020.
- ALONSO, J. R. *Tratado de Fitoterápicos e Nutracêuticos*. São Paulo: AC, 2016.
- AMES, B. N. *et al.* Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 2.281-2.285, 1973.
- ANDRADE, E. *et al.* Non-clinical studies required for new drug development – Part I: early *in silico* and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(11): e5.644, 2016.
- ASTROGILDO, T. & TRÉZ. Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. *Revista Brasileira de Zootecias*, 19: 97-113, 2018.
- BEN-SHABAT, S. *et al.* Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: applications and drug delivery strategies. *Drug Delivery and Translational Research*, 10: 354-367, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 17 de 24 de fevereiro 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2000.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos versão II. Brasília: Anvisa, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n. 2 de 13 de maio de 2014. Dispõe a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e a lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014b.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n. 4 de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2014c.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Consolidado de Normas de Registro e Notificação de Fitoterápicos*. Brasília: Anvisa, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia n. 22, versão I. Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos*. Brasília: Anvisa, 2019.
- BRUNTON, L. L. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CANADA. Draft: Pathway for licensing natural health products used as traditional medicines. 2012. Disponível em: <[https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt\\_formats/pdf/prodnatur/legislation/docs/tradit-eng.pdf](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt_formats/pdf/prodnatur/legislation/docs/tradit-eng.pdf)>. Acesso em: jan. 2024.
- CAZARIN, K.; CORRÊA, C. & ZAMBRONE, F. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(3): 289-299, 2004.
- CHEN, C. M.; CHI, Y. & CHANG, H. M. Curtailed two-stage design for comparing two arms in randomized phase II clinical trials. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 28: 939-950, 2018.
- CURRIE, G. M. Pharmacology, Part 1: introduction to pharmacology and pharmacodynamics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46: 81-86, 2018.
- DAINESI, S. M. & GOLDBAUM, M. Pesquisa clínica como estratégia de desenvolvimento em saúde. *Revista da Associação de Medicina Brasileira*, 58: 2-6, 2012.
- DINIZ, D. & CORRÊA, M. Declaração de Helsinki: relativismo e vulnerabilidade. *CADERNOS de Saúde Pública*, 17: 679-688, 2001.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. 2001. Disponível em: <[www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s-7-safety-pharmacology-studies-human-pharmaceuticals-step-5\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s-7-safety-pharmacology-studies-human-pharmaceuticals-step-5_en.pdf)>. Acesso em: jan. 2024.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guideline on the assessment of genotoxicity of herbal substances/preparations, 2008. Disponível em: <[www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-assessment-genotoxicity-herbal-substances-preparations\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-assessment-genotoxicity-herbal-substances-preparations_en.pdf)>. Acesso em: nov. 2023.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guideline on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2), 2009. Disponível em: <[https://database.ich.org/sites/default/files/M3\\_R2\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/M3_R2_Guideline.pdf)>. Acesso em: jan. 2024.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Reflection paper on the level of purification of extracts to be considered as herbal preparations, 2010. Disponível em: <[www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-level-purification-extracts-be-considered-herbal-preparations\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-level-purification-extracts-be-considered-herbal-preparations_en.pdf)>. Acesso em: nov. 2023.

- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products, 2015. Disponível em: <[www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-local-tolerance-testing-medicinal-products\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-local-tolerance-testing-medicinal-products_en.pdf)>. Acesso em: nov. 2023.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). ICH S5 (R3) Guideline on detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals, 2020. Disponível em: <[www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s5-r3-guideline-detection-reproductive-and-developmental-toxicity-human-pharmaceuticals-step-5-revision-4\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s5-r3-guideline-detection-reproductive-and-developmental-toxicity-human-pharmaceuticals-step-5-revision-4_en.pdf)>. Acesso em: jan, 2024.
- FERNANDES, T. M. *Plantas Medicinais: memória da ciência no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2004. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/bg6yw>>. Acesso em: jan. 2024.
- FUCHS, F. D. Farmacologia clínica: princípios e aplicações. In: FUCHS, F. D. & WANNMACHER, L. *Farmacologia Clínica e Terapêutica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional, Guanabara Koogan, 2017.
- GREENE, J. A. & PODOLSKY, S. H. Reform, regulation, and pharmaceuticals – the Kefauver-Harris Amendments at 50. *New England Journal of Medicine*, 367(16): 1.481-1.483, 2012.
- GUYTON A. C. & HALL, J. H. Organização funcional do corpo humano e controle do meio interno. In: HALL, J. E. *Guyton & Hall: tratado de fisiologia médica*. 14. ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional, Guanabara Koogan, 2021.
- LANGHOF, H. *et al.* Preclinical efficacy in therapeutic área guidelines from FDA and EMA: A cross-sectional study. *British Journal Pharmacology*, 175: 4.229-4.238, 2018.
- LIN, X. *et al.* Structural basis of ligand recognition and self-activation of orphan GPR52. *Nature*, 579: 152-157, 2020.
- LINDSTRÖM-GOMMERS, L. & MULLIN, T. International Conference on Harmonization: recent reforms as a driver of global regulatory harmonization and innovation in medical products. *Clinical Pharmacology Therapy*, 105: 926-931, 2019.
- LOCKETT, J. *et al.* Adequacy of inclusion of older adults in NIH-funded phase III clinical trials. *Journal of American Geriatric Society*, 67: 218-222, 2019.
- MORO, A. & INVERNIZZI, N. The thalidomide tragedy: the struggle for victims rights and improved pharmaceutical regulation. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, 24(3): 603-622, 2017.
- MUKHTAR, M. *et al.* Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research*, 131: 111-120, 2008.
- NOËL, F. G. Medicamento (vs Remédio) e Fármaco (vs droga), 2013. Disponível em: <<https://sbfte.org.br/wp-content/uploads/2017/05/1.medicamentovsRemedio-Farmacovs-droga-Junho2013.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2020.
- NOËL, F. G. Ensaios de binding: fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações no desenvolvimento de fármacos, 2017. Disponível em: <[www.sbfte.org.br/wp-content/uploads/2018/11/LIVRO\\_FNoel.pdf](http://www.sbfte.org.br/wp-content/uploads/2018/11/LIVRO_FNoel.pdf)>. Acesso em: 21 jul. 2020.
- OLIVEIRA, P. H. & ANJOS FILHO, R. N. Bioética e pesquisas em seres humanos. *Revista da Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo*, 101: 1.187-1.227, 2006.



- ORHAN, I. & DENIZ, F. Natural products as potential leads against coronaviruses: could they be encouraging structural models against SARS-CoV-2? *Natural Products and Bioprospecting*, 10: 171-186, 2020.
- REIS, C.; LANDIM, A. & PIERONI, J. P. Lições da experiência internacional e propostas para a incorporação da rota biotecnológica na indústria farmacêutica brasileira. *BNDES Setorial*, 34: 5-44, 2011.
- RIEDER, M. J. & SPINO, M. The theophylline-erythromycin interaction. *Journal of Asthma*, 25(4): 195-204, 1988.
- ROWDEN, A. K. *et al.* Updates on acetaminophen toxicity. *Medical Clinics of North America*, 89: 1.145-1.159, 2005.
- STEPHENSON, R. P. A modification of receptor theory. *British Journal of Pharmacology*, 11: 379-393, 1956. Disponível em: <<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1476-5381.1956.tb00006.x>>. Acesso em: 21 jul. 2020.
- THE EUROPEAN PATIENTS' ACADEMY ON THERAPEUTIC INNOVATION (EUPATI). The predictive value of non-clinical testing, 19 Nov. 2015. Disponível em: <<https://toolbox.eupati.eu/resources/e-predictive=-value-of-non-clinical-testing/#:-:text=Non%2Dclinical%20studies%20provide%20this,appropriate%20inclusion%20and%20exclusion%20criteria>>. Acesso em: jan. 2024.
- TORNIO, A. & BACKMAN J. T. Cytochrome P450 in pharmacogenetics: an update. *Advances in Pharmacology*, 83: 3-32, 2018.
- TRUONG, K. *et al.* Retrospective pharmaceutical financial benefits and cost avoidance analysis of clinical trial participation in the Australian haematology setting. *Internal Medicine Journal*, 49: 1.092-1.098, 2019.
- UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF) *et al.* *Handbook Non-Clinical Safety Testing*. Geneva: Unicef, UNDP, World Bank, WHO, 2002.
- VALLANCE, P. & SMART, T. G. The future of pharmacology. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 147: S304-S307, 2006.
- VASCONCELOS, B. C. E. O cegamento na pesquisa científica. *Brazilian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 16: 5, 2016.
- ZAGO, M. A. A pesquisa clínica no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 9: 363-374, 2004.
- ZOU, H. *et al.* Application of pharmacokinetic-pharmacodynamics modeling in drug delivery: development and challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 11: 997, 2020.







# 16

## Proteção do Conhecimento Tradicional no Brasil e a Experiência das Bases de Dados da Índia e da China

*Sylvia Rivera Alves Vieira, Priscila da Nobrega Rito e  
Wanise Borges Gouvea Barroso*

**A** maior parte dos recursos genéticos e das espécies animais e vegetais existentes no planeta encontra-se em países do hemisfério sul, enquanto a sede das principais indústrias farmacêuticas, de engenharia genética e biotecnologia está nos países do hemisfério norte. Melo (2015) estima que estejam no Brasil cerca de 20% a 22% da diversidade de espécies vegetais encontradas no mundo. Com os novos avanços na área de biotecnologia, ter acesso à biodiversidade tornou-se algo estratégico, alvo de constantes disputas e debates (Brasil, 2019).

No Brasil, tem ocorrido a apropriação indevida de espécies vivas da flora e da fauna, bem como da sabedoria popular sobre suas utilizações, com o objetivo de realizar estudos e produzir medicamentos, sem remuneração dos benefícios para o país ou para a população detentora dos conhecimentos (Fiorillo & Rodrigues, 1996). A biopirataria que tem sido realizada não é apenas o contrabando de diversas formas de vida da flora e fauna, mas, principalmente, a apropriação e monopolização dos conhecimentos das populações tradicionais no que se refere ao uso dos recursos naturais (Fiorillo & Rodrigues, 1996).

A exploração da biodiversidade deve ser feita de forma controlada e consciente, a fim de garantir proteção ao meio ambiente e benefícios para a sociedade. Entretanto, tem ocorrido de forma indiscriminada, resultando

no empobrecimento dos recursos genéticos e podendo levar ao aumento do número de espécies ameaçadas de extinção (Brasil, 2018).

Com a finalidade de minimizar os prejuízos da exploração indevida da biodiversidade para o país, foi publicada, em 20 de maio de 2015, a lei n. 13.123, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, à proteção e ao acesso ao conhecimento tradicional associado e à repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade (Brasil, 2015).

O desenvolvimento e a produção de fitoterápicos nacionais vêm crescendo, e, para regular essa área, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu orientações para o registro dos fitoterápicos, porém as espécies vegetais, utilizadas nos produtos, ainda não são objeto de registro ou cadastro no Brasil (Anvisa, 2021). Portanto, a elaboração de bases de dados compreendendo espécies vegetais e conhecimentos tradicionais brasileiros contribuirá para promover a inovação de novos medicamentos, bem como combater a biopirataria.

## Biodiversidade e Bioprospecção

A biodiversidade compreende as diferentes categorias de riquezas biológicas da Terra e abrange todas as espécies da flora, fauna e micro-organismos, bem como as funções ecológicas desempenhadas por elas nos ecossistemas. Esses ecossistemas são o conjunto dos relacionamentos mútuos entre determinado meio ambiente e a flora, a fauna e os micro-organismos que nele habitam e incluem os fatores de equilíbrio geológico, atmosférico, meteorológico e biológico (Wilson, 1997). Como a biodiversidade ou diversidade biológica brasileira tem diversas espécies de plantas, animais, micro-organismos e ecossistemas, o Brasil é um alvo mundial da biopirataria.

Os diversos produtos originários da biodiversidade e aprimorados pelas tecnologias foram extraídos de materiais contrabandeados e patenteados por laboratórios estrangeiros. Estudos realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que o Brasil já perdeu centenas de milhões de dólares com registros no exterior de novas patentes baseadas em espécies vegetais da Amazônia por não dispormos de mecanismos eficientes de defesa do nosso patrimônio genético. De forma muito fácil qualquer pessoa entra no território, exporta, mapeia e registra patentes com base nos recursos coletados livremente (Campello, 2002). Apesar de a biopirataria atingir vários países, o Brasil é o país com maior destaque devido a sua biodiversidade, principalmente a da Amazônia e a do Pantanal (Pereira, 2013).

A bioprospecção consiste em “atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial” (Nascimento, 2007: 179).

O patrimônio genético de países como o Brasil é de suma importância para o desenvolvimento de novos medicamentos e tecnologias para a humanidade e constitui uma alavanca econômica em potencial para os detentores desse patrimônio. Assim, por meio do uso sustentável do seu patrimônio genético poderia haver a criação de novas atividades econômicas no país (Ekandzi, 2017).

O valor econômico da diversidade biológica da Floresta Amazônica é de difícil mensuração. Constanza e colaboradores (2014) publicaram estudo global macroeconômico em *Changes in the Global Value of Ecosystem Services*, que precifica os serviços oferecidos pela natureza. Segundo os cálculos estimados por eles, em 2014, a Amazônia brasileira rendeu ao país (e ao mundo) cerca de US\$ 1,83 trilhão (R\$ 9,15 trilhões) por ano em valor bruto (Vasconcelos, 2019). A transformação de biodiversidade em desenvolvimento, por meio do seu uso sustentado e de seus recursos derivados, é o grande desafio. A etapa inicial para vencer tal desafio é transformar conhecimento em valor econômico e bem-estar da população, uma das maiores preocupações das sociedades atuais.

## Conhecimento Tradicional

Os conhecimentos tradicionais envolvem saberes empíricos, práticas, crenças e costumes passados de pais para filhos das comunidades indígenas ou de comunidade local (por exemplo, os ribeirinhos), quanto ao uso de vegetais, microrganismos ou animais cujas amostras contêm informações de origem genética (Jungmann & Bonetti, 2010; WIPO, 2021f). A própria riqueza e variedade de biodiversidade brasileira pode demandar uma nova procura, ou seja, a partir da grande quantidade de material genético, encontrar aquele que pode vir a gerar um produto inovador, por isso a importância de tais conhecimentos tradicionais aliados ao patrimônio genético e à própria bioprospecção (Freitas, 2002).

O conhecimento tradicional faz parte da identidade de diversas comunidades. A legislação no país, entretanto, determina que o conhecimento tradicional é proveniente de comunidades indígenas e populações locais. Ainda que não haja determinação sobre o conceito de populações locais, entende-se que são aquelas com modo de vida e relações sociais e materiais inerentes à diversidade biológica. São comunidades ribeirinhas, seringueiros, quilombolas,

entre outros. Essa categoria de conhecimento é o componente principal do ambiente físico e social das comunidades, sendo sua preservação muito importante (Barbosa, 1996).

A proteção do conhecimento tradicional é complexa, uma vez que boa parte desse conhecimento é oral, não documentada, o que torna inviável a apresentação de provas para impedir a concessão de patente. A Organização Mundial de Propriedade Intelectual orienta criar um banco de dados de conhecimentos tradicionais, sugestão acatada por diversos países. O Brasil, contudo, até o momento, ainda não segue essa orientação, mesmo sabendo que muitos desses conhecimentos são provenientes de diferentes tribos e nunca foram catalogados. Esse tema gera debates calorosos sobre maneiras de preservar, proteger, desenvolver e usar de forma sustentável o conhecimento tradicional, mas até o momento nada foi feito no país (WIPO, 2019a).

A utilização do conhecimento das comunidades tradicionais sobre recursos naturais pode ser o ponto de partida para pesquisas que podem levar ao patenteamento de produtos e processos de obtenção de novas tecnologias. Os recursos biológicos, muitas vezes presentes em terras indígenas, são coletados por pesquisadores ou laboratórios, que passam a estudar o potencial farmacológico de determinada planta ou veneno de animal, baseando-se no uso tradicional que se faz deles (WIPO, 2019a).

Hoje já se reconhecem o saber tradicional associado aos recursos biológicos e a possibilidade de repartição de possíveis benefícios advindos do seu uso comercial ou industrial. Além disso, o Estado também reconhece o direito das comunidades indígenas, entre outras, de decidirem sobre o uso de seus conhecimentos tradicionais associados ao patrimônio genético do país, ou seja, o consentimento prévio das comunidades para o acesso aos recursos situados em suas terras (Brasil, 2016).

## Biopirataria

A biopirataria é a apropriação indevida de espécies vivas da flora e da fauna e da sabedoria popular sobre suas utilizações com o objetivo de se realizarem estudos, reprodução em laboratório e comercialização, sem remuneração nem benefícios para o país ou para a população detentora das espécies ou das informações (Santilli, 2016). O foco deste capítulo recai sobre o contrabando de diversas formas de vida da flora, mas, principalmente, a apropriação e monopolização dos conhecimentos das populações no que se refere ao uso dos recursos naturais (Simões *et al.*, 2017).

A exploração da biodiversidade tem ocorrido no país de forma indiscriminada, resultando no empobrecimento dos seus recursos e, conseqüentemente, no aumento do número das espécies em risco de extinção. Portanto, propostas de alteração desse quadro devem ser apresentadas para que a exploração da biodiversidade seja efetuada de forma controlada e consciente, de modo a proteger o meio ambiente e gerar benefícios para a população (Simões *et al.*, 2017).

É comum a transferência de material genético entre países, e um exemplo disso é o que acontece com a ipecacuanha, planta nativa em Rondônia, de cujas raízes extrai-se o princípio ativo emetina, cultivada no Himalaia, e com a castanha-do-pará, cultivada em Singapura, Malásia, Sri Lanka e Trinidad e Tobago (Fonseca & Ferreira, 2018).

Sempre pairou sobre o território brasileiro a cobiça de estrangeiros, hoje potencializada pela globalização, pela excepcional posição geográfica e pelo conhecimento tradicional e científico de que se dispõe sobre o seu incomensurável potencial hídrico, mineralógico e diversidade biológica. A história mostra que uma quantidade de material genético de nosso país foi retirada. Citam-se como exemplos:

- em 1746 o cacau foi levado do estado da Bahia para o continente africano, tornando-se este importante produtor de seus derivados;
- em 1860 Richard Spruce, botânico inglês, foi o encarregado de proceder à coleta de mudas de cinchona, de cujas cascas ocorre a extração do quinino – esta substância foi levada para o Sudeste Asiático. A Indonésia tornou-se um dos maiores produtores de quinino;
- e em 1876 Henry Wickham realizou a transferência de setenta mil sementes da *Hevea brasiliensis* (seringueira) da região de Santarém para as colônias britânicas na Malásia. O Brasil só foi o grande produtor de látex durante o período de crescimento de sementes na Ásia, após esse período, a Ásia passou a ser um dos maiores produtores de borracha (Santos, 1999).

## Acordo Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (ADPIC)

O acordo Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (ADPIC), conhecido por TRIPs, sigla em inglês para Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights (Brasil, 1994), trata de um acordo internacional que faz parte do tratado geral que criou a Organização

Mundial do Comércio (OMC) por ocasião da Rodada do Uruguai do General Agreement on Tariffs and Trade (GATT), em português Acordo Geral de Tarifas e Comércio.

O tratado que criou a OMC diz respeito aos aspectos gerais do relacionamento comercial entre os países. O ADPIC trata, especificamente, da parte relativa aos direitos de propriedade intelectual. Embora contenha ainda algumas falhas, sua assinatura marcou um momento realmente histórico, pois 127 países concordam em ter um nível mínimo de proteção da propriedade intelectual (Brasil, 1994).

O acordo ADPIC trata da proteção internacional de direitos da propriedade intelectual e respeita as convenções e tratados já existentes ao dispor, expressamente, que seu objetivo não é diminuir as obrigações dos seus membros que sejam signatários das Convenções da União de Paris, de Berna, de Roma e do Tratado de Washington (Brasil, 1994).

O ADPIC tem como objetivo complementar os tratados anteriores. O acordo estabelece um nível de proteção comum que deve ser respeitado por todos, deixando, porém, os membros completamente livres para decidirem qual a forma mais adequada a ser adotada no âmbito interno, desde que não seja inconsistente com o próprio acordo (Brasil, 1994). Uma de suas propostas fundamentais é inserir a proteção dos direitos de propriedade intelectual no sistema multilateral de comércio representado pela OMC. O ADPIC é classificado como um dos pilares da OMC (Brasil, 1994).

Segundo o ADPIC, pode ser concedida patente a qualquer invenção nova, independentemente do setor tecnológico em que se encontre; essas invenções devem apresentar novidade, atividade inventiva e aplicação industrial (Brasil, 1994).

O direito de propriedade intelectual pode ser definido como aquele conferido a pessoas sobre as criações de sua mente. Essas se subdividem em: direitos autorais e direitos de propriedade industrial. A proteção dos conhecimentos tradicionais das comunidades encaixa-se no caso dos direitos autorais, como o conhecimento de tribos indígenas sobre a utilização de alguma planta como medicamento (Pimentel, 2000). Nos direitos de propriedade industrial encaixa-se toda descoberta que tenha origem na fauna ou na flora e que possa gerar tecnologia ou invenção, por exemplo, a criação de um produto farmacêutico que tenha sido extraído de alguma planta (Gontijo *apud* Chaves *et al.*, 2007).

A propriedade intelectual é o direito que cidadãos, empresas ou instituições têm sobre o que resultar de sua inteligência ou criatividade. Ele é protegido por meio de diversos instrumentos jurídicos que, cada um à sua maneira,

servem para proteger os titulares ou proprietários contra o uso não autorizado de sua legítima criação, talento ou inteligência, por terceiros. A propriedade industrial, por sua vez, é um tipo de propriedade intelectual. Abrange a proteção de atividades, produtos, ideias ou símbolos relacionados a um processo industrial ou comercial. É o caso das patentes de invenção, modelos de utilidade, desenhos industriais, marcas e indicações geográficas (Pimentel, 2000).

De um modo geral os direitos à propriedade intelectual são reconhecidos em todo o mundo. Entretanto, há níveis de proteção bem variáveis. Na realidade, esse reconhecimento evoluiu muito a partir da assinatura do ADPIC, em Marrakesh, em 1994 (Brasil, 1994).

Os países signatários do ADPIC obrigam-se a reescrever suas leis nacionais para adaptá-las às normas internacionais pactuadas nesse acordo, que abrange patentes, produtos farmacêuticos etc. Segundo o ADPIC, um membro poderá recusar-se a patentear uma invenção em função de três fatores:

- proteção da ordem pública e da moralidade;
- proteção da vida ou da saúde humana, animal ou vegetal;
- proteção do meio ambiente (Brasil, 1994).

Também podem os países recusar-se a conceder patentes de invenções relacionadas com:

- diagnósticos, métodos cirúrgicos e terapêuticos utilizados no tratamento humano ou animal;
- animais, plantas, exceto micro-organismos e processos biológicos destinados à produção de animais e plantas (salvo processos não biológicos e microbiológicos) (Brasil, 1994).

## Patenteabilidade Relacionada às Plantas e aos Animais

O art. 27.3 do ADPIC orienta aos seus membros as criações que podem ser consideradas como não patenteáveis (Brasil, 1994). Em virtude do art. 27.3 (b), os membros podem decidir que não concederão patentes em seus países para determinados tipos de invenções vegetais e animais. Em concreto o acordo permite excluir da patenteabilidade as plantas e os animais, exceto micro-organismos e processos essencialmente biológicos para a produção de plantas e animais, que não sejam procedimentos não biológicos ou microbiológicos (Brasil, 1994).



Desde a elaboração do art. 27.3 do ADPIC, a sua revisão é polêmica devido à discussão sobre as divergências entre o ADPIC e a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB). Os Estados Unidos, que assinaram, mas não ratificaram a convenção, acham que ADPIC e CDB não são compatíveis, pois tratam de assuntos diferentes. Por sua vez, o Brasil e a União Europeia afirmam que é possível harmonizar esses dois fóruns de discussão, mas defendem duas maneiras diferentes para que isso seja feito. Enquanto para a União Europeia a revisão do acordo deve ser apenas uma adequação de linguagem; para o Brasil o artigo 27.3 (b) deve ser reescrito incorporando os dispositivos da CDB (Dutra, 2004).

No Brasil, a Lei da Propriedade Industrial n. 9.279/96 estabelece, no art. 10, inciso IX, que não é considerada invenção “o todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ou ainda que dela isolados, inclusive o genoma ou germoplasma de qualquer ser vivo natural e os processos biológicos naturais”; enquanto, no artigo 18, inciso III e parágrafo único, define que não são patenteáveis “o todo ou parte dos seres vivos, exceto os microrganismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade – novidade, atividade inventiva e aplicação industrial, previstos no artigo 8º, e que não sejam mera descoberta” (Brasil, 1996).

## Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB)

A CDB, assinada em 1992, durante a RIO-92 e ratificada pelo Congresso Nacional brasileiro, em 1994, foi uma das mais polêmicas, por expor os muitos e divergentes interesses entre os países industrializados e os países ricos em patrimônio genético e diversidade biológica (Franco, 2013). Portanto, por uso sustentável ou desenvolvimento sustentável entende-se “aquele que não sacrifica seu próprio cenário, ou seja, aquele que não compromete suas próprias condições de durabilidade” (Silva, 2021, n.p.).

A CDB trata do acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado à repartição de benefícios e o acesso à tecnologia para sua conservação, utilização e uso sustentável e baseia-se nos deveres de precaução e de cooperação internacional (Silva, 2021).

Outra discussão que devemos realizar compreende a Declaração do Rio sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento em comparação com a CDB e se estas seriam *soft laws*, ou seja, trata-se de diretrizes de comportamento, uma declaração de princípios sem o poder de vincular ou obrigar qualquer país

ao seu cumprimento. Analisando a Declaração do Rio e a CDB, verifica-se que ambas estabelecem princípios a serem seguidos pelos países signatários para alcançar as metas previstas para a proteção do meio ambiente e para o desenvolvimento sustentável do planeta. A CDB define princípios voltados para a cooperação entre os Estados e os povos, com a única finalidade de estabelecer as bases para o direito internacional ao desenvolvimento sustentado (Silva, 2021).

Algumas regras da CDB definem princípios do direito internacional, outras refletem princípios emergentes e outras ainda preveem orientações a serem incorporadas nos sistemas normativos internos e internacionais. A Declaração do Rio e a própria CDB são importantes fontes que possibilitam a avaliação dos desdobramentos do direito internacional futuros ao prover as bases para a definição do desenvolvimento sustentável, bem como sua aplicação no plano do direito interno (Silva, 2021).

O princípio da precaução, que faz parte do direito internacional e está devidamente integrado na CDB, especificamente, é uma regra de *jus cogens* que se incorpora automaticamente ao direito interno. Sendo assim, a CDB compreende um tratado internacional, o qual foi ratificado pelo Brasil e incorporado em suas legislações internas, e segue o princípio da precaução como meio de proteção da variedade biológica no planeta. Verifica-se que até a assinatura da CDB, em 1992, qualquer um poderia ter acesso aos recursos genéticos, pois a biodiversidade era considerada um patrimônio da humanidade. Com a CDB, seus países signatários passaram a ter tanto os direitos sobre seus recursos biológicos como o dever de zelar pela sua conservação e utilização sustentável. Cada um dos países passou a ter a obrigação de regulamentar o acesso à sua biodiversidade, garantindo a repartição justa e equitativa dos benefícios oriundos do uso desses recursos e/ou de produtos derivados, além disso, comprometeram-se a respeitar o conhecimento das comunidades tradicionais e/ou indígenas, garantindo-lhes o retorno derivado da sua exploração comercial (Silva, 2021).

Dentre as possíveis resoluções para o combate à biopirataria, destacam-se:

- regulamentar o acesso aos recursos e proteger os direitos das comunidades sobre os conhecimentos da fauna e da flora brasileira ou de sua região;
- aplicar tanto o ADPIC, bem como a CDB com mudanças na legislação nacional (Silva, 2021).

## Resolução por meio da Aplicação Mútua do Acordo ADPIC e a CDB

O processo de exame do art. 27.3(b) do ADPIC começou em 1999. O objetivo, nesse exame, era tratar da patenteabilidade das invenções, incluindo o material biológico (invenções biotecnológicas), a proteção das obtenções vegetais e as possíveis exclusões de patenteabilidade (WTO, 2021).

Na reunião do conselho do ADPIC, celebrada em 21 de março de 2000, seu presidente chegou à conclusão de que o conselho deveria proceder de maneira mais organizada, sistemática e produtiva, centrando-se em:

- vinculação entre as disposições do art. 27.3 (b);
- questões técnicas relativas à proteção mediante patente em conformidade com o §3(b) do art. 27 do ADPIC;
- questões técnicas relativas às obtenções vegetais;
- questões técnicas relativas à patenteabilidade de formas de vida;
- relação com a conservação e a utilização do material genético;
- a relação com os conceitos de conhecimentos tradicionais e de direitos do agricultor (WTO, 2021).

O Brasil apresenta uma posição bastante interessante e avançada com relação à revisão do art. 27.3(b) do ADPIC. Na proposta brasileira, os países devem incorporar os dispositivos da CDB no ADPIC para garantir a criação de um arcabouço jurídico internacional que permita a valorização do conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o consentimento prévio das comunidades (WTO, 2021).

Com o documento IP/C/W/403 (WTO, 2003), Bolívia, Brasil, Cuba, Equador, Índia, Peru, República Dominicana, Tailândia e Venezuela desenvolveram as propostas do “consentimento fundamentado prévio”, ou seja, o consentimento anterior sobre a divulgação da fonte dos recursos biológicos e dos conhecimentos tradicionais. O termo “consentimento fundamentado prévio” é utilizado na CDB ao se tratar da exploração desses recursos e conhecimentos, assim como da distribuição equitativa dos benefícios. Esse grupo de países deseja que o ADPIC seja modificado para incluir que a distribuição seja obrigatória.

A União Europeia, por sua vez, com o documento IP/C/W/383 (WTO, 2002) inclui uma proposta para examinar o requisito de que os depositantes de patentes divulguem a origem do material genético e propõe que consequências jurídicas de não respeitar esse requisito devem situar-se fora do âmbito do direito de patentes.

O ADPIC não se opõe à distribuição de benefícios derivados da proteção da propriedade intelectual sobre invenções que incorporam recursos genéticos ou à proteção dos conhecimentos tradicionais. Todavia, não prevê instrumentos diretos para estabelecer um vínculo entre a proteção da propriedade intelectual e o cumprimento dos princípios da CDB. Ambos, a CDB e o ADPIC, não estão em conflito em uma perspectiva jurídica. Têm objetivos diferentes e não se ocupam da mesma matéria. Não existe nada nas disposições de um ou de outro acordo que impeça a um país signatário da CDB e membro da OMC (ADPIC) de cumprir as obrigações que lhe incumbem esses acordos. Por exemplo, a CDB não proíbe que se faça patente de invenções que utilizam material genético. O ADPIC não impede aos signatários da CDB exercerem seu direito de regulamentar o acesso aos recursos genéticos, exigir o seu consentimento fundamentado prévio ou compartilhar os benefícios derivados de sua utilização. Ao não haver incompatibilidade jurídica entre os acordos em questão, não pode haver problema com aplicação de ambos.

Apesar das diferenças quanto ao âmbito de aplicação dos instrumentos em questão, existe realmente uma interação considerável entre os direitos a que se refere o ADPIC e a matéria da CDB. A aplicação do ADPIC pode utilizar-se em apoio dos objetivos da CDB, como garantir a participação justa e equitativa dos benefícios que derivam da utilização dos recursos genéticos. A propriedade intelectual pode ser um instrumento adequado para a aplicação da CDB. Os direitos de propriedade intelectual podem estimular a utilização de recursos genéticos fomentando a inovação biotecnológica. Esses direitos geram benefícios financeiros devido à exploração comercial.

Dessa maneira, sempre respeitando o direito internacional, em particular a CDB, a legislação nacional e os acordos contratuais em matéria de acesso e de participação nos benefícios, há margem para que os interesses de provedores e usuários, por meio da utilização dos direitos de propriedade intelectual, em que estes contribuem para a criação de benefícios derivados da utilização de recursos genéticos, retornem em forma de rendimentos financeiros ou de acesso à tecnologia pertinente.

## Bases de Dados de Conhecimento Tradicional

### Base de Dados da Índia

A Índia possui um rico conhecimento tradicional de formas e meios praticados para tratar doenças que afligem as pessoas. Esse conhecimento tem sido transmitido oralmente, de geração para geração. Uma parte desse

conhecimento tem sido descrita na literatura clássica e outros artigos, muitas vezes inacessíveis ao homem comum e até mesmo, quando acessíveis, raramente compreendido. A documentação de conhecimentos existentes, disponíveis em domínio público, em vários sistemas tradicionais de medicina tornou-se imperativo para salvaguardar a soberania desse conhecimento tradicional e para protegê-lo de ser desviado na forma de patentes de inovações conhecidas, e tem sido uma questão de interesse nacional (WIPO, 2021d).

A Biblioteca Digital de Conhecimento Tradicional (*Traditional Knowledge Digital Library* – TKDL) da Índia consiste em um projeto colaborativo entre o Conselho de Pesquisa Científica e Industrial (CSIR) e o Departamento de Ayurveda, Yoga & Naturopatia, Unani, Siddha e Homeopatia (AYUSH) que tem como objetivo garantir que os escritórios de patentes em todo o mundo não concedam patentes para pedidos baseados no conhecimento tradicional milenar da Índia. A ideia de estabelecer a base de dados TKDL surgiu em meio aos esforços da Índia para revogar a patente concedida pelo Escritório de Marcas e Patentes dos Estados Unidos (USPTO) sobre as propriedades cicatrizantes do açafraão e a patente concedida pelo Escritório Europeu de Patentes (EPO) sobre as propriedades antifúngicas do nim.

A TKDL fornece informações sobre conhecimento tradicional existente na Índia, em línguas e formato compreensível por examinadores de patentes dos escritórios de patentes internacionais, de modo a evitar a concessão de patentes indevidas, e atua como uma ponte entre a informação do conhecimento tradicional existente em línguas locais e os examinadores de patentes (TKDL, 2021; WIPO, 2021d). Ela compreende o resultado de um projeto colaborativo entre o Conselho de Pesquisa Científica e Industrial (CSIR), Ministério da Ciência e Tecnologia e do Departamento de Ayush, Ministério da Saúde e Bem-Estar da Família, e está sendo implementado em CSIR. Uma equipe interdisciplinar de medicina tradicional (Ayurveda, Unani, Siddha e Yoga), os peritos examinadores de patentes, cientistas e oficiais técnicos foram envolvidos na criação de TKDL para os sistemas de medicina (TKDL, 2021).

A TKDL disponibiliza documentação do conhecimento tradicional em domínio público, sob a forma de literatura existente relacionada a Ayurveda, Unani, Siddha e Yoga, em formato digitalizado em cinco idiomas internacionais, que são inglês, alemão, francês, japonês e espanhol. Também foi criada a Classificação de Recursos de Conhecimento Tradicional (TKRC, na sigla em inglês), um inovador sistema de classificação estruturado com o propósito de sistematização, divulgação e recuperação com cerca de 25 mil subgrupos, referentes a plantas medicinais, minerais, recursos animais, efeitos e doenças, métodos de preparação, modo de administração etc. (TKDL, 2021).

A Índia tem desenvolvido uma política específica, as leis e aquisição de sistemas apropriados e é um candidato a participar de acordos internacionais sobre comércio, utilização, proteção e preservação de conhecimentos tradicionais e recursos genéticos de plantas. De modo mais geral, os ativos e conhecimentos indianos ganharam um lugar central nas políticas nacionais de conservação (TKDL, 2021).

Em 2000, foi orientada a criação de uma Biblioteca Digital de Conhecimento Tradicional, cujo objetivo foi levar o conhecimento de práticas terapêuticas indianas (Ayurveda, Yunani, Siddha, Yoga) de uma forma utilizável por instituições gestoras de direitos propriedade intelectual. A TKDL integra diversas disciplinas como Ayurveda, Unani, Siddha, Yoga, e idiomas, sânscrito, árabe, urdu, persa, tamil, inglês, japonês, espanhol, francês, alemão. Atualmente, o TKDL é baseado em livros de sistemas indianos de medicina, que estão disponíveis em domínio aberto e podem ser adquiridos por qualquer indivíduo/organização em nível nacional/internacional. A TKDL atua como uma ponte entre esses livros (técnica anterior) e examinadores internacionais de patentes (TKDL, 2021; WIPO, 2021d).

Essa escolha de formalização *moderna* foi reforçada pela relação entre a Índia e a Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI), em inglês *World Intellectual Property Organization* (WIPO). A experiência indiana é, de fato, fundamental para a organização definir um quadro jurídico no que diz respeito ao conhecimento tradicional. O Interstate, grupo de trabalho voltado para essa questão, criado em 2002, não só apoiou o projeto, mas adotou na Índia os métodos de inventário e classificação de recursos tradicionais como base para a modificação da Classificação Internacional de Patentes. De modo mais geral, a OMPI tem desenvolvido um discurso sobre a natureza do conhecimento tradicional, a necessidade de protegê-los e como fazer isso, que ecoa as posições oficiais da Índia e do seu papel no mercado de construção (WIPO, 2021d).

A elaboração da TKRC propiciou a criação de um grupo de Força Tarefa da OMPI-TK composta de USPTO, EPO, *Japan Patent Office* (JPO), *China National Intellectual Property Administration e Office of the Controller General of Patents, Designs & Trade Marks* (CGPDTM) para aumentar os subgrupos da International Patent Classification (IPC) destinados a classificar o conhecimento tradicional relacionado, vinculando a TKRC à IPC. Em fevereiro de 2002, um Comitê de Peritos recomendou a inclusão de aproximadamente duzentos subgrupos sobre conhecimento tradicional e a ligação de TKRC ao IPC e, assim, um novo grupo principal foi incluído na IPC: A61K 36/00, com 207 subgrupos, que cobrem diferentes categorias de plantas (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificações Internacionais de Patentes para as categorias da base de dados TKDL

Quantidade	Espécies	Categoria da IPC	Quantidade de subgrupos IPC
1	Algas	A61K36/02 a 36/05	4
2	Fungos e líquens	A61K36/06 a 36/09	10
3	Briófitas	A61K36/10	1
4	Pteridófitas	A61K36/11 a 36/126	3
5	Gimnospermas	A61K36/13 a 36/17	5
6	Angiospermas	A61K36/18	1
7	Dicotiledôneas	A61K36/185 a 36/87	148
8	Monocotiledôneas	A61K36/88 a 36/9068	35
Quantidade total de subgrupos			207

Fonte: WIPO, 2021b, 2021g.

A base de dados TKDL dá legitimidade ao conhecimento tradicional existente e permite a proteção patentária dos conhecimentos tradicionais da Índia pelos inventores. Ela impede a apropriação indevida de conhecimento tradicional indiano, principalmente por quebrar a barreira do formato e linguagem e torná-lo acessível aos examinadores de patentes dos escritórios de patentes internacionais para fins de realização de busca e exame de patentes (TKDL, 2021). No Quadro 2, mostramos a situação da transcrição da medicina tradicional na base de dados TKDL, em outubro de 2012.

Quadro 2 – Quantidade de livros e transcrições na base de dados TKDL

Disciplina	Número de textos (incluindo volumes) na transcrição
Ayurveda	119
Unani	55
Siddha	91
Sowa Rigpa	1
Yoga	15
Total	281

Fonte: TKDL, 2021.

## Base de Dados da China

A medicina tradicional chinesa (TCM, sigla em inglês para *traditional chinese medicine*) tem um papel importante no diagnóstico e tratamento de doenças na Ásia. No entanto, no passado, devido à falta de pesquisas científicas sistemáticas, a TCM não era reconhecida na sociedade ocidental. Recentemente, cada vez mais pessoas estão conscientizando-se do TCM devido ao crescente número de dados que sustentam seu potencial terapêutico. Com base nessa crescente demanda por modernização da medicina chinesa, o Laboratório de Biologia Computacional e de Sistemas começou a integrar a TCM e as tecnologias ocidentais em 2003 (Song, 2009).

O primeiro banco de dados com informações estruturais tridimensionais dos constituintes da TCM tem a simulação de acoplamento molecular. Nos últimos sete anos, foram realizadas pesquisas bibliográficas para que fosse obtida a composição química de cada erva e foram construídas estruturas bi e tridimensionais de cada constituinte da TCM. Atualmente, todos os compostos TCM no banco de dados foram geometricamente otimizados no campo de força MM2 (Song, 2009).

A Base de Dados de Patentes da Medicina Tradicional Chinesa (TCM) foi estabelecida em 2001, apoiada pelo Escritório Estadual de Propriedade Intelectual da China (SIPO), e, em 2002, a versão em inglês foi estabelecida. O TCM abrange pedidos de patente publicados desde 1985 e fornece 29 entradas de pesquisa com os dados bibliográficos, assuntos e aplicações/efeitos terapêuticos. Além disso, esse banco permite uma interface com outros sistemas, o que proporciona a realização de: uma pesquisa rápida, uma pesquisa avançada, uma pesquisa de fórmula e da procura de expressões no dicionário da TCM (Liu & Sun, 2004).

O escritório *China National Intellectual Property Administration* (CNIPA) possui documentos de 94 instituições de patentes e descrições de textos completos, publicados por quarenta bancos de dados. Mais de cinquenta mil publicações de patentes na China são tornadas públicas por essa base. Além disso, o banco de dados possui o Sistema de Tradução de Patentes da China e também é útil na recuperação de informações publicadas, concedidas e não examinadas, de patentes chinesas e aquelas depositadas através Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT) (Liu & Sun, 2004).



## Soluções Adotadas na Índia, na China e no Brasil

A Índia, China e Brasil têm implantado diversas políticas relacionadas a biodiversidade e conhecimentos tradicionais, destinadas não só ao tratamento de doenças da população, como também ao combate à biopirataria. A Índia, por exemplo, foi pioneira ao criar a ferramenta TKDL, que permite aos examinadores terem acesso a uma base de dados de conhecimento tradicional medicinal da Índia. Ela contém 34 milhões de páginas formatadas sobre 2,26 milhões de formulações medicinais em diversos idiomas.

Na China, para o desenvolvimento do banco de dados de TCM e disponibilização na *web* foram utilizadas as ferramentas ISAPI, VRML, JavaScript e tecnologia HTML. Também foi desenvolvido um método para a transferência de estrutura química tridimensional e exibição pela internet usando VRML e JavaScript (Song, 2009).

No Brasil, a biodiversidade e os conhecimentos tradicionais passaram a ser protegidos segundo a medida provisória (MP) n. 2.186/01, de 23 de agosto de 2001, que condicionava o acesso aos recursos naturais à autorização da União. A MP ainda previa a partilha de benefícios resultantes de uso e comercialização, reconhecendo o direito das comunidades indígenas e locais de decidirem sobre o uso dos seus conhecimentos relacionados aos recursos genéticos (Brasil, 2001). De acordo com a MP, os depositantes de pedidos de patente deveriam solicitar autorização prévia de acesso a componente do patrimônio genético nacional, concedida pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), e informar, no ato do depósito do pedido, a data e o número dessa autorização de acesso (Brasil, 2001). Em observância à MP n. 2.186/01 e à resolução n. 23 do CGEN, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) publicou a resolução n. 134, em dezembro de 2006, condicionando o depósito de pedido de patente de invenção com acesso a componente de patrimônio genético à apresentação do número e data de autorização correspondente, outorgado pelo CGEN (Brasil, 2001).

A lei n. 13.123, de 20 de maio de 2015, revogou a MP 2.186/01 e passou a estabelecer dispositivos sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade (Brasil, 2015). Dentre os principais temas abordados nessa lei, destacamos o artigo 1º, que dispõe sobre bens, direitos e obrigações relativos:

I – ao acesso ao patrimônio genético do país, bem de uso comum do povo encontrado em *condições in situ*, inclusive espécies domesticadas e populações espontâneas, ou mantido em condições *ex situ*, desde que encontrado em condições *in situ* no território nacional, na plataforma continental, no mar territorial e na zona econômica exclusiva;

II – ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, relevante à conservação da diversidade biológica, à integridade do patrimônio genético do País e à utilização de seus componentes;

III – ao acesso à tecnologia e à transferência de tecnologia para a conservação e a utilização da diversidade biológica;

IV – à exploração econômica de produto acabado ou material reprodutivo oriundo de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado;

V – à repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da exploração econômica de produto acabado ou material reprodutivo oriundo de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado, para conservação e uso sustentável da biodiversidade;

VI – à remessa para o exterior de parte ou do todo de organismos, vivos ou mortos, de espécies animais, vegetais, microbianas ou de outra natureza, que se destine ao acesso ao patrimônio genético; e,

VII – à implementação de tratados internacionais sobre o patrimônio genético ou o conhecimento tradicional associado aprovados pelo Congresso Nacional e promulgados. (Brasil, 2015)

Assim, essa legislação deixa claro que o acesso ao patrimônio genético existente no país ou ao conhecimento tradicional associado para fins de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico e a exploração econômica de produto acabado ou material reprodutivo oriundo desse acesso somente serão realizados mediante cadastro, autorização ou notificação e serão submetidos a fiscalização, restrições e repartição de benefícios nos termos e nas condições estabelecidos nessa lei e no seu regulamento. Porém, essa lei deve ser usada com devida cautela, pois ela deve servir para impedir a biopirataria sem prejudicar pesquisas científicas.

O art. 47 da lei n. 13.123/15 condiciona a concessão de pedidos de patentes obtidos a partir de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado ao cadastramento ou autorização de acesso obtida no CGEN. A fim de cumprir o estabelecido na lei, a partir de 27 de fevereiro de 2018, o Inpi passou a emitir automaticamente uma exigência formal (código de despacho 6.6.1) em todos os pedidos de patente depositados no Inpi de modo que os requerentes pudessem apresentar a comprovação do cadastramento e/ou autorização de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado (Brasil, 2015).

Esses documentos (MP 2.186/01 a lei n. 13.123/15) representam as diversas estratégias que têm sido adotadas no Brasil, mas não se têm alcançado os objetivos desejados, uma vez que a biopirataria praticada pelos pesquisadores e pela indústria estrangeira continua (Brasil, 2015). Portanto, verificamos a necessidade de elaboração de uma base de dados similar à TKDL e à TCM, de modo que nossa biodiversidade e conhecimentos tradicionais não sejam utilizados por outras nações indevidamente e sem a repartição dos benefícios para o detentor dos conhecimentos tradicionais.

## Considerações Finais

Desde o início do século estão sendo realizados esforços para a promoção do acesso a medicamentos. A importância dessa promoção fica evidente nas ações praticadas pelas três organizações internacionais, a OMS, a OMPI e a OMC, que estão fortalecendo sua cooperação na interface entre propriedade intelectual e saúde pública como parte do crescente esforço internacional para melhorar o acesso da população aos medicamentos e garantir a disponibilidade de produtos e tratamentos novos e mais eficazes.

A apropriação indevida dos conhecimentos tradicionais e a biopirataria de recursos genéticos preocupam diversos países, bem como diversas comunidades indígenas e ribeirinhos. Embora essas questões sejam discutidas em vários fóruns multilaterais, como a CDB, o ADPIC, o OMC e a OMPI, uma estrutura global para proteger os conhecimentos tradicionais brasileiros ainda não foi estabelecida. O comitê intergovernamental da OMPI tem trabalhado para que, no futuro próximo, estabeleça-se um consenso sobre um instrumento obrigatório para proteger efetivamente os conhecimentos tradicionais, em âmbito internacional, com efeitos harmônicos e norteadores, para recomendar/inspirar políticas públicas dedicadas a promover a construção e institucionalização de bases de dados de conhecimento tradicional associados ao patrimônio genético das respectivas biodiversidades das nações, de modo a privilegiar a sustentabilidade econômica, jurídica e ambiental.

Deve ser realizado estudo mais aprofundado em relação a todas as bases de dados referentes a conhecimentos tradicionais, bem como definir parceiros com interesse em desenvolver uma base de dados com informações da biodiversidade brasileira de modo a gerar produtos que possam contribuir com a melhoria da qualidade de vida e tratamento de doenças (WIPO, 2021c, 2021e).

O valioso ativo imaterial está ameaçado de extinção em muitas partes do mundo, a exemplo do Brasil. Por esse motivo, torna-se necessário documentar

e digitalizar informações relacionadas ao conhecimento tradicional em uma biblioteca digital, na forma de TKDL, pois é um meio comprovado e eficaz de preservar o conhecimento tradicional e impedir a sua apropriação indébita por terceiros. A documentação de conhecimento tradicional é uma estratégia de propriedade intelectual *sui generis* que tem como objetivo promover conservação e proteção ambientais e socioeconômicas.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Formulário de Fito-terápicos. Farmacopeia Brasileira. 2ª edição. Brasília. 2021. Disponível em <[www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-cap2.pdf](http://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-cap2.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2021.
- BARBOSA, D. G. G. & GONZALEZ, C.A. *Derecho Ambiental: conceptos, principios y legislación*. Córdoba: Editora Alverone, 1996.
- BRASIL. Decreto n. 1.355, de 30 dez. 1994. Promulga a Ata Final que Incorpora os Resultados da Rodada Uruguaí de Negociações Comerciais Multilaterais do GATT. Acordo sobre aspectos dos direitos de propriedade intelectual relacionados ao comércio. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1994.
- BRASIL. Lei 9.279, de 14 maio 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1996.
- BRASIL. Medida Provisória n. 2.186. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 23 ago. 2001.
- BRASIL. Lei n. 13.123, de 20 maio 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2015.
- BRASIL. Decreto n. 8772, de 11 maio 2016. Regulamenta a lei n. 13.123, de 20 maio 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2016.
- BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. v. II: Mamíferos. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente, 2018.
- BRASIL. Ministério Meio Ambiente (Org.). *Biodiversidade Brasileira: mas o que é biodiversidade*. Brasília, Ministério Meio Ambiente, 2019. Disponível em: <<https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

- CAMPELLO, E. R. *A Amazônia em Números: atlas geográfico IBGE*. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.
- CHAVES, G. C. *et al.* A evolução do sistema internacional de propriedade intelectual: proteção patentária para o setor farmacêutico e acesso a medicamentos. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(2):257-267, 2007.
- COSTANZA, R. C. *et al.* Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change*, 26 (2014) 152-158.
- DUTRA, P. H. *Biodiversidade e Propriedade Intelectual: negociações sobre o artigo 27.3(b) do TRIPS – Posições Negociadoras e Interesses Nacionais*, 2004. Campinas, TCC: Universidade Estadual de Campinas.
- EKANDZI, N. *La Protection des Savoirs Traditionnels Médicinaux par le Droit de la Propriété Intellectuelle dans l'Espace OAPI*, 2017. Tese de Doutorado, Paris: Escola de Doutorado em Direito Privado, Paris.
- FIORILLO, C. A. P. & RODRIGUES, M. A. *Direito Ambiental e Patrimônio Genético*. Belo Horizonte: Del Rey, 1996.
- FONSECA, V. M. & FERREIRA, C.L. Biopirataria no Brasil, 2018. Disponível em: <[www.portalsaofrancisco.com.br/meio-ambiente/biopirataria-no-brasil](http://www.portalsaofrancisco.com.br/meio-ambiente/biopirataria-no-brasil)>. Acesso em: 15 ago. 2019.
- FRANCO, J. L. A. O conceito de biodiversidade e a história da biologia da conservação: da preservação da wilderness à conservação da biodiversidade. *História (São Paulo)*, 32(2): 21-48, 2013.
- FREITAS, V. P. *A Constituição Federal e a Efetividade das Normas Ambientais*. São Paulo: Revista dos Tribunais, 2002.
- JUNGMANN, D. M. & BONETTI, E. A. *Inovação e Propriedade Intelectual: guia para o docente*. Brasília: Senai, 2010.
- LIU, Y. & SUN, Y. China traditional Chinese Medicine (TCM) Patent Database. *World Patent Information*, 26(1): 91-96, 2004.
- MELO, S. S. C. A Medida Provisória n. 2.186/2001 e a pesquisa com a biodiversidade brasileira. *Revista Jus Navigandi*, 20(4.301): 1-2, 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164847/1/Jus-Navigandi.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2021.
- NASCIMENTO, D. L. *A Biopirataria na Amazônia: uma proposta jurídica de proteção transnacional da biodiversidade e dos conhecimentos tradicionais associados*, 2007. Dissertação de Mestrado, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.
- PEREIRA, V. C. A. *O Acesso à Biodiversidade Brasileira: As principais medidas no combate à biopirataria pós-Nagoya*, 2013. Monografia, Fortaleza: Faculdade de Direito, Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <[www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/28090/1/2013\\_tcc\\_vcapereira.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/28090/1/2013_tcc_vcapereira.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2021.
- PIMENTEL, L. O. *Normas Jurídicas do Comércio Mundial: propriedade intelectual*. Scientia Iuris. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2000.
- SANTILLI, J. Conhecimentos tradicionais associados à biodiversidade: elementos para a construção de um regime jurídico sui generis de proteção. In: VARELLA, M. D. & BARROS-PLATIAU, A. F. (Orgs.). *Diversidade Biológica e Conhecimentos Tradicionais*. Belo Horizonte: Del Rey, 2004. (Coleção Direito Ambiental, 2)

SANTOS, Á. *História Biológica do Brasil*. Rio de Janeiro: Saraiva, 1999.

SILVA, C. E. Biopirataria no Brasil e a proteção interna e externa através da legislação. Disponível em <[www.portalsaofrancisco.com.br/meio-ambiente/biopirataria-no-brasil](http://www.portalsaofrancisco.com.br/meio-ambiente/biopirataria-no-brasil)>. Acesso em: 18 set. 2021.

SIMÕES, C. M. O. *et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017, 609 p.

SONG, J. China Traditional Chinese medicine patent database search system. The Pharmaceutical and Biotechnological Invention Examination Department of Sipo, 2009. Disponível em: <[www.wipo.int/edocs/mdocs/tk/en/wipo\\_iptk\\_bkk\\_09/wipo\\_iptk\\_bkk\\_09\\_topic5\\_2.pdf](http://www.wipo.int/edocs/mdocs/tk/en/wipo_iptk_bkk_09/wipo_iptk_bkk_09_topic5_2.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2018.

TRADITIONAL KNOWLEDGE DIGITAL LIBRARY (TKDL). Site. Disponível em: <[www.tkdl.res.in](http://www.tkdl.res.in)>. Acesso em: 11 ago. 2021.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE (USPTO). Traditional knowledge and medicine dictionaries/databases. Disponível em: <[www.uspto.gov/patent/laws-and-regulations/comments-public/traditional-knowledge-and-medicine-dictionariesdatabases](http://www.uspto.gov/patent/laws-and-regulations/comments-public/traditional-knowledge-and-medicine-dictionariesdatabases)>. Acesso em: 12 ago. 2018.

VASCONCELOS, M. R\$ 7 trilhões por ano: os estudos que tentam calcular quanto a Amazônia, em pé, rende ao Brasil. *BBC News Brasil*. Londres, 23 nov. 2019.

WILSON, E.O. *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO). International Patent Classification (IPC). Disponível em: <[www.wipo.int/classifications/ipc/en/](http://www.wipo.int/classifications/ipc/en/)>. Acesso em: 18 set. 2021b.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO). Online databases and registries of traditional knowledge and genetic resources. Disponível em: <[www.wipo.int/tk/en/resources/db\\_registry.html](http://www.wipo.int/tk/en/resources/db_registry.html)>. Acesso em: 18 set. 2021c.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO). Protecting India's traditional knowledge. Disponível em: <[www.wipo.int/wipo\\_magazine/en/2011/03/article\\_0002.html](http://www.wipo.int/wipo_magazine/en/2011/03/article_0002.html)>. Acesso em: 18 set. 2021d.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO). Topic 5: TK databases and other forms of TK and TCEs Documentation: intellectual property-related objectives and methodologies for the establishment of databases. Disponível em: <[www.wipo.int/meetings/fr/doc\\_details.jsp?doc\\_id=130804](http://www.wipo.int/meetings/fr/doc_details.jsp?doc_id=130804)>. Acesso em: 18 set. 2021e.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO). Traditional knowledge. Disponível em: <[www.wipo.int/tk/en/tk](http://www.wipo.int/tk/en/tk)>. Acesso em: 18 set. 2021f.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO). Traditional Knowledge Resource Classification (TKRC): Classification Methodologies of Traditional Knowledge. Disponível em: <[www.wipo.int/edocs/mdocs/tk/en/wipo\\_tkdl\\_del\\_11/wipo\\_tkdl\\_del\\_11\\_ref\\_t3\\_1.pdf](http://www.wipo.int/edocs/mdocs/tk/en/wipo_tkdl_del_11/wipo_tkdl_del_11_ref_t3_1.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2021g.

WORLD TRADE ORGANIZATION (WTO). IP/C/W/383. Council for Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights. Communication from the European Communities and their Member States. Review of article 27.3(b) of the Trips Agreement, and the relationship between the Trips Agreement and the Convention on Biological Diversity (CBD) and the protection of traditional knowledge and folklore. Geneva: WTO, 17 Oct. 2002.

WORLD TRADE ORGANIZATION (WTO). IP/C/W/403. Council for Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights. The relationship between the Trips Agreement and the Convention on Biological Diversity (CBD) and the protection of traditional knowledge. Geneva: WTO, 24 Jun. 2003.

WORLD TRADE ORGANIZATION (WTO). Trilateral cooperation on intellectual property and public health. Disponível em: <[www.wto.org/english/tratop\\_e/trips\\_e/who\\_wipo\\_wto\\_e.htm](http://www.wto.org/english/tratop_e/trips_e/who_wipo_wto_e.htm)>. Acesso em: 18 set. 2021.

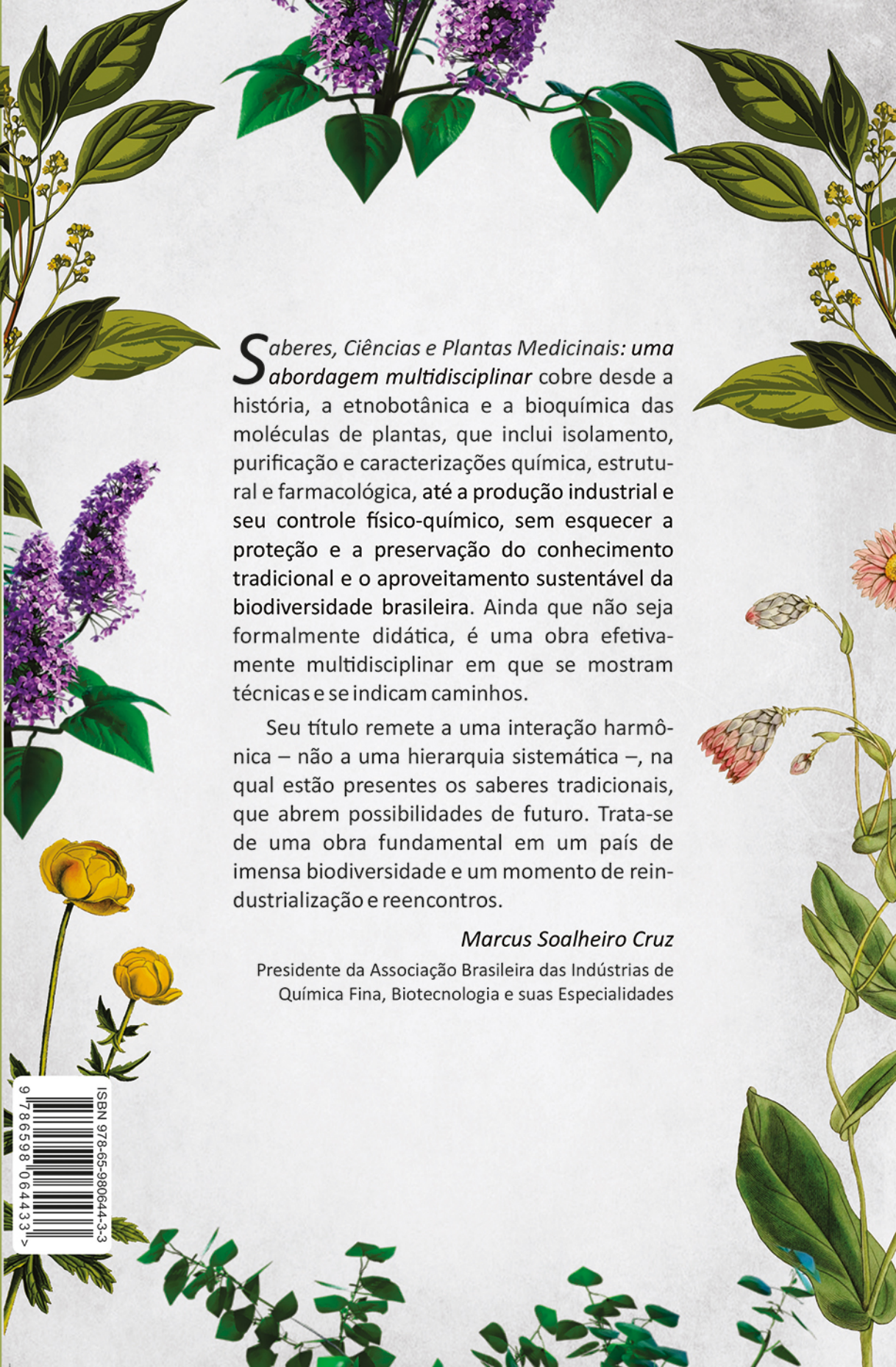
---

*Formato:* 16 x 23cm  
*Tipologia:* Adobe Garamond Pro  
*Papel:* Offset 90 g/m<sup>2</sup> (miolo)  
Cartão Supremo 250 g/m<sup>2</sup> (capa)  
*Impressão e acabamento:* psi7 - Printing Solutions & Internet 7 S.A.  
Rio de Janeiro, abril de 2024









**S**aberes, Ciências e Plantas Medicinais: uma abordagem multidisciplinar cobre desde a história, a etnobotânica e a bioquímica das moléculas de plantas, que inclui isolamento, purificação e caracterizações química, estrutural e farmacológica, até a produção industrial e seu controle físico-químico, sem esquecer a proteção e a preservação do conhecimento tradicional e o aproveitamento sustentável da biodiversidade brasileira. Ainda que não seja formalmente didática, é uma obra efetivamente multidisciplinar em que se mostram técnicas e se indicam caminhos.

Seu título remete a uma interação harmônica – não a uma hierarquia sistemática –, na qual estão presentes os saberes tradicionais, que abrem possibilidades de futuro. Trata-se de uma obra fundamental em um país de imensa biodiversidade e um momento de reindustrialização e reencontros.

*Marcus Soalheiro Cruz*

Presidente da Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades

ISBN 978-65-980644-3-3



9 786598 064433 >