

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**CLONE ELITE DE *Uncaria tomentosa* COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA SOBRE CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE HUMANO**

MESTRANDA: BEATRIZ DE SOUZA RODRIGUES

RIBEIRÃO PRETO
DEZEMBRO 2024

BEATRIZ DE SOUZA RODRIGUES

**CLONE ELITE DE *Uncaria tomentosa* COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA SOBRE CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE HUMANO**

Dissertação apresentada à Universidade
de Ribeirão Preto – UNAERP, como
requisito para a obtenção de título de
Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliana da Silva
Coppede

RIBEIRÃO PRETO

2024

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

RODRIGUES, Beatriz De Souza, 2000-

R696c

Dissertação (Mestrado) - Universidade de
Ribeirão Preto, UNAERP, Biotecnologia, 2024.

1. Biodiversidade. 2. Citotoxicidade. 3.
Fitoterápico. 4. Germoplasma. 5. Unha-de-gato. II.
COPPEDE, Juliana da Silva, 1984-. III. Título.

BEATRIZ DE SOUZA RODRIGUES

CLONE ELITE DE *Uncaria tomentosa* COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE HUMANO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

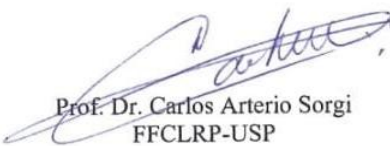
Data da defesa: 13 de dezembro de 2024

Resultado: Aprovada.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Juliana da Silva Coppede
Presidente/UNAERP


Prof. Dra. Bianca Waléria Bertoni
UNAERP


Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi
FFCLRP-USP

**RIBEIRÃO PRETO
2024**

RESUMO

A espécie medicinal *Uncaria tomentosa* apresenta evidência de atividade anti-inflamatória. No Brasil, está elencada na Renam (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais) podendo ser amplamente disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Porém, a coleta inadequada do material na natureza, tem promovido a erosão genética da espécie. A continuidade da utilização de *U. tomentosa* em escala industrial e a disponibilidade do fitoterápico para os pacientes pelo SUS depende da conservação desta espécie vulnerável à extinção. Como alternativa para conservação do recurso genético da espécie, foi selecionado de um banco de germoplasma *in vitro*, os clones UTBN207 e UTBN233. Para multiplicação dos clones mantidos a 25 ± 2 °C foi determinado a melhor condição de cultivo o meio de cultura WP contendo 10 g L^{-1} da fonte de carbono glicose e, para a manutenção dos indivíduos em sala de crescimento a 18 ± 2 °C constatou-se que o meio de cultura WP/2 suplementado com 10 g L^{-1} de sacarose é a melhor opção. Ademais, a conservação desses indivíduos imersos em óleo mineral, é possível e foi mostrada pela primeira vez em *U. tomentosa*. Os indivíduos sobreviveram durante 6 meses sem a troca do meio de cultura. A melhor condição encontrada foi utilizando-se o segmento nodal inserido com um par de folhas seccionadas em meio WP basal (100 mL L^{-1}) suplementado com sacarose (20 g L^{-1}) e acrescido de 15 mL de óleo mineral. A partir do desenvolvimento dos indivíduos de *U. tomentosa*, foram gerados extratos de todos os materiais advindo de micropropagação e da cultura de tecido vegetal, todos contendo os marcadores químicos, com a quantificação de isomitrafalina ao analisar o extrato de raízes provenientes da cultura de raízes UTBN233. Os extratos vegetais foram avaliados quanto à sua atividade imunológica, utilizando células mononucleares do sangue humano incubadas com a bactéria *Escherichia coli* enteropatogênica para analisar a fagocitose, a atividade microbida e a produção de citocinas por citometria de fluxo. A fluorescência da laranja de acridina foi empregada para avaliar a viabilidade celular e a atividade funcional dos fagócitos. Todos os extratos foram também analisados em relação à citotoxicidade. O genótipo UTBN233 mostrou-se mais apropriado em termos de segurança quando ensaiado frente a monócitos humanos. Houve aumento no índice de fagocitose em $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ no extrato de raízes de plantas UTBN233 e com elevada ação microbida em $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. As plantas micropropagadas do genótipo UTBN207 parecem estar associadas a um perfil pró-inflamatório, com níveis elevados de expressão de IL-6. O germoplasma vegetal do clone elite UTBN233 *in vitro* e seus extratos obtidos a partir dessa multiplicação exibe promissora ação para utilização na conservação da espécie e auxilia no desenvolvimento da produção de novos fitoterápicos obtidos de forma sustentável. Com o uso das ferramentas biotecnológicas foi possível a obtenção de resultados sólidos que permitem a reprodutibilidade das técnicas aplicadas para que a qualidade, segurança e eficácia dos extratos provenientes dos processos biotecnológicos propostos sejam plenamente alcançadas.

Palavras-chave: Biodiversidade. Citotoxicidade. Fitoterápico. Germoplasma. Unha-de-gato.

ABSTRACT

The medicinal species *Uncaria tomentosa* has evidence of anti-inflammatory activity. It is listed in Renam (National List of Essential Medicines) in Brazil and can be widely available through the Unified Health System (SUS). However, inadequate collection of material from nature has promoted the genetic erosion of the species. The continued use of *U. tomentosa* on an industrial scale and the provision of the phytotherapeutic agent to patients through the SUS depend on the conservation of this species vulnerable to extinction. As an alternative for conserving the genetic resource of the species, clones UTBN207 and UTBN233 were selected from an *in vitro* germplasm bank. For multiplication of the clones maintained at 25 ± 2 °C, the best culture condition was determined to be the WP culture medium containing 10 g L^{-1} of glucose carbon source. For maintenance of individuals in a growth room at 18 ± 2 °C, it was found that the WP/2 culture medium supplemented with 10 g L^{-1} of sucrose is the best option. Furthermore, conservation of these individuals immersed in mineral oil is possible and was demonstrated for the first time in *U. tomentosa*. The individuals survived for 6 months without changing the culture medium. The best condition found was using the nodal segment inserted with a pair of sectioned leaves in WP basal medium (100 mL L^{-1}) supplemented with sucrose (20 g L^{-1}) and added with 15 mL of mineral oil. From the development of *U. tomentosa* individuals, extracts were generated from all materials from micropropagation and plant tissue culture, all containing chemical markers, with quantification of isomitraphylline by analysis of the root extract of the UTBN233 root culture. Plant extracts were evaluated for their immunological activity using human blood mononuclear cells incubated with enteropathogenic *Escherichia coli* bacteria to analyze phagocytosis, microbicidal activity and cytokine production by flow cytometry. Acridine orange fluorescence was used to evaluate cell viability and functional activity of phagocytes. All extracts were also analyzed for cytotoxicity. The UTBN233 genotype was shown to be more suitable in terms of safety when tested against human monocytes. There was an increase in the phagocytosis index at $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the root extract of UTBN233 seedlings and with high microbicidal action at $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. The micropropagated plants of genotype UTBN207 appear to be associated with an inflammatory profile, with elevated expression of IL-6, while the aerial parts of genotype UTBN233 of *U. tomentosa* suggest an anti-inflammatory character, with increased IL-4. The plant germplasm of the elite clone UTBN233 *in vitro* and its extracts obtained from this multiplication show promising action for use in the conservation of the species and assist in the development of the production of new phytotherapeutics obtained sustainably. With the use of biotechnological tools, it was possible to obtain solid results that allow the reproducibility of the applied techniques so that the quality, safety and efficacy of the extracts from the proposed biotechnological processes are fully achieved.

Keywords: Biodiversity. Cytotoxicity. Phytotherapeutic. Germplasm. Cat's claw.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Partes aéreas de *Uncaria tomentosa*. Fonte: Autoria do autor (2023)
..... 16
- Figura 2 - Espinhos de *Uncaria tomentosa*. Fonte: Autoria do autor (2023) 19
- Figura 3 - Preparação dos extratos hidroalcoólicos de *U. tomentosa in vitro*: (A) Parte aérea de plantas micropropagadas; (B) Raízes de plantas micropropagadas; (C) Raízes obtidas da cultura de raízes 37
- Figura 4 - A) Perfil cromatográfico de extrato metanólico das raízes de *U. tomentosa* genótipo UTBN233; B) Resolução ampliada do segmento do perfil cromatográfico de extrato metanólico das raízes de *U. tomentosa* genótipo UTBN233 onde se é possível observar picos dos alcaloides isomitrafalina (21,7 min), pteropodina (23,4 min) e isorinchofilina (26,9 min).
..... 40
- Figura 5 - Gráfico de dispersão da curva de crescimento das raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233, monitorada por 63 dias, PS = Peso Seco.
..... 41
- Figura 6 - Registro após 180 dias de experimento de todos os tratamentos, com e sem a presença do óleo mineral 61
- Figura 7 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das raízes de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233; B) Cromatograma do extrato de raízes de plantas UTBN233 a 245 μm ; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina Tr=10, uncarina F Tr=14, mitrafalina Tr=15, isomitrafalina Tr=22, isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção. 66
- Figura 8 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das raízes de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo UTBN207; B) Cromatograma do extrato de raízes de plantas UTBN207 a 245 μm ; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina Tr=10, mitrafalina Tr=15, isomitrafalina Tr=22, isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção..... 68
- Figura 9 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico obtido de raízes provenientes da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233; B) Cromatograma do extrato de raízes da cultura UTBN233 a 245 μm ; C) Ampliação do tempo de retenção do composto isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção. 69
- Figura 10 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo

UTBN233; B) Cromatograma do extrato das partes aéreas de plantas UTBN233 a 245 nm; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina Tr=10, uncarina F Tr=14, mitrafilina Tr=15, isomitrafilina Tr=22, isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção..... 70

Figura 11 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo UTBN207; B) Cromatograma do extrato das partes aéreas de plantas UTBN207 a 245 nm; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina Tr=10, uncarina F Tr=14, mitrafilina Tr=15, isomitrafilina Tr=22, isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção..... 71

Figura 12 - Gráfico de coluna da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos, na concentração de 0,2 µg mL⁻¹, das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e de raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo, UTBN233. 72

Figura 13 - Gráfico de coluna da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 2 µg mL⁻¹ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233..... 73

Figura 14 - Gráfico de coluna da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 20 µg mL⁻¹ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233..... 73

Figura 15 - Gráfico de coluna da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 200 µg mL⁻¹ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233..... 74

Figura 16 - Gráfico de coluna da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 2.000 µg mL⁻¹ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233..... 75

Figura 17 - Gráfico de coluna do índice de fagocitose realizado em células de monócitos humanos, expostas a EPEC e aos extratos nas concentrações ensaiadas do extrato das raízes de *U. tomentosa* proveniente da cultura de raízes e de plantas micropropagadas do genótipo UTBN233..... 77

Figura 18 - Gráfico de coluna da atividade microbicida realizado em células de monócitos humanos, expostas a EPEC e aos extratos nas concentrações ensaiadas do extrato de raízes de <i>U. tomentosa</i> proveniente da cultura de raízes e de plantas micropropagadas do genótipo UTBN233.....	78
Figura 19 - Gráfico de coluna da expressão de IL-4 (pg mL ⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL ⁻¹	80
Figura 20 - Gráfico de coluna da expressão de IL-6 (pg mL ⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL ⁻¹	81
Figura 21 - Gráfico de coluna da expressão de IL-17A (pg mL ⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL ⁻¹	81
Figura 22 - Gráfico de coluna da expressão de IL-2 (pg mL ⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL ⁻¹	82
Figura 23 - Gráfico de coluna da expressão de IL-10 (pg mL ⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL ⁻¹	82
Figura 24 - Gráfico de coluna da expressão de TNF-α (pg mL ⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL ⁻¹	83
Figura 25 - Gráfico de coluna da expressão de IFN-γ (pg mL ⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL ⁻¹	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Resumo de p valor da análise de variância em esquema fatorial triplo, considerando as variáveis avaliadas para os fatores concentração dos sais de WP, tipo e concentração da fonte de carbono, suplementados ou não com 1 µM de 6-benzilaminopurina, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 43

Tabela 2 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável altura, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 45

Tabela 3 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número dos brotos, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 46

Tabela 4 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de gemas, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 47

Tabela 5 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de raízes, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 48

Tabela 6 – Resumo de p valor da análise de variância em esquema fatorial triplo, considerando as variáveis avaliadas para os fatores concentração dos sais de WP, tipo e concentração da fonte de carbono, suplementados ou não com 1 µM de 6-benzilaminopurina, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 50

Tabela 7 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável altura, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 52

Tabela 8 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de brotos, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com

fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 53

Tabela 9 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% probabilidade para a variável número de gemas, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 54

Tabela 10 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de raízes, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 55

Tabela 11 – Resultado da avaliação experimental no desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* expostos a variação da concentração de glicose, durante 180 dias, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).....54

Tabela 12 – Taxa de morte no desenvolvimento de explantes expostos a variação da concentração de glicose no período de 180 dias.....55

Tabela 13 – Resultado da avaliação experimental no desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* expostos a variação da concentração de sacarose, durante 180 dias, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 58

Tabela 14 – Taxa de morte no desenvolvimento de explantes expostos a variação da concentração de sacarose no período de 180 dias. 58

Tabela 15 - Avaliação do desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* imersos em óleo mineral, durante 180 dias, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*)..... 60

Tabela 16 – Taxa de morte no desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* imersos em óleo mineral no período de 180 dias..... 61

Lista de abreviaturas

ANA	Ácido Naftaleno Acético
ANOVA	Análise de variância
AOP	Alcaloides oxindólicos pentacíclicos
AOT	Alcaloides oxindólicos tetracíclicos
BAP	6-Benzilaminopurina
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectroscopia Ultravioleta
COX	Enzima ciclooxigenase
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EMBRAPA	Organização Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPEC	Cultura de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17 A
IFN- γ	Interferon Gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
KIN	Cinetina
KCL	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MN	Mononucleares
MOA	Alcalóides monoterpeneo oxindólicos
MS	Murashige Skoog Medium
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico

NF-kB	Factor Nuclear Kappa B
PBS	Tampão Fosfato Salino
q.s.p	Quantidade suficiente para
RENAME	Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais do Governo Brasileiro
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SISGEN/MMA	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético/Ministério do Meio Ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
<i>U. tomentosa</i>	<i>Uncaria tomentosa</i>
UTBN	<i>Uncaria tomentosa</i> Bannach
UV	Ultravioleta
WP	Wood Plant Medium

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo geral.....	28
4.2	Objetivos específicos.....	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1	Material vegetal.....	29
5.2	Ampliação do banco de germoplasma <i>in vitro</i>	29
5.3	Micropropagação de plantas de <i>U. tomentosa</i> da região de Bannach (UTBN) genótipos UTBN207 e UTBN233.....	30
5.4	Avaliação das fontes de carbono	30
5.4.1	Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a 25 ± 2 °C	30
5.4.2	Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a 18 ± 2 °C	31
5.5	Avaliação da concentração de fontes de carbono.....	32
5.6	Avaliação de plantas UTBN <i>in vitro</i> imersas em óleo mineral.....	32
5.7	Estabelecimento da cultura de raízes de <i>U. tomentosa</i> da região de Bannach (UTBN) genótipo UTBN233.....	32
5.8	Obtenção do extrato vegetal de raízes UTBN233.....	33
5.9	Curva de crescimento de raízes UTBN233	33
5.10	Análise química por CLAE-UV	34
5.11	Avaliação do efeito anti-inflamatório dos extratos de <i>Uncaria tomentosa in vitro</i> .	35
5.11.1	Sujeitos e tamanho amostral.....	35
5.11.2	Separação das células do sangue	35
5.11.3	Viabilidade celular	36
5.11.4	Cultura de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	38
5.11.5	Avaliação da fagocitose e atividade microbicida dos fagócitos	38
5.11.6	Quantificação das citocinas por citometria de fluxo.....	38
5.11.7	Análise estatística	39
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	Quantificação de alcaloides por CLAE-UV de raízes UTBN233.....	40
6.2	Curva de crescimento das raízes UTBN233	41

6.3 Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a 25 ± 2 °C	43
6.4 Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a 18 ± 2 °C	50
6.5 Avaliação da concentração de fonte de carbono.....	56
6.5.1 Avaliação da concentração da fonte de carbono glicose.....	56
6.5.2 Avaliação da concentração da fonte de carbono sacarose.....	57
6.6 Avaliação de plantas UTBN <i>in vitro</i> imersas em óleo mineral.....	59
6.7 Avaliação da atividade funcional de fagócitos e efeito anti-inflamatório dos extratos de <i>Uncaria tomentosa in vitro</i>	65
6.7.1 Viabilidade celular	65
6.8 Avaliação da fagocitose e atividade microbida dos fagócitos.....	76
6.9 Quantificação das citocinas por citometria de fluxo	79
7. CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
Apêndice 1	95

1 INTRODUÇÃO

A *Uncaria tomentosa* (Figura 1) é uma planta medicinal de grande valor econômico, encontrada em solos ricos em matéria orgânica, em áreas de florestas primárias, restingas e nas margens de cursos d'água. Entre as angiospermas, as famílias que se destacam na produção de alcaloides são Apocynaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae e Solanaceae, sendo que *U. tomentosa* pertence à família Rubiaceae.



Figura 1 - Partes aéreas de *Uncaria tomentosa*. Fonte: A autoria do autor (2023)

A composição química dos vegetais confere-lhes propriedades terapêuticas, sobretudo em plantas medicinais, devido à complexa interação entre os metabólitos secundários. Moléculas com a porção oxindol são encontradas em uma variedade de compostos extraídos de fontes vegetais. O primeiro derivado oxindol conhecido foi extraído na forma de alcaloides da casca de *U. tomentosa* (Willd.) DC. Diferentes posições do núcleo oxindólico foram exploradas por pesquisadores para variadas atividades farmacológicas, as quais

essa espécie também apresenta, a exemplo da atividade anti-inflamatória exibida pela mitrafilina isolada.

Os alcaloides oxindólicos são utilizados como marcadores químicos da planta no controle de qualidade da matéria-prima vegetal. Em 2012, foi documentado pelo ministério da saúde o uso de fitoterápicos com alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP) obtidos de *U. tomentosa*, em diversas formas farmacêuticas, sendo elas: cápsulas, comprimidos e gel. Há duzentas e setenta e uma patentes registradas mundialmente que mencionam a espécie. Grande parte da comercialização da matéria prima são por suas cascas, sendo o Peru o maior vendedor mundial.

A conservação das espécies de plantas pode ser realizada na região de origem na qual ela se encontra e fora do seu ambiente natural. Quando se trata de espécies vegetais em risco de extinção, na natureza, uma das medidas a serem tomadas para a conservação delas é o desenvolvimento e manutenção em banco de germoplasma, um espaço que armazena e garante a permanência do material genético da espécie. *U. tomentosa* é uma das plantas que enfrenta esse risco e, por ser medicinal e ainda não possuir alternativas sustentáveis do seu uso, sofre consequências pela alta procura do seu material vegetal que é retirado dos ambientes naturais de forma extrativista.

Nesse contexto, a preservação da diversidade genética é essencial para evitar o desaparecimento da espécie. O germoplasma vegetal atua como essa fonte de informação genética. Existem diversas formas de executar o processo de conservação de plantas, para as espécies mais vulneráveis, é viável realizar a conservação *in vitro*, que é possível através da cultura de tecidos, técnica fundamentada na totipotencialidade da célula vegetal, capaz de regenerar uma planta completa. Um banco de germoplasma *in vitro* é capaz de promover o crescimento, estabelecimento, desenvolvimento e multiplicação da espécie, e por ser estruturado em um ambiente controlado e com condições adequadas, tem a vantagem de manter e armazenar esses materiais livres de patógenos.

Encontrar indivíduos elites da espécie de interesse *U. tomentosa*, contendo concentrações suficientes dos marcadores químicos, é fundamental para a micropropagação. Este processo acelera a produção clonal de modo eficiente e auxilia a obtenção de condições favoráveis de manipulação sem comprometer a diversidade genética da espécie.

O critério de seleção, para a escolha dos clones utilizados nesse trabalho, foi o teor dos marcadores químicos da espécie (mitrafilina e isomitrafilina). Sendo o genótipo UTBN207 detentor destes alcaloides em níveis não quantificáveis, enquanto o genótipo UTBN233 apresenta teor superior a 3% do alcaloide mitrafilina.

Para completar o estudo é importante que sejam definidos métodos de preparo dos extratos e avaliação anti-inflamatória dos extratos obtidos determinando-se o mais promissor. Introduzir novos acessos no banco de germoplasma de *U. tomentosa*, que tem sido estabelecido *in vitro* desde 2015, irá possibilitar o desenvolvimento de protocolos de manutenção de uso do recurso genético vegetal, que darão suporte para as próximas etapas e processos a serem empregados no cultivo sustentável de *U. tomentosa* e no desenvolvimento do medicamento fitoterápico anti-inflamatório, a ser disponibilizado futuramente no SUS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

No Brasil, *Uncaria tomentosa*, conhecida popularmente como "unha de gato" é uma espécie de planta medicinal encontrada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará (Honório; Bertoni; Pereira, 2016). Essa planta pode levar 20 anos para atingir a maturidade. É uma trepadeira lenhosa que possui espinhos semicurvados (Figura 2), podendo alcançar até 30 metros de altura (Miranda, 2005).



Figura 2 - Espinhos de *Uncaria tomentosa*. Fonte: A autoria do autor (2023)

Povos indígenas utilizam amplamente essa espécie medicinal que tem sido atualmente fonte de produção de fitoterápico (Keplinger *et al.*, 1999) e, são indicados para o tratamento de artrite e osteoartrite (Zeferino *et al.*, 2021).

A espécie *U. tomentosa* apresenta grande importância, uma vez que compõe o rol das 12 plantas medicinais que estão na Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais do Governo Brasileiro (RENAME) fazendo parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Tendo

em vista a sua aplicabilidade para o tratamento de indivíduos da população brasileira, é imprescindível promover o uso de forma sustentável.

Sua matéria prima passou a ter valor econômico, a partir do patenteamento dos produtos fitoterápicos, como exemplo o Krallendorn[®] que é um extrato padronizado em alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP), obtido por tratamento das cascas de *U. tomentosa* com ácido clorídrico seguido de uma extração que contém entre 1,3 e 1,75% de alcaloides totais sendo, 97% de AOP. Outro produto é o Saventaro[®], extrato etanólico padronizado das cascas de *U. tomentosa* contendo >1,3% de AOP, produzido sob licença da empresa IMMODAL Pharmaka GmbH Áustria nos Estados Unidos e no Japão. A Alemanha e os EUA estão entre os maiores consumidores dos produtos naturais brasileiros (Brasil, 2016). Por apresentarem comercialização mundial, há forte demanda pela matéria prima da espécie, especialmente por suas cascas.

Essa espécie medicinal possui metabólitos secundários, como os heterosídeos triterpênicos derivados do ácido quinóico e polifenólicos (Pavei *et al.*, 2012; Sheng *et al.*, 2005).

Em relação aos alcaloides, alguns autores realizaram a quantificação desses metabólitos secundários em várias partes da planta. Quiroz *et al.* (2001) demonstraram que flores e folhas acumulam as maiores concentrações de alcaloides oxindólicos, 2,10% e 1,59%, respectivamente; enquanto Peñaloza *et al.* (2015), constataram o maior acúmulo dessa classe de compostos em folhas, dentre estes, detectou-se predominantemente mitrafilina e isomitrafilina. Outros autores que realizaram a quantificação dos alcaloides oxindólicos, também encontraram maiores concentrações desses compostos presente em folhas de *U. tomentosa* (Hoyos *et al.*, 2015, Azevedo *et al.*, 2018, Venutolo *et al.*, 2018).

Os alcaloides oxindólicos da unha de gato são bastante suscetíveis à isomerização tanto para os alcaloides oxindólicos tetracíclicos (AOT) quanto em alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP). Sendo estes últimos representados por especiofilina, isomitrafilina, mitrafilina, isopteropodina, pteropodina e uncarina F (Kaiser *et al.*, 2013), que foram considerados, por Valente (2006), como marcadores químicos da espécie. Os AOT (isorinchofilina, rinchofilina, corinoxeína, isocorinoxeína) atuam no sistema nervoso central, diferentemente dos AOP que afetam o sistema imunológico celular (Reinhard, 1999). Em relação à atividade imunoestimulante, enquanto os AOP induzem as células endoteliais humanas a liberar um fator que regula a proliferação de linfócitos B e T, os AOT

têm uma ação supressora, inibindo essa proliferação. Conclui-se que esses compostos possuem efeito antagônico, conforme demonstrado por Wurm *et al.* (1998).

Em 1997, mais de 50 fabricantes de suplementos dietéticos nos EUA ofereciam produtos de *U. tomentosa*. Essas aplicações terapêuticas eram indicadas para artrite, câncer, processos inflamatórios, úlceras gástricas entre outros (Keplinger *et al.*, 1999). A espécie apresenta diversas propriedades farmacológicas, como anticâncer (Dietrich *et al.*, 2014), anti-hipertensiva (Oogaki *et al.*, 2021), antiviral (Reis *et al.*, 2008), atividade antioxidante (Azevedo *et al.*, 2019), tendo sido relatado a inibição de partículas infecciosas do coronavírus (SARS-CoV-2) (Perez *et al.*, 2021). No que tange a atividade antioxidante, foi constatada a capacidade do extrato aquoso de folhas de *U. tomentosa* em aumentar a resistência ao estresse oxidativo (Azevedo *et al.*, 2019). Os extratos aquosos e etanólicos também indicaram atividade antioxidante *in vitro*, destacando atividade em frações contendo proantocianidinas de *U. tomentosa* (Hoyos *et al.*, 2017). Extratos advindos desta planta medicinal, também apresentaram atividade anti-inflamatória (Dietrich *et al.*, 2015).

A mitrafilina, é um alcaloide que, está presente em 20 das 34 espécies do gênero *Uncaria* (Heitzman *et al.*, 2005). Esse composto foi avaliado com citocinas e, Duran *et al.* (2012), relataram que, este composto, inibiu cerca de 50% da liberação das interleucinas 1 α , 1 β , 17 e do fator de necrose tumoral (TNF- α), sugerindo que a mitrafilina pode ser usada como um marcador de controle de qualidade para medicamentos fitoterápicos baseados nos extratos desta espécie medicinal. Do mesmo modo pode ser considerado como um novo composto líder para o desenvolvimento de produtos a serem empregados no tratamento da inflamação.

Além disso, foi demonstrado o efeito antifúngico de *U. tomentosa* no trabalho de Silva *et al.* (2022) que realizaram um estudo randomizado com pacientes infectados por estomatite protética, uma patologia bucal causada comumente por *Candida albicans*, no qual foi verificado o potencial fungicida de três produtos naturais, incluindo o gel de *U. tomentosa* (ImunoMax gel™) no tratamento da estomatite, que se mostrou equivalente ao tratamento convencional utilizado com o antifúngico nistatina.

No entanto, existem alguns fatores que impactam na sobrevivência de *U. tomentosa*, são eles: a ação antrópica, como o desmatamento em área de

ocorrência natural, coleta realizada de modo extrativista e falta de manejo sustentável, o que resultará na escassez de matéria prima necessária para a indústria farmacêutica. Devido ao longo período de 20 anos necessário para que a espécie atinja a maturidade, seus recursos tornam-se limitados, o que torna urgente a necessidade de sua conservação (Snow *et al.*, 2019).

A avaliação da variabilidade genética e química entre e dentro de oito populações de *U. tomentosa* advindas de alguns estados brasileiros, foi analisada, e detectou-se baixo fluxo gênico, ou seja, tem-se uma diminuição da transferência de genes entre as populações, o que é um problema para a sobrevivência da espécie tornando-a mais vulnerável à extinção. Portanto, estratégias de conservação da espécie, são necessárias, introduzindo-a em bancos de germoplasma *in vitro* e estabelecendo bancos de germoplasma *in situ*, de modo a evitar que ocorra a perda da variabilidade (Honório *et al.*, 2017).

O alerta para a conservação dessa espécie foi anunciado desde 2002 na 1ª Reunião Técnica Sobre Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas, que foi organizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e pela Organização Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e que reuniu profissionais e instituições de todo o Brasil e estipularam as espécies medicinais e aromáticas prioritárias para a conservação nos principais biomas brasileiros, seguindo os critérios de pressão antrópica, frequência e demanda de mercado. Dentre as espécies indicadas na reunião, treze encontram-se no bioma Amazônia, incluindo *U. tomentosa* (Vieira *et al.*, 2002).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos instituída por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro, o uso racional e sustentável de plantas medicinais e fitoterápicos, que conseqüentemente promova o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. É fundamental que seja feito um trabalho com a espécie, que vise a aplicação dessas diretrizes e possibilite o êxito da regulamentação do cultivo sustentável.

Uma forma eficaz de preservar a espécie é implementar a conservação *ex situ*, um processo que envolve a conservação da planta fora do seu habitat natural, sendo uma alternativa indispensável para minimizar a perda contínua de recursos genéticos em razão de pressões de seleção naturais e artificiais.

O emprego de ferramentas biotecnológicas, servem como estratégia capaz de resgatar e disponibilizar o germoplasma para atividades e uso futuro,

como por exemplo, em programas de melhoramento genético (Paiva *et al.*, 2019).

É essencial que os recursos genéticos vegetais sejam conservados em sistemas vivos. Um conjunto específico de indivíduos pode ser protegido em coleções de germoplasma, armazenados em bancos de germoplasma *in vitro*, com o objetivo de preservar fontes de genes, identificar e caracterizar genótipos, visando reduzir a erosão genética (Barbieri, 2003). Nesse contexto, os compostos ativos vegetais provenientes de espécies raras ou ameaçadas de extinção podem ser obtidos por meio de técnicas *in vitro*, sem causar impactos ambientais adversos e atendendo às demandas de biosustentabilidade exigidas pelo mercado (Hasnain *et al.*, 2022). A conservação *in vitro* oferece a vantagem de proteger as espécies contra pragas, patógenos e riscos climáticos, além de aumentar sua disponibilidade para distribuição, desde que mantidas livres de vírus (Reed *et al.*, 2004). Esse método pode ser aplicável para as espécies de propagação vegetativa, com alta heterozigosidade ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias (Matsumoto *et al.*, 2010).

O primeiro requisito para a definição de qualquer protocolo de conservação *in vitro* é o estabelecimento de condições de cultura de tecidos totalmente operacionais para regeneração e multiplicação de material vegetal. Os fatores que determinam a resposta na regeneração vegetal são ambientais, físicos e genotípicos (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

Devido ao potencial terapêutico da planta, é importante identificar amostras ricas em alcaloides. Selecionar indivíduos contendo características de interesse, chamados indivíduos elites, é um fator determinante no processo de propagação clonal, que envolve a técnica de cultura de tecidos vegetais. A micropropagação, como forma de multiplicação de órgãos de uma planta, a partir de clones elites, pode ser uma alternativa sustentável para a produção em escala dos indivíduos selecionados que tem como vantagem gerar plantas com alto grau de homogeneidade morfológica e química (Palencia *et al.*, 2013). Existem alguns trabalhos realizados com a multiplicação *in vitro* de *U. tomentosa* (Pereira *et al.*, 2008, Venutolo, 2011, Raposo; Teixeira 2011, Palencia *et al.*, 2013). Contudo, apesar do desenvolvimento e publicação desses estudos importantes, um protocolo de manutenção da espécie em banco de germoplasma *in vitro* é necessário.

Na conservação *in vitro*, os acessos são mantidos a temperaturas entre 12 e 25 °C. (Silva *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2022). A propagação pode ser feita com explantes vindo de plantas germinadas *in vitro*. O melhor meio para germinação dos embriões, em trabalho realizado por Ferreira *et al.* (2022) foi ¼ MS (Murashige; Skoog, 1962), independente da presença ou não de sacarose. Em trabalho desenvolvido por Pinto *et al.* (2022) a melhor condição de germinação foi WP (Lloyd; McCown, 1981) suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose com pH 6,00 ± 0,05.

Outro método de conservação *in vitro* de algumas espécies de plantas é realizado com a utilização de óleo mineral, um líquido oleoso, incolor e quimicamente inerte, o que o torna um ambiente ideal para conservação, porém existem poucos estudos publicados sobre esse tipo de protocolo (Peixoto *et al.*, 2017). O óleo diminui a transferência de oxigênio, resultando em uma desaceleração do metabolismo dos tecidos (Augereau, Courtois, Petiard, 1986), o que favorece o armazenamento em médio prazo do germoplasma vegetal e se torna mais eficiente em termos de custo. Um estudo envolvendo *Bacopa monnieri* exposta ao óleo mineral teve efeito benéfico significativo na conservação *in vitro* e os autores afirmam que 18 meses foi considerado o período de conservação ideal para essa espécie (Sharma *et al.*, 2012).

O teor de alcaloides totais em plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, após a aclimatização varia de acordo com a idade. Foi demonstrado que as folhas de plantas após 2 meses têm maiores quantidades de AOT, mas aos 6 meses, a quantidade desses alcaloides diminui. Diferente dos AOP em que a quantidade aumenta com 6 meses. Neste ínterim, foi demonstrado por Palencia *et al.* (2013) que as condições mais favoráveis para a produção de alcaloides oxindólicos pentacíclicos ocorre aos 6 meses. Nesse mesmo estudo, foi relatado que mudas micropropagadas de *U. tomentosa* produziram quatro vezes mais alcaloides do que plantas cultivadas em estufa.

A última etapa do processo de micropropagação envolve a transferência da planta cultivada *in vitro* para a casa de vegetação, a fim de realizar a aclimatização feita em ambiente sombreado no qual as plantas ficam por um período que varia de 15 a 30 dias para posteriormente serem expostas a pleno sol e assim ocorrer adaptação e crescimento (Dutra *et al.*, 2010).

Em relação à atividade anti-inflamatória de *U. tomentosa*, é necessário esclarecer e mencionar os elementos responsáveis dentro do processo

inflamatório. Os eicosanoides e a via da enzima ciclooxigenase (COX) aparecem em quase todos os aspectos da saúde e da doença (Mitchell, 2018). O ácido araquidônico, que é um ácido graxo de 20 carbonos possui um papel importante na síntese de mediadores químicos, como os eicosanoides, esse ácido graxo é liberado dos fosfolipídios da membrana pela fosfolipase A2 dentro da cascata do araquidonato, na qual a COX está envolvida (Abdulkhaleq *et al.*, 2018). A enzima COX apresenta algumas isoformas. A COX-1 e COX-2 são quase idênticas em estrutura, mas têm diferenças na seletividade de substrato e inibidor e em suas localizações intracelulares. As prostaglandinas protetoras, que preservam a integridade do revestimento do estômago e mantêm a função renal normal em um rim comprometido, são sintetizadas pela COX-1. Já a isoforma COX-2, além de ser induzida em lesões inflamatórias, está presente constitutivamente no cérebro e na medula espinhal (Vane *et al.*, 1998).

A atividade anti-inflamatória de *U. tomentosa* foi avaliada *in vitro* pela inibição da produção da citocina TNF- α e nitrito de células RAW 264.7 que foram expostas ao lipopolissacarídeo: LPS (Sandoval *et al.*, 2002). A espécie também pode exercer efeito anti-inflamatório pela inibição da expressão gênica da enzima iNOS induzida por LPS, formação de nitrito, morte celular e ativação do fator NF- κ B (Setty *et al.*, 2005).

U. tomentosa apresenta efeito imunoestimulante, dependendo do tipo de extrato e concentração. O efeito foi avaliado utilizando macrófago RAW 264.7 e indutores LPS, IFN- γ e IL-4 além de avaliar a citotoxicidade celular. A IC₅₀ foi de 0,3 mg mL⁻¹ enquanto, concentrações inferiores a 0,2 mg mL⁻¹, mantiveram a viabilidade superior a 90%. A atividade pró-inflamatória foi demonstrada nas concentrações 0,2, 0,1 e 0,05 mg mL⁻¹, sendo significativamente superior na concentração 0,2 mg mL⁻¹ (Brito *et al.*, 2023).

A atividade antitumoral foi relatada juntamente com um efeito imunomodulador nas células dendríticas e citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2), Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17A) de acordo com a análise de células mononucleares do sangue periférico humano de um extrato hidroalcoólico padronizado da casca de *U. tomentosa* (5,03% de AOP), demonstrou ser efetivo em aumentar a produção de citocinas relacionadas à resposta antitumoral em concentrações de 0,5 a 1 mg mL⁻¹ (Núñez *et al.*, 2015).

Algumas plantas medicinais têm demonstrado capacidade de induzir a ativação do sistema imunológico exibindo efeitos benéficos contra doenças

(França *et al.*, 2010). Os monócitos e macrófagos do sistema imunológico produzem mediadores inflamatórios e possui funções externas na detecção de patógenos, promovendo a fagocitose e migração. Esses mediadores inflamatórios são de interesse clínico e podem ser alvos terapêuticos em doenças inflamatórias (Timmons *et al.*, 2020).

A atividade da fagocitose realizada por essas células representa um importante mecanismo de defesa, especialmente contra infecções bacterianas, assim como outro mecanismo aliado a esse, a atividade microbicida (França *et al.*, 2010), segundo esses autores, que desenvolveu um estudo, cujo objetivo foi verificar os efeitos imunomoduladores *in vitro* da melatonina e de uma mistura de plantas medicinais sobre fagócitos mononucleares sanguíneos, com base em seus resultados, sugeriram que a atividade microbicida dos fagócitos do sangue humano é dependente da liberação do ânion superóxido, constituindo um mecanismo crucial de defesa contra infecções bacterianas.

Esses ensaios *in vitro* incluindo células mononucleares humanas, podem ser realizados com o auxílio da bactéria *Escherichia coli*, uma cepa capaz de se aderir à parede do intestino, causando inflamação em humanos e animais. Essa espécie pode ser dividida em seis subtipos, sendo a *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) a bactéria que mais suscita preocupações entre as diarreio gênicas, essa cepa é testada em estudos de produtos naturais para determinar a toxicidade do material (Costa *et al.*, 2023).

A técnica de viabilidade celular combinada com a tecnologia de citometria de fluxo, que é capaz de detectar várias interleucinas presentes em uma única amostra de células, permite analisar a presença dessas citocinas que relevam atividade pró inflamatória ou anti-inflamatória do material vegetal.

Direcionar a redução de mediadores pró-inflamatórios que são citocinas capazes de promover cascatas inflamatórias, como as famílias de interleucina IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), pode ser uma abordagem eficaz de controle e prevenção doenças inflamatórias crônicas (Liu *et al.*, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

O estudo proposto com a espécie *U. tomentosa*, está de acordo com a Política de Biodiversidade do decreto de nº 4.339 de 22 de agosto de 2002, a qual engloba diretrizes atribuídas à conservação *in situ* e *ex situ* de variabilidade genética de espécies, particularmente daquelas ameaçadas ou com potencial econômico. O material vegetal de *U. tomentosa* conservada em banco de germoplasma *in vitro*, permitirá o acesso seguro e sustentável a espécie, e uma vez analisado quanto a citotoxicidade e potencial anti-inflamatório em monócitos humanos, permitirá o desenvolvimento de novo medicamento, por possuir compostos capazes de reduzir os níveis de citocinas pró inflamatórias. Esse estudo combinado a trabalhos que serão publicados posteriormente, poderão contribuir para a produção de fitoterápicos da espécie de forma sustentável.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver protocolo de conservação *in vitro* de *U. tomentosa*, estabelecendo a produção de clones elites, visando auxiliar a cadeia produtiva de fitoterápicos, e avaliar quimicamente os extratos vegetais produzidos, bem como determinar a atividade microbica e anti-inflamatória desses extratos.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Multiplicar acessos mantidos em banco de germoplasma *in vitro*;
- ✓ Quantificar isomitrafalina, através de cromatografia líquida de alta-eficiência acoplada ao detector ultravioleta (CLAE-UV), dos acessos UTBN233 e UTBN207 selecionados do banco de germoplasma *in vitro*, utilizando método analítico validado;
- ✓ Definir parâmetros para manutenção em banco de germoplasma da espécie *Uncaria tomentosa*;
- ✓ Estabelecer cultura de raízes do indivíduo elite de *U. tomentosa*, selecionados para o desenvolvimento deste trabalho;
- ✓ Determinar a curva de crescimento das raízes UTBN233;
- ✓ Analisar quimicamente a cultura de raízes estabelecidas;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, os extratos obtidos de plantas e raízes, quanto à atividade microbica;
- ✓ Dosar as citocinas, por citometria de fluxo, liberadas das células mononucleares expostas aos extratos de plantas, raízes e a *Escherichia coli*, a fim de determinar a atividade anti-inflamatória.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material vegetal

O acesso ao patrimônio genético do material vegetal em seu ambiente natural, com o objetivo de introdução *in vitro*, foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente (SISGEN/MMA), sob o registro A4E1F8C.

Um exemplar da espécie *U. tomentosa* foi depositado no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) sob o voucher HPMURP 3059.

Foram coletadas sementes de indivíduo localizado na região de Bannach-PA. Essas sementes foram submetidas a assepsia, sendo embebidas em solução de hipoclorito de sódio (Triex® – L6241L12) 1,25% e água autoclavada a 134 °C por 10 minutos, na proporção 1:1; obtendo-se concentração final de hipoclorito de sódio à 0,625%. Nessa solução, as sementes foram mantidas por 2 horas, sob agitação constante a 75 rpm em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de solução. Decorrido o período de exposição, a solução foi removida e substituída por uma solução contendo 8 mL de hipoclorito (1,25%) em 72 mL de água previamente autoclavada, gerando uma solução de concentração 0,125% de hipoclorito de sódio, na qual permaneceu, sob agitação, por 24 horas. As sementes foram enxaguadas com água destilada estéril e transferidas para cubetas contendo meio de cultura WP (WPM - Wood Plant Medium), 3,0 g L⁻¹ de Gellan Gum (Gellex® – 11172025) (Caisson Laboratories, Smithfield, North Carolina, EUA), isento de fonte de carbono, tendo o pH ajustado para 6,00 ± 0,05.

5.2 Ampliação do banco de germoplasma *in vitro*

Para introduzir no banco de germoplasma novos genótipos, sementes de indivíduo de Bannach-PA foram cultivadas e a incubação foi realizada na sala de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h claro (25 μmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*). Foi feita a manutenção das plantas em meio de cultura realizando repicagens e também avaliação de crescimento e enraizamento com 1,0 μM do regulador 6-benzilaminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich® – 107K0737 / Steinheim, Germany).

5.3 Micropropagação de plantas de *U. tomentosa* da região de Bannach (UTBN) genótipos UTBN207 e UTBN233

A micropropagação dos acessos foi realizada utilizando 100 mL L⁻¹ do meio WP (Lloyd; Mccown, 1981) suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose (Synth® – 207434), com pH ajustado para 6,00 ± 0,05 e foi adicionado 3,0 g L⁻¹ de Gellan Gum (Gellex® – 11172025) para a solidificação desse meio de cultura preparado, que foi distribuído em 5 mL nas cubetas. Em seguida os meios de cultura foram submetidos a autoclavagem a 121 °C e 1 atm de pressão por 15 minutos. As plantas desenvolvidas nesse meio foram monitoradas para realização dos repiques.

5.4 Avaliação das fontes de carbono

Para estabelecer as condições favoráveis de cultivo mínimo, foi realizado um experimento com 192 explantes cultivados em sala de crescimento a 18 ± 2 °C. Um segundo experimento foi conduzido com mais 192 explantes, contendo as mesmas características, porém em ambiente a 25 ± 2 °C. O primeiro experimento visou avaliar o desenvolvimento dos clones gerados para a manutenção da espécie em banco de germoplasma, enquanto o segundo focou no desenvolvimento dos mesmos durante o processo de micropropagação.

Esses 384 indivíduos foram mantidos em meio de cultura utilizando glicose ou sacarose, como fontes de carbono, nas concentrações de 10 e 20 g L⁻¹, nos meios WP e WP/2, considerados ideais para a manutenção da espécie.

5.4.1 Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a 25 ± 2 °C

Indivíduos UTBN micropropagados foram submetidos à avaliação de fontes de carbono. Este experimento foi conduzido com 16 tratamentos diferentes. Foram utilizados 12 indivíduos por tratamento, cultivados em 5 mL do meio de cultura WP (Lloyd; McCown, 1981) para cada tratamento. Em todas as

condições realizadas, o pH do meio foi ajustado para $6,00 \pm 0,05$ e para solidificar o meio, foi adicionado $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de Gellan Gum (Gellex[®] – 11172025).

Os tratamentos foram: **1** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 10 g L^{-1} de glicose; **2** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 20 g L^{-1} de glicose; **3** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 10 g L^{-1} de sacarose; **4** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose; **5** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 10 g L^{-1} de glicose; **6** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 20 g L^{-1} de glicose; **7** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 10 g L^{-1} de sacarose; **8** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose. **9** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 10 g L^{-1} de glicose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina) (Sigma-Aldrich[®] – 107K0737); **10** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 20 g L^{-1} de glicose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina); **11** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 10 g L^{-1} de sacarose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina); **12** - WP 100 mL L^{-1} , suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina); **13** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 10 g L^{-1} de glicose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina); **14** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 20 g L^{-1} de glicose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina); **15** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 10 g L^{-1} de sacarose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina); **16** - WP 50 mL L^{-1} (WP/2), suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose e $1 \mu\text{M}$ de BAP (benzilaminopurina).

Após 3 meses, foi avaliado a altura, o número de brotos, o número de gemas e o número de raízes dos explantes mantidos nos tratamentos.

5.4.2 Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a $18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Foram avaliados 192 indivíduos UTBN em relação às fontes de carbono, glicose e sacarose, contendo 10 ou 20 g L^{-1} . Esse experimento foi realizado da mesma forma descrita no item 5.4.1, porém os clones se desenvolveram em um ambiente controlado de temperatura que permaneceu a $18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Decorrido os 3 meses nas diferentes condições, foram analisados quanto aos parâmetros altura dos brotos, número de brotos, número de gemas e número de raízes.

5.5 Avaliação da concentração de fontes de carbono

Segmentos nodais provenientes de plantas micropropagadas (n=9), foram separadamente expostos a diferentes concentrações de glicose e sacarose, como fonte de carbono (0,10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). O desenvolvimento dos explantes foi monitorado a cada 30 dias quanto à altura, número de brotos, gemas e raízes.

5.6 Avaliação de plantas UTBN *in vitro* imersas em óleo mineral

Para determinar a melhor condição de manutenção da espécie *U. tomentosa* em banco de germoplasma (*no prelo*: Honório *et al.*, 2024), na presença de óleo mineral (Mineral oil light - Sigma-Aldrich® 330779) em sala a 18 ± 2 °C, foi utilizado cubetas contendo 5 mL de meio de cultura WP basal suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose (Synth® – 207434) em pH 6,00 ± 0,05 (n=9). Os explantes introduzidos, têm como característica: **1** - uma gema única isenta de qualquer tecido foliar; **2** - uma gema única isenta de qualquer tecido foliar coberta com 5 mL de óleo mineral; **3** - uma gema única isenta de qualquer tecido foliar coberta com 15 mL de óleo mineral; **4** - uma gema única com tecido foliar parcialmente seccionado; **5** - uma gema única contendo tecido foliar parcialmente seccionado coberta com 5 mL de óleo mineral; **6** - uma gema única contendo tecido foliar parcialmente seccionado coberta com 15 mL de óleo mineral. A análise foi realizada levando em consideração a altura dos brotos, o número de brotos, o número de gemas e de raízes.

5.7 Estabelecimento da cultura de raízes de *U. tomentosa* da região de Bannach (UTBN) genótipo UTBN233

A propagação de raízes obtidas de plantas foi realizada utilizando 100 mL L⁻¹ do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Synth® – 207434) e 1 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético [(ANA) / (Sigma-Aldrich® – 016K0736)] (Rodrigues *et al.*, 2024). O pH foi ajustado para 6,00 ± 0,05 e o meio transferido para um erlenmeyer, seguido de autoclavagem

a uma pressão de 1 atm por 15 minutos. As raízes desenvolvidas nesse meio foram monitoradas para realizar os repiques.

5.8 Obtenção do extrato vegetal de raízes UTBN233

Raízes UTBN233 com 45 dias de idade, mantidas *in vitro*, foram enxaguadas (3x) em água corrente e retiradas dos frascos erlenmeyer para posterior secagem. Estas, foram transferidas para uma caixa de papel pardo confeccionada e inserida em Estufa de Circulação e Renovação de ar (Marconi® MA035) a 45 ± 2 °C por 24 horas, após o tempo de secagem, o material foi macerado no gral e a droga vegetal (500 mg) foi exposta a 5 mL de metanol, 30 minutos em banho ultrassônico (Ultronique eco-sonics® - Q5.9/37). A filtração dos extratos foi iniciada com o auxílio de um funil e papel de filtro. Um e meio mililitro do extrato das raízes foi recuperado, por filtração, utilizando-se uma seringa acoplada a uma membrana de filtro de 0,45 µm (Millipore®). Essa amostra foi inserida em um *vial* que posteriormente foi analisado no aparelho CLAE-UV (Shimadzu) para realização de análise química.

5.9 Curva de crescimento de raízes UTBN233

Um total de 22 raízes, do genótipo UTBN233, com 3 semanas (21 dias) de idade foram utilizadas para montagem da curva de crescimento. Dentro de câmara de fluxo laminar (VECO® HLFS12), com o auxílio de uma balança e pinça, foram transferidas, $2,00 \pm 0,20$ g das raízes para erlenmeyers com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 mg L⁻¹ ANA, pH 6,0, preparado de acordo com condições estabelecidas no item 5.7. As raízes foram pesadas igualmente com massa conhecida e um total de 40 erlenmeyers foi obtido.

No tempo zero, retirou-se três amostras expostas durante a montagem do experimento a este novo meio de cultivo. De sete em sete dias, três erlenmeyers foram aleatoriamente retirados e as raízes contidas nesses frascos foram removidas, enxaguadas em água corrente, transferidas para recipientes individuais e em seguida colocadas em Estufa de Circulação e Renovação de ar (Marconi® MA035) a 45 ± 2 °C, onde permaneceram durante 72 horas. Finalizada a secagem, foi obtido o peso seco das raízes e as amostras foram envelopadas

em papel pardo, previamente identificado, e armazenadas em freezer -20 °C (Consul® CVU26DBANA). Os pontos de coleta foram 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63 dias.

5.10 Análise química por CLAE-UV

Para análise química, as partes aéreas e raízes de plantas dos genótipos UTBN207 e UTBN233, e também raízes advindas da cultura de raízes do genótipo UTBN233 foram secas, pesadas e expostas separadamente ao solvente etanol 70% por 48 horas no escuro e posteriormente, foi realizada uma extração em banho ultrassônico (Ultronique eco-sonics® - Q5.9/37) por 30 minutos. O método utilizado para a extração e quantificação da mitrafilina e isomitrafilina foi baseado no protocolo de Bertol (2012), com algumas modificações. Para a detecção e quantificação desses alcaloides foi realizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, com detector ultravioleta (CLAE-UV). As amostras foram previamente submetidas a uma limpeza ou *clean up*, para a retirada de compostos de baixa polaridade que poderiam estar presentes na amostra. Nesse *clean up*, 15 mg de extrato foram solubilizados em 1 mL de metanol (JT BAKER – CAS 67-56-1):H₂O (Milli-Q) (80:20), e a solução contendo os analitos de interesse foi aplicada em cartucho de sílica C18 (Supelco® - LC18 reorder 57054), ativado com 1 mL de metanol, seguido de 1 mL de metanol:H₂O (80:20). Depois de drenada toda a fase líquida, os analitos, retidos no cartucho, foram eluídos com 3 mL de metanol:H₂O (80:20), obtendo-se solução de extrato (5 mg mL⁻¹), em concentração já apropriada para a análise.

Na análise cromatográfica, foi utilizado o cromatógrafo líquido Agilent, modelo 1260 Infinity II, acoplado ao detector de arranjo diodo (DEAC614600), coluna Zorbax XDB (150 x 4.6mm i.d., 5µm) (Agilent, USA) protegida por uma coluna guarda Eclipse XDB-C18 (4.6 x 12.5 mm i.d., 5µm) com quatro bombas (DEAE209468), sendo uma bomba injetora (DEAEQ41523), um degazeificador (G7116-60051) e um forno (DEAED25112).

A fase móvel utilizada foi acetato de amônio (Neon – CAS 631-61-8) 10 mM (ajustado para pH 6.9 com trietanolamina, quando necessário) (solvente A) e acetonitrila (JT BAKER – CAS 75-05-8) (solvente B) em um gradiente linear programado: 35 % B (0.01 – 18.00 min); 50 % B (18.01 – 25.00 min); 50- 100 %

B (25.01 - 40 min); 35 % B (40.01 – 45 min) e término (45.01 min). As análises foram conduzidas em temperatura ambiente (22 ± 1 °C) por 45 minutos com fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção no comprimento de onda de 245 nm. Sendo o volume de injeção de 20 μL (Pinto *et al.*, 2022 adaptado de Bertol *et al.*, 2012). Todos os dados foram processados pelo software Agilent Infinity II Acquisition.

Para o estabelecimento da curva analítica foram utilizados os padrões mitrafilina (CAS nº 509-80-8) e isomitrafilina (CAS nº 4963-01) adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

5.11 Avaliação do efeito anti-inflamatório dos extratos de *Uncaria tomentosa in vitro*

5.11.1 Sujeitos e tamanho amostral

Os vinte voluntários saudáveis entre 18 e 40 anos de ambos os sexos que participaram deste estudo, foram esclarecidos quanto ao caráter espontâneo da participação e sigilo das informações, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) contido no Apêndice I. Ao estarem de acordo com o TCLE, foi coletado de cada participante 8 mL de sangue periférico por punção venosa.

As atividades com células humanas foram iniciadas após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa sob o registro CAAE 77962724.1.0000.5498.

5.11.2 Separação das células do sangue

Para a separação de células do sangue, foi preparado tampão fosfato salino (PBS) nas seguintes condições: 80 g de NaCl (cloreto de sódio), 11,6 g de Na_2HPO_4 (fosfato dissódico), 2 g de KH_2PO_4 (fosfato monopotássico), 2 g de KCl (cloreto de potássio), q.s.p. 1000 mL de água destilada, com pH final ajustado para 7,0.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA como agente anticoagulante (Labor Import®). O material biológico foi processado no Laboratório de Imunologia da Relação Materno Infantil/CUA/FMT, localizado na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) em Barra do Garças-MT, sob orientação da Professora Doutora Adenilda Cristina Honório França,

imunologista do Instituto de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso e responsável pelo laboratório supracitado.

Em seguida, foi realizada a separação das populações celulares por gradiente de densidade com Ficoll-Paque PLUS (Cytiva® - 10343540) durante 40 minutos a 1500 *rpm* em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após este período, foi retirado o anel enriquecido de células mononucleares (MN) e lavado por duas vezes com 3 mL de PBS que foi previamente diluído na proporção 1:10 (10X concentrado), com 1 mL do PBS concentrado para 9 mL de água destilada. Logo depois, o sobrenadante foi desprezado e ressuspensionado com 1 mL de PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/mL, para a análise da viabilidade celular.

5.11.3 Viabilidade celular

A viabilidade dos fagócitos do sangue periférico humano foi avaliada pela técnica de alaranjado de acridina. O laranja de acridina é um corante de ácido nucleico que possui propriedades espectrais únicas e possibilita a medição em tempo real de RNA e DNA como substitutos da viabilidade celular ao longo da exposição a vários estímulos nocivos (Plemel *et al.*, 2017). Esse fluorocromo metacromático, sob análise de um microscópio ultravioleta emite cor verde na sua forma ortocromática ao se ligar no DNA de fita dupla, e emissão vermelha ou alaranjado na sua forma metacromática quando entra em contato com DNA desnaturado ou despolimerizado ou ainda RNA de fita simples (Smith; Rommel, 1977).

Os extratos vegetais avaliados (Figura 3) foram previamente preparados utilizando álcool de cereais 96% (CereAlcool® – 20H171415), o qual foi diluído com Água Milli-Q® para ficar na concentração de 70 °GL. As partes aéreas e as raízes de plantas micropropagadas por 90 dias de ambos os genótipos UTBN, foram retiradas do cultivo *in vitro* e enxaguadas em água corrente para posterior adição do álcool 70 °GL, essas amostras foram armazenadas no escuro por 48 horas, após esse período, os extratos foram filtrados com papel filtro e por fim permaneceram em capela de fluxo laminar para realizar a secagem dos extratos, esse mesmo procedimento foi realizado em amostras de raízes obtidas da cultura de raízes com 45 dias de cultivo. Posteriormente, todos os extratos foram igualmente pesados, em microtubos *ependorf* previamente identificados, contendo 0,02 mg de material vegetal. Em seguida foram expostos a 2 mL de

PBS e agitados em vórtex, para ressuspensão. Os extratos ainda, permaneceram em banho ultrassônico (Ultronique eco-sonics® - Q5.9/37) por uma hora para então ser realizada as diluições seriadas nas concentrações: 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2 mg mL^{-1} para determinação da viabilidade celular de monócitos expostos aos mesmos.

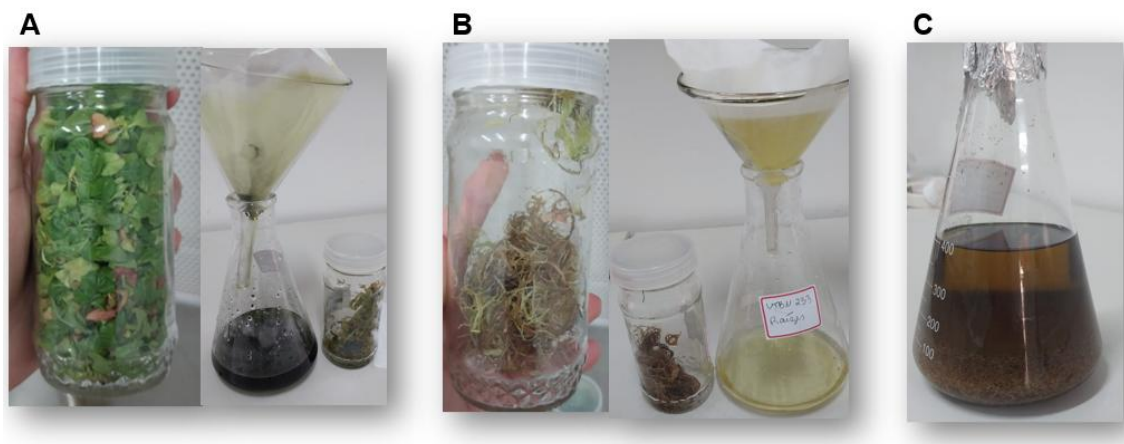


Figura 3 - Preparação dos extratos hidroalcoólicos de *U. tomentosa in vitro*: (A) Parte aérea de plantas micropropagadas; (B) Raízes de plantas micropropagadas; (C) Raízes obtidas da cultura de raízes

Após separar os fagócitos MN, conforme protocolo de separação de células (sangue), e ajuste da concentração celular (2×10^6 células/mL), os fagócitos foram incubados, separadamente, com extratos hidroalcoólicos já diluídos das partes aéreas e raízes dos acessos de *U. tomentosa* (UTBN207 e UTBN233) por um tempo de exposição de 30 minutos.

As suspensões celulares (2×10^6 células/mL), tratadas ou não com os extratos das plantas micropropagadas de *U. tomentosa* foram incubadas de acordo com o tempo, em banho-maria a 37 °C. Decorrido o período de incubação as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 160 x g) (Centrífuga Refrigerada Cientec®- CT-5000R). O sobrenadante foi armazenado para realizar a dosagem das citocinas e o botão celular “pellet” foi corado com 200 μL de alaranjado de acridina (concentração de 14,4 mg mL^{-1}) (Sigma, St Louis, USA - 2 mg mL^{-1}). Posteriormente as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS sob centrifugação (10 minutos a 160 x g). Em seguida, foram montadas lâminas com 20 μL das células e analisadas em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse E-200).

Para determinar o índice de viabilidade celular, foi realizada a contagem de 100 células. As células que apresentaram coloração verde representaram as células viáveis (vivas) e aquelas que possuíram coloração alaranjada

representaram as células não viáveis (mortas) obtendo-se uma relação entre células vivas e mortas (França *et al.*, 2011), sendo esse experimento realizado em triplicata.

5.11.4 Cultura de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

A bactéria *Escherichia coli* isolada das fezes de uma criança com diarreia aguda (sorotipo 0111: H- AL-, eae+, eaf+, bfp+) conservada à -70 °C foi cultivada, conforme descrito por Honório *et al.* (1997). Esse material previamente preparado foi diluído em PBS e ajustado para 1×10^7 bactérias/mL, medida com espectrofotômetro (620 nm) T 2000 Tekna®.

5.11.5 Avaliação da fagocitose e atividade microbicida dos fagócitos

Para avaliar a atividade funcional dos fagócitos, o ensaio da fagocitose foi realizado de acordo com o item 5.11.2 e 5.11.3, entretanto, no momento da incubação, as células MN estimuladas ou não com os extratos hidroalcóolicos de *U. tomentosa* foram incubadas juntamente com a EPEC.

A fagocitose e atividade microbicida dos fagócitos foram analisadas através de microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse E-200), com a utilização do corante laranja de acridina (Sigma Aldrich® - A6014). Nessa análise, as células são classificadas de acordo com a ocorrência de fagocitose e de morte intracelular da bactéria. O índice de fagocitose foi calculado pela contagem de células que ingeriram pelo menos 3 bactérias, em uma avaliação de 100 células. Para determinar o índice bactericida, foram contadas 100 células com bactérias fagocitadas. O índice bactericida foi calculado como a razão entre bactérias coradas de laranja [mortas] e bactérias coradas de verde [vivas] x 100 (França *et al.* (2011), todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

5.11.6 Quantificação das citocinas por citometria de fluxo

As concentrações de citocinas, como Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL- 10), fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-17A (IL-17A) presentes no sobrenadante de cultura celular foram avaliadas pelo Kit "BD™ Cytometric Bead Array (CBA, BD Bioscience, USA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine". Análises

destas citocinas foram realizadas através de citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados através do software FCAP Array 3.0.

5.11.7 Análise estatística

As análises realizadas tiveram delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos a ANOVA através do programa SISVAR V.4.3 (Ferreira, 2011), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Scott-Knott, 1974). A análise da avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN foi realizada em esquema fatorial triplo.

Para a análise estatística foi empregada a análise de variância, e para a comparação das médias entre os grupos controles e tratados, o teste “t” de Student e para os parâmetros bioquímicos, teste “U” de Mann – Whitney. O programa BioEstat 5.3 foi utilizado para as análises estatísticas da viabilidade celular, quantificação de citocinas, fagocitose e atividade microbicida através do teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey.

Resultados com $p < 0.05$ (*p-value*) foram considerados estatisticamente significativos (Sokal; Rohlf, 1994).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Quantificação de alcaloides por CLAE-UV de raízes UTBN233

O extrato metanólico, das raízes cultivadas *in vitro*, foi preparado na proporção 100 mg por mililitro (m/v). Nas condições de ensaio, foi possível detectar a presença de alcaloides oxindólicos. Somente o alcaloide isomitrafalina, foi passível de quantificação, nas condições do ensaio (Figura 1).

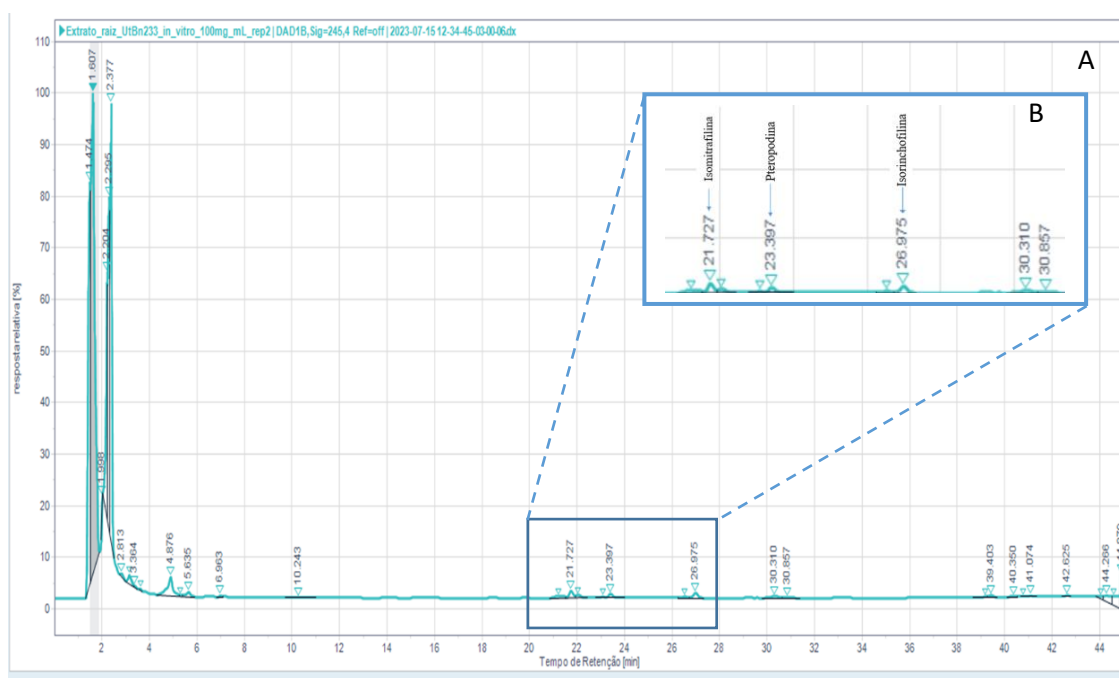


Figura 4 - A) Perfil cromatográfico de extrato metanólico das raízes de *U. tomentosa* genótipo UTBN233; B) Resolução ampliada do segmento do perfil cromatográfico de extrato metanólico das raízes de *U. tomentosa* genótipo UTBN233 onde se é possível observar picos dos alcaloides isomitrafalina (21,7 min), pteropodina (23,4 min) e isorinchofilina (26,9 min).

O crescimento radicular das raízes *in vitro* foi eficiente, devido as condições dentro de um ambiente controlado que as raízes adventícias estavam. A composição do meio de cultura contendo o regulador de crescimento (ANA) também foi fundamental para a propagação e estabelecimento de *U. tomentosa*, pois essa auxina exógena em concentrações específicas para cada espécie pode aumentar o crescimento e a diferenciação radicular (Kovács *et al.*, 2024).

Na figura 4, os alcaloides oxindólicos foram detectados pelo método descrito por Bertol *et al.*, 2012 e estão representados de acordo com o tempo de retenção dos compostos isolados, tendo sido a isomitrafalina detectada a 21,7 minutos, pteropodina

em 23,4 minutos e a isorinchofilina em 26,9 minutos. Deste modo, constata-se que a cultura de raízes estabelecida a partir do clone UTBN233, com 45 dias de idade, produziu alcaloides.

Esse resultado que confere a quantificação de isomitrafalina por CLAE-UV e a detecção dos outros marcadores, mostrou que raízes UTBN233 com 45 dias de idade, cultivada a partir da cultura de raízes *in vitro* produz alcaloides, essa identificação foi o que tornou possível a obtenção e utilização do extrato vegetal para realizar outros ensaios e análises.

6.2 Curva de crescimento das raízes UTBN233

A biomassa (mg) das raízes UTBN233 foi determinada em relação ao peso seco. Os valores constatados nas amostras coletadas por um período de 63 dias, pode ser observada na figura 5, juntamente com o teor de isomitrafalina demonstrado no período do experimento.

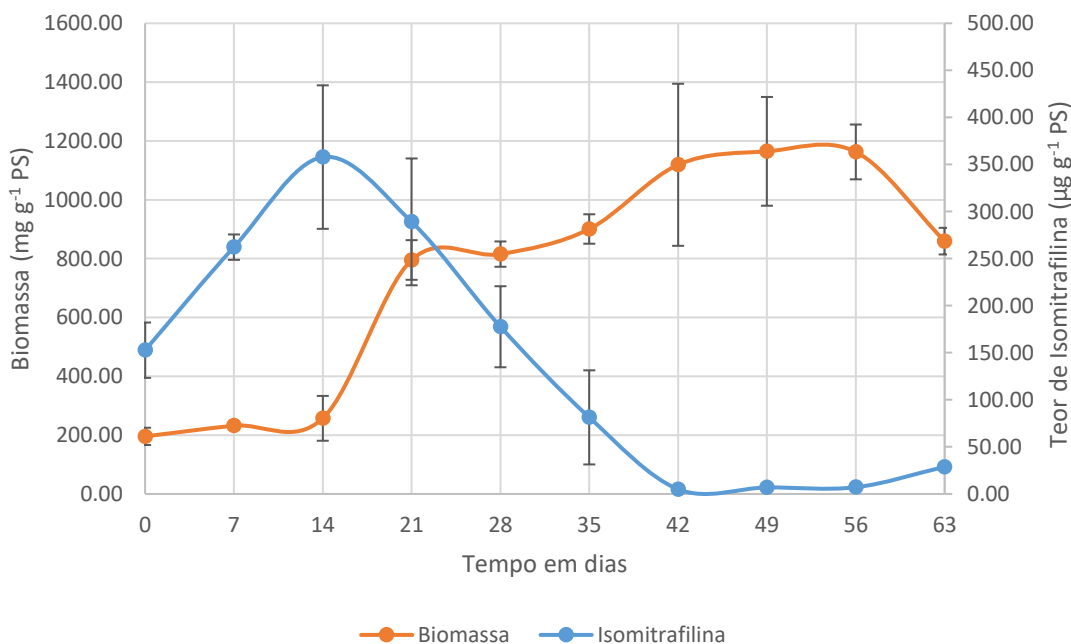


Figura 5 - Gráfico de dispersão da curva de crescimento das raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233, monitorada por 63 dias, PS = Peso Seco.

A curva de crescimento representada pela Figura 5, apresentou fase inicial de crescimento (latência) nas duas primeiras semanas de experimento. A partir de então, as raízes UTBN233 tem sua fase exponencial, entre o 14^o e 42^o dia. A fase

estacionária pode ser observada entre o 42º e 56º dia e o declínio ocorre a partir do 56º dia de experimento até o 63º dia. Conclui-se que as raízes UTBN233 apresentaram todas as fases de crescimento, observadas pelo gráfico de dispersão.

Um dos marcadores químicos de *U. tomentosa*, a isomitrafalina, apresentou aumento no teor (m/m) nas semanas iniciais do experimento e o nível desse alcaloide oxindólico foi reduzido a partir do 21º dia, conforme a biomassa das raízes aumenta, o alcaloide diminui. Chacón *et al.* (2023) relatam em seus resultados que, de maneira geral, a biomassa de uma espécie de planta ameaçada foi maximizada com a combinação dos hormônios de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e ácido naftaleno acético (ANA); no entanto, a biossíntese de alcaloides foi reduzida. A formação de alcaloides, conforme o autor destaca, depende da ação de enzimas que catalisam reações químicas. O uso de auxinas e citocininas, individualmente ou em combinação, alteram tanto o crescimento da planta quanto a produção de metabólitos secundários, podendo influenciar a expressão dessas enzimas, que quando são expressas em níveis adequados, aumentam a produção de alcaloides.

Estes resultados corroboram com Borroto *et al.* (2008), uma vez que o metabólito antraquinona intracelular da espécie *Morinda royoc* pertencente à família Rubiaceae também diminui consideravelmente a partir do 30º dia de experimento com raízes cultivadas *in vitro*, além disso, a maior produção desse metabólito foi evidenciada quando a menor quantidade de peso fresco radicular foi produzida, assim como observado neste trabalho para *U. tomentosa*. Nota-se o ápice de produção de isomitrafalina (357 $\mu\text{g g}^{-1}$) enquanto a biomassa é de 257 mg (14 dias). Esse dado (357,87 $\mu\text{g g}^{-1}$) é semelhante ao resultado demonstrado por Huerta-Heredia *et al.* (2009), que também cultivou raízes de *U. tomentosa* proveniente da cultura de tecido e nesse trabalho, a concentração máxima de alcalóides monoterpênicos oxindólicos (MOA) foi observada no 18º dia, com o teor de 348,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco.

6.3 Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a 25 ± 2 °C

Cada tratamento conduzido experimentalmente promoveu diferente desempenho dos clones micropropagados do genótipo de UTBN (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo de p valor da análise de variância em esquema fatorial triplo, considerando as variáveis avaliadas para os fatores concentração dos sais de WP, tipo e concentração da fonte de carbono, suplementados ou não com $1 \mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro ($25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

Fonte de Variação Tratamentos	GL	Altura	Nº de Brotos	Nº de Gemas	Nº de Raízes
		Pr>Fc	Pr>Fc	Pr>Fc	Pr>Fc
MEIO DE CULTURA	1	0.0000**	0.3368 ^{ns}	0.0000**	0.0000**
FONTE DE CARBONO	3	0.0000**	0.8756 ^{ns}	0.3295 ^{ns}	0.0000**
REGULADOR	1	0.0000**	0.0011**	0.0002**	0.5608 ^{ns}
MEIO*FONTE DE CARBONO	3	0.0000**	0.1509 ^{ns}	0.0001**	0.8869 ^{ns}
MEIO*REGULADOR	1	0.0000**	0.9038 ^{ns}	0.0001**	0.0000**
FONTE DE CARBONO*REGULADOR	3	0.1807 ^{ns}	0.5012 ^{ns}	0.2824 ^{ns}	0.0000**
MEIO*FONTE DE CARBONO*REGULADOR	3	0.0011**	0.5820 ^{ns}	0.0202**	0.1739 ^{ns}
CV(%)		9,51	27,53	13,74	16,94
Média geral		3,55	1,72	7,12	3,47
GL erro	32				
GL total corrigido	47				

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

* Interação entre os tratamentos; ** Significativo a 5% de probabilidade segundo o teste Scott Knott; CV = Coeficiente de variação; Fc = Valor calculado; GL = Graus de liberdade; N° = número; ns = não significativo a 5% de probabilidade segundo o teste Scott Knott; Pr = probabilidade; > = maior.

A análise estatística dos tratamentos expostos a temperatura de 25 ± 2 °C, apontam que, quanto as variáveis altura e número de gemas, estas apresentaram interação tripla significativa entre os tratamentos no desdobramento do tipo e concentração da fonte de carbono, além da concentração dos sais do meio de cultura e regulador de crescimento utilizado (Tabela 1).

A variável número de brotos, apresentou resultado estatisticamente significativo somente quanto ao regulador BAP.

Os tratamentos Meio de cultivo; Fonte de carbono; Meio e regulador; Fonte de carbono e regulador, apresentaram interação significativa quando analisada a variável número de raízes dos explantes frente ao teste Scott Knott 5% de variância.

É possível identificar na Tabela 2, que indivíduos UTBN expostos à 10 g L^{-1} de glicose em meio WP (100 mL L^{-1}) na ausência do regulador BAP, apresentaram maior promoção de desenvolvimento para o parâmetro altura, atingido aos noventa dias 5,76 centímetros.

Tabela 2 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável altura, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro ($25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

	0,0 μM BAP				1,0 μM BAP			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
WP	5.76aA	4.20aB	4.16aB	4.00aB	4.46aA	4.13aA	2.43bB	2.43aB
WP/2	2.96bA	3.70aA	3.20bA	3.16bA	2.93bA	3.10bA	3.23aA	2.93aA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

	WP				WP/2			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
0 BAP	5.76a	4.20a	4.16a	4.00a	2.96a	3.70a	3.20a	3.16a
1 BAP	4.46b	4.13a	2.43b	2.43b	2.93a	3.10b	3.23a	2.93a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

É observado, que os clones *in vitro* de *U. tomentosa* monitorados durante o processo de micropropagação, em sala de crescimento a 25 ± 2 °C quanto a variável altura, apresentaram bom desempenho na presença ou ausência do regulador BAP.

De acordo com a análise dos dados apresentados na Tabela 3, quando se trata da variável número de brotos, a presença do regulador demonstra resultados superiores independente da concentração dos sais do meio de cultura WP (100 mL L^{-1}) bem como em WP/2 (50 mL L^{-1}).

Em relação a fonte de carbono, a condição utilizando 20 g L⁻¹ de sacarose é melhor na presença de 1,0 mg L⁻¹ de BAP, do que isento de regulador, sendo esta última, estatisticamente inferior.

Tabela 3 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número dos brotos, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

Meio de cultura	0,0 µM BAP		1,0 µM BAP	
WP	1.41bA		1.89aA	
WP/2	1.53bA		2.04aA	

BAP	Sacarose 10g	Sacarose 20g	Glicose 10g	Glicose 20g
0,0 µM	1.45aA	1.38aB	1.56aA	1.50aA
1,0 µM	1.90aA	2.23aA	1.90aA	1.83aA

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. (*) variáveis transformadas para $\sqrt{x} + 0,5$.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

No meio de cultura contendo 1,0 mg L⁻¹ de BAP também é possível utilizar 10 g L⁻¹ de sacarose ou glicose a 10 ou 20 g L⁻¹, tornando viável a seleção de quaisquer dessas fontes de carbono a ser utilizada no preparo do meio de cultivo.

Ao observar os resultados da Tabela 4, é possível afirmar que o meio de cultura estatisticamente superior para a variável número de gemas dos explantes de *U. tomentosa* mantidos a 25 ± 2 °C, é WP suplementado com 10 g L⁻¹ de glicose, estejam eles na presença ou ausência do regulador BAP.

Tabela 4 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de gemas, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro ($25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

	0,0 μM BAP				1,0 μM BAP			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
WP	8.50aA	8.33aA	8.10aA	6.56aB	9.53aA	8.00aB	6.00bC	7.63aB
WP/2	5.03bA	4.66bA	5.56bA	5.43aA	6.90bB	6.10bB	9.23aA	8.33aA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente ($P > 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

	WP				WP/2			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
0 BAP	8.50a	8.33a	8.10a	6.56a	5.03b	4.66a	5.56b	5.43b
1 BAP	9.53a	8.00a	6.00b	7.63a	6.90a	6.10a	9.23a	8.33a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

A fonte de carbono sacarose também pode ser utilizada, uma vez que é estatisticamente equivalente quando comparados os meios de cultivo WP contendo 10 g L^{-1} de sacarose ou glicose isento de regulador de crescimento.

Se o meio de cultura de escolha for o WP/2, para que este se mantenha equivalente aos estatisticamente superiores, será necessário a presença do BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), independentemente da concentração de sacarose (10 ou 20 g L^{-1}).

Ao analisar a tabela 5, conclui-se que a melhor condição para o desenvolvimento de raízes dos clones UTBN cultivados em sala de crescimento

mantida a 25 ± 2 °C é WP/2 (50 mL L⁻¹), suplementado com 20 g L⁻¹ de glicose contendo 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

Tabela 5 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de raízes, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

Meio de cultura	0,0 µM BAP	1,0 µM BAP
WP	3.05aB	2.11bB
WP/2	3.80bA	4.94aA

	Sacarose 10g	Sacarose 20g	Glicose 10g	Glicose 20g
WP	1.63bB	2.51aB	2.86aB	3.33aB
WP/2	3.50cA	4.40bA	4.41bA	5.16aA

BAP	Sacarose 10g	Sacarose 20g	Glicose 10g	Glicose 20g
0,0 µM	2.85bA	4.06aA	3.18bB	3.61aB
1,0 µM	2.28cA	2.85cB	4.10bA	4.88aA

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

Alguns autores que realizaram a micropropagação de *U. tomentosa*, utilizaram no meio de cultura a fonte de carbono sacarose, com 30 g L⁻¹ (Pereira *et al.*, 2008, Venutolo, 2011, Raposo; Teixeira 2011), porém no presente estudo, constatamos que em sala a 25 ± 2 °C utilizada para a multiplicação em escala dos indivíduos UTBN a melhor fonte de carbono foi a glicose (10 g L⁻¹) em meio WP (100 mL L⁻¹), pois nos parâmetros avaliados, determinantes à micropropagação de *Uncaria*, esta condição apresentou-se estatisticamente superior quanto aos parâmetros altura dos explantes, número de brotos e de gemas que são fundamentais para a micropropagação, pois

quanto maior for o número de brotos e gemas, maior será a quantidade de clones obtidos.

O sucesso da micropropagação envolve vários fatores, como a composição do meio de cultura, ambiente de cultivo e genótipo (Balasubramaniam *et al.*, 2024), esses fatores foram alcançados com sucesso nesse modelo experimental, os explantes permaneceram saudáveis nessa condição durante 3 meses. Além disso, não foi necessário a adição do regulador BAP, talvez porque os níveis de hormônio endógeno dos indivíduos UTBN foram suficientes para garantir o desenvolvimento no meio de cultura em que se encontravam, do mesmo modo que foi apontado essa possibilidade no trabalho de Álvarez *et al.* (2024) com a leguminosa *Zuccagnia punctata* mantida *in vitro*.

6.4 Avaliação das fontes de carbono de indivíduos UTBN cultivados em sala a 18 ± 2 °C

Ao analisar a fonte de variação identificada na Tabela 6, constatou-se interação tripla significativa para o parâmetro meio de cultivo juntamente com a fonte de carbono e regulador de crescimento para todas as variáveis ensaiadas com os indivíduos UTBN, cultivados em sala de crescimento a 18 ± 2 °C.

Tabela 6 – Resumo de p valor da análise de variância em esquema fatorial triplo, considerando as variáveis avaliadas para os fatores concentração dos sais de WP, tipo e concentração da fonte de carbono, suplementados ou não com 1 μ M de 6-benzilaminopurina, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 μ mol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

Fonte de Variação Tratamentos	GL	Altura	Número de Brotos	Número de Gemas	Número de Raízes
		Pr>Fc	Pr>Fc	Pr>Fc	Pr>Fc
MEIO DE CULTURA	1	0.8957ns	0.1086ns	0.0279**	0.0000**
FONTE DE CARBONO	3	0.0003**	0.8792ns	0.0073**	0.0000**
REGULADOR	1	0.2430ns	0.0000**	0.0000**	0.8699ns
MEIO*FONTE DE CARBONO	3	0.0000**	0.0064**	0.0006**	0.0025**
MEIO*REGULADOR	1	0.3618ns	0.0024**	0.6257ns	0.0000**
FONTE DE CARBONO*REGULADOR	3	0.0000**	0.0730ns	0.0003**	0.1360ns
MEIO*FONTE DE CARBONO*REGULADOR	3	0.0005**	0.0122**	0.0136**	0.0054**
CV(%)		8,10	18,50	14,74	19.45
Média geral		2,69	1,79	6,16	2.69
GL erro	32				
GL total corrigido	47				

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

* Interação entre os tratamentos; ** Significativo a 5% de probabilidade segundo o teste Scott Knott; CV = Coeficiente de variação; Fc = Valor calculado; GL = Graus de liberdade; ns = não significativo a 5% de probabilidade segundo o teste Scott Knott; Pr = probabilidade; > = maior.

Os meios de cultura avaliados diferiram estatisticamente para as variáveis número de gemas e raízes.

Quando foi avaliado o tipo e concentração da fonte de carbono, todos os parâmetros, exceto o número de brotos, diferem significativamente, assim como a presença ou ausência do regulador BAP em relação ao número de brotos e gemas dos explantes.

A associação entre a concentração dos sais de WP com as fontes de carbono, em todas as variáveis avaliadas, apresentou diferença estatística significativa com $P < 0,05$. Na interação entre regulador e meio de cultura, significância estatística é observada para as variáveis número de brotos e número de raízes. Enquanto a interação entre o regulador e a fonte de carbono, foi significativa para as variáveis altura e número de gemas.

Os valores apresentados na tabela 7, apontam os meios WP suplementado com 20 g L^{-1} de glicose e $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP e WP/2 contendo 10 g L^{-1} de sacarose isento de BAP como as melhores condições para a variável altura dos explantes de *U. tomentosa* submetidos a avaliação experimental, sendo estatisticamente equivalentes.

Tabela 7 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável altura, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro ($25 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

	0,0 μM BAP				1,0 μM BAP			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
WP	2,76aA	2,60aA	2,26bB	2,90aA	3,16aB	3,80aA	1,66bD	2,43aC
WP/2	2,30bB	2,56aB	3,30aA	2,56aB	2,90aA	2,63bA	2,73aA	2,53aA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

	WP				WP/2			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
0 BAP	2,76b	2,60b	2,26a	2,90a	2,30b	2,56a	3,30a	2,56a
1 BAP	3,16a	3,80a	1,66b	2,43b	2,90a	2,63a	2,73b	2,53a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

Os fatores avaliados quanto a variável número de brotos (Tabela 8), mostram que na ausência do BAP é possível ser utilizada todas as variações de sais dos meios de cultura (WP e WP/2), bem como as fontes de carbono (glicose e sacarose), nas diversas contrações ensaiadas, uma vez que estatisticamente todas as combinações não apresentaram diferença estatística.

Tabela 8 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de brotos, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

	0,0 μM BAP				1,0 μM BAP			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
WP	1.20aA	1.76aA	1.90aA	1.66aA	1.80bA	2.20aA	1.16bB	2.03aA
WP/2	1.56aA	1.33aA	1.43aA	1.56aA	2.66aA	2.10aB	2.46aA	1.86aB

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

	WP				WP/2			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
0 BAP	1.20b	1.76a	1.90a	1.66a	1.56b	1.33b	1.43b	1.56a
1 BAP	1.80a	2.20a	1.16b	2.03a	2.66a	2.10a	2.46a	1.86a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

Quanto ao parâmetro número de gemas (Tabela 9), é observado que na ausência do BAP, todas as variações de sais dos meios de cultura, assim como as fontes de carbono nas contrações ensaiadas, são completamente viáveis para cultivar os explantes mantidos a 18 ± 2 °C, pois não apresentaram diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de gemas, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

	0,0 μM BAP				1,0 μM BAP			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
WP	5.56aA	5.46aA	5.56aA	6.10aA	8.16aB	10.0aA	4.03bC	6.83aB
WP/2	5.50aA	4.83aA	5.86aA	4.60aA	6.76aA	6.76bA	6.56aA	6.00aA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

	WP				WP/2			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
0 BAP	5.56b	5.46b	5.56a	6.10a	5.50a	4.83b	5.86a	4.60a
1 BAP	8.16a	10.0a	4.03b	6.83a	6.76a	6.76a	6.56a	6.00a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

Para o cultivo dos indivíduos UTBN mantidos a 18 ± 2 °C quanto ao parâmetro número de raízes, com base na análise estatística apresentada na Tabela 10, todos os tratamentos em meio WP/2 na presença do regulador são estatisticamente significativos.

Tabela 10 - Comparação das médias utilizando Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para a variável número de raízes, analisados em explantes de *U. tomentosa*, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

	0,0 μM BAP				1,0 μM BAP			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
WP	2.66bA	2.90aA	1.00bB	2.76aA	2.33bA	3.03bA	0.00bB	0.76bB
WP/2	3.66aA	3.43aA	2.56aB	2.66aB	3.43aA	4.43aA	3.56aA	3.90aA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

	WP				WP/2			
	Glicose		Sacarose		Glicose		Sacarose	
	10	20	10	20	10	20	10	20
0 BAP	2.66a	2.90a	1.00a	2.76a	3.66a	3.43b	2.56b	2.66b
1 BAP	2.33a	3.03a	0.00b	0.76b	3.43a	4.43a	3.56a	3.90a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott.

BAP = 6-Benzilaminopurina; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

É observado que até o momento, não existe um protocolo de manutenção adequado para *U. tomentosa*. Os resultados desse experimento mostram que foi possível padronizar a melhor condição para manter a espécie em banco de germoplasma a 18 ± 2 °C, utilizando WP/2 (50 mL L⁻¹) suplementado com 10 g L⁻¹ de sacarose, isento de regulador, o qual apresentou superioridade no parâmetro altura dos brotos.

Por se tratar de um protocolo de conservação da espécie que sempre será monitorada, a utilização de metade dos sais de WP e metade da fonte de carbono é favorável, pois implica em menor custo, tornando o protocolo desenvolvido além de reprodutível mais acessível do ponto de vista econômico.

6.5 Avaliação da concentração de fonte de carbono

A avaliação experimental dos genótipos UTBN micropropagados demonstra que foi possível avaliar durante 6 meses, todos os parâmetros propostos nesse trabalho, tendo as análises estatísticas sido realizadas a cada 30 dias.

6.5.1 Avaliação da concentração da fonte de carbono glicose

Os resultados representados na Tabela 11, demonstram que a condição: WP 100 mL L⁻¹ + 10 g L⁻¹ glicose apresentou superioridade para todos os parâmetros avaliados, exceto para os parâmetros número de brotos e raízes. Quanto ao parâmetro número de brotos, todos os tratamentos que receberam fonte de carbono apresentaram resultados estatisticamente equivalentes. No que se refere ao número de raízes, os tratamentos contendo 10, 20 e 40 g L⁻¹ de glicose não diferiram estatisticamente.

Na condição contendo 100 mL L⁻¹ de WP, isenta de glicose, cinco dos nove explantes apresentaram algum nível de desenvolvimento nas condições de manutenção *in vitro*. Os indivíduos sobreviventes alcançaram 1,7 ± 0,4 cm de altura e 3 gemas. Nessa condição não desenvolveram raízes, portanto quando comparado aos outros tratamentos estes explantes demonstraram baixo desempenho embora tenham sobrevivido por 180 dias na ausência de fonte de carbono.

Tabela 11 – Resultado da avaliação experimental no desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* expostos a variação da concentração de glicose, durante 180 dias, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

Tratamentos	Altura (cm)	Número Brotos	Número Gemas	Número Raízes
WP 100 mL L ⁻¹ + 0 g L ⁻¹ glicose	1,7±0,2d	1,0±0,0b	3,3±0,4b	0,0±0,0c
WP 100 mL L ⁻¹ + 10 g L ⁻¹ glicose	3,8±0,6a	1,7±0,8a	7,7±1,9a	4,3±2,9a
WP 100 mL L ⁻¹ + 20 g L ⁻¹ glicose	2,9±0,4b	1,8±0,4a	6,3±0,1b	4,8±1,0a
WP 100 mL L ⁻¹ + 30 g L ⁻¹ glicose	2,1±0,2d	2,0±0,0a	5,2±0,4c	1,8±0,4b
WP 100 mL L ⁻¹ + 40 g L ⁻¹ glicose	2,4±0,3c	1,8±0,5a	5,3±1,4c	4,1±1,2a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

cm = centímetros; mL = mililitro; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

Nota: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Outro aspecto observado nessa análise experimental foi a quantidade de morte dos explantes, determinantes para a escolha do melhor meio de cultivo para manutenção dos clones UTBN. Uma avaliação mensal da taxa de morte foi elaborada (Tabela 12).

Tabela 12 – Taxa de morte no desenvolvimento de explantes expostos a variação da concentração de glicose no período de 180 dias.

Tratamentos	Taxa de morte					
	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
WP 100 mL L ⁻¹ + 0 g L ⁻¹ glicose	33,33%	33,33%	44,44%	44,44%	44,44%	66,66%
WP 100 mL L ⁻¹ + 10 g L ⁻¹ glicose	0%	0%	0%	0%	22,22%	44,44%
WP 100 mL L ⁻¹ + 20 g L ⁻¹ glicose	0%	0%	11,11%	33,33%	66,66%	77,77%
WP 100 mL L ⁻¹ + 30 g L ⁻¹ glicose	0%	0%	0%	44,44%	66,66%	66,66%
WP 100 mL L ⁻¹ + 40 g L ⁻¹ glicose	0%	0%	11,11%	22,22%	66,66%	77,77%

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

mL = mililitro; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

O tratamento contendo 100 mL L⁻¹ de WP suplementado com 10 g L⁻¹ de glicose foi o que promoveu a sobrevivência de todos os explantes por mais tempo, apresentando, no quinto mês, uma taxa de mortalidade de apenas 22,22%. Isso indica que essa condição favorece a manutenção dos explantes por um período prolongado.

Sendo assim, a avaliação da concentração de glicose dos genótipos UTBN mantidos a 25 ± 2 °C analisada ao longo de seis meses, permitiu encontrar o melhor tratamento quanto à altura e ao número de gemas, parâmetros essenciais para a micropropagação da espécie.

Esse resultado confirma que essa é a melhor condição para a micropropagação de *U. tomentosa*, pois foi a mesma indicada no experimento do item 6.3.

6.5.2 Avaliação da concentração da fonte de carbono sacarose

Os resultados representados na Tabela 13, demonstra que a condição: WP 100 mL L⁻¹ + 10 g L⁻¹ sacarose apresentou superioridade para todos os parâmetros avaliados, exceto para o número de brotos. Quanto a esse parâmetro, todos os tratamentos apresentaram resultados estatisticamente equivalentes.

A condição contendo 100 mL L⁻¹ de WP, isenta de sacarose, não foi exitosa, já que um meio de cultivo sem fonte de carbono impossibilita o desenvolvimento de plantas mantidas *in vitro*. O único indivíduo que sobreviveu aos 180 dias (sobrevivência de 11,12%), alcançou apenas 1,2 cm de altura, obteve 4 gemas e não desenvolveu raízes, portanto esse explante demonstrou baixo desempenho com reduzidas chances de sobrevivência para posterior multiplicação.

Tabela 13 – Resultado da avaliação experimental no desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* expostos a variação da concentração de sacarose, durante 180 dias, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro (25 µmol/m²/s) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

Tratamentos	Altura (cm)	Número Brotos	Número Gemas	Número Raízes
WP 100 mL L ⁻¹ + 0 g L ⁻¹ sacarose	1,2±0,0c	1,0±0,0a	4,0±0,0c	0,0±0,0c
WP 100 mL L ⁻¹ + 10 g L ⁻¹ sacarose	3,8±0,8a	1,3±0,3a	6,0±1,9a	8,9±2,7a
WP 100 mL L ⁻¹ + 20 g L ⁻¹ sacarose	2,2±0,2b	1,0±0,0a	5,0±0,5b	2,9±1,5b
WP 100 mL L ⁻¹ + 30 g L ⁻¹ sacarose	1,0±0,0c	1,0±0,0a	2,0±0,0d	0,0±0,0c
WP 100 mL L ⁻¹ + 40 g L ⁻¹ sacarose	1,2±0,0c	1,0±0,0a	3,0±0,0d	0,0±0,0c

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

cm = centímetros; mL = mililitro; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

Nota: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Outro aspecto observado nessa análise experimental foi a quantidade de morte dos explantes, determinantes para a escolha do melhor meio de cultivo para manutenção dos clones UTBN. Uma avaliação mensal da taxa de morte foi elaborada (Tabela 14).

Tabela 14 – Taxa de morte no desenvolvimento de explantes expostos a variação da concentração de sacarose no período de 180 dias.

Tratamentos	Taxa de morte					
	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
WP 100 mL L ⁻¹ + 0 g L ⁻¹ sacarose	88,88%	88,88%	88,88%	88,88%	88,88%	88,88%
WP 100 mL L ⁻¹ + 10 g L ⁻¹ sacarose	55,55%	55,55%	55,55%	55,55%	55,55%	55,55%
WP 100 mL L ⁻¹ + 20 g L ⁻¹ sacarose	22,22%	22,22%	22,22%	33,33%	55,55%	55,55%
WP 100 mL L ⁻¹ + 30 g L ⁻¹ sacarose	0%	0%	0%	33,33%	88,88%	88,88%
WP 100 mL L ⁻¹ + 40 g L ⁻¹ sacarose	11,11%	22,22%	22,22%	33,33%	77,77%	88,88%

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

mL = mililitro; WP = Meio de cultura Wood Plant de Lloyd & McCown, 1981.

No primeiro mês de experimento a maior taxa de morte evidenciada foi no tratamento isento de sacarose, e se manteve ao longo dos seis meses de experimento.

Todos os nove clones submetidos a 100 mL L⁻¹ de WP suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, permaneceram vivos durante 3 meses, apresentando valores superiores na altura, no número de brotos e de gemas, porém a partir do quarto mês a taxa de morte aumenta consideravelmente, alcançando a mesma taxa morte do meio de cultura contendo 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose.

Após 5 meses de cultivo as condições contendo 100 mL L⁻¹ de WP e 10 ou 20 g L⁻¹ de sacarose garantiu a sobrevivência de 44,44% dos explantes, que foi mantida até o sexto mês de experimento.

6.6 Avaliação de plantas UTBN *in vitro* imersas em óleo mineral

A realização do experimento na análise dos indivíduos UTBN em meio de cultura contendo ou não óleo mineral, apresentou resultados significativos que ajudaram definir as características dos explantes utilizados na manutenção em banco de germoplasma de *U. tomentosa*.

Diante dos resultados apresentados (Tabela 15), os explantes foram capazes de crescerem e se adaptarem ao meio de cultura contendo 100 mL L⁻¹ de sais WP suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose em pH 6,00, com a adição de 5 ou 15 mL de óleo mineral (Figura 6).

Tabela 15 - Avaliação do desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* imersos em óleo mineral, durante 180 dias, cultivados em sala de crescimento mantida a 18 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h claro ($25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) fornecido por lâmpadas LED (*light-emitting diode*).

Tratamentos	Altura (cm)	Número de Brotos	Número de Gemas	Número de Raízes
1 Controle – segmento nodal sem folhas	3,4±0,9b	1,7±0,7d	8,2±3,1c	2,7±2,1b
2 Segmento nodal sem folhas, exposto a 5 mL de óleo mineral	2,4±1,0c	3,1±2,1c	8,8±3,2c	5,9±4,5a
3 Segmento nodal sem folhas, exposto a 15 mL de óleo mineral	2,8±0,4c	4,9±1,4b	11,8±3,1b	5,9±2,0a
4 Controle – segmento nodal contendo folhas seccionadas	4,4±0,7a	1,8±0,4d	8,8±2,3c	7,1±1,7a
5 Segmento nodal contendo folhas seccionadas, exposto a 5 mL de óleo mineral	4,2±0,0a	1,0±0,0d	9,0±0,0c	6,0±0,0a
6 Segmento nodal contendo folhas seccionadas, exposto a 15 mL de óleo mineral	3,0±0,0b	7,8±0,8a	15,8±1,5a	5,1±0,3a

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

nº = número; mL = mililitro

Nota: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

O tratamento no qual os segmentos nodais que foram introduzidos inicialmente com um par de folhas seccionadas imerso em 15 mL de óleo mineral (Tratamento 6), foi o que promoveu melhor desempenho dos explantes em relação ao número de brotos e gemas durante os 180 dias de experimento, demonstrando que a formação de novos brotos e gemas foi significativamente superior à dos demais tratamentos. Essa condição pode ser indicada para o aprimoramento do protocolo de manutenção no armazenamento de curto prazo da espécie *in vitro*.

O número de raízes foi estatisticamente semelhante para todos os tratamentos, exceto o controle contendo o segmento nodal sem tecido foliar e isento de óleo que apresentou desempenho inferior aos 5 tratamentos (Tabela 15).

Quanto aos tratamentos controle, aquele contendo o segmento nodal inserido com o par de folhas parcialmente seccionadas (Tratamento 4) demonstrou resultados superiores em relação à altura dos explantes e ao número de raízes, daqueles cujo o tecido foliar foi completamente removido (Tratamento 1). Para os parâmetros número de brotos e gemas, não foi constatada diferença estatística entre os segmentos controle na presença ou ausência do par de folhas.

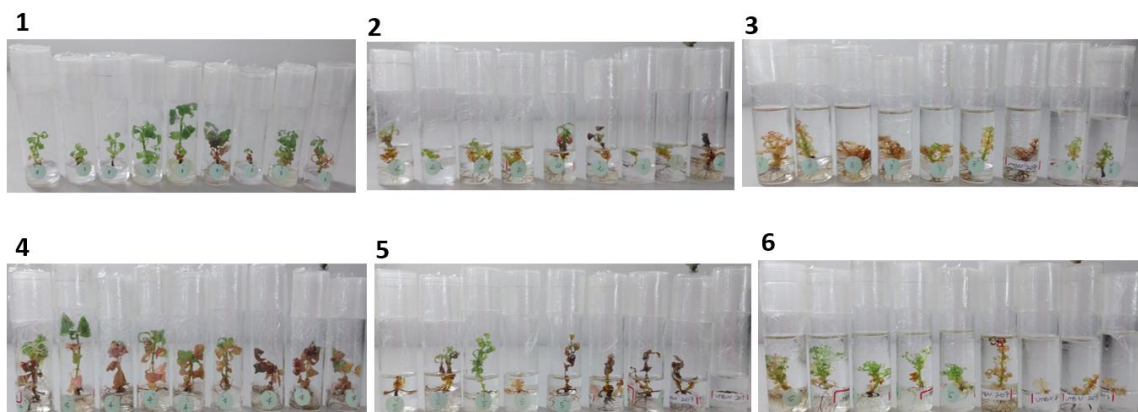


Figura 6 - Registro após 180 dias de experimento de todos os tratamentos, com e sem a presença do óleo mineral

Culturas de células e tecidos de seis espécies de plantas cultivadas a 25 ± 2 °C na presença de 10 ou 15 mL de óleo mineral (Mathur *et al.*, 1991) mostraram que a taxa de crescimento e morfogênese foi reduzida em comparação com os controles. Esses autores relatam que isso prolonga o período de subcultura e resulta na economia de material e tempo de repique.

Neste trabalho, os tratamentos nos quais os explantes avaliados foram expostos a 15 mL de óleo (Tratamento 3 e 6) apresentaram resultados inferiores quanto ao parâmetro altura, quando comparados aos tratamentos controles correspondentes (Tratamentos 1 e 4), respectivamente. Esse resultado corrobora também com os estudos obtidos por Lacerda *et al.* (2021) que constata a sobreposição em óleo mineral dos explantes de *Lippia flifolia* conservados por 360 dias como responsável por diminuir significativamente sua altura em todas as temperaturas avaliadas (15, 20, 25 °C). No trabalho de Lacerda, independentemente do volume de óleo utilizado, a altura dos explantes expostos ao óleo mineral foi inferior ao controle, o que com exceção do Tratamento 5 também aconteceu aos explantes de *U. tomentosa* avaliados durante este

ensaio. Os autores sugeriram que a metodologia de conservação empregada, para *L. flifolia*, fosse realizada por um período não superior a 180 dias, assim como a partir dos experimentos realizados recomendamos que esse período seja o teto máximo de exposição da espécie *U. tomentosa*.

Segundo Lacerda *et al.* (2021) análises anatômicas e histoquímicas são essenciais para identificar possíveis anormalidades decorrentes das condições do microambiente *in vitro*, que nem sempre são identificadas visualmente, portanto, no trabalho desses autores foram realizadas essas análises, mas de acordo com os resultados, os tratamentos na presença de óleo mineral não apresentaram anormalidades morfoanatômicas, apenas alterações adaptativas às condições impostas, em contraposição, durante o desenvolvimento dos clones de *U. tomentosa* em contato direto com o óleo (Tratamento 3) foi visualmente observado que alguns deles apresentaram alteração morfológica, no qual os caules tornaram-se visivelmente mais espessos, a partir do 5 mês, provavelmente por conta do estresse da planta, sendo inviáveis para a continuidade do estudo, pois essas anormalidades podem diminuir a aplicabilidade e eficiência da técnica de conservação. O monitoramento através dessas observações é importante, pois auxilia a compreender os efeitos das condições *in vitro* propostas para a espécie.

A análise de morte dos explantes foi realizada (Tabela 16) para auxiliar a descartar os tratamentos que não atingiram aos objetivos do experimento.

Tabela 16 – Taxa de morte no desenvolvimento de explantes de *U. tomentosa* imersos em óleo mineral no período de 180 dias.

Tratamentos	Taxa de morte					
	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
1 Controle – segmento nodal sem folhas	0%	0%	0%	0%	11,11%	22,22%
2 Segmento nodal sem folhas, exposto a 5mL de óleo mineral	0%	0%	0%	0%	11,11%	22,22%
3 Segmento nodal sem folhas, exposto a 15mL de óleo mineral	0%	0%	0%	0%	22,22%	44,44%
4 Controle – segmento nodal contendo folhas seccionadas	0%	0%	0%	44,44%	44,44%	44,44%
5 Segmento nodal contendo folhas seccionadas, exposto a 5mL de óleo mineral	0%	0%	22,22%	22,22%	55,55%	88,88%
6 Segmento nodal contendo folhas seccionadas, exposto a 15mL de óleo mineral	0%	0%	11,11%	11,11%	33,33%	55,55%

Fonte: Arquivo pessoal, 2024.
mL = mililitro.

Os nove indivíduos UTBN de cada tratamento permaneceram vivos durante 2 meses, semelhante ao trabalho de Sharma *et al.* (2012) mais de 90% das culturas com óleo mineral sobreviveram até esse mesmo período em todos os tratamentos analisados no estudo com a espécie *Bacopa monnieri*.

Os segmentos inseridos sem o tecido foliar (Tratamentos 1, 2 e 3) mantêm os clones vivos por mais tempo e tem menor taxa de morte quando comparado aos outros tratamentos contendo o segmento nodal inserido com um par de folhas seccionadas expostos ou não ao óleo mineral, sendo a remoção completa do tecido foliar fator que influencia positivamente na sobrevivência dos explantes.

Com base nesse experimento preliminar, ainda há necessidade de aprimoramento dessa metodologia para os indivíduos UTBN, como por exemplo, certificar se há redução na produção de metabólitos secundários, ou se o mesmo é preservado no meio de cultivo contendo óleo mineral.

É recomendado também avaliação da estabilidade genética por meio de métodos moleculares e bioquímicos para validar a estabilidade genética do germoplasma conservado usando óleo mineral (Sharma *et al.*, 2012).

A realização do subcultivo nas condições ensaiadas em determinado intervalo de tempo, é necessária para avaliar a capacidade de regeneração de *U. tomentosa* após o armazenamento em sala de crescimento a 18 ± 2 °C exposto ao óleo, possibilitando sua implementação em etapas futuras, pois para armazenamento de curto ou médio prazo, o objetivo é reduzir o crescimento e aumentar os intervalos entre subculturas (Hassan, 2004).

Sabendo que os órgãos vegetativos das plantas que são cultivadas *in vitro* têm tecidos e estruturas pouco diferenciados em comparação com as plantas que são cultivadas em uma estufa, é importante destacar que a eficácia de protocolos de conservação requer uma transição bem sucedida de um ambiente *in vitro* para um ambiente *ex vitro*, ao tornar possível essa transição, ela servirá para complementar ainda mais o processo de conservação da espécie (Peixoto *et al.*, 2017).

6.7 Avaliação da atividade funcional de fagócitos e efeito anti-inflamatório dos extratos de *Uncaria tomentosa* *in vitro*

6.7.1 Viabilidade celular

Os extratos, das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas, provenientes de dois genótipos (UTBN207 e UTBN233) e um extrato obtido da cultura de raízes estabelecidas a partir do acesso UTBN233, foram avaliados.

A viabilidade das células mononucleares humanas tratadas com os extratos das partes aéreas e raízes de *U. tomentosa* dos genótipos UTBN207 e UTBN233, foi determinada, e apresentaram diferenças significativas de acordo com a concentração dos extratos em solução: 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das raízes de plantas micropropagadas UTBN233, nas condições deste ensaio, embora tenha apresentado diferença estatística entre as concentrações analisadas (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), manteve a viabilidade celular superior a 80% (Figura 7).

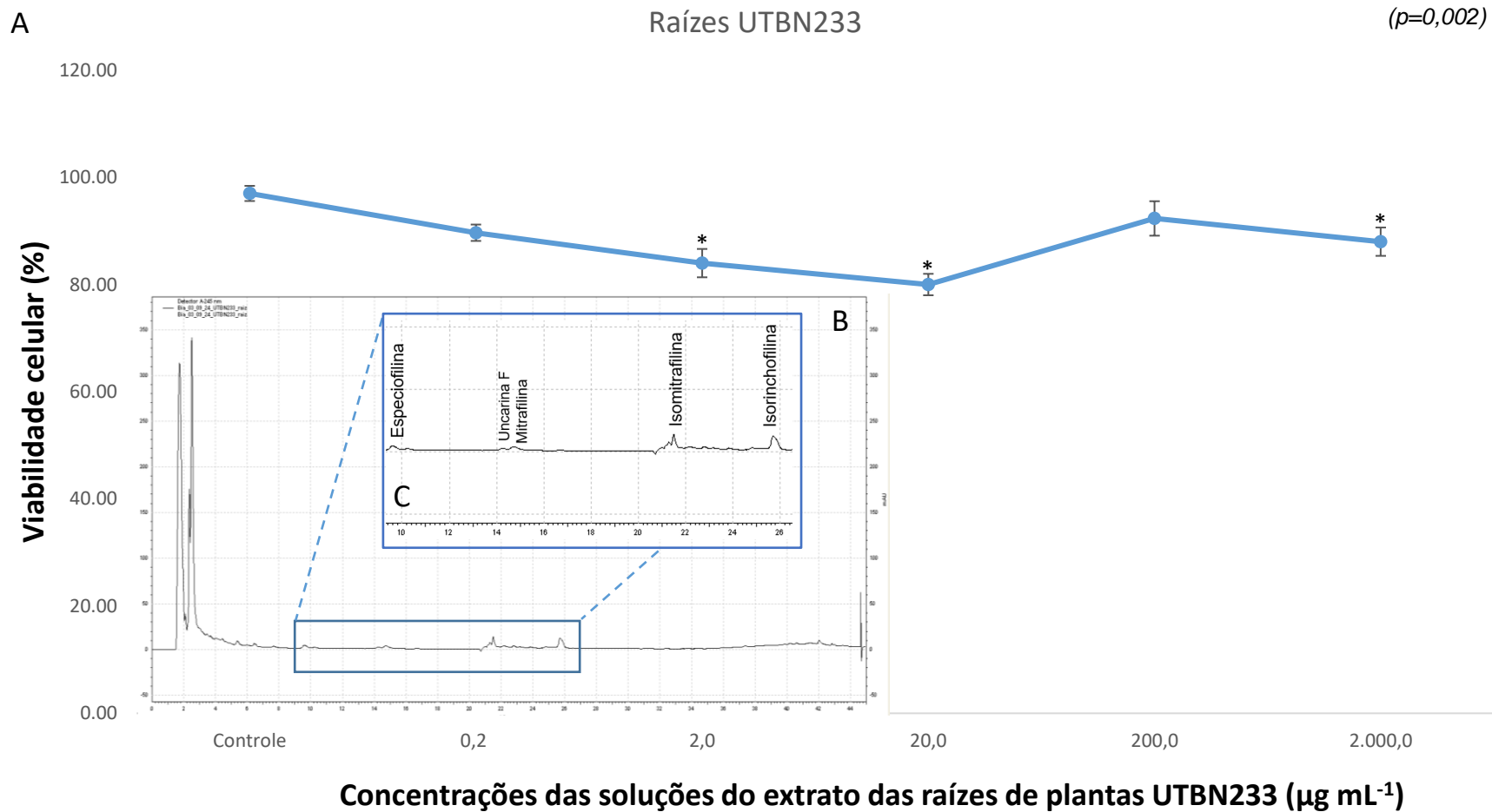


Figura 7 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das raízes de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233; B) Cromatograma do extrato de raízes de plantas UTBN233 a 245 nm; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina Tr=10, uncarina F Tr=14, mitrafilina Tr=15, isomitrafilina Tr=22, isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção.

O extrato hidroalcoólico das raízes de plantas UTBN207 representada na figura 8, mostrou viabilidade celular superior a 83% nas três primeiras concentrações ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Enquanto, nas concentrações $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a viabilidade celular decaiu consideravelmente, demonstrando a citotoxicidade do extrato dessas raízes UTBN207, nessas condições experimentais.

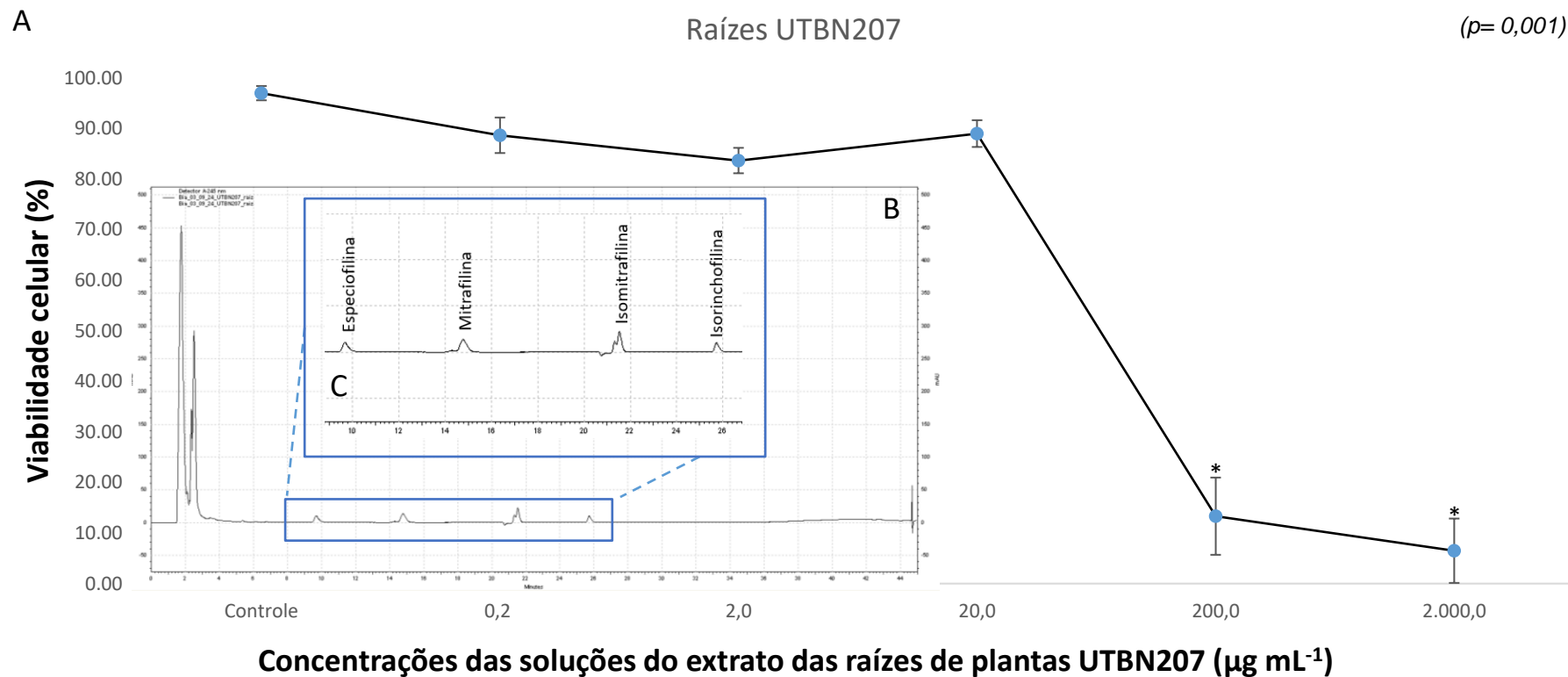


Figura 8 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das raízes de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo UTBN207; B) Cromatograma do extrato de raízes de plantas UTBN207 a 245 μm ; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina $\text{Tr}=10$, mitrafilina $\text{Tr}=15$, isomitrafilina $\text{Tr}=22$, isorinchofilina $\text{Tr}=26$. Tr = Tempo de retenção.

De acordo com o gráfico da figura 9, o extrato hidroalcoólico de raízes obtidas da cultura raízes do genótipo UTBN233 apresentou citotoxicidade nas concentrações de 200 e 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tornando inviável a utilização dessas concentrações em etapas posteriores.

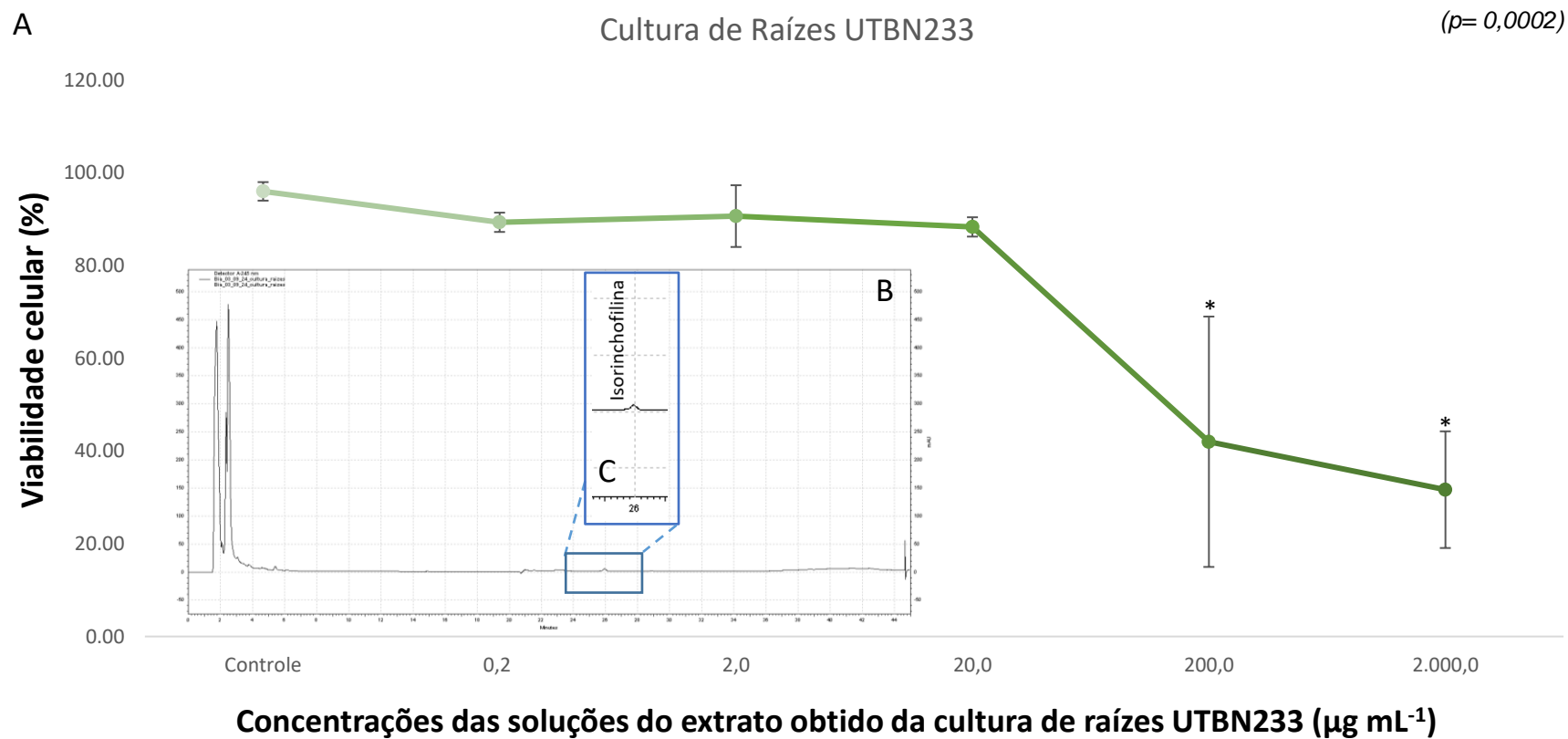


Figura 9 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico obtido de raízes provenientes da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233; B) Cromatograma do extrato de raízes da cultura UTBN233 a 245 nm; C) Ampliação do tempo de retenção do composto isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção.

De acordo com os dados apresentados na figura 10, a viabilidade celular observada do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de UTBN233 apresenta percentual entre 84 e 92% de células vivas.

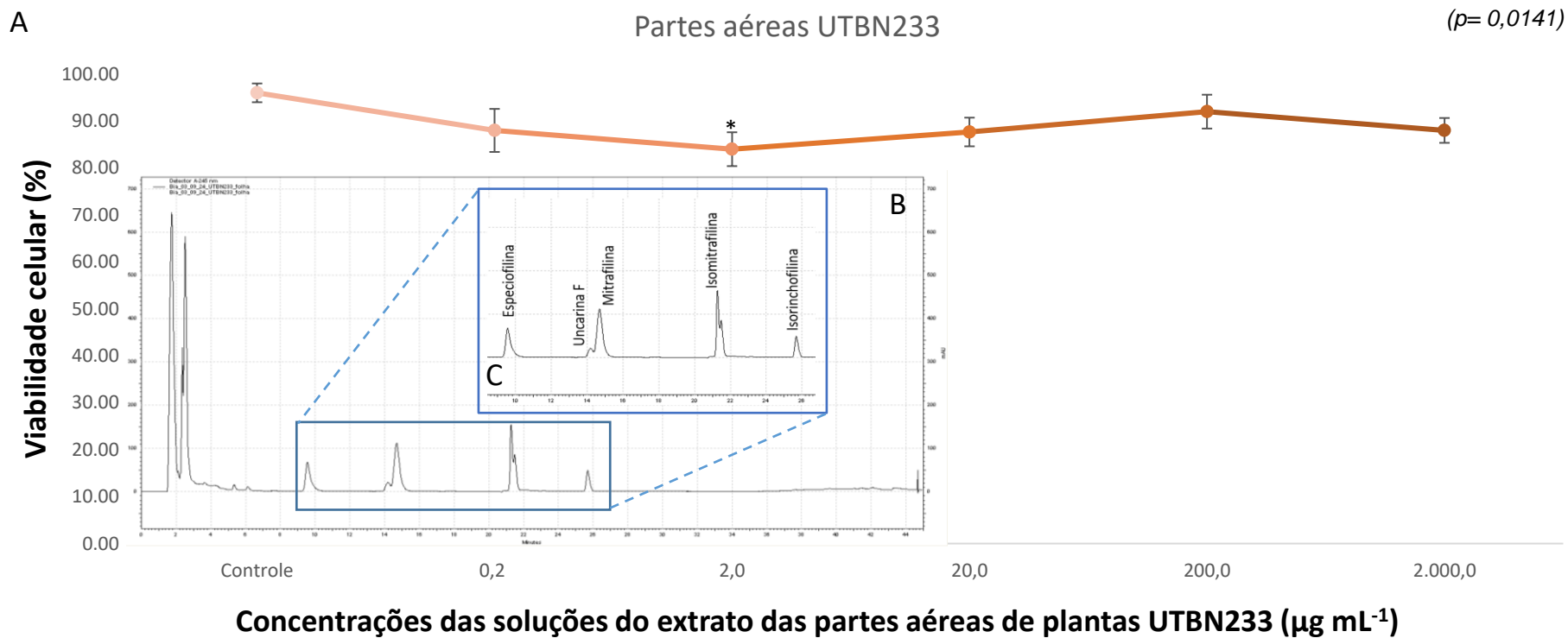


Figura 10 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233; B) Cromatograma do extrato das partes aéreas de plantas UTBN233 a 245 nm; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina Tr=10, uncarina F Tr=14, mitrafilina Tr=15, isomitrafilina Tr=22, isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção.

Os resultados obtidos, apresentados no gráfico da figura 11 foram analisados, e constatou-se que a viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de UTBN207 variou de 82% a 90%, de acordo com as concentrações testadas.

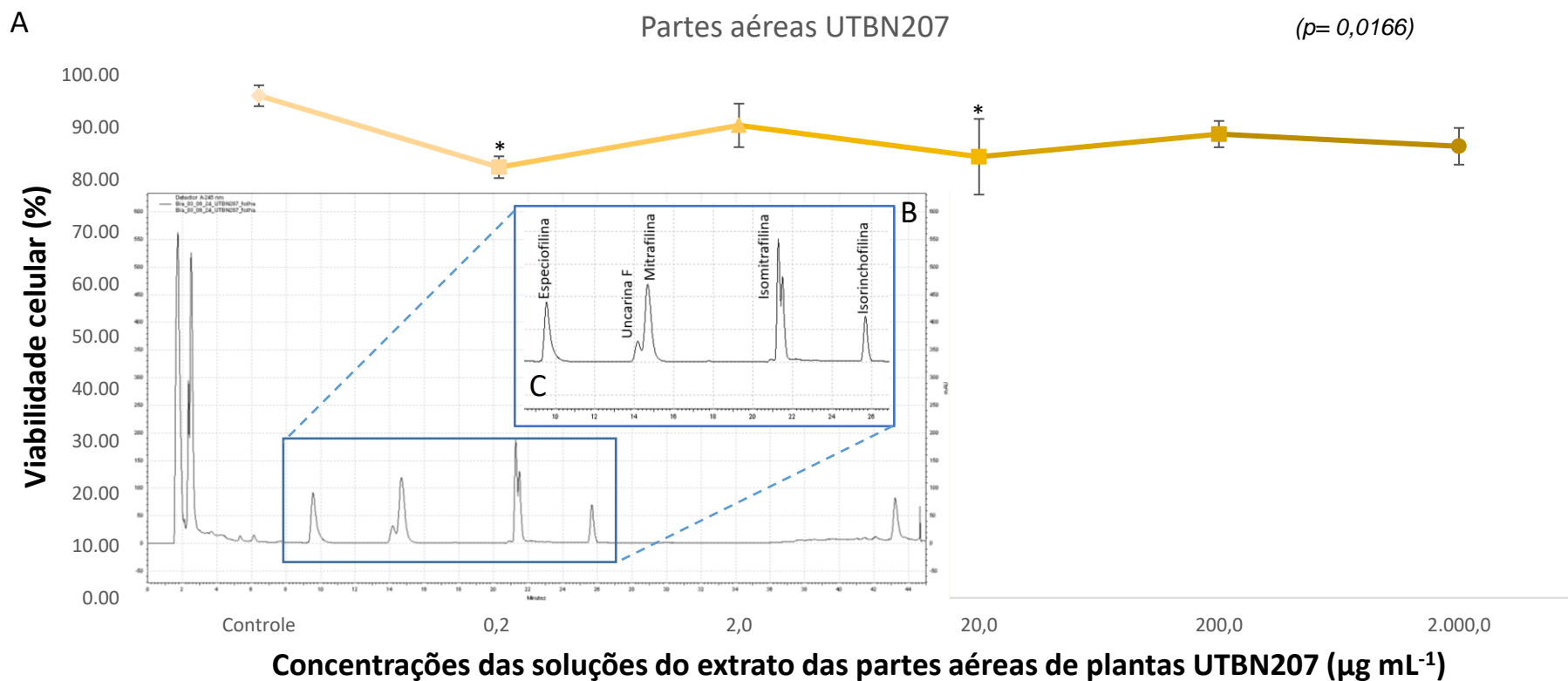


Figura 11 - A) Gráfico de linha da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, genótipo UTBN207; B) Cromatograma do extrato das partes aéreas de plantas UTBN207 a 245 nm; C) Ampliação do tempo de retenção dos compostos especiofilina Tr=10, uncarina F Tr=14, mitrafilina Tr=15, isomitrafilina Tr=22, isorinchofilina Tr=26. Tr = Tempo de retenção.

Nas figuras 12 e 13, foi representado os dados da viabilidade dos três extratos hidroalcoólico, obtidos a partir do indivíduo UTBN233, nas concentrações de 0,2 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados demonstram que não foi constatada nenhuma diferença estatística entre extratos provenientes das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas, tão pouco de raízes obtidas via cultura de raízes de *U. tomentosa*.

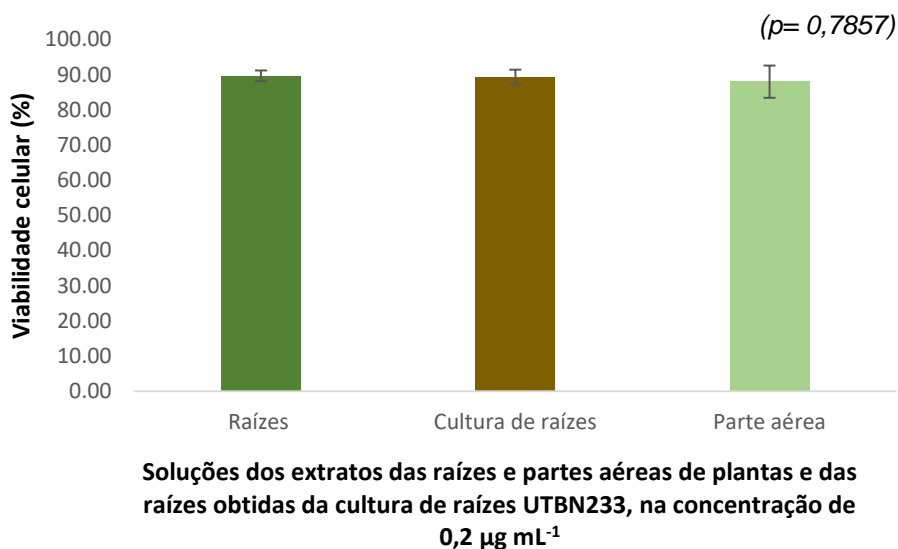


Figura 12 - Gráfico de colunas da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos, na concentração de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e de raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo, UTBN233.

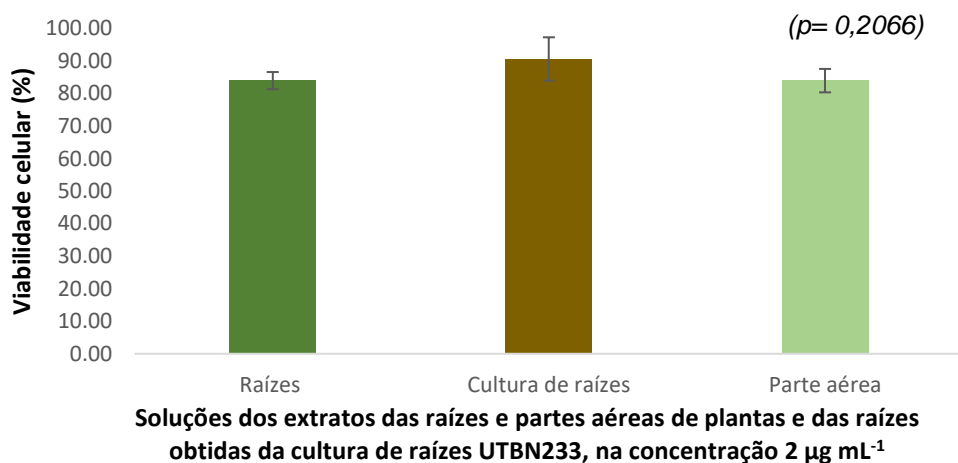


Figura 13 - Gráfico de colunas da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 2 µg mL⁻¹ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233.

É possível observar, pelos resultados expressos na figura 14, que na concentração de 20 µg mL⁻¹, os extratos das raízes de plantas micropropagadas diminuíram a viabilidade celular, de monócitos humanos, quando comparados aos extratos de raízes obtidas da cultura de raízes e das partes aéreas UTBN233, em mesma concentração.

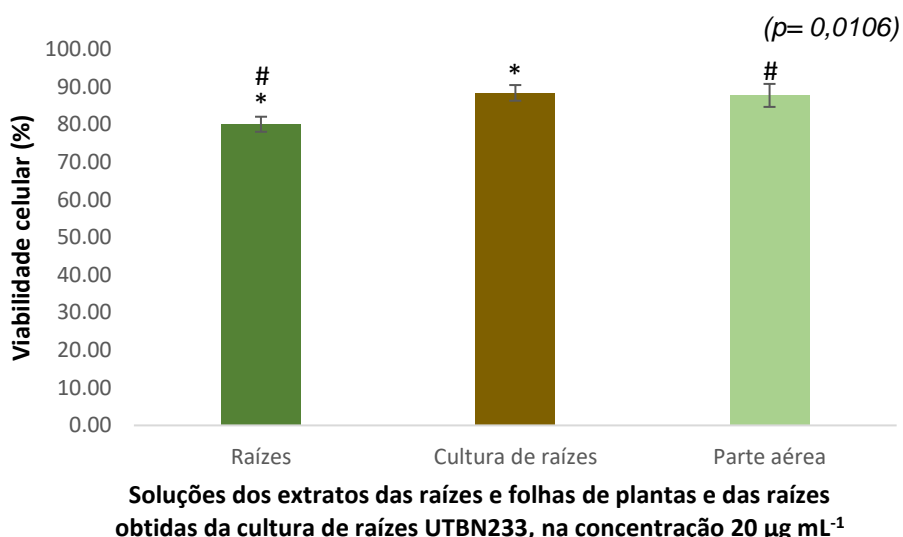


Figura 14 - Gráfico de colunas da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 20 µg mL⁻¹ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233.

A figura 15, indica que o extrato hidroalcoólico das raízes e das partes aéreas de plantas micropropagadas mantém viabilidade celular superior à dos extratos provenientes de raízes obtidas da cultura de raízes UTBN233, a qual mostrou-se citotóxica na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nas condições do ensaio realizado.

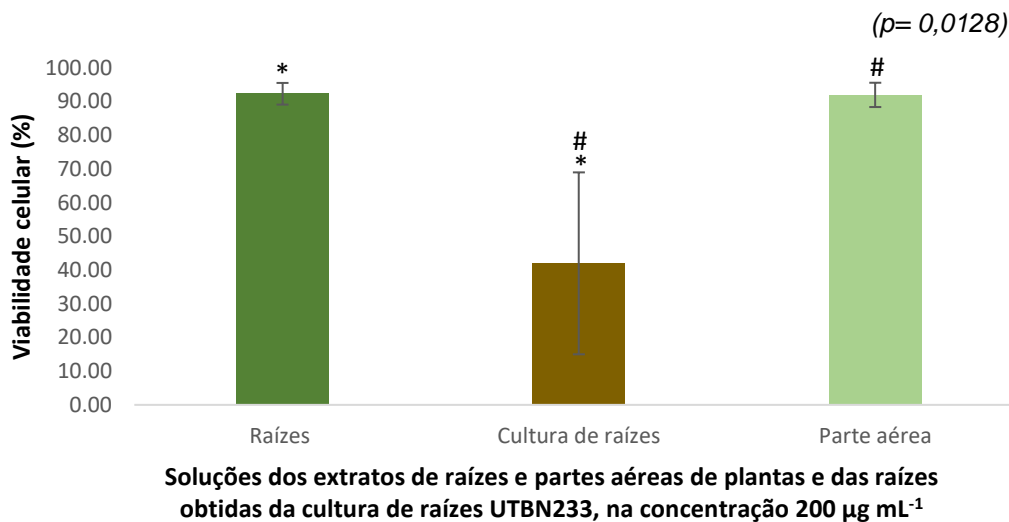


Figura 15 - Gráfico de coluna da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233.

Na figura 16, a viabilidade celular apresentada frente aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e de raízes obtidas da cultura de raízes UTBN233, resulta em diferenças significativas, onde há quantidade superior de células viáveis expostas aos extratos de raízes e partes aéreas de plantas da *U. tomentosa* quando comparados as raízes obtidas da cultura de raízes.

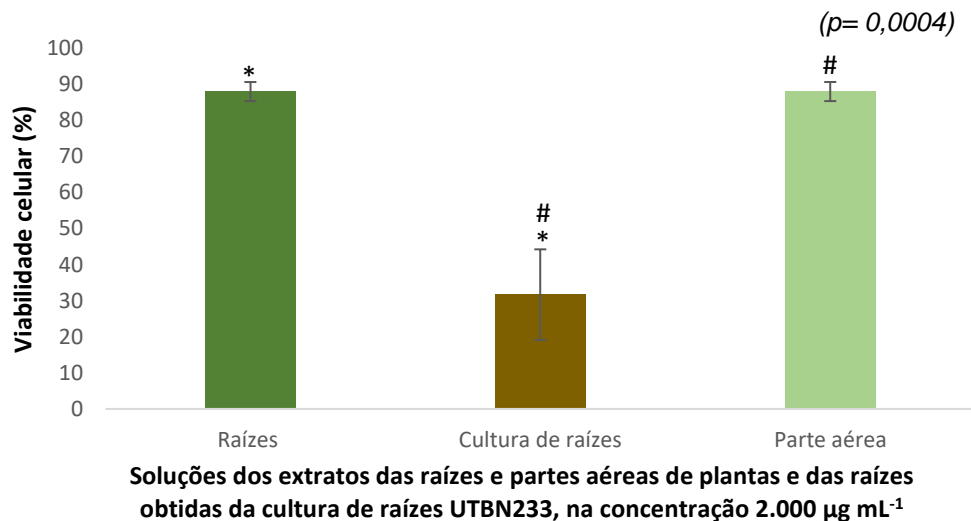


Figura 16 - Gráfico de coluna da viabilidade celular de células de monócitos humanos, expostas por 30 minutos aos extratos hidroalcoólicos na concentração de 2.000 µg mL⁻¹ das raízes e partes aéreas de plantas micropropagadas e das raízes obtidas da cultura de raízes de *U. tomentosa*, genótipo UTBN233.

Ao observar todos os resultados analisados, constata-se que as células mononucleares expostas aos extratos do genótipo UTBN233 permaneceram viáveis nas concentrações de 0,2, 2 e 20 µg mL⁻¹, com viabilidade celular superior a 80%.

Quanto aos extratos obtidos de plantas micropropagadas na concentração de 200 µg mL⁻¹ a viabilidade foi superior a 92%, essa concentração também foi viável no trabalho de Brito *et al.* (2023) que utilizou o extrato hidroalcoólico das cascas de *U. tomentosa*. Em um outro estudo envolvendo o efeito do extrato aquoso da casca de *U. tomentosa* no qual foi avaliada a viabilidade de mioblastos C2C12 incubados por 24 horas, os resultados demonstraram viabilidade celular na concentração de 250 µg mL⁻¹, que foi a menor concentração capaz de promover aumento da viabilidade celular dessas células (Marchi *et al.*, 2023).

A citotoxicidade apresentada no extrato de raízes UTBN233 provenientes da cultura de raízes foi determinada nas concentrações de 200 e 2.000 µg mL⁻¹, essas concentrações também foram citotóxicas para o extrato das raízes de plantas UTBN207. A presença de AOP é observada no perfil cromatográfico de ambos, indicando que a citotoxicidade demonstrada não está relacionada a estes compostos.

6.8 Avaliação da fagocitose e atividade microbicida dos fagócitos

O ensaio da fagocitose realizado na presença da bactéria EPEC que interagiu com as células mononucleares humanas estimuladas com extratos das raízes seccionadas de plantas e de raízes provenientes da cultura de raízes UTBN233, nas diversas concentrações ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi avaliado.

Foi observado na Figura 17, que nas concentrações utilizadas para cada extrato avaliado, somente a concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou diferença estatística entre os extratos. O índice de fagocitose em raízes de plantas é mais elevado quando comparado as raízes advindas da cultura de raízes nessa concentração.

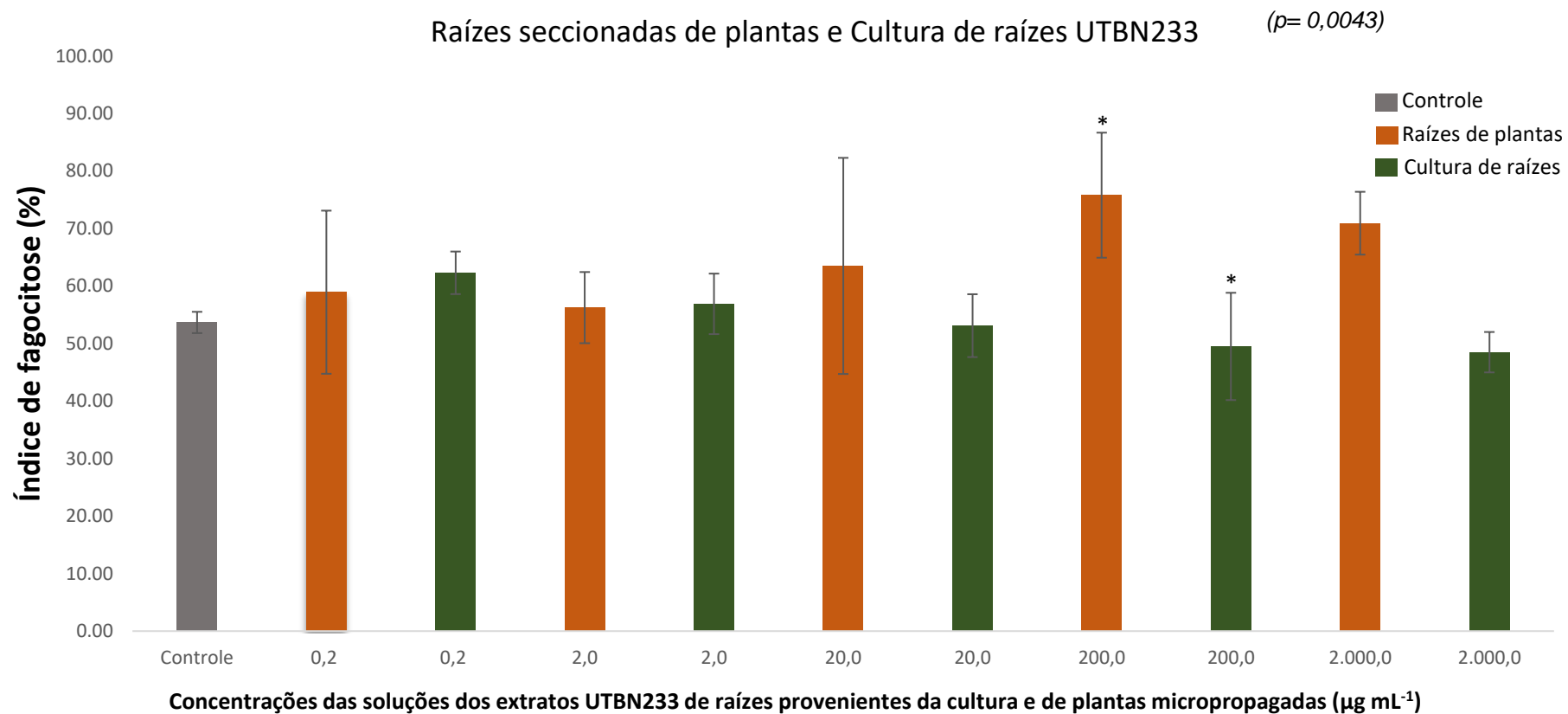


Figura 17 - Gráfico de coluna do índice de fagocitose realizado em células de monócitos humanos, expostas a EPEC e aos extratos nas concentrações ensaiadas do extrato das raízes de *U. tomentosa* proveniente da cultura de raízes e de plantas micropropagadas do genótipo UTBN233.

O extrato das raízes de plantas se destaca na atividade microbicida, como mostrado no resultado representado na Figura 18. As células MN estimuladas por esse extrato são capazes de fagocitar e eliminar as bactérias mais do que quando essas células são estimuladas com extratos das raízes advindas da cultura UTBN233, nas concentrações de 20 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

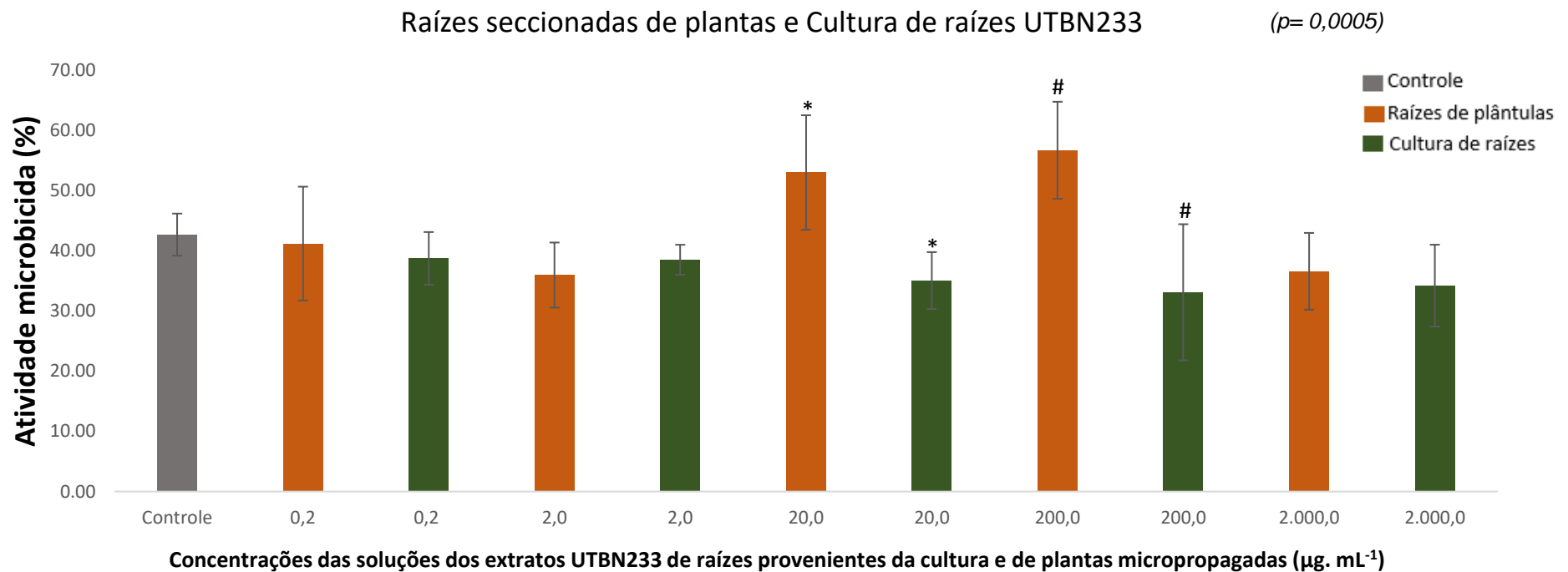


Figura 18 - Gráfico de coluna da atividade microbicida realizado em células de monócitos humanos, expostas a EPEC e aos extratos nas concentrações ensaiadas do extrato de raízes de *U. tomentosa* proveniente da cultura de raízes e de plantas micropropagadas do genótipo UTBN233.

Com base nos dados analisados, o extrato que apresentou resultados significativos quanto ao índice de fagocitose e a atividade microbicida foi o de raízes seccionadas de plantas dos indivíduos UTBN233, com maior percentual do que raízes obtidas da cultura de raízes desse mesmo genótipo, na concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir desses resultados, foi selecionada essa concentração para realizar a dosagem de citocinas, tendo sido avaliadas para todos os extratos obtidos durante a realização deste trabalho.

6.9 Quantificação das citocinas por citometria de fluxo

As citocinas presentes no sobrenadante da cultura celular armazenado durante a realização do ensaio da fagocitose foi analisada diante de todos os extratos utilizados na concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os resultados mostraram diferença estatística na expressão das citocinas envolvidas na atividade anti-inflamatória e pró inflamatória.

Foi observado na Figura 19, aumento na expressão de IL-4 no extrato hidroalcolóico de partes aéreas de plantas micropropagadas do genótipo UTBN233 na concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Um extrato aquoso-etanólico da casca do caule de *U. tomentosa* no trabalho de Domingues *et al.* (2011) em camundongos BALB/c saudáveis também demonstrou aumento de IL-4, porém na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

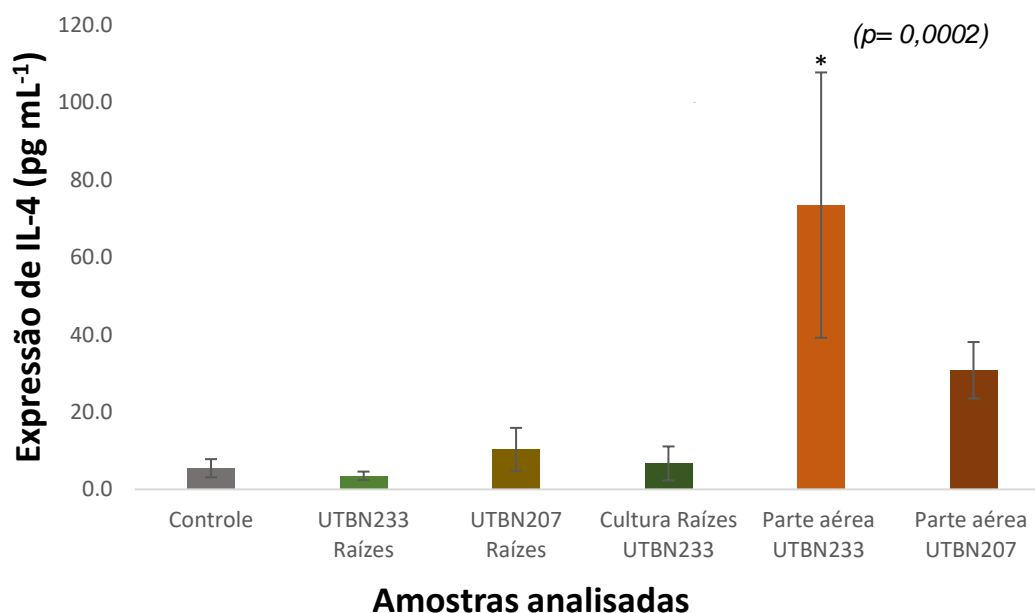


Figura 19 - Gráfico de coluna da expressão de IL-4 (pg mL⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL⁻¹.

O extrato hidroalcólico de partes aéreas UTBN207 de plantas micropropagadas representado no gráfico da Figura 20, induziu a liberação de IL-6 em monócito humano estimulado por EPEC.

O aumento na produção de IL-6 também foi relatado no trabalho de Núñez *et al.* (2015) que avaliou o extrato hidroalcólico de *U. tomentosa* em células mononucleares do sangue periférico humano, testado em pacientes com câncer de mama em estágio II e mulheres saudáveis.

A elevada expressão da IL-6 em monócitos humanos expostos ao extrato analisado, foi semelhante aos resultados apresentados por Azevedo *et al.* (2018) que utilizaram macrófagos estimulados por LPS e constataram aumento significativo dessa citocina, a partir da exposição dessas células ao extrato aquoso das cascas de *U. tomentosa* a 300 µg mL⁻¹ advindo de coleta realizada em uma fazenda no município de Bannach-PA, sendo esta a mesma origem dos indivíduos, introduzidos e mantidos *in vitro*, avaliados neste trabalho.

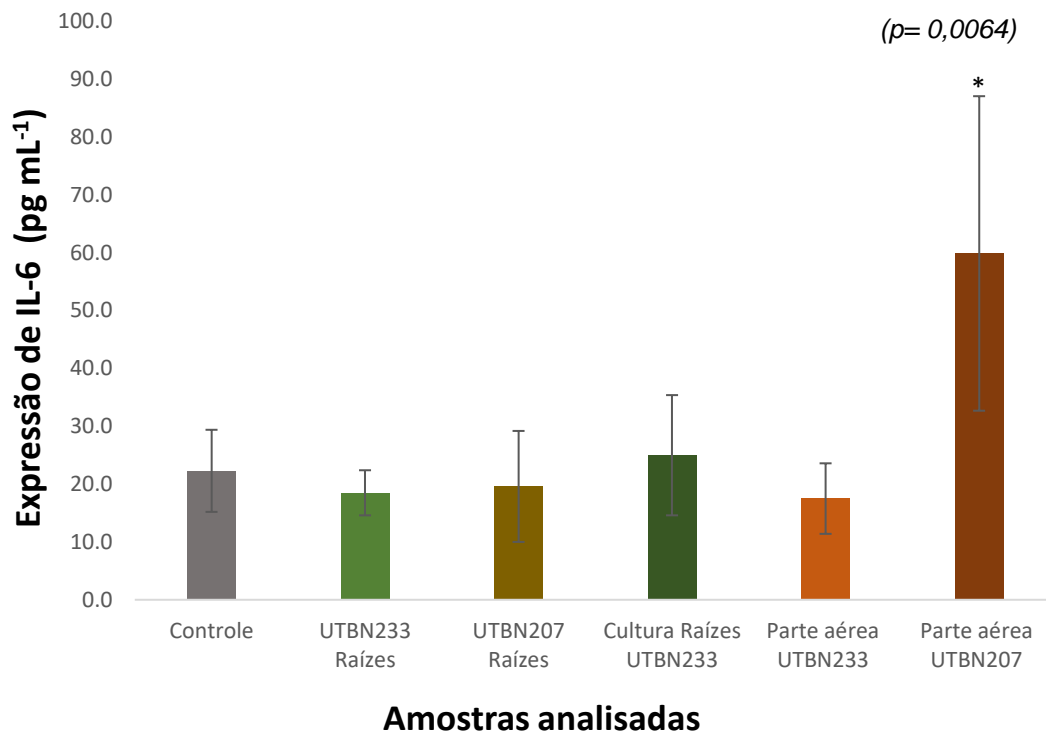


Figura 20 - Gráfico de colunas da expressão de IL-6 (pg mL⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL⁻¹.

A dosagem da IL-17A, IL-2, IL-10, TNF-α e IFN-γ foi realizada para todos os extratos na concentração de 20 µg mL⁻¹. Ao analisar a expressão dessas citocinas (Figura 21 a 25), não foi observada diferença estatística na resposta das células MN humanas quando expostas aos diferentes extratos avaliados.

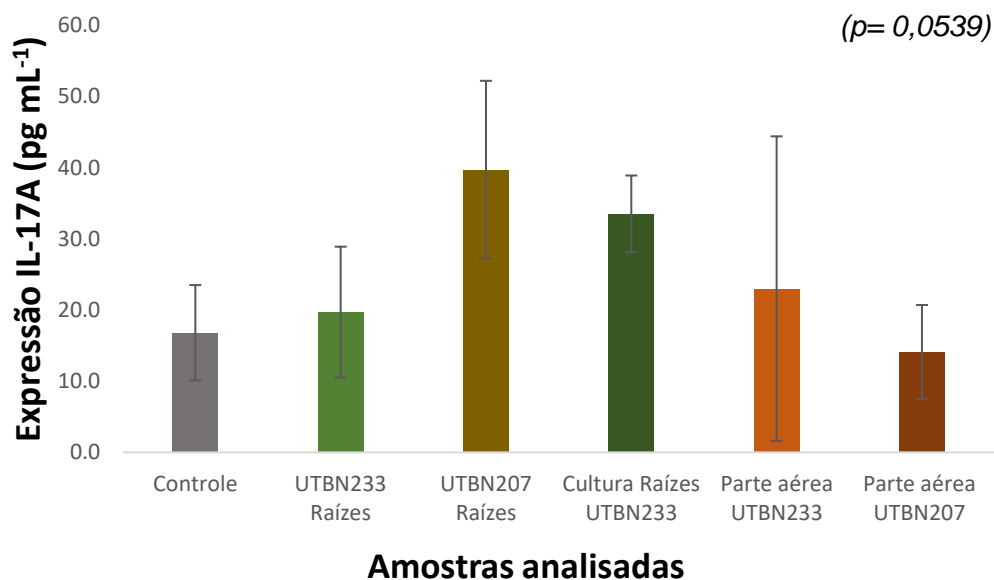


Figura 21 - Gráfico de colunas da expressão de IL-17A (pg mL⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL⁻¹.

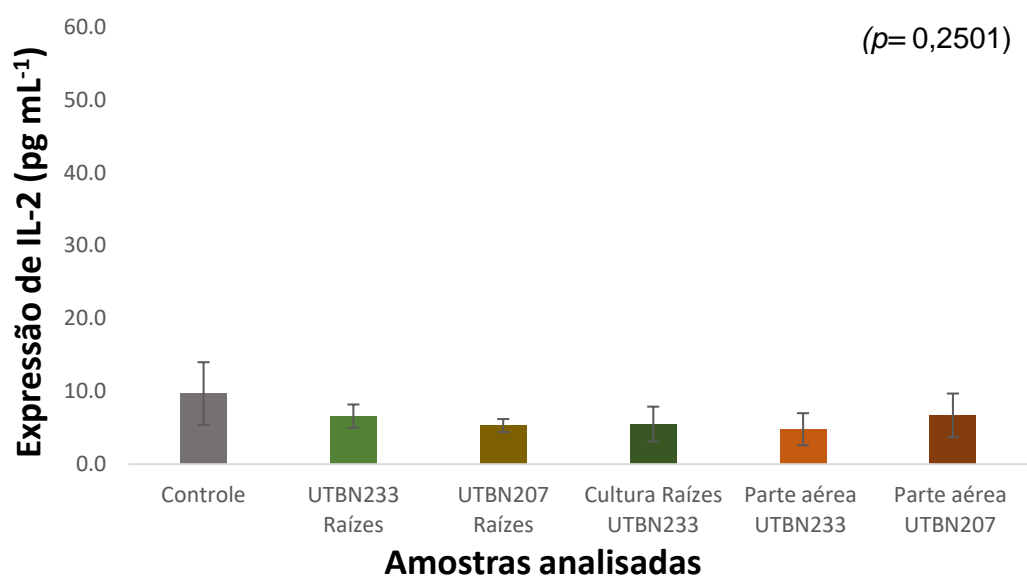


Figura 22 - Gráfico de coluna da expressão de IL-2 (pg mL⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL⁻¹.

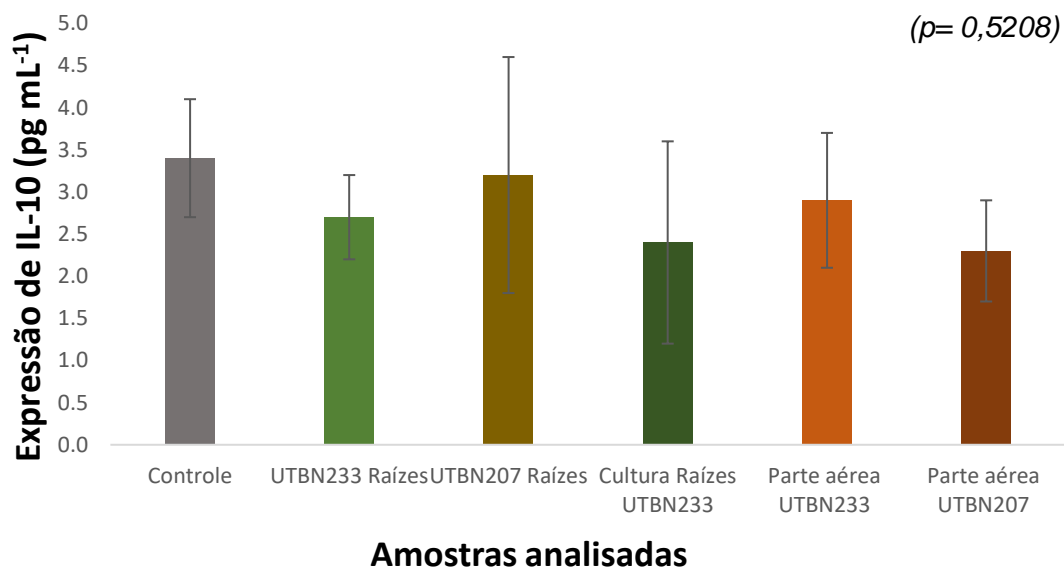


Figura 23 - Gráfico de coluna da expressão de IL-10 (pg mL⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 µg mL⁻¹.

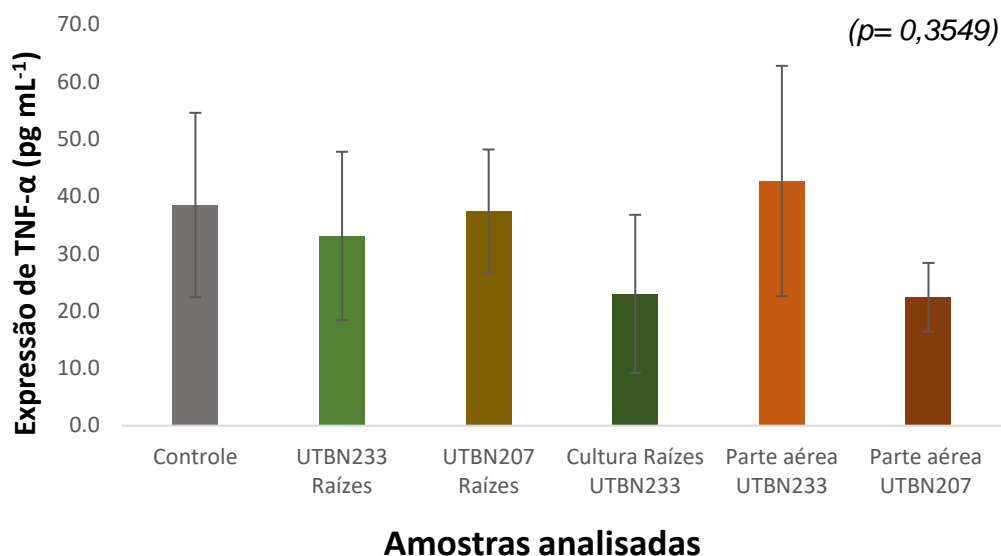


Figura 24 - Gráfico de coluna da expressão de TNF- α (pg mL⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 μ g mL⁻¹.

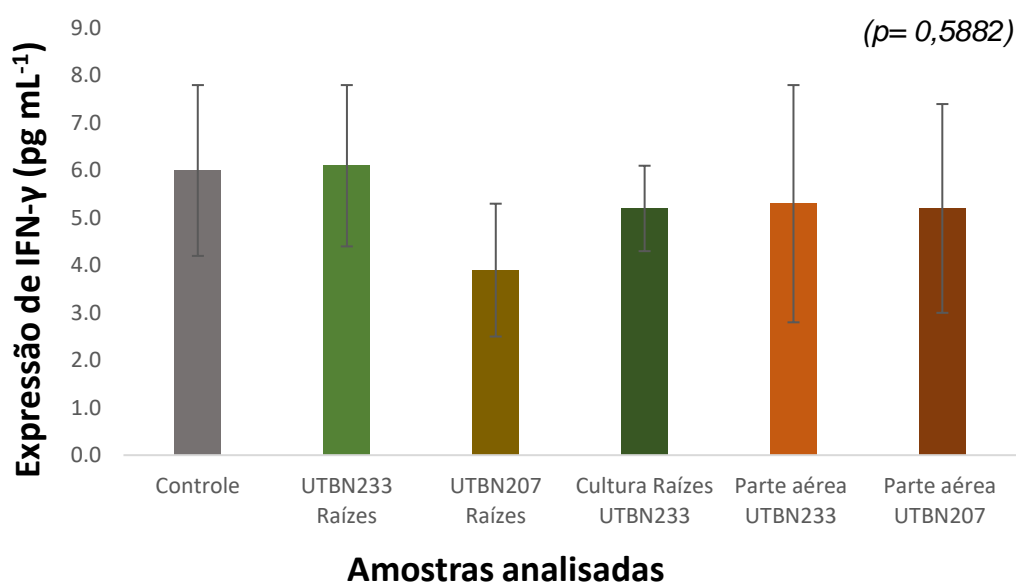


Figura 25 - Gráfico de coluna da expressão de IFN- γ (pg mL⁻¹) em monócito humano após estimulação por EPEC e tratamento com extratos UTBN a 20 μ g mL⁻¹.

Assim como ocorreu com os nossos resultados, o efeito de *U. tomentosa*, porém *in vivo*, sobre os níveis de TNF- α foi avaliado em estudos como os de Araujo *et al.* (2018) e Lozada-Requena *et al.* (2015). Esses trabalhos demonstraram que os extratos não promoveram alterações significativas nos níveis dessa citocina. Resultados semelhantes foram observados para IL-10, em pesquisas que utilizaram extratos aquosos e hidroetanólicos de *U. tomentosa*, de acordo com a revisão feita por Arado *et al.* (2024).

A análise da dosagem das citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 nos extratos submetidos à fagocitose em células MN sugere que o genótipo UTBN207 das partes aéreas da espécie pode estar relacionado a um perfil inflamatório por aumentar a expressão da citocina IL-6, enquanto o genótipo UTBN233, também das partes aéreas, pode estar associado a um caráter anti-inflamatório, pois apresentou aumento na expressão da interleucina IL-4. Vale ressaltar que ambos os extratos contêm AOP, o que sugere que a atividade inflamatória ou anti-inflamatória, observada pelo aumento de IL-6 e IL-4, respectivamente, pode não estar estritamente relacionadas a esses alcaloides.

U. tomentosa produz diferentes respostas dependendo da forma de preparação do extrato utilizado, do genótipo e de cada parte que compõe a planta, por apresentar essa variedade de resultados é importante levar em consideração o conjunto de variáveis evidenciadas para construir uma base sólida que favoreçam a ação da espécie.

7. CONCLUSÃO

Sabe-se que *U. tomentosa* é comumente encontrada em florestas primárias, apresentando uma taxa reduzida de regeneração natural. É nesse ambiente que se coletam grandes quantidades de cascas para comercialização mundial. A maioria dos estudos sobre *U. tomentosa* concentra-se principalmente em suas cascas, havendo poucos estudos que exploram outras partes da planta.

No presente trabalho, mostramos que a partir dos clones selecionados, foi possível realizar a multiplicação dos acessos mantidos em banco de germoplasma *in vitro*, permitindo definir os parâmetros para manutenção da espécie.

Embora não tenha sido possível realizar o estabelecimento da cultura de raízes do genótipo UTBN207, foi estabelecida a cultura de raízes do indivíduo elite UTBN233 e a curva de crescimento dessas raízes com 45 dias de idade foi determinada, sendo possível analisar quanto ao teor de isomitrafalina. Os extratos gerados provenientes dessa cultura e também de plantas com três meses de idade, foram avaliados, *in vitro*, quanto à sua citotoxicidade, demonstrando diferenças entre eles.

A viabilidade celular de monócitos frente aos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas de plantas micropropagadas, dos dois genótipos avaliados (UTBN233 e UTBN207), merece destaque, pois foi mantida nas concentrações ensaiadas, o que deve ser levado em consideração quando se trata da produção de fitoterápico a partir de *Uncaria tomentosa*. Além disso, essa mesma parte da planta do genótipo UTBN233 exibiu atividade anti-inflamatória, o qual apresentou um perfil cromatográfico contendo cinco alcaloides oxindólicos pentacíclicos. A concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizada nos ensaios de viabilidade celular, foi viável para todos os extratos analisados e ainda apresentou atividade microbicida significativa no extrato das raízes seccionadas de plantas, o que contribui para o avanço de pesquisas futuras em humanos.

Com base nos ensaios apresentados, é possível reproduzir o protocolo estabelecido para a micropropagação dos indivíduos de *U. tomentosa*, bem como para realizar a manutenção em banco de germoplasma, favorecendo a conservação da mesma.

O conhecimento acerca dos resultados obtidos sobre essa espécie viabilizará o manejo e a aquisição de matéria-prima de qualidade, sem comprometer a integridade da diversidade genética de *U. tomentosa* e afetar a sobrevivência de indivíduos que ocorrem espontaneamente em ambientes naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKHALEQ, Layth A.; ASSI, Mohammed A.; ABDULLAH, Rasedee *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**. 11(5):627-635, 2018. DOI: 10.14202/vetworld.2018.627-635.
- ÁLVAREZ, Maria A; KOBAC, Camila Pedraza; ENRICO Roxana J. *et al.* Micropropagación de *Zuccagnia punctata*, planta medicinal argentina mediante tecnología “*in vitro*” para impulsar su conservación y producción sostenible de compuestos bioactivos. **Darwiniana, Nueva Serie**, 12(1), 135–148, 2024. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2024.121.1212>.
- ARADO, Gustavo Marin; AMATTO, Pedro de Padua G.; MARINS, Mozart *et al.*, Anti-inflammatory and/or immunomodulatory activities of *Uncaria tomentosa* (cat’s claw) extracts: A systematic review and meta-analysis of *in vivo* studies. **Frontiers in Pharmacology**. 15:1378408, 2024. DOI: 10.3389/fphar.2024.1378408.
- ARAUJO, Layanne C. C; FEITOSA, Karla B.; MURATA, Gilson M. *et al.* *Uncaria tomentosa* improves insulin sensitivity and inflammation in experimental NAFLD. **Scientific Reports**. Rep. 8 (1), 11013, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-29044-y.
- AUGEREAU, Jean Michel; COURTOIS, Didier; PÉTIARD, V. Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer. **Plant cell reports**. 5. 372-6, 1986. 10.1007/BF00268605.
- AZEVEDO, Bruna Cestari; MOREL, Lucas Junqueira Freitas; CARMONA, Fábio *et al.* Aqueous extracts from *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. reduce bronchial hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 218, 2018.
- AZEVEDO, Bruna Cestari; ROXO, Mariana; BORGES, Marcos C. *et al.* Antioxidant activity of an aqueous leaf extract from *Uncaria tomentosa* and its major alkaloids mitraphylline and isomitraphylline in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**. Sep 10;24(18):3299, 2019. DOI: 10.3390/molecules24183299.
- BALASUBRAMANIAM, Santhanalakshmi; GANESHAN, Sivanandhan; NATESAN, Selvaraj *et al.* A review on genetic diversity, micropropagation and transformations in the high-value medicinal plant of Himalayas-Seabuckthorn (*Hippophae* sp.). **Journal Pharmacognosy and Phytochemistry** 2024;13(1):360-366. DOI: 10.22271/phyto.2024.v13.i1e.14849.
- BARBIERI, Rosa Lía. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 403-414.

BERTOL, Gustavo; FRANCO, Luzia; OLIVEIRA, Brás H. HPLC of oxyndole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: Sample preparation and analysis optimization by factorial design, **Phytochemical Analysis**, 2(23):143-151, 2012.

BRASIL. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRITO, A. S. D.; SOUZA, J. G.; MORAES, Filho A. V. *et al.* Immunostimulating activity of *Uncaria tomentosa* in RAW 264.7 macrophages. **Brazilian Journal of Biology** vol. 83 e271339. 15 Sep. 2023, DOI:10.1590/1519-6984.271339.

BORROTO, Janetsy; COLL, Josep; RIVAS, Maribel *et al.* Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 94, 181–187, 2008. DOI: 10.1007/s11240-008-9403-z.

CHACÓN, Lina M. Trujillo; LEIVA, Haver; VAHOS Isabel C. Zapata *et al.* Influence of plant growth regulators on *in vitro* biomass production and biosynthesis of cytotoxic Amaryllidaceae alkaloids in *Caliphuria tenera* Baker, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. V. 50,102670, 2023.

COSTA, Ellen Fernanda Brito da; COTRIM, Aron Carlos de Melo; Marchi, Gabriela Feres de. *Et al.* Avaliação da atividade reológica e imunomodulatória das células mononucleares do sangue de bovinos estimuladas pelo óleo de soja. **Seven Editora** (2023). 10.56238/tecnolocienagrariabiosoci-028.

CRUZ-CRUZ, Carlos Alberto; ARNÃO, Gonzáles Maria Tereza; ENGELMANN, Florent. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. **Resources**, v. 2, p.73-95, 2013.

DIETRICH, Fabrícia; KAISER, Samuel; ROCKENBACH, Liliana *et al.* Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder câncer cell line. **Food and Chemical Toxicology**, p.222-229, 2014.

DIETRICH, Fabrícia; MARTINS, Jerônimo Pietrobon.; KAISER, Samuel *et al.* The quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* protects against hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in mice. **PLoS One** 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0131882.

DOMINGUES, Alexandre; SARTORI, Alexandrina; VALENTE, Ligia Maria Marino *et al.* *Uncaria tomentosa* aqueous-ethanol extract triggers an immunomodulation toward a Th2 cytokine profile. **Phytotherapy Research**. Aug;25(8):1229-35, 2011. DOI: 10.1002/ptr.3549.

DURAN, R. Rojas; ASPAJO, G. González; MARTEL, C. Riuz *et al.* Anti-inflammatory activity of mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. **J Ethnopharmacol** 143:801–804, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.015>.

DUTRA, Leonardo Ferreira.; WENDLING, Ivar; BRONDANI, Gilvano Ebling. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2010.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039–1042, 2011.

FERREIRA, Márlia Coelho; LAMEIRA, Osmar Alves; OLIVEIRA, Elaine Cristina Pacheco *et al.* *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa*: Unha-de-gato. In: CORADIN L.; CAMILLO J.; VIEIRA I.C.G. (ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Norte. p. 1095-1103. Brasília, DF: MMA, 2022.

FRANÇA, Eduardo Luzia; BITENCOURT, Renata Vieira; FUJIMORI, Mahmi *et al.* Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, n. 1, p. 1-7, 2011.

FRANÇA Eduardo Luzia; MAYNIÉ, Joanna Conde; CORREA, Valéria Conde *et al.* Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes. **International Journal of Phytomedicine**. 2(4):354-62, 2010.

FRANCO, Jorge; CROSSA, Jose; RIBAUT, Jean Marcel. *et al.* A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. **Theoretical and Applied Genetics** 103:944–952, 2001.
<https://doi.org/10.1007/s001220100641>.

HASSAN, Noaman Shawky. Storage of *In Vitro* Banana Shoot Cultures at Low Temperature or under Mineral Oil Layer. **International Journal of Agriculture & Biology**. (2004) 1560–8530/2004/06–2–303–306.

HASNAIN, Ammarah; NAQVI, Syed Atif Hasan; Ayesha Syeda Iqra. *et al.* Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. **Frontiers in Plant Science**. 2022 Oct 13;13:1009395. DOI:10.3389/fpls.2022.1009395.

HEITZMAN, Mary E.; NETO, Catherine; WINIARZ, Elizabeth *et al.* Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**. 66(1):5–29, 2005.

HONORIO França, A.C; CARVALHO, M.P.S.M.; ISAAC, L. *et al.* Colostral Mononuclear Phagocytes are Able to Kill Enteropathogenic *Escherichia coli* Opsonized with Colostral IgA. **Scandinavian Journal of Immunology**. 46: 59-66, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-86.x>

HONÓRIO, Isabela Cristina Gomes; BERTONI, Bianca Waleria; PEREIRA, Ana Maria Soares. *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* an agronomic history to be written. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1401–1410, ago. 2016.

- HONÓRIO, Isabela Cristina Gomes; BERTONI, Bianca Waleria; TELLES, Mariana Pires de Campos *et al.* Genetic and chemical diversity of *Uncaria tomentosa* (Willd. Ex. Schult.) DC. in the Brazilian Amazon. **PLOS ONE**, p. 1-17, 2017.
- HOYOS, Mirtha Navarro; AGUILAR, Rosa Lebrón; LÓPEZ, Jesus E. Quintanilla *et al.* Proanthocyanidin Characterization and Bioactivity of Extracts from Different Parts of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw). **Antioxidants**, v.6, 2017.
- HOYOS, Mirtha Navarro; PATÁN, Fernando Sánchez; MASIS, Murillo Renato *et al.* Phenolic Assesment of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw): Leaves, Stem, Bark and Wood Extracts. **Molecules**. Dec 18; 20(12):22703-17, 2015 doi: 10.3390/molecules201219875.
- HUERTA-HEREDIA, Ariane A; MARÍN-LÓPEZ, Ricardo; PONCE-NOYOLA, Teresa *et al.* Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. **Eng. Life Sci.**, 9: 211-218, 2009. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800118>
- KAISER, Samuel; DIETRICH, Fabrícia; RESENDE, Pedro E. *et al.* Cat's Claw Oxindole Alkaloid Isomerization Induced by Cell Incubation and Cytotoxic Activity against T24 and RT4 Human Bladder Cancer Cell Lines. **Planta Medica** 79:1413–1420, 2013.
- KEPLINGER, Klaus; LAUS, Gerhard; WURM, Martin *et al.* *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology** 64:23-24, 1999.
- KOVÁCS, Zsófia; PORTOCARRERO, Liz Kelly; HONFI, Péter. *et al.* Enhancing Micropropagation of *Adenophora liliifolia*: Insights from PGRs, Natural Extracts, and pH Optimization. **Plants**.13, 1735, 2024. <https://doi.org/10.3390/plants13131735>.
- LACERDA, Luciana Florêncio de; GOMES, Hugo Teixeira; BARTOS, Patrícia Monah Cunha *et al.* Growth, anatomy and histochemistry of fast growing species under *in vitro* conservation through mineral oil and low-temperature combination. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. (2021). 10.1007/s11240-020-01821-6.
- LIU, Weiwei; ZHANG, Yajie; ZHU Weina *et al.* Sinomenine Inhibits the Progression of Rheumatoid Arthritis by Regulating the Secretion of Inflammatory Cytokines and Monocyte/Macrophage Subsets. **Front Immunol**. Sep 26; 9:2228, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02228.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society** 30:421–427, 1981.
- LOZADA-REQUENA, I.; NÚÑEZ, C.; ALVÁREZ, Y., *et al.* Poblaciones linfocitarias, células dendríticas y perfil de citoquinas en ratones con melanoma

tratados con *Uncaria tomentosa*. **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública** 32, 633–642, 2015. DOI:10.17843/rpmpesp.2015.324.1752.

MARCHI, Bruna Leticia de Freitas; SANTOS, Jeniffer Faria dos; REIGADO, Gustavo Roncoli. *et al.* Effect of *Uncaria tomentosa* aqueous extract on the response to palmitate-induced lipotoxicity in cultured skeletal muscle cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 412, p. 01-11, 2023. DOI: 10.1186/s12906-023-04204-4.

MATSUMOTO, Kazumitsu; CARDOSO, Luciene Dionizio; SANTOS, Izulme Rita Imaculada. Manual de curadores de germoplasma - vegetal: conservação *in vitro*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

MATHUR Jaideep; S. Mukunthakumar; GUPTA S.N *et al.* Growth and morphogenesis of plant tissue cultures under mineral-oil. **Plant Science**. V. 74, Issue 2, 1991, P. 249-254. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90053-B](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90053-B).

MIRANDA, Elias Melo *et al.* Unha-de-gato: *Uncaria tomentosa* (Wild.) D. C. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. In: SHANLEY P.; MEDINA G. (Ed.). Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém: CIFOR: Embrapa: Imazon, 2005. p. 141-146.

MITCHELL, Jane A.; KIRKBY, Nicholas S. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, 2018. <https://doi.org/10.1111/bph.14167>

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, **Physiologia Plantarum** 15:473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

NÚÑEZ, César; REQUENA, Iván Lozada; YSMODES, Tíndara *et al.* Immunomodulation of *Uncaria tomentosa* over dendritic cells, il-12 and profile TH1/TH2/TH17 in breast câncer. **Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica**. 2015 Oct;32(4):643-51.

OOGAKI, Yuka; OZAWA, Ren; SESHIMA, Kay. *et al.* *Uncaria tomentosa* extract (AC-11) improves pregnancy hypertension together with suppression of sFlt-1 and sEng. **Pregnancy Hypertens**. 26:127-132, 2021. DOI:10.1016/j.preghy.2021.10.013.

PAIVA, Samuel Rezende; ALBUQUERQUE, Maria do Socorro Maues; SALOMÃO, Antonieta Nassif *et al.* Recursos genéticos: O produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PALENCIA, Gabriela R Luna; HEREDIA, Ariana A Huerta; ROJAS, Carlos M Cerda García *et al.* Differential alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures. **Biotechnology Letters**. 35, p.791-797, 2013.

PAVEI, Cabral; KAISER, Samuel; VERZA, Simone Gasparin *et al.* HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 62:250–257, 2012.

PEIXOTO, Magna Galvão; OLIVEIRA, Ana Catarina Lima de; BLANK, Arie Fitzgerald *et al.* *In vitro* conservation and leaf anatomy of different chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. **Bioscience Journal**. Vol. 33, no. 1, pp. 41–51, 2017. DOI 10.14393/BJ-v33n1a2017-35757.

PEÑALOZA, Evelyn Maribel Condori; KAISER, Samuel; RESENDE, Pedro *et al.* Chemical composition variability in the *Uncaria tomentosa* (cat's claw) wild population. **Química Nova**, 38(3):378-386, 2015.

PEREIRA, Rita de Cássia Alves; VALENTE, Ligia M. M.; PINTO, José Eduardo B. *et al.* *In vitro* cultivated *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* with determination of the pentacyclic oxindole alkaloid contents and profiles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1193–1200, 2008.

PEREZ, Andres F. Yepes; CALDERÓN, Oscar Herrera; Oliveros Cistian A. *et al.* The Hydroalcoholic Extract of *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) Inhibits the Infection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) *In Vitro*. **Evid Based Complement Alternat Med**. 24;2021:667976, 2021. DOI: 10.1155/2021/6679761.

PINTO, Gustavo Henrique Teixeira; LOPES, Adriana Aparecida; MOREL, Lucas Junqueira de Freitas *et al.* Genetic diversity among genotypes of *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. Gmel. maintained in an *in vitro* germplasm bank. **Biotech**. 12(1):8, 2022. DOI: 10.1007/s13205-021-03016-y.

PLEMEL, Jason R.; CAPRARIELLO, Andrew V.; KEOUGH, Michael B. *et al.* Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. **The Journal of Cell Biology** vol. 216,4 (2017): 1163-1181 DOI:10.1083/jcb.201602028.

QUIROZ, Juan de Dios Zúñiga; PAUCAR, Oscar Llapapasca; GARCIA, Warren Rios. Nuevos aspectos en el estudio agronômico y fitoquímico de las dos espécies peruanas del género *Uncaria*: *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. Y la *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel Uña de Gato. Lima: INMETRA, 2001. 46p.

RAPOSO, Andrea; TEIXEIRA, Renata Beltrao. Metodologia científica: cultivo *in vitro* de unha-de-gato. Circular Técnica 57. ISSN 0100-9915. Embrapa Acre, 2011.

REED, Barbara M.; ENGELMANN, F.; DULLOO, Mohammad Ehsan *et al.* Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Handbook for Genebanks N 7. IPGRI/SGRP, Rome; 2004.

REIS, Sonia Regina I.N.; VALENTE, Ligia M.M.; SAMPAIO, André L.; *et al.* Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. **International**

Immunopharmacology 8:468–476, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2008.11.010>

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K. e TYLER, V. E. 1997. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. Editora Premier. São Paulo. 372p.

RODRIGUES, Beatriz de Souza; COPPEDE, Juliana da Silva; PEREIRA, Ana Maria Soares *et al.* Estabelecimento de cultura de raízes *in vitro* de *Uncaria tomentosa*. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**. V. 5, Nº 2, 2024.

SANDOVAL, Manuel; OKUHAMA, Nataly N.; ZHANG, Xiao Jing *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**. 9(4):325-37, 2002. DOI: 10.1078/0944-7113-00117.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**. 30:507-512, 1974.

SETTY, Arathi R.; SIGAL, Leonard H. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. **Semin Arthritis Rheum**. 34(6):773-84, 2005. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2005.01.011.

SHARMA, Neelam; SATSANGI, Richa; PANDEY, Ruchira. *et al.* *In vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 111, 291–301, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0194-x>.

SHENG, Yezhou; AKESSON, Cristina; HOLMGREN, Kristin *et al.* An active ingredient of Cats's Claw water extracts: identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacology** 96(3):577-584, 2005.

SILVA, Paulo Maurício Batista; CHOCANO, Ana Paula Chappuis; VENANTE, Helena Sandrini *et al.* Efeitos benéficos de três produtos naturais para o tratamento da estomatite protética: um ensaio clínico randomizado. **Arquivos Em Odontologia** 57:141–148, 2022. <https://doi.org/10.35699/2178-1990.2021.25765>.

SILVA, Rafael de Carvalho; LUIS, Zanderluce Gomes; PEREIRA, Jonny Everson Scherwinski. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47(3):344-350, 2012.

SMITH, David Lee; ROMMEL, Fred. A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbiocidal activity of human peripheral blood leukocytes *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 17, n. 3-4, p. 241-247, 1977.

SOKAL, Robert R.; ROHLF, F. James. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 3. ed. New York, W.H. Freeman, 1994.

SNOW, Alan D; CASTILLO, Gerardo M; NGUYEN Beth P. *et al.* The Amazon rain forest plant *Uncaria tomentosa* (cat's claw) and its specific proanthocyanidin constituents are potent inhibitors and reducers of both brain plaques and tangles. **Scientific Reports**. 2019;9(1):561. DOI:10.1038/s41598-019-38645-0.

TIMMONS, George A.; O'SIORAIN James R.; ORAN, Kennedy D. *et al.* Innate Rhythms: Clocks at the Center of Monocyte and Macrophage Function. **Front Immunol**. 2020 Aug 4; 11:1743. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01743.

VALENTE, Ligia M.M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um Panorama Sobre seus Aspectos mais Relevantes. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 48-58, 2006.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 38:97-120, 1998. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.

VENUTOLO, Silvana Alvarenga. Establecimiento in vitro y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd.) D.C. *Revista Tecnología En Marcha*, 23(5), pág. 24. (2011). Recuperado a partir de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/55.

VENUTOLO, Silvana Alvarenga; LÓPEZ, Catalina Rosales; CHINCHILLA Luis Sánchez *et al.* Seasonality effect on the composition of oxindole alkaloids from distinct organs of *Uncaria tomentosa* from the Caribbean region of Costa Rica. **Phytochemistry**, v. 151, 2018.

VIEIRA, Roberto Fontes; SILVA, Suelma Ribeiro; ALVES, Rosa de Belem das Neves *et al.* Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Resultados da 1ª Reunião Técnica. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002.

WURM, M.; KACANI, L., LAUS, G. *et al.* Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. **Planta Medica**, 1998, 64:701–704.

ZEFERINO, Nabia Azevedo; LAURENTINO, Soraia Alves; DE BARROS, Neuza Biguinati *et al.* (2021). Systematic review on the herbal effects of *uncaria tomentosa* and *uncaria guianensis* in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Brazilian Journal of Development**, 7(9), 91805–91819.

Apêndice 1



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título: CLONE ELITE DE *Uncaria tomentosa* COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA SOBRE CÉLULAS DO SANGUE HUMANO

Pesquisadoras envolvidas: Beatriz De Souza Rodrigues e Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede

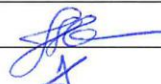
As informações contidas neste termo de consentimento livre e esclarecido, fornecida pelas pesquisadoras acima referidas, que será assinada em duas vias – uma para a pesquisadora principal e outra para o(a) voluntário(a), tem por objetivo firmar acordo escrito com o(a) voluntário(a) para a avaliação da pesquisa acima referida, autorizando sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que será submetido(a).

1 – Natureza da pesquisa: o(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de pesquisa intitulada “Clone elite de *Uncaria tomentosa* com atividade anti-inflamatória sobre células do sangue humano”. Esse trabalho tem como objetivo estabelecer a produção de clones elites de *Uncaria tomentosa* visando auxiliar a cadeia produtiva de fitoterápico da espécie. Entre os objetivos específicos destaca-se a avaliação, *in vitro*, dos extratos obtidos quanto à atividade anti-inflamatória. O(A) Sr(a) está sendo convidado a doar aproximadamente 8 mL de sangue venoso que será coletado por profissionais capacitados do laboratório. Este sangue será processado no Laboratório de Imunologia da Relação Materno Infantil/CUA/FMT localizado na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Barra do Garças/MT, para a obtenção de células que serão analisadas, *in vitro*, com a finalidade de se determinar a citotoxicidade e atividade anti-inflamatória dos extratos da unha de gato frente a essas células. O tempo previsto para sua participação é de 10 minutos. Esse termo está de acordo com o artigo 5º da resolução 510/16 (CNS, 2016).

2 – Participantes da pesquisa: serão convidados a participar da análise, indivíduos que frequentam o Campus Universitário do Araguaia, UFMT, na cidade de Barra do Garças – MT, Brasil.

3 – Envolvimento na pesquisa: ao participar da pesquisa o(a) senhor(a) receberá e assinará este TCLE e doará aproximadamente 8 mL de sangue, do qual será extraído as células para o desenvolvimento da pesquisa. Caso aceite participar, garantimos a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros, de acordo com o item II.2.i, Res 466/2012/CNS e Constituição Federal Brasileira de 1988, artigo 5º, incisos V, X e XXVIII. Por ser esta uma pesquisa que necessita de coleta de material biológico (sangue) do(a) participante, atenderá as exigências de dizeres para o TCLE constantes

Rubricas _____ (Participante)

 _____ (Pesquisador)

Página 1 de 3

no Anexo II da Norma Operacional 001/2013-CONEP/CNS em acordo com Resolução CNS 441/2011 e Portaria MS 2.201/11.

4 – Riscos e desconfortos: o(a) senhor(a) deverá se identificar e não participar da pesquisa caso: não esteja habituado(a) a doar sangue ou não seja adepto(a) a pesquisas científicas que visem auxiliar a comunidade. A coleta de sangue não causará risco a sua saúde, sendo que eventualmente, poderá sentir um desconforto físico (possivelmente o aparecimento de uma mancha roxa no local da picada) ou algum desconforto psicológico devido a “picada”, de modo que, nesse caso, poderá receber assistência conforme as instruções da resolução CNS nº 466/2012.

5 – Confidencialidade: todas as informações coletadas nesse estudo serão estritamente confidenciais. Apenas os membros da pesquisa terão conhecimento dos dados, assegurando assim a sua privacidade. Porém, os resultados da pesquisa serão utilizados em trabalhos científicos publicados ou apresentados oralmente em congressos e palestras sem jamais revelar sua identidade. Os dados obtidos durante a pesquisa são confidenciais e não serão usados para outros fins que não os científicos.

6 – Benefícios: ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo possa contribuir com informações relevantes para a sociedade em que vivemos. O(a) senhor(a) não terá nenhum tipo de despesa ao autorizar sua participação nesta pesquisa, bem como nada será pago pela sua participação.

7 - Liberdade de recusar ou retirar o consentimento: como voluntário(a), o(a) senhor(a) tem plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma para o tratamento que recebe neste serviço de acordo com o Item IV.3.d, da resolução CNS nº. 466 de 2012. Se julgar necessário, o(a) sr(a) dispõe de tempo (48 horas) para que possa refletir sobre sua participação, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-los na tomada de decisão livre e esclarecida.


Este documento (TCLE) foi elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término pelo(a) sr(a), ou por seu representante legal, e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

7 – Consentimento pós-informação: confirmo que recebi uma via deste termo de consentimento e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo ao assinar o presente documento.

Declaro que concordo em participar da pesquisa.

Nome do participante

Rubricas _____ (Participante)

 _____ (Pesquisador)

_____ / ____ / ____

Assinatura do Participante



IMPRESSÃO BIOTECNOLOGIA

 Beatriz De Souza Rodrigues

Assinatura da Pesquisadora Principal Juliana da Silva Coppede e da Mestranda Beatriz De Souza Rodrigues - contato: beatriz.drodrigues@sou.unaerp.edu.br cel.:(16) 99643-2684

Em caso de dúvidas quanto aos procedimentos envolvidos na pesquisa, sinta-se à vontade para entrar em contato com Beatriz De Souza Rodrigues beatriz.drodrigues@sou.unaerp.edu.br (16) 99643-2684, mestranda responsável pela execução do projeto "CLONE ELITE DE *Uncaria tomentosa* COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA SOBRE CÉLULAS DO SANGUE HUMANO" ou com a Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede pelo telefone (16) 36036726. Em caso de dúvidas quanto aos procedimentos éticos envolvidos na pesquisa, sinta-se à vontade para entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UNAERP) – Avenida Costábile Romano, 2201 – Bloco C – Campus Ribeirão Preto – Ribeirão Preto/SP – Brasil – CEP:14096-900 – Telefone: (16) 3603-7709 – E-mail: cetica@unaerp.br