

Cultura Monoclonal de Erva de Bicho (*Polygonum acre* H. B. K. var *aquatile*) para Produção de um Fitoterápico em Escala Comercial

Lima, S. S.¹; Esquibel, M.A.¹, Henriques, A. B.²; Silva, F.O.³; Silva, P. H. B.⁴; Lage, C. L. S.^{1*}

¹Laboratório de Fisiologia Vegetal – IBCCF° - CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Av. Brigadeiro Trompowsk, s/ n° - CEP: 21.951-590, ²Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal – IB - CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Av. Brigadeiro Trompowsk, s/ n° - CEP: 21.951-590, ^{1,2} Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal – UFRJ, ³Emater – Muriaé/MG, ⁴ Laboratório Simões Ltda – Rua Pereira de Almeida, 104 – Pça da Bandeira – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 20.950-100.

RESUMO: Uma das maiores dificuldades enfrentadas pela indústria dos fitoterápicos é a falta de constância nas características dos lotes de fitoterápicos produzidos, que pode decorrer tanto de fatores genéticos quanto ambientais. Visando evitar a variação genética foi utilizada a técnica de micropropagação para a produção de mudas de Erva-de-bicho monoclonais, em quantidade suficiente para a produção de pomada em escala comercial. As plantas foram desinfestadas, os segmentos nodais retirados e introduzidos em meio de Murashige & Skoog (MS). Das plântulas obtidas, três clones foram micropropagados em meio MS sem adição de reguladores de crescimento, sob intensidade luminosa de 23 (moles. m².s⁻¹, 16h de fotoperíodo, a 25±2°C. No processo de aclimação, as plântulas foram transferidas para sementeiras de isopor contendo condicionador de solo e mantidas por 30 dias em casa de vegetação. Após os 30 dias, foram transferidas para solo, com espaçamento de 40 X 40cm. Em campo as plantas desenvolveram novos brotos na base, em média 14,2 por planta (n=90), chegando ao total de 1194 brotos, os quais chegaram a atingir 2,0 m de altura em seis meses, quando foram colhidas. Durante todo o cultivo, não foi usado nenhum tipo de defensivo ou adubo químico. Após a colheita, as plantas foram lavadas e secas ao abrigo da luz do sol. Foram produzidos de 120Kg de planta seca que foram trituradas e utilizadas na preparação do extrato hidroalcoólico, adicionado à base anidra para a produção da pomada. Este método permitiu uniformizar geneticamente os lotes de fitoterápicos.

Palavras-chave: fitoterápicos, cultura *in vitro*, micropropagação, *Polygonum acre*.

ABSTRACT: Monoclonal culture of Erva-de-bicho (*Polygonum acre* H.B.K. var. *aquatile*) for commercial scale production of a phyto-therapeutic medicine. The aim of this work, as one of the greatest problems that the industry has to deal with is the absence of homogeneity among different batches of materials acquired for production of phyto-medicines. Heterogeneity comes from plant characteristics found among different raw material suppliers. There are differences in size, color, and chemical composition of medicinal substances due to both genetic and environmental factors. In order to avoid this problem, the technique of cloned micro-propagation of plants was employed to obtain shoots of erva-de-bicho in sufficient quantity to permit production in an industrial scale. Polygon *acre* plants were purchased from a supplier in a popular market, identified by a botany expert, then deposited in the Herbarium of Inst. of Biology at UFRJ. The plants were decontaminated, their nodal segments removed and introduced into Murashige & Skoog (MS) medium. Three clones from the resulting shoots were micro-propagated in MS medium without growth regulators under a photo-period of 16hrs at intensity of 23 (mol.m². s⁻¹) and at 25±2°C. During the process of acclimatization, the micro-propagated plants were transferred into inoculated seed plots in isopor containers and kept in a green house for 30 days, with frequent sprinkling with filtered and UV-sterilized water. At the end of 30 days, the plants were transferred to soil, with spacing of 40x40cm. When in soil, the plants developed an average of 14.2 new shoots at their base, to a total of 1194 shoots, with more than 2.0m each after 6 months. The plants were then harvested, at early morning, washed and dried in the shade, within textured walls and on textured shelves. Thick layers were avoided to prevent fungi growth. The process yielded 120kg of dry material. The aerial parts were crushed and ground, and used to prepare hydro-alcoholic extracts to be put into a topic medicine of anhydrous base. This method, together with controlled field conditions during cultivation, permitted genetic uniformity of batches of phyto-therapeutic medicines.

Key words: phytotherapics, *in vitro* culture, micropropagation, *Polygonum acre*.

INTRODUÇÃO

Polygonum acre H. B. K. var. *aquatile* (Meisner, 1855) é da família Polygonaceae, sendo vulgarmente conhecida como Erva-de-bicho ou Pimenta-d'água (Machado, 1949; Joly, 1976; Teris & Threes, 1994). É uma espécie comum nas

Américas (Simões *et al.*, 1998); crescendo preferencialmente nos pântanos, em lugares úmidos, na beira de rios e em terrenos um pouco secos que formam a transição entre os brejos e os campos (Pio Corrêa, 1984).

A planta inteira é usada na preparação de infusos, tinturas ou banhos. Externamente, sob a

Recebido para publicação em 12/07/01 e aceito para publicação em 05/10/01.

forma de compressas, a infusão da planta é utilizada sobre varizes inflamadas e sobre úlceras varicosas, os banhos são utilizados no tratamento contra sarna (Teixeira, 1989). Em preparações farmacêuticas, as pomadas e os comprimidos são indicados no tratamento de hemorróidas (Simões *et al.*, 1998). As ações terapêuticas desta planta são atribuídas aos elevados teores de taninos e flavonóides (Simões *et al.*, 1998) e a presença do sesquiterpeno dialdeído poligodiol (Barnes & Lorder, 1962; Kubo & Taniguchi, 1988; Teris & Threes, 1994). *P. acre* exerce uma ação hemostática tópica, diminui a permeabilidade capilar e aumenta a resistência dos vasos (Joachimovits, 1959), apresenta efeito anti-hemorrágico (Teixeira, 1989), antipirético, bradicárdico e hipotensor (Simões *et al.*, 1989), anti-diarréico (Almeida *et al.*, 1995), antifúngico (Freixa *et al.*, 1998) e antiviral contra o vírus respiratório sincicial (Kott *et al.*, 1999).

Ao contrário das drogas farmacêuticas, os fitoterápicos não possuem um padrão quanto aos tipos e quantidades de ingredientes ativos. Os princípios ativos podem sofrer variações devido a diferentes fatores ambientais e genéticos (Currier *et al.*, 2000). A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos mais utilizadas e aquela de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998), que tem sido considerada uma alternativa para a produção de plantas em escala comercial (Rout *et al.*, 2000), viabilizando a produção de plantas monoclonais em grande quantidade, cultivadas em locais previamente selecionados, evitando inclusive o extrativismo, responsável pela extinção de muitas espécies (Evans *et al.*, 1983). Deste modo, a micropropagação constitui-se em uma forma de padronização de matéria-prima vegetal, cujo aspecto é de alta relevância pois tem sido um dos entraves para validação de fitoterápicos, como citado por Currier *et al.* (2000).

Cabe aqui ressaltar o caráter pioneiro deste tipo de abordagem biotecnológica, visto que o uso da micropropagação, com fins comerciais tem sido utilizada em diversas culturas, como batata, milho, aveia e trigo (Evans *et al.*, 1984), mas é incomum nos sistemas produtivos que se utilizam de plantas medicinais.

Neste trabalho, a micropropagação foi utilizada com o objetivo de produzir uma cultura monoclonal de *Polygonum acre*, como alternativa para produção de matéria-prima vegetal homogênea e de qualidade para fabricação de fitoterápico.

MATERIAL E MÉTODO

Identificação da espécie

Exsicatas de *Polygonum acre* H.B.K. var aquatile foram preparadas com plantas aclimatadas da cultura *in vitro* já estabelecida. A identificação da espécie foi feita pela Professora Doutora Cecília Maria Rizzini do Instituto de Biologia/CCS/UFRJ. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia (RFA) - UFRJ, sob a inscrição 23928.

Estabelecimento da cultura *in vitro*

Para introdução *in vitro* de *P. acre* foram utilizadas mudas adquiridas em feira livre, que após cultivo e floração foram identificadas como referido. Para a desinfestação, foram isolados os segmentos nodais da planta, submetendo-os a banhos subseqüentes em água corrente com detergente líquido, para depois permanecerem por 5 minutos em álcool 70%. Transferidos para ambiente estéril, os segmentos nodais foram lavados três vezes em água destilada estéril, sendo posteriormente imersos por 5 minutos, em água sanitária 20% e novamente lavados três vezes em água destilada estéril. Concluída a desinfestação, os segmentos nodais foram inoculados em meio de Murashige e Skoog - MS (Murashige & Skoog, 1962) solidificados com 7g.L⁻¹ de agar e esterilizados em autoclave a 121°C e 1,1 kgf.cm⁻², durante 15 minutos.

As plântulas regeneradas dos segmentos nodais foram selecionadas para micropropagação em meio MS e subcultivadas a cada 4 meses.

O material vegetal *in vitro* de *P. acre* foi mantido em sala de crescimento a temperatura de 25°C±1, intensidade luminosa de 23 µmoles cm⁻². s⁻¹ e fotoperíodo de 16/8 horas.

Aclimação

Plântulas de *P. acre* com 2 a 3 meses de idade, cultivadas em meio MS, foram levadas à Fazenda Bom Jardim, região de Muriaé no Estado de Minas Gerais, no período de setembro de 1999 a junho de 2000. Após serem retiradas dos frascos de cultura, o excesso de meio de suas raízes foi removido com água e as plântulas foram acondicionadas em sementeiras, preparadas com condicionador de solo da marca Plugmix. As sementeiras com as plântulas permaneceram durante 30 dias em casa de vegetação onde receberam freqüente aspersão de água filtrada esterilizada com luz ultravioleta. Ao final deste período, as plântulas foram transferidas dois

canteiros de 18,9 m X 0,92 m, com o espaçamento entre as plantas de 40cm X 40cm. As plantas não receberam quaisquer defensivos ou adubos químicos, durante todo o período de permanência no campo.

Colheita, secagem e produção do fitoterápico

As colheitas foram realizadas no início da manhã. As plantas foram cortadas com facão, de modo a preservar no solo as raízes e partes do caule que pudessem regenerar novas plantas. Após a colheita as plantas foram lavadas e secas ao abrigo da luz do sol, em ambiente com paredes de tela, sobre prateleiras de tela bem espaçadas entre si, evitando o empilhamento excessivo para minimizar a proliferação de fungos. A planta seca foi entregue ao laboratório fabricante do fitoterápico.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Estabelecimento da cultura *in vitro*

O processo de desinfestação viabilizou a introdução de 4 clones, todos subcultivados em meio MS com sucesso, porém baseado em critérios como vigor e maior velocidade de crescimento, somente 1 (um) clone foi selecionado (Figura 1) para produção de mudas monoclonais utilizadas na fabricação do fitoterápico.



FIGURA 1: *Polygonum acre* cultivada *in vitro*, plântulas com 2,5 meses de cultura.

A rizogênese ocorreu de modo a possibilitar a aclimação após 60 dias do início da cultura, todavia, algumas plantas foram aclimatadas após 90 dias.

Aclimação e desenvolvimento das plantas cultivadas no campo

Não ocorreram quaisquer diferenças no padrão de desenvolvimento das plantas aclimatadas após 60 ou 90 dias de cultivo *in vitro*. Todas foram micropropagadas em meio MS sem adição de reguladores de crescimento, pois o meio

MS foi suficiente para o pleno estabelecimento das plantas.

No período de setembro de 1999 a junho de 2000 foram aclimatadas 373 plântulas de *P. acre*. As plântulas que foram transferidas da cultura *in vitro* para a sementeira e posteriormente para o campo (Figuras 2 e 3), adaptaram-se muito bem às novas condições a que foram submetidas, com 100 % de sobrevivência. Na Figura 2, pode-se observar o aspecto geral da planta, em condições de transferência para o solo, após um mês em processo de aclimação na casa de vegetação.



FIGURA 2: Plântulas transferidas para a sementeira, mantidas na casa de vegetação há 1 (um) mês.



FIGURA 3: Plantas floridas com 5 meses de cultivo no campo.

Segundo Pio Corrêa (1984), *P. acre* tem tamanho variável, alcançando geralmente menos de 1 (um) metro de altura, porém a parte aérea das plantas aclimatadas alcançou até 2,00 metros de altura e cada planta regenerou em média 14,23 novos brotos ($n=90$) depois de 5 meses de cultivo no campo, resultando no aumento da produção de material vegetal. Foi registrada a floração das plântulas de *P. acre* no início do 5º mês de cultivo no campo, no mês de março de 2000 e também nos meses de novembro e dezembro de 2000 (Figura 3), seguida pela formação de frutos com sementes viáveis, pois grande parte das sementes germinaram depois que os frutos caíram no solo.

Diversos fatores como temperatura, luz,

umidade, altitude e latitude influenciam no desenvolvimento de plantas cultivadas em campo (Júnior *et al.*, 1994), portanto o local onde foram feitas as culturas de Erva-de-bicho foi satisfatório, como prova o bom desenvolvimento das plantas. Além disso, é fato conhecido que a passagem da planta pela cultura *in vitro* leva à melhoria de produtividade (Grattapaglia & Machado, 1999).

Colheita, secagem e produção do fitoterápico

O método de colheita adotado não acarretou perda das plantas cultivadas. Como as plantas não foram arrancadas do solo e sim cortadas, as raízes e os pequenos pedaços de caule que permaneceram no solo regeneraram novas plantas em pouco tempo. As plantas formadas a partir da germinação das sementes que caíram no solo foram todas retiradas para a salvaguarda do clone.

O período ideal para secagem das plantas foi de duas semanas no ambiente de secagem utilizado, não foram encontrados insetos, fungos ou quaisquer outros tipos de contaminação no material durante o processo. As plantas cultivadas em 35 m² deram origem a 120kg de matéria-seca, o suficiente para a produção de 1.200Kg de pomada.

Este material foi entregue para a produção, em escala comercial, de um fitoterápico indicado para o tratamento de hemorroidas e varizes. O fitoterápico produzido consiste em uma pomada que contém extrato fluido das plantas de *P. acre*, aclimatadas no campo.

CONCLUSÃO

Pelo resultado pode-se concluir que o processo utilizado para a micropropagação viabilizou a produção de cultura monoclonal de *P. acre in vitro*.

O protocolo de micropropagação estabelecido para *P. acre* é viável, pois as plantas produzidas eram saudáveis e apresentaram bom desenvolvimento no campo. O rendimento da cultura foi compatível com o uso comercial, eliminando o caráter extrativista do processo de produção.

Os procedimentos utilizados para aclimação das plantas demonstraram alta eficiência, visto que não foram observadas perdas durante esse processo.

A colheita e a secagem das plantas utilizadas na fabricação do fitoterápico foram bem sucedidas, assim como a fabricação do fitoterápico, sob a forma farmacêutica de pomada, onde foram utilizadas plantas monoclonais de *P.*

acre, cuja origem, identidade e qualidade do material botânico eram garantidos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALMEIDA, C. E.; KARNNIKOWISK, M. G. O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saúde Pública*, vol. 29 (6): 428-33. 1995.
- BARNES, C. S. & LORDER, J. W. The structure of polygodial: a new sesquiterpene dialdehyde of *Polygonum hydropiper* L. *Aust. J. Chem.* Vol. 15: 322-327. 1962.
- CURRIER, S. J.; JOHNSTON, P. D.; GORELICK, K. *J. Herbal Medicines. Science and Medicine*, pp: 40-43. Jan/feb 2000.
- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. *Handbook of plant cell culture*. Vol. I. New York, Macmillan Publishing Co. 970p. 1983.
- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BRAVO, J. E. Cell culture methods for crop improvement. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. *Handbook of plant cell culture*. Vol. I. New York, Macmillan Publishing Co. 970p. 1984.
- FREIXA, B.; VILA, R.; VARGAS, L.; LOZANO, N.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants, *Phytotherapy Research* Vol. 12 (6): 427-430. 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Vol. I, 1ª edição. Brasília-DF. Embrapa. 864p. 1998.
- JOACHIMOVITS, R. Estudo farmacológico da ação anti-hemorrágica de *Polygonum acre* H. B. K. *Med. Cirurgic. Farm.*, Rio 278: 216-234. 1959.
- JOLY, Aylthon Brandão. Polygonaceae. In: BOTÂNICA: *Introdução à taxonomia vegetal*. 3ª ed. Companhia Editora Nacional. São Paulo, 1976. p. 777.
- KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J. de D.; VIVOT, E.; CRUAÑES, J.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; CARVALLARO, L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 64: 79-84. 1999.
- KUBO, I. & TANIGUCHI, M. Polygodial, an antifungal potentiator. *Journal of Natural Products*. Vol. 51 (1): 22-29. 1988.
- MACHADO, O. X. B. *Polygonum acre* (Erva-de-bicho ou Catáia). *Rodriguesia*, 24: 33-37. 1949.
- MEISNER, C. F. Polygonaceae. In: Martius, *Flora Brasiliensis*, vol. 5, Parte I, Ilust. 5. 1855.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497, 1962.
- PIO CORRÊA, Manuel. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Vol. IV, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS., P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, vol. 18: 91-120. 2000.
- SIMÕES, C. M., Ribeiro-do-Vale, R. M., Poli, A., Nicolau, M., Zanin, M. The Farmacologic action of extracts of *Polygonum punctatum* Elliot. **J. Pharm. Belg.**, vol. 44(4): 275-84, 1989.
- SIMÕES, C. M. O. et al. *Polygonum hidropiperoides* Michaux. In: **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Editora da Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, p. 62-63. 1998.
- TEIXEIRA, A. H. Protector effect of *Polygonum acre* H. B. K. on the artificial pulmonary hemorrhages in mice. **Saúde – Revista do Centro de Ciências da Saúde – UFSM**. Vol. 15. p. 105-116. 1989.
- TERIS, A. & THREES, A. Determination of the Sesquiterpene Dialdehyde Polygodial by High-Pressure Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, vol.5, p. 19-23. 1994.