



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA**

LÉA MARIA DOS SANTOS LOPES FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E FITOQUÍMICA DA *Physalis angulata* L. E
SEU EFEITO SOBRE CÉLULAS DE INDIVÍDUOS COM MIELOPATIA
ASSOCIADA AO HTLV-1**

TESE DE DOUTORADO

SALVADOR - Bahia

2018

LÉA MARIA DOS SANTOS LOPES FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E FITOQUÍMICA DA *Physalis angulata* L. E
SEU EFEITO SOBRE CÉLULAS DE INDIVÍDUOS COM MIELOPATIA
ASSOCIADA AO HTLV-1**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Rios Grassi

**Salvador - Bahia
2018**

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

F813 Ferreira, Léa Maria dos Santos Lopes
Caracterização anatômica e fitoquímica da *Physalis angulata* L. e seu efeito sobre células de indivíduos com mielopatia associada ao HTLV-1. / Léa Maria dos Santos Lopes Ferreira. – 2018.
98f.: il. Color; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Inclui bibliografia

1. Antioxidante. 2. Fitoquímica. 3. HTLV-1. 4. *Physalis angulata*.

I. Título.

CDU: 616.9

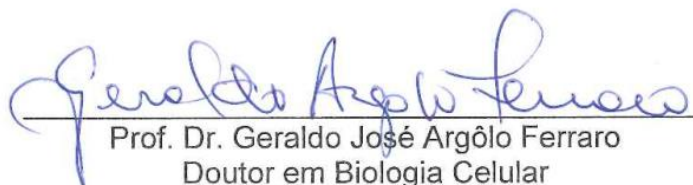
LÉA MARIA DOS SANTOS LOPES FERREIRA

**“CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E FITOQUÍMICA DA PHYSALIS
ANGULATA L. E SEU EFEITO SOBRE CÉLULAS DE INDIVÍDUOS COM
MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1”**

Tese apresentada à Escola
Bahiana de Medicina e Saúde
Pública, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Doutora em
Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 24 de julho de 2018.

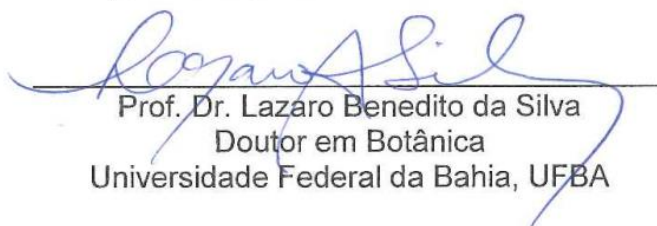
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Geraldo José Argôlo Ferraro
Doutor em Biologia Celular
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP



Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale
Doutor em Química
Universidade Federal da Bahia, UFBA



Prof. Dr. Lázaro Benedito da Silva
Doutor em Botânica
Universidade Federal da Bahia, UFBA



Prof^ª. Dr.^a Lourdes Cardoso de Souza Neta
Doutora em Química
Universidade do Estado da Bahia, UNEB



Prof. Dr. Jorge Clarencio Souza Andrade
Doutor em Patologia Experimental
Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP - Centro de HTLV
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ

FONTE DE FINANCIAMENTO

Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) – Fiocruz/CNPq.

AGRADECIMENTOS

Entrei na Fiocruz, no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), me deparei com a Imunologia, de arrepiar!! Tive que aprender muitos procedimentos para atuar no laboratório, foi a condição “*Sine qua non*” da orientadora. Resolvi até fazer um curso de verão de Imunologia!! Meu Deus, estava difícil, mas fui caminhando. Prossegui, mas o cheiro de flor me perseguia, como posso trabalhar com extrato de planta sem conhecer a espécie? Sem conhecer sua parte externa e interna, era difícil para mim, pois sou da área de anatomia e fisiologia vegetal. Estava com uma curiosidade: em que parte da planta poderiam estar esses bioativos contidos naqueles extratos que eu estava trabalhando? Me veio a ideia: será que posso combinar botânica com imunologia ou colocar a botânica nesse trabalho!!! Não custa perguntar e quando veio o SIM da orientadora segui a BR 324 e lá estava eu no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, coletando a *Physalis angulata*. Quando faltava a planta para alguma outra finalidade olha eu na estrada de novo. Faltou um detalhe da planta para a ilustração, lá vou para estrada. E aí cheguei na Faculdade de Farmácia cheia de raiz, caule, folha, flor e fruto. E o resultado do trabalho está aqui.

Agradeço:

À Dra Prof. Fernanda Grassi pessoa muito linda e especial para mim, contribuiu muito com meu crescimento com sua perspicácia e inteligência. “*Que bom que essa mulher apareceu em minha vida*”! E olha que tentei me aproximar e quando tinha apresentação de imunologia na Pós estava lá acompanhando, com o intuito dela ser minha orientadora. Não tenho como agradecer, ficarei com saudades!

Ao Dr Bernardo Galvão, meu anjo da guarda nessa jornada, que colocou Dra. Fernanda Grassi em meu caminho.

À Dra. Ana Marise Ladeia, bateu o martelo e pronto, vai ser Dra. Fernanda a minha orientadora e fez isso no momento crucial, quando necessitava de nova orientação. E Lurdinha ali junto apoiando.

Aos professores da pós-Bahiana dividindo seus conhecimentos e incentivando nessa jornada.

Ao grupo do Laboratório de Engenharia tecidual e Imunofarmacologia (LETI): Dra. Milena Soares, Dr. Diogo Moreira, Mestre Mariana Silva e especial ao Dr. Cássio Meira, esse menino adorável, que me passou conhecimento, me ensinou, foi muito atencioso comigo.

À Dra. Luana Góis, nós invertemos, fui sua professora e dessa vez foi você quem me ensinou, sempre disposta, contribuiu muito com essa minha jornada.

À Dra. Rita Elizabeth Mascarenhas, que me incentivou várias vezes, principalmente na minha atuação no laboratório.

À Jaqueline Gomes, IC, disposta aos desafios, erramos, acertamos, crescemos juntas nesse trabalho e ainda vamos terminar algumas tarefas.

Ao Dr. Ademir Vale, foi uma descoberta importante para meu trabalho, conheci, convidei e topou ser meu colega nessa jornada, cheguei com uma floresta de *P. angulata* no laboratório de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Ao Dr. Amâncio de Souza, esse gigante, pessoa com astral maravilhoso topou contribuir com esse trabalho. Com essa pitada de agrônomo e grande pesquisador.

À Dra. Thessika Araújo, coração bom, atenciosa, com sua mega tecnologia foi uma pessoa que contribuiu muito,

Ao Instituto de Biologia da UFBA: Dra Kelly Leite; Dr. Lazaro Silva, Mestres Marcelo Silva e Cássia Sacramento, pessoas muito bacanas que contribuíram na anatomia. Sempre penso neles, pois trabalhamos com as plantas, aí eu penso que trabalhamos com a alma das plantas, pois lá dentro que enxergamos o que elas “sentem”.

À Dra. Maria Lucia Moreno, com sua animação e disposição trabalhamos bastante no Laboratório de microscopia de varredura.

À Arlene Lessa, laboratório de microscopia de varredura, muito empenhada nas minhas solicitações.

Ao Dr. Jorge Clarêncio Andrade, pela sua boa vontade e disponibilidade.

À Mestre e amiga Jéssica Fernandes, uma grande pessoa que eu tenho muito apreço. Participou com muito carinho, boa vontade, disposição contribuindo com esse valioso trabalho e sempre atenta aos meus projetos.

Ao Mestre Gabriel Queiroz, sempre disposto a ajudar, caro amigo, parando para explicar quando não entendia. Invertemos também Gabi, antes fui sua professora.

Ao Dr. Geraldo Ferraro, quando estava dividida entre o doutorado de botânica na UEFS ou topar o doutorado da Bahiana e ele comentou: “Eu você pensaria” isso foi um incentivo e contribuiu como um “divisor de águas”.

À Mestre Cristina Brasil, pela sua envolvente didática nas aulas de estatística.

Ao Dr. Diego Menezes, não conseguimos fechar o trabalho devido você ter mudado seu destino, mas a tentativa foi importante para iniciar a minha jornada de doutorado.

À Equipe da secretaria do LASP: Eugenia Góes com sua elegância e delicadeza, Jurema Carrilho disponível as minhas solicitações, Noilson Gonçalves com sua cordialidade e Rita Santana, Ritinha, amor de pessoa, sempre ali presente e solícita no que precisava.

Aos ICs, mestrandos e doutorandos do LASP pelo convívio agradável.

À simpatia de Dr. Carlos Gustavo Regis Santos.

À equipe do LASP, bem representada por Fred Luciano N Santos e que contribuiu e brilhou com a elaboração no pictorial abstract do meu artigo referente a tese.

À Flora Grassi Aguiar, pelo fluente e harmonioso inglês contribuiu no meu artigo.

À Monique Lírio, companheira do LASP.

À Dra. Claudineia Pelacani, UEFS, por ter cedido os indivíduos de *P. angulata*.

Ao Mestre Romeu Leite, muito obrigada pelo auxílio na coleta e fotos da *P. angulata*.

Ao Mestre Gustavo Surlo pela bela ilustração da *P. angulata*.

Às meninas do café Joanice Gonzaga, Leda Lima e ao Sr. Valmir Lopes que iniciou o plantio das *Physalis*

Ao Dr. Adriano Alcântara meu grande amigo pelo incentivo e com suas ideias inovadoras.

Ao Mestre Anderson Suzart amigo, atencioso colaborou na etapa inicial do doutorado.

Ao meu lindo amigo Valter Forastieri me acompanhando nas aulas de campo.

À minha coordenadora da Unijorge e grande amiga Dra. Camila Pigozzo pela compreensão e companhia da coleta das plantas nas UEFS.

Ao meu amigo Dr. Ednaldo Neves e coordenador da Unijorge pelo carinho e incentivo.

Ao Dr. Lázaro Silva, pela companhia na coleta das plantas na UEFS.

À Luiz Ferreira, irmão, seguindo viagem e coletando mais tipos de *Physalis*.

A minha grande amiga Ingrid Sturm, pelo incentivo.

À minha coordenadora Mestre Ieda Oliveira do Emitec que concedeu algumas ausências e meus colegas especiais, principalmente a colega e amiga Solange Alcântara.

À minha coordenadora do Candéal Mestre Lavínia Boaventura por sua compreensão.

Ao quinteto: Queridos colegas e amigos, mestres Antonieta Araújo, Barbara Soares, Rita Carvalho e Ubton Nascimento que juntos estudamos, rimos e nos preocupamos em acertarmos.

À Francine Oliveira, mesmo em um período curto, contribuiu muito na minha aprendizagem, foi importante no início do meu trabalho no LASP.

Aos meus colegas dos pós, que foram muitos, uns mais próximos que outros, meu obrigada.

As palavras de incentivo no grupo do zap foram importantes.

Aos colegas de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, principalmente Carol Feitosa, Vanessa Brito e Viviane Ferreira com carinho.

Aos colegas do Candeal da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, principalmente Lavínia Boaventura Silva com muito carinho.

Ao cosmos e ao grande avatar Deus.

Todos vocês foram importantes, muito obrigada!

Ao Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ e funcionários.

À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública na qual tenho orgulho de trabalhar.

*A minha flor e grande amor de
minha vida, minha mãe Marieta, o
maior presente que Deus me deu!
Está aqui me apoiando com os
seus 91 anos nessa grande
jornada.*

RESUMO

Introdução: *Physalis angulata* L. é uma planta da família Solanaceae amplamente utilizada na medicina popular. Metabólitos secundários com potencial farmacológico, incluindo fisalinas que exibem atividades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antiparasitárias, foram identificados nesta espécie. Poucos estudos investigaram os locais de armazenamento de metabólitos secundários na planta e o efeito dos bioativos na linfoproliferação causada pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1). **Objetivos:** Caracterizar as estruturas anatômicas vegetais, o perfil fitoquímico dos extratos e avaliar o efeito da *Physalis angulata* em linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. **Material e métodos:** Foram empregadas técnicas de microscopia eletrônica e óptica convencional para a caracterização anatômica dos órgãos da *P. angulata* (folha, raiz, caule e frutos). Extratos metanólicos de folhas, raízes, caule e frutos foram qualitativamente caracterizados pela presença de esteroides, terpenoides, taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, teor de compostos fenólicos totais e conteúdos de flavonoides. A capacidade antioxidante desses extratos foi determinada pela atividade de sequestro de radicais livres do DPPH. Para avaliar o efeito do extrato da *P. angulata* e Fisalina F sobre a linfoproliferação, células de três indivíduos infectados pelo HTLV-1 e três controles não infectados foram cultivadas em presença de diluições seriadas do extrato e da Fisalina F por 5 dias. As células foram pulsadas por 18h com $1\mu\text{Ci}$ ^3H - Timidina. Além disso, foi realizado a análise do ciclo celular, na presença ou ausência da Fisalina F e do extrato. **Resultados:** Os estômatos anisocíticos localizados na face abaxial foram mais abundantes que os estômatos na face adaxial. Tricomas foram evidenciados mais abundantes ao longo das nervuras do pecíolo, caules, além da margem nas sépalas e pétalas e dispersos no ovário. Esteroides e terpenoides estiveram presentes nas folhas, caules e frutos de *P. angulata*. Saponinas eram exclusivas nos frutos. A triagem fitoquímica não detectou flavonoides, antraquinonas e alcaloides em todas os extratos metanólicos das partes testadas da planta. As maiores capacidades antioxidantes foram identificadas nos extratos foliares e frutíferos, possivelmente devido à presença de compostos fenólicos nesses órgãos. O IC_{50} encontrado para Fisalina F foi $3,0\ \mu\text{M}$ e o IC_{50} do extrato etanólico do caule de *P. angulata* foi de $7,0\ \mu\text{g}$. A Fisalina F e o extrato da *P. angulata* inibiram a proliferação espontânea de células infectadas de HTLV-1 e reduziram o número de células em processo de mitose. **Conclusão:** Este estudo descreveu as características anatômicas e bioquímicas de *P. angulata* e identificou órgãos do indivíduo abundantes em antioxidantes (folhas e frutos) e esteroides (possivelmente fisalinas; folhas). Fisalina F e extrato de *P. angulata* apresentaram um efeito inibitório sobre células de indivíduos infectados pelo HTLV-1, diminuindo a proporção de células em divisão celular.

Palavras chave: HTLV-1. *Physalis angulata*. Fisalina F. Anatomia. Fitoquímica. Antioxidante. Linfoproliferação.

ABSTRACT

Background: *Physalis angulata* L. is widely used in folk medicine. Secondary metabolites with pharmacological potential, including physalins that exhibit anti-inflammatory / immunomodulatory and antiparasitic activities, have been identified in this species. Few studies have investigated the storage sites of secondary metabolites in the plant, and the effect of bioactives on lymphoproliferation caused by human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). **Objectives:** To characterize the plant anatomical structures, the phytochemical profile of the extracts and to evaluate the effect of *Physalis angulata* on lymphocytes of individuals infected by HTLV-1. **Material and methods:** Electron and conventional optic microscopy were used for the anatomical characterization of the *P. angulata* organs (leaf, root, stem and fruits). Methanolic extracts of leaves, roots, stems and fruits were qualitatively and chemically characterized by the presence of steroids, terpenoids, tannins, alkaloids, saponins, flavonoids, anthraquinones, coumarins and phenolic compounds. Phenolic compounds, flavonoid contents and antioxidant capacity of these extracts was determined by the free radical scavenging activity of DPPH. To evaluate the effect of the extract and Physalin F on lymphoproliferation, cells from three individuals infected with HTLV-1 and three uninfected controls were cultured in the presence of serial dilutions of the extract and the compound for 5 days. Cells were pulsed with 1 μ Ci ³H-Thymidine for 18 h. In addition, cell cycle analysis in the presence or absence of Physalin F and the extract was performed using flow cytometry. **Results:** Stomatas were more frequent on abaxial surface compared to adaxial surface. Trichomes were more abundant along the veins of the petiole, stems, besides the margin in the sepals and petals and dispersed in the ovary. Steroids and terpenoids were present on the leaves, stems and fruits of *P. angulata*. Saponins were found only in fruits. Phytochemical screening did not detect flavonoids, anthraquinones and alkaloids in all methanol extracts of the tested parts of the plant and alkaloids in all parts tested. High antioxidant capacity were identified in both leaf and fruit extracts, possibly due to the presence of phenolic compounds in these organs. The IC₅₀ for Physalin F was 3.0 μ M and extract de *P. angulata* was 7.0 μ g. Physalin F and the ethanolic extract of the stem inhibited the spontaneous proliferation of HTLV-1 infected cells, and reduced the number of cells in the process of mitosis. **Conclusion:** This study describes the anatomical and biochemical characteristics of *P. angulata* and identified organs abundant in antioxidants (leaves and fruits) and steroids (possibly fisalinas; leaves). Physalin F and extract of *P. angulate* showed an inhibitory effect on cells of individuals infected by HTLV-1, decreasing the proportion of cells in cell division.

Key words: HTLV-1. *Physalis angulate*. Physalin, anatomy. Phytochemistry. Antioxidant. Lymphoproliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>Physalis angulata</i> no Brasil.....	19
Figura 2 - Ilustração das partes da <i>Physalis angulata</i> L.....	21
Figura 3 - Vitaesteroides (fisalinas A, B, C, D, E, F, G, H) encontradas no gênero <i>Physalis</i> .	23

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Folha, caule, flor e fruto de <i>Physalis angulata</i> . cultivada em campo experimental na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brasil.....	29
Figura 2 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da epiderme de <i>Physalis angulata</i> - Estomatos na folha.....	35
Figura 3 - Detalhes anatômicos da folha de <i>Physalis angulata</i>	36
Figura 4 - Anatomia do caule e raiz da <i>P. angulata</i> . Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).	37
Figura 5 - Curva de calibração obtida com o padrão de <i>ácido gálico</i>	40
Figura 6 - Curva de calibração obtida com o padrão de quercetina.	41

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Histograma representativo das fases do ciclo celular em células marcadas com iodeto de propídio avaliadas por citometria de fluxo.	45
Figura 2 - Inibição da proliferação espontânea de indivíduos de PBMC não infectados pelo HTLV-1 por fisalina F.	47
Figura 3 - Inibição da proliferação espontânea de indivíduos de PBMC com HAM/TSP.....	48
Figura 4 - Efeito da Fisalina F sobre o ciclo celular de um indivíduo infectado pelo HTLV-1: A/B PBMC	49
Figura 5 - Inibição da proliferação espontânea de PBMC de indivíduos não infectados pelo HTLV-1 pelo extrato de <i>Physalis angulata</i>	50
Figura 6 - Inibição da proliferação espontânea de PBMC de indivíduos com HAM/TSP pelo extrato de <i>Physalis angulata</i>	50
Figura 7 - Efeito do extrato de <i>P. angulata</i> sobre o ciclo celular de um indivíduo infectado pelo HTLV-1.	51
Quadro 1 - Valores de conteúdos totais de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante encontrados nos estudos em referências.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituintes fitoquímicos identificados na triagem fitoquímica nos extratos metanólicos de diferentes partes de <i>Physalis angulata</i>	39
Tabela 2 - Conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides presentes em extratos metanólicos de diferentes partes da <i>P. angulata</i>	40
Tabela 3 - Parâmetros de validação do método da curva de calibração da do <i>ácido gálico</i> ...	41
Tabela 4 - Capacidade antioxidante dos extratos dos órgãos de <i>P. angulata</i> via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de extratos metanólicos de <i>Physalis angulata</i>	42
Tabela 5 - Valores comparativos das fases de divisão do ciclo celular da Fisalina F e do extrato etanólico do caule da <i>P. angulata</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	= Capacidade antioxidante
ATLL	= (<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i>) Leucemia/linfoma de células T do adulto
BHA	= Butilhidroxianisol
CD	= Cluster de diferenciação
CHTLV	= Centro de Referência de Portadores do HTLV
Ci	= Curie (unidade de atividade de radionuclídeos)
CMSP	= Células mononucleares de sangue periférico
CO₂	= Dióxido de carbono
CPM	= Contagem por minutos
CTR	= Controle não infectados
DPPH	= radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EBMSP	= Escola Bahiana Medicina Saúde Pública
ELISA	= (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) Ensaio de imunoabsorção enzimática
EQ	= (<i>quercetin equivalentes</i>) Equivalente Quercetina
FAA	= Formaldeído, álcool, ácido acético glacial
g	= grama
GAE	= (<i>gallic acid equivalentes</i>)- Equivalentes ácido gálico EAG
h	= Hora
HAM/TSP	= (<i>HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis</i>) Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical
HEMOBA	= Hematologia e Hemoterapia da Bahia
HLA-DR	= (<i>Human leukocyte antigen</i>) Antígeno leucocitário humano
HPLC-UV	= (<i>High performance liquid chromatography</i>) (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HTLV	= (<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i>) Vírus linfotrópico de células T humanas
H-Timidina	= Timidina radioativa
IC50	= Média da inibição de um composto
IE	= Índice de estimulação
IFN-γ	= Interferon
IL	= Interleucina

IS	= Índice seletividade
Kg	= Kilograma
L	= Litro
M	= Molar
MEV	= Microscopia eletrônica de Varredura
mg	= Miligrama
mL	= Mililitros
mM	= Milimol
nm	= Nanômetros
PBMC	= (<i>em inglês</i>) Células mononucleares de sangue periférico
PHA	= (<i>Phytohemagglutinin</i>) Fitohemaglutinina
pH	= potencial hidrogeniônico
QE	= (<i>quercetin equivalents</i>) Equivalente quercetina - EQ
TNF-α	= (<i>tumor necrosis factor</i>) Fator de necrose tumoral
TCF	= Teor de Conteúdo Fenólico
CTF	= Conteúdo Total de Flavonoides
μL	= Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	<i>Physalis angulata</i> L.	19
2.1.1	Caracterização Farmacológica	22
2.2	HTLV-1	24
2.2.1	Patogênese da infecção	25
2.2.2	HAM/TSP	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
	CAPÍTULO 1	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Espécie Vegetal	29
4.2	Avaliação anatômica	29
4.3	Avaliação de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	30
4.4	Testes fitoquímicos	30
4.5	Capacidade Antioxidante	31
4.6	Determinação de conteúdo fenólico	31
4.7	Determinação de conteúdo total de flavonoides (CTF)	31
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6	RESULTADOS	34
6.1	Caracterização anatômica da <i>P. angulata</i>	34
6.1.1	Estômatos	34
6.1.2	Tricomas	34
6.1.3	Mesofilo	36
6.1.4	Anatomia do caule	37
6.1.5	Raiz	37
6.2	Caracterização fitoquímica da <i>P. angulata</i>	38
	CAPÍTULO 2	43
7	MATERIAL E MÉTODOS	43
7.1	Desenho Experimental	43
7.1.1	Material vegetal	43
7.1.2	Obtenção das fisalinas de <i>P. angulata</i>	43
7.1.3	Pacientes	43
7.1.4	Obtenção de células	44
7.1.5	Ensaio da proliferação	44
7.2	Ciclo Celular	45
7.3	Análises dos dados	45
8	RESULTADOS	47
8.1	Efeito da Fisalina F sobre a proliferação de PBMC de indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1	47

8.2	Efeito do extrato etanólico do caule de <i>Physalis angulata</i> sobre a proliferação de PBMC de indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1.....	49
9	DISCUSSÃO	52
10	CONCLUSÕES.....	59
11	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE.....	69

1 INTRODUÇÃO

A *Physalis angulata* (Linnaeus 1753) é uma espécie da família Solanaceae, originária da América do Sul, distribuída em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo. No Brasil é popularmente conhecida como camapú, balãozinho, juá-de-capote, mata-fome⁽¹⁾. As propriedades biológicas da *P. angulata* são amplamente utilizadas na medicina popular no tratamento de reumatismo crônico, rim, bexiga, fígado e doenças da pele, bem como por suas propriedades sedativas, antipiréticas e antieméticas⁽¹⁾.

Vários metabólitos secundários com propriedades farmacológicas foram identificados no gênero *Physalis*, como alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, taninos, terpenoides e, especialmente, uma série de lactonas esteroidais C28, fisalinas e vitanolideos⁽²⁻⁴⁾.

Os estudos com esteroides secos purificados a partir de extratos de *P. angulata* (fisalinas B, F ou G) ou extratos preparados a partir de raízes mostraram potentes atividades anti-inflamatórias/imunomoduladoras⁽⁵⁾ e antineoplásicas^(6,7). Dentre os compostos naturais, as fisalinas vem se destacando com diversas ações terapêuticas. Particularmente, a Fisalina F tem um efeito contra o *Trypanosoma cruzi*^(5,8), bem como atividade antileishmanial⁽⁹⁾ e antiplasmodial⁽¹⁰⁾. Recentemente, observou-se igualmente um efeito imunossupressor na proliferação de células infectadas com o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)⁽¹¹⁾.

O HTLV-1 infecta linfócitos T CD4+, T CD8+, monócitos e células dendríticas, induzindo a proliferação espontânea destas células. O vírus se multiplica por divisão mitótica (expansão clonal) ou em menor intensidade pelo contato célula-célula (sinapse virológica)⁽¹²⁾.

O HTLV-1 é o agente etiológico da mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)⁽¹³⁾, da leucemia/linfoma de células T adultas (ATLL)⁽¹⁴⁾, da uveíte associada ao HTLV-1⁽¹⁵⁾ e da dermatite infecciosa em crianças⁽¹⁶⁾.

O tratamento da infecção pelo HTLV-1 é sintomático e restrito aos pacientes que apresentem alguma doença associada. O tratamento da ATLL é a quimioterapia convencional associada a antirretrovirais e não apresenta boa resposta terapêutica⁽¹⁷⁾. Pacientes com doenças

inflamatórias, especialmente, HAM/TSP, normalmente fazem uso de corticosteroides, como prednisona e IFN- α ^(18,19).

Em busca de novas drogas terapêuticas, compostos quinolínicos, alcaloides extraídos de uma planta da Amazônia boliviana, tem demonstrado inibir a integrase do HIV-1 e a proliferação de células infectadas pelo HTLV-1. Um composto quinolínico (fluoroquinolona K-37) foi capaz de inibir a replicação do HTLV-1 em células de linhagem MT-2 e MT-4, e em PBMC de dois indivíduos com HAM/TSP⁽²⁰⁾. Compostos quinolínicos foram capazes de modular a intensidade de proliferação em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1⁽²¹⁾.

Poucos estudos caracterizaram a estrutura anatômica de *P. angulata* e a distribuição tecidual de metabólitos secundários na espécie. A fim de identificar a localização de metabólitos na *P. angulata*, foi realizada uma descrição anatômica abrangente da raiz, caule, folha e flor e caracterização fitoquímica dos extratos metanólicos da raiz, caule, folha e fruto. Além disso, foi investigado o efeito do extrato da *P. angulata* e do secoesteroide Fisalina F sobre células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Este trabalho lança luz sobre aspectos funcionais das estruturas secretoras e pode contribuir para melhorar o processo de bioprospecção. Conseqüentemente, poderia ser melhor avaliado o potencial farmacológico da planta sobre a inibição da proliferação espontânea das células infectadas pelo HTLV-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Physalis angulata* L.

A Solanaceae compreende cerca de 150 gêneros e 3000 espécies amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, com 30 gêneros e 450 espécies presentes no Brasil. Dentre os gêneros descritos, *Physalis* é um dos maiores possuindo cerca 110 espécies, das quais 11 ocorrem no Brasil. As espécies de *Physalis* mais estudadas são a *P. peruviana*, *P. ixocarpa* e a *P. angulata*⁽¹⁾.

Physalis angulata Linné é nativa da América Tropical, distribuída nas Américas do Norte, Central e do Sul, e nas áreas tropicais da África e da Ásia. É distribuída em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo e em várias regiões do Brasil (Figura 1).⁽²²⁾



Figura 1 - Distribuição geográfica de *Physalis angulata* no Brasil⁽²³⁾.

O nome *Physalis* origina-se do grego. *Physa* significa bolha ou bexiga, em referência ao cálice da flor que cresce e protege o fruto, característica que evidencia a planta e auxilia na classificação do táxon (Figura 2). No Brasil, *P. angulata* é conhecida como camapu, joá-de-capote, mata-fome, balão. A planta é utilizada no tratamento caseiro do reumatismo crônico, problemas renais, da bexiga, do fígado e doenças de pele, assim como sedativo, antitérmico e antiemético ⁽¹⁾.

A *P. angulata* é uma erva anual de 70 cm de altura (Figura 2), que se expande facilmente, sendo caracterizada como planta invasora. A lâmina foliar é ovalada-lanceolada a oblonga, com folha simples, alternas, membranácea, de margens denteadas. As flores são pentâmeras, de cor creme-amarela, geralmente solitárias. Os frutos são bagas globosas de cor amarelo, com muitas sementes em forma discoides, coloração marrom. Os frutos são envolvidos pelo cálice (conjunto de sépalas) concrecentes e inflados, conferindo forma de um pequeno balão. O estame possui anteras azuis, estilete com estigma capitado e ovário bicarpelar. O caule é anguloso e a raiz axial, pivotante. O ciclo de vida da *P. angulata* é considerado curto, produzindo frutos em média aos 90 dias após a semeadura ⁽¹⁾.

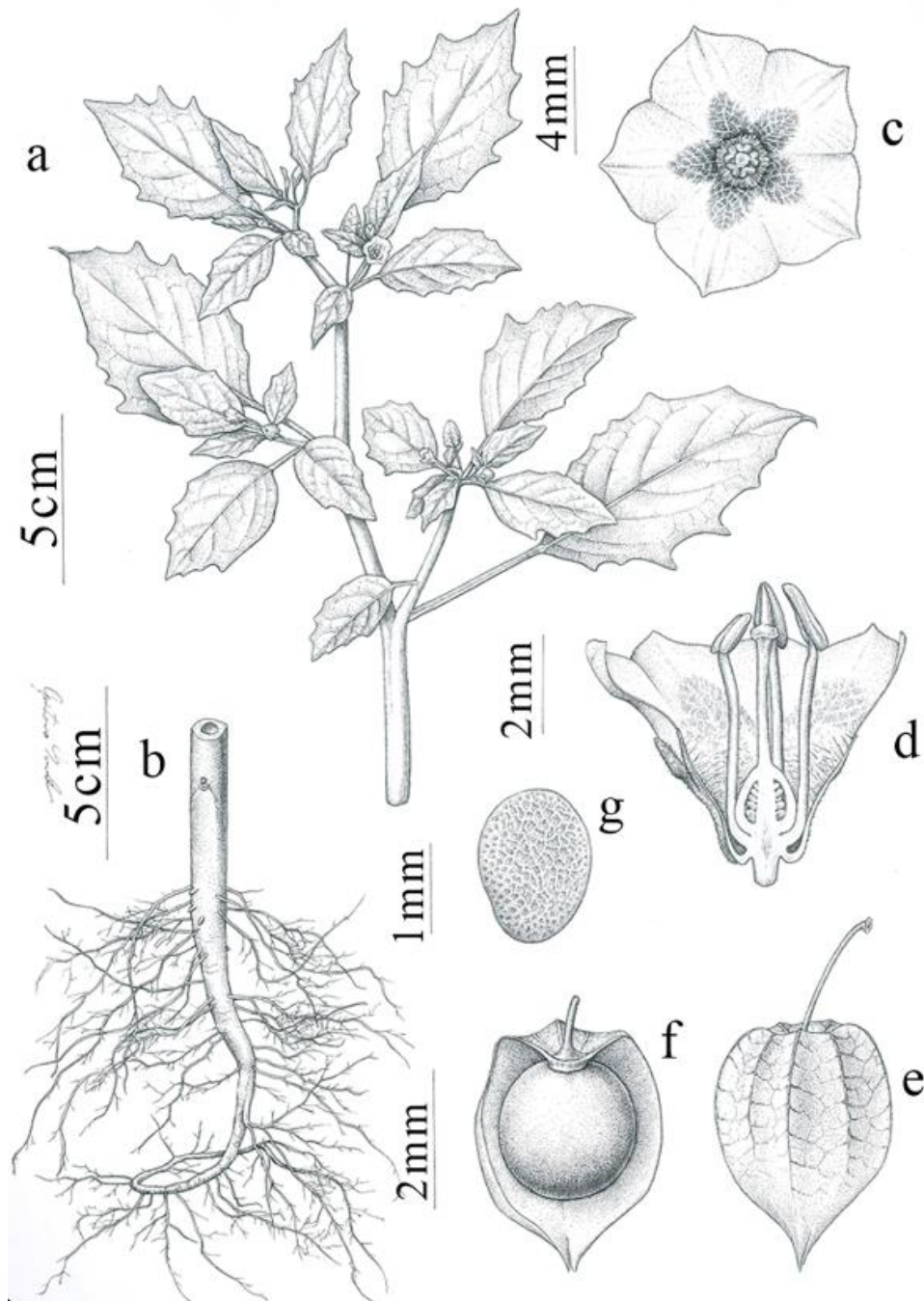


Figura 2 - Ilustração das partes da *Physalis angulata* L.: a = aspecto geral do ramo; b = raiz primária e raízes secundárias; c = corola em vista frontal; d = estruturas reprodutivas: estames e pistilo (ovário e estigma); e = fruto envolvido por sépalos; f = fruto conecrescido com a semente; g = semente.

2.1.1 Caracterização Farmacológica

As plantas do gênero *Physalis* são consideradas relevantes quanto aos aspectos etnobotânico, nutracêutico e medicinal, devido a sua vasta composição química a qual é formada de micronutrientes, metabólitos primários e especialmente os metabólitos secundários, além de servir para fins alimentares.

Dentre os metabólitos secundários encontrados no gênero *Physalis* destacam-se os flavonoides, em folhas da *P. peruviana*; calisteginas em diferentes estruturas da *P. alkekengi* var. *francheti*, *P. philadelphica* Lam., *P. ixocarpa* Brot e da *P. peruviana*; triterpenoides em sementes de *P. alkekengi* L.; ceramidas em folhas e estames de *P. philadelphica*; fenilpropanóides; inúmeras classes de ácidos graxos em sementes além de diferentes tipos de esteróides⁽²⁴⁻²⁶⁾.

Os esteróides denominados vitaesteróides (vitanólidos, vitafisalinas, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas e fisalinas são originados a partir da via do ácido mevalônico e são de grande interesse farmacológico⁽⁴⁾. Os vitaesteróides são substâncias bioativas, caracterizadas como lactonas esteroidais que reproduzem o esqueleto intacto do ergostano, sendo, em sua grande maioria, polioxigenados⁽⁴⁾.

A *P. angulata* tem na sua composição fitoquímica flavonoides, alcaloides, carotenoides⁽²⁷⁾. Os frutos da *P. angulata* apresentam uma alta concentração de flavonoides, alcaloides e fitoesteroides, que são amplamente empregados na indústria de fármacos, além de serem ricos em vitaminas A e C, fósforo e ferro. Além disso, as fisalinas B, G, D, E, F, H, I, K e U (Figura 3) já foram isoladas de raiz, caule e folhas da *P. angulata*^(28, 29).

Estudos com seco-esteroides purificados a partir de extratos de *P. angulata* (fisalinas B, F ou G) ou de extratos preparados a partir de raízes mostraram atividades antiinflamatórias / imunomoduladoras⁽⁵⁾ e antineoplásicas^(6,7). Particularmente, a Fisalina F foi identificada como uma substância com potencial farmacológico, diminuindo a proliferação do *Trypanosoma cruzi*^(5,8), atividades antileishmania⁽⁹⁾ e antiplasmodial⁽¹⁰⁾ além de um efeito imunossupressor na proliferação de células infectadas com o vírus linfotrópico de células T do tipo 1 (HTLV-1)⁽¹¹⁾.

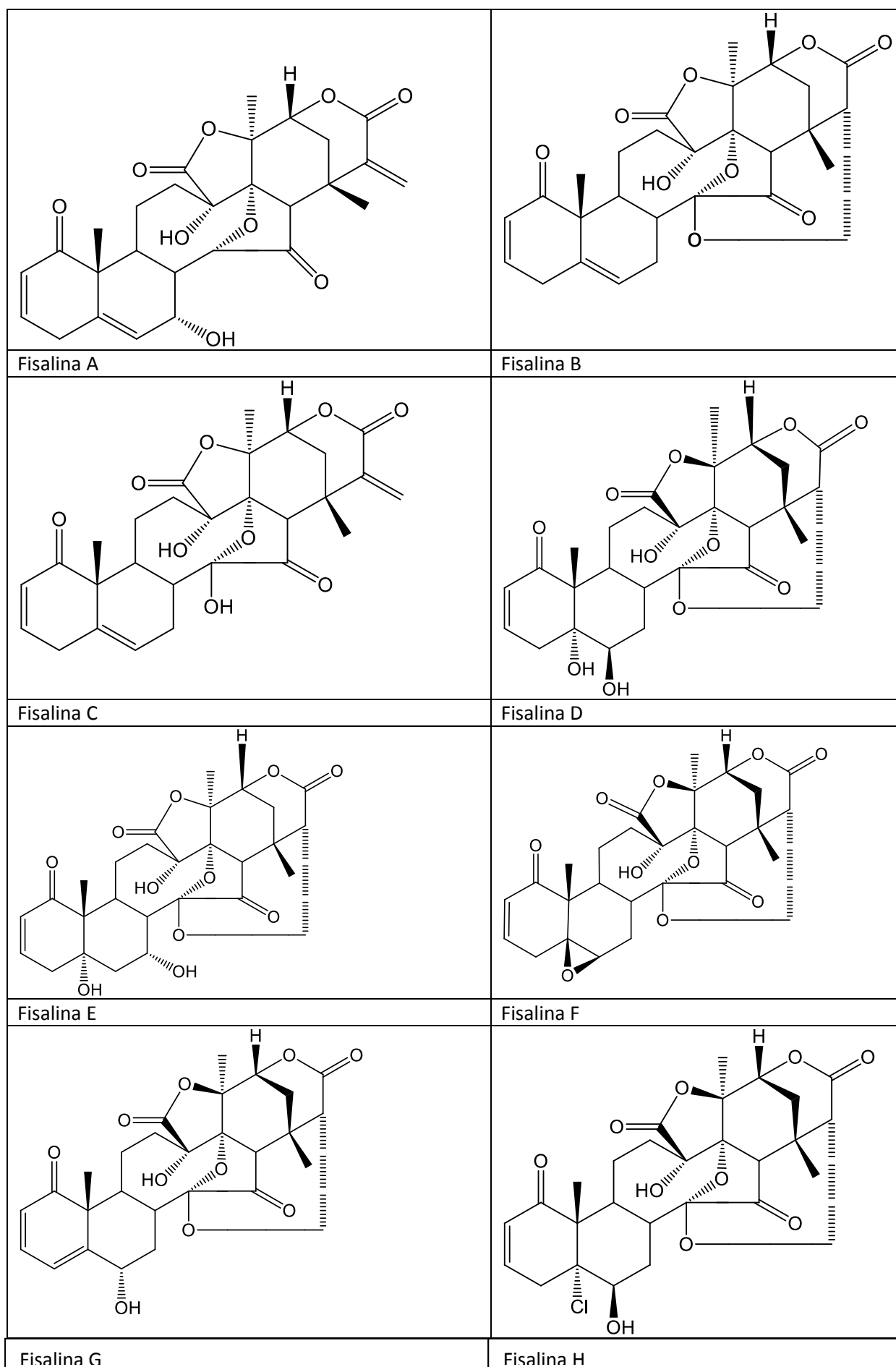


Figura 3 - Vitaesteroides (faisalinas A, B, C, D, E, F, G, H) encontradas no gênero *Physalis*.

2.2 HTLV-1

O HTLV-1 é um retrovírus da família *Retroviridae*. Foi o primeiro retrovírus humano descoberto associado ao desenvolvimento de doenças⁽³⁰⁾. Posteriormente, foi identificado o HTLV-2, que não está claramente associado a doenças⁽³¹⁾. Mais recentemente, dois outros subtipos, HTLV-3⁽³²⁾ e HTLV-4⁽³³⁾ foram identificados na África.

A estimativa de infecção pelo HTLV-1 está em torno de 5 a 10 milhões de pessoas⁽³⁴⁾. O vírus é considerado endêmico no Japão, Caribe, África, América do Sul e ilhas da Melanésia. No Brasil, esse vírus está registrado em quase todos os estados, considerando em torno de 800 mil o número de pessoas infectadas⁽³⁴⁾. A Bahia é o estado com maior prevalência (6,7 a 10/1000 habitantes) em relação aos demais estados que apresentam uma prevalência abaixo de 3,4/1000 habitantes⁽³⁵⁾. Um estudo de base populacional realizado em Salvador, Ba, evidenciou que cerca de 2% da população (em torno de 50.000) encontra-se infectada⁽³⁶⁾. A soropositividade para o HTLV-1 é considerada baixa e se eleva a partir da adolescência e início da atividade adulta, sendo destacado mais em mulheres devido a transmissão por via sexual mais eficiente do homem para a mulher, além das transfusões sanguíneas serem mais frequentes em mulheres^(37, 38). No entanto, o risco de transmissão de HTLV-1 por transfusão de sangue é mínimo devido a triagem obrigatória nos bancos de sangue desde 1993⁽³⁹⁾.

As vias de transmissão da infecção pelo HTLV-1 incluem transmissão vertical principalmente por aleitamento materno, parenteral e sexual. Recentemente, um estudo realizado em Salvador, mostrou que a transmissão sexual é uma via importante de transmissão nesta cidade⁽⁴⁰⁾. Os fatores de risco associados a infecção pelo HTLV-1 incluem hemotransfusão, baixo poder aquisitivo, nível inferior de educação, relações sexuais sem preservativo^(41, 42).

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 é realizado através dos testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos contra o vírus (ELISA ou aglutinação). Para confirmação utiliza-se o Western Blot (WB) além dos testes moleculares, (reação em cadeia de polimerase), que detecta a presença de ácidos nucleicos ou ribonucleicos do vírus, além de ser utilizado para distinguir a infecção dos tipo 1 e 2 do HTLV.

2.2.1 Patogênese da infecção

Uma das características imunológicas mais marcantes da infecção pelo HTLV-1 é a indução da proliferação espontânea de células mononucleares⁽⁴³⁾. As células dos indivíduos infectados proliferam mesmo na ausência de estímulos exógenos, como IL-2 ou antígenos. Esta proliferação pode ocorrer tanto *in vitro* quanto *in vivo* e atinge várias populações celulares, como linfócitos T CD4+ e CD8+ além de células natural killer^(12, 44).

O HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4+, induzindo a proliferação espontânea das subpopulações linfocitárias. O vírus se integra ao genoma da célula infectada na forma de provírus. A proliferação espontânea dos linfócitos mantém a infecção por divisão mitótica. Além disso, ocorre uma sinapse virológica, com transferência de partículas virais no contato célula-célula⁽¹²⁾.

No processo da infecção do HTLV-1 a resposta imune aciona células T contra o vírus, o que contribuirá para a eliminação das células infectadas mantendo estável a carga proviral do HTLV⁽¹²⁾. A carga proviral permanece estável na maioria dos indivíduos assintomáticos infectados, sendo menor quando comparada aos indivíduos infectados com HAM/TSP^(45,46). Uma elevada carga proviral (> 5% de células infectadas) está associada ao desenvolvimento das doenças associadas aos indivíduos portadores de HTLV-1⁽⁴⁵⁾. A proliferação é também um dos mecanismos de manutenção da carga proviral, através da mitose de células infectadas pelo HTLV-1. A carga viral mantém a infecção viral por meio da proliferação de linfócitos que portam um provírus e expressam proteínas virais, particularmente Tax⁽¹²⁾. A proteína Tax, uma das proteínas regulatórias do HTLV-1, tem um papel importante nesta proliferação por sua ação transativadora, e é considerada central no processo de proliferação e ativação celular aumentando a transcrição de diversos genes celulares implicados na proliferação (IL-2, IL-15 e o receptor de IL-2) e de proto-oncogenes (c-Fos e c-Jun)⁽⁴⁷⁾. Além disso, Tax estimula a mitose ativando as ciclinas D (CDK4 e CDK6), inibindo as proteínas regulatórias do ciclo celular (p15, p16, p53, pRb) e suprimindo a apoptose pelo aumento de proteínas anti-apoptóticas com Bel-2 e Bel-x⁽⁴⁷⁾. Esta proliferação é policlonal e está presente na maioria dos indivíduos infectados pelo vírus, embora a intensidade de proliferação seja maior em indivíduos com HAM/TSP^(48,49). Existe igualmente uma correlação direta entre a proliferação espontânea de linfócitos e a produção de citocinas inflamatórias como IFN e TNF que tem um papel na patogênese das doenças associadas ao HTLV-1, especialmente a HAM/TSP.

O HTLV resulta em uma infecção persistente, levando a ativação do sistema imune, proliferação das populações de linfócitos T CD4 e T CD8⁽⁴⁹⁾. Os linfócitos T expressam moléculas de ativação como CD 25 e HLA-DR⁽⁴⁶⁾.

2.2.2 HAM/TSP

A HAM/TSP é uma doença neurológica progressiva e debilitante causando paraparesia espástica, que leva a uma perda progressiva da função motora nos membros inferiores. Além disso, os pacientes queixam-se de disfunção da bexiga e do intestino, bem como distúrbios sensoriais superficiais e profundos em extremidades, incluindo parestesias e disestesias. O diagnóstico de HAM/TSP baseia-se numa extensa lista de sinais e sintomas clínicos e critérios laboratoriais, conforme proposto pela Organização Mundial de Saúde, em 1988 e revisado em 1989^(50,51).

Os principais sintomas atribuídos a infecção de pessoas infectadas pelo HTLV-1 são paraparesia espástica ou paraplegia, alterações autonômicas dos esfíncteres com retenção e incontinência urinária ou constipação e disfunção erétil. Alterações sensoriais como parestesia e disestesia nos membros, dificuldades de locomoção, perda do equilíbrio e fadiga muscular⁽⁵¹⁾. Também tem sido registradas em pacientes com HAM/TSP e em indivíduos assintomáticos concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, ou aquelas que induzem a proliferação de linfócitos como IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 E IL-15⁽⁵²⁾.

Não existe um tratamento específico para a infecção pelo HTLV-1 e poucas drogas são disponíveis. A indicação terapêutica é restrita aos grupos sintomáticos, com doenças associadas. A quimioterapia apresenta pouco sucesso no tratamento da ATLL. O uso combinado de antirretroviral, como a zidovudina, associado ao IFN-alfa, tem mostrado alguma atividade, mas a toxicidade e elevado custo limitam seu uso.

Em relação à HAM/TSP, ainda não há um tratamento eficaz. As drogas mais utilizadas são a prednisona, interferon alfa, gamaglobulinas, pentoxifilina, entre outras.

Uma possível estratégia para o tratamento de pacientes infectados por HTLV-1 seria o uso de drogas capazes de controlar a proliferação de linfócitos induzida pelo vírus. Metabólitos

secundários da *P. angulata*, especialmente a Fisaliana F diminui a proliferação espontânea de linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e podem ser promissores ⁽¹¹⁾.

A *P. angulata* é nativa do Brasil e encontra-se disseminada no território e particularmente no Nordeste. É de fácil cultivo e utilizada na medicina popular. Poucos estudos caracterizaram a estrutura anatômica de *P. angulata* e a distribuição tecidual de metabólitos secundários na espécie. A identificação e localização de metabólitos na *P. angulata*, através da caracterização fitoquímica dos extratos dos órgãos vegetativos, podem ser úteis na otimização do processo de extração dos compostos bioativos, bem como na atribuição correta do farmacógeno ou substâncias tóxicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar as estruturas anatômicas vegetais, o perfil fitoquímico dos extratos e avaliar o efeito da *Physalis angulata* em linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever a microscopia dos órgãos de *P. angulata*;
- Realizar triagem fitoquímica dos extratos metanólicos de *P. angulata*;
- Determinar o teor de fenólicos e flavonoides totais dos extratos metanólicos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos através do sequestro do radical livre DPPH;
- Testar o efeito do extrato da *P. angulata* e da Fisalina F sobre a linfoproliferação e ciclo celular.

CAPÍTULO 1

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécie Vegetal

Os indivíduos de *P. angulata* (Figura 1) foram coletados no período vespertino, durante o outono (novembro de 2017) no Horto Florestal Experimental da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brasil. A espécie foi identificada pelo sistemata e curador do Herbário da UEFS Dr. Luciano Paganucci Queiroz. O voucher da espécie *P. angulata* foi depositado no Herbário da UEFS pelo número 110448.



Figura 1: Folha, caule, flor e fruto de *Physalis angulata*. cultivada em campo experimental na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brasil.

4.2 Avaliação anatômica

Três indivíduos de *P. angulata* foram fixados em formaldeído, ácido acético e fixados em álcool 70% (FAA70) na proporção 3:2:1. As folhas (ápice, meio e base), pecíolos, caules e raízes foram embebidos em metacrilato (Historessin Leica) e depois seccionadas em um micrótomo rotativo, Scope Zeiss, usando lâminas de aço descartáveis. As seções paradérmicas das folhas foram obtidas por dissociação utilizando ácido acético e peróxido de hidrogênio 1:1 (v/v) e coradas com safranina. As seções foram em seguida coradas com azul de toluidina 0,05% (m/v) e as lâminas montadas com Entellan (Merck).

A descrição da estrutura anatômica foi realizada de acordo com a classificação de Metcalfe e Chalk (1950)⁽⁵³⁾. A medida da densidade estomática foi feita usando o software ANATI QUANTI⁽⁵⁴⁾. Os cortes foram fotografados em uma câmera QImaging Go-3 acoplada ao fotomicroscópio óptico Olympus BX41. A avaliação anatômica foi realizada no Laboratório de anatomia vegetal e identificação de madeira - LAVIM do Instituto de Biologia da UFBA.

4.3 Avaliação de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Fragmentos das partes aéreas e reprodutivas de *P. angulata* foram fixados com 2,0% (v/v) de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) em tampão cacodilato de sódio (0,1 molL⁻¹, pH 7,2) por 1 h em temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio (0,1 molL⁻¹, pH 7,2). As células foram então fixadas com solução de tetróxido de ósmio por 30 min e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100% v/v). As amostras foram secas até o ponto crítico, método com CO₂, montadas em suportes metálicos (stubs), metalizadas com camada de ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV. A avaliação do MEV foi realizada no Laboratório de microscopia de varredura da Fiocruz.

4.4 Testes fitoquímicos

Os caules, folhas, raízes e frutos foram separados, secos a um peso constante numa estufa com circulação de ar a 36±2 °C (Fanem, Mod. 320-SE) e depois pulverizados num moinho do tipo Wilye (Tecnal, TE 650). Amostras em pó (30g) foram extraídas por maceração com 300 mL de metanol por 72 horas à temperatura ambiente (30 °C). Em seguida, a mistura obtida da maceração foi filtrada (usando filtro de papel Whatman nº 1) e concentrada sob pressão reduzida usando um evaporador rotativo (IKA RV 10 digital) a 40±2 °C. Todos os extratos brutos secos obtidos foram armazenados a 8 °C em recipientes herméticos até a análise.

Para a triagem fitoquímica, foram preparadas soluções metanólicas dos extratos brutos (3,0 mg/mL) que, em seguida, foram submetidas aos respectivos testes. Triagem fitoquímica preliminar qualitativa para metabólitos secundários, tais como flavonoides, cumarinas, taninos, saponosídeos, esteroides e terpenoides, antraquinonas e alcaloides foi realizada de acordo com adaptação de Evans, 1983⁽⁵⁵⁾. Os testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFBA.

4.5 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada utilizando o método de sequestro do radical de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) in vitro⁽⁵⁶⁾. Diluições em série dos extratos de partes de *P. angulata* (0,625, 1,25, 2,5 e 5,0 mg / mL⁻¹) foram preparadas em metanol. Utilizou-se a quercetina como composto de referência/padrão nas mesmas concentrações dos extratos. Assim, 50 µL das amostras ou padrão foram adicionadas a 200 µL de DPPH (0,2 mM) em metanol em placas de microtitulação de 96 poços. A solução de DPPH e o metanol foram usados como branco. A absorbância foi determinada a 517 nm utilizando um leitor de placas de microtitulação (BioRad Elx800), e a percentagem de atividade de eliminação de radicais DPPH (% RSA) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ RSA} = 100 \times [(\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle}].$$

4.6 Determinação de conteúdo fenólico

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada com o método de Folin-Ciocalteu usando o ácido gálico como padrão⁽⁵⁷⁾. Resumidamente, 20 µL de extratos (300 mg L⁻¹) foram misturados com 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu em uma microplaca e agitados por 4 minutos. Em seguida, 75 µL de carbonato de sódio (100 g L⁻¹) foram adicionados. Após 2 h de incubação, no escuro, à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 750 nm no leitor de microplacas BioRad Elx800. O branco de reação foi preparado com H₂O destilada. O resultado do teste foi expresso como o equivalente em ácido gálico (mg GAE / g extrato), calculado através da construção de uma curva analítica usando as diferentes concentrações de ácido gálico (10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 Determinação de conteúdo total de flavonoides (CTF)

A CTF foi medida usando um método espectrofotométrico modificado proposto por Chatatikun e cols⁽⁵⁸⁾. Resumidamente, 50 µL de extratos (1000 mg L⁻¹) ou quercetina foram adicionados a 10 µL de uma solução de cloreto de alumínio a 10% em etanol (p/v), seguido pela adição de 150 µL de etanol a 95% (v/v). O branco foi preparado com etanol 80% (v/v). 10 µL de acetato de sódio 1M foram adicionados à mistura em uma microplaca de 96 poços e

incubados por 40 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. A absorbância foi medida a 415 nm no leitor de microplacas BioRad Elx800. A CTF foi calculada a partir da concentração versus curva de absorbância construída usando quercetina como padrão (5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 µg/mL). Os resultados foram expressos em equivalente quercetina mg g⁻¹ de extrato (mg EQ/g extrato). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma regressão linear foi usada para calcular os valores de IC50. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o método de regressão do software Analyze-it, (Analyze-it Software, Ltd., Reino Unido).

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização anatômica da *P. angulata*

6.1.1 Estômatos

Os tecidos da epiderme da *P. angulata* são constituindo de uma única camada. A epiderme foliar apresenta estrias epicuticulares, paredes sinuosas, anfiestomáticas, estômato do tipo anisocítico. Foram verificados maior concentração de estômatos na face abaxial ($370.1 \pm 152.8 \text{mm}^2$) em relação a face adaxial ($269.2 \pm 167.2 \text{mm}^2$) (Figura 2A).

6.1.2 Tricomas

Tricomas multicelulares tectores e glandulares capitatos foram mais abundantes ao longo das nervuras do pecíolo (Figuras 2 B e C) e do caule (Figuras 2D e E), nas margens das sépalas (Figura 2F) e pétalas (Figura 2G) e dispersos no ovário (Figura 2H). Escassos tricomas tectores (Figura 2I) e glandulares (Figura 2J) foram observados na face adaxial e abaxial na lâmina foliar.

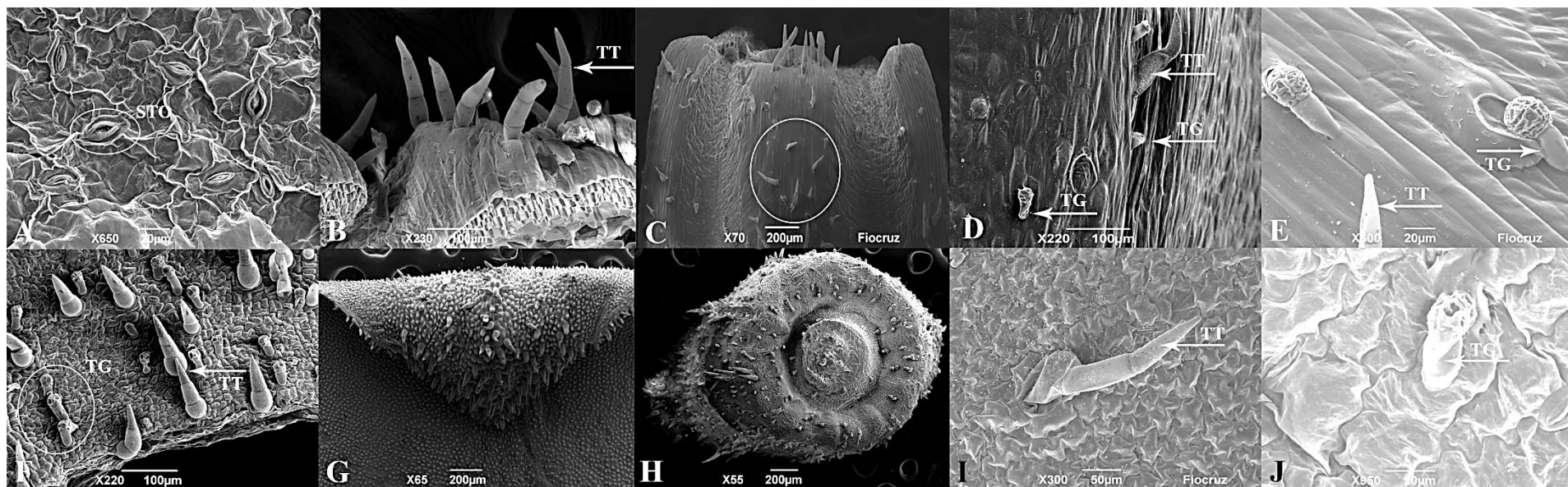


Figura 2: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da epiderme de *Physalis angulata* - Estômatos na folha (A). Tricomas tectores no pecíolo (B). Tricomas agregados nas nervuras dos pecíolos (C) e nos caules (D). Detalhe dos tricomas tectores e glandulares capitados (E); Distribuição de tricomas tectores e glandulares em sépala (F), pétala (G) ovário (H). Detalhe dos tricomas tectores (I) e glandulares (J) na lâmina foliar. STO = estômatos; TT = tricoma tectores; GT = tricoma glandular.

6.1.3 Mesofilo

O mesofilo é dorsiventral (parênquima paliçádico e lacunoso), compreende uma camada de parênquima paliçádico e três camadas de parênquima esponjoso (Figuras 3A-3B). O sistema vascular é bicolateral, isto é o xilema se encontra entre as camadas de floema (Figura 3C). Numerosas drusas, agregados de cristais de oxalato de cálcio, foram distribuídos no parênquima paliçádico e lacunoso (Figura 3D).

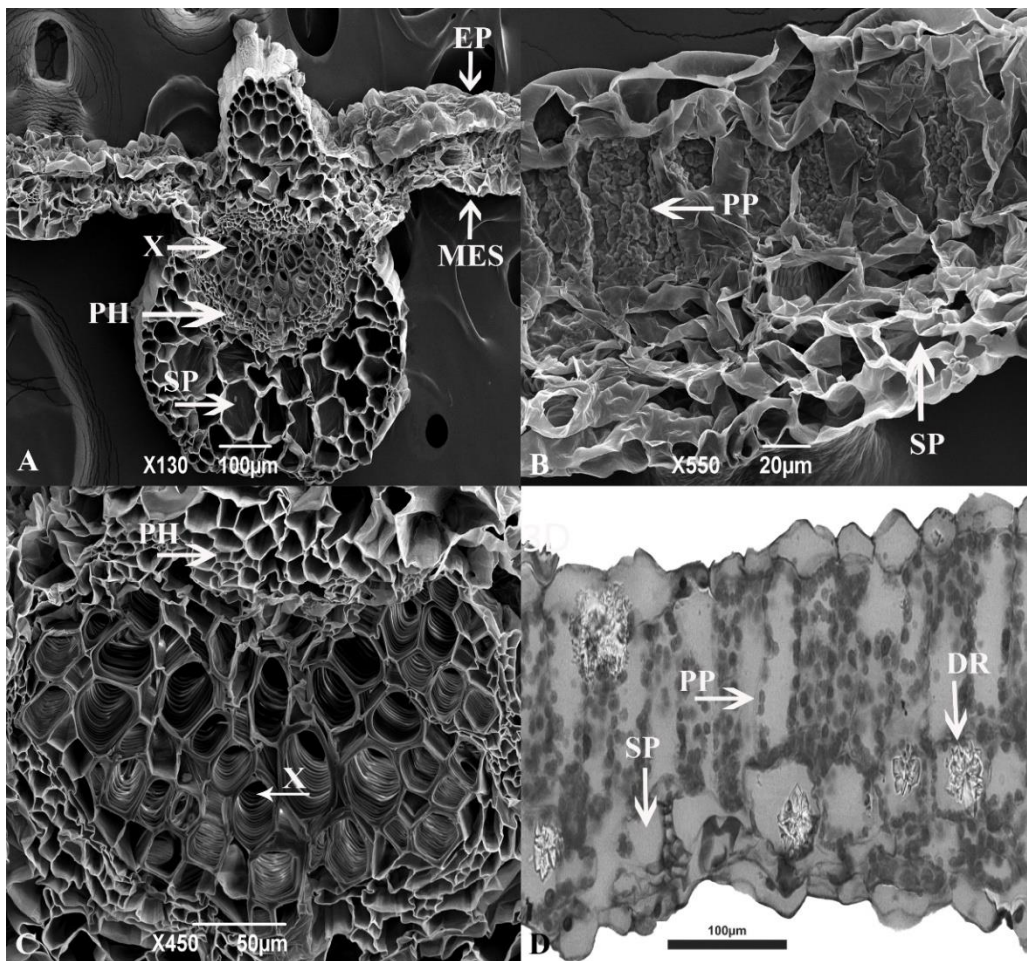


Figura 3 - Detalhes anatômicos da folha de *Physalis angulata*. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de parênquima paliçádico e esponjoso (MES); xilema e floema (A); detalhe do parênquima paliçádico e esponjoso (B) nervura central (floema e xilema); (C). Imagem de microscopia óptica de drusas distribuídas no mesofilo (D). EP = epiderme; PP = parênquima paliçádico; SP = parênquima esponjoso; DR = drusas; X = xilema; PH = floema.

6.1.4 Anatomia do caule

O caule apresenta o tecido do colênquima formado por duas camadas de células, do tipo angular, o córtex apresenta três camadas de células, a medula é fistulosa (Figura 4A), numerosos cristais prismáticos de oxalato de cálcio foram observados no parênquima (Figura 4B).

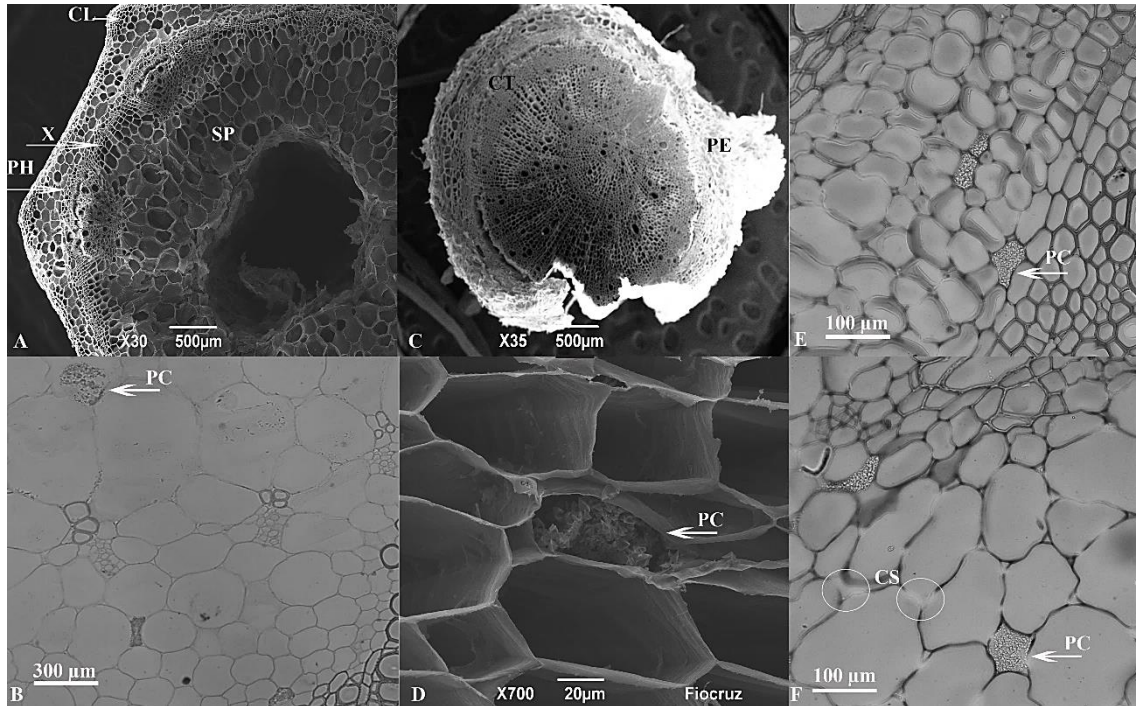


Figura 4: Anatomia do caule e raiz da *P. angulata*. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) imagem de colênquima, córtex (parênquima esponjoso), vasos condutores (xilema e floema), caule fistuloso (A). Cristais prismáticos no parênquima do caule (B). Imagem TEM da raiz (C). Cristais prismáticos (D, E e F) e areias de cristal (F) na raiz..- EP = epiderme; CT = córtex; Ph = floema; X = xilema; SP = parênquima esponjoso; PC = cristais prismáticos; CS = areias cristalinas, PE = periderme.

6.1.5 Raiz

O córtex da raiz apresenta 3 a 4 camadas de células, a medula é preenchida por parênquima (Figura 4C). Numerosas areias cristalinas e cristais prismáticos de oxalato de cálcio foram observados no córtex (Figuras 4D-4F).

6.2 Caracterização fitoquímica da *P. angulata*

Os rendimentos dos extratos metanólicos da raiz, caule, folha e fruto da *P. angulata* foram entre 3,1% e 9,6%. A triagem fitoquímica do extrato em metanol da folha, caule e fruto da *P. angulata* indicou a presença de esteroides, terpenoides e taninos principalmente na folha. Saponinas foram encontradas apenas nos frutos. Flavonoides, antraquinonas e alcaloides não foram detectados pela metodologia utilizada (Tabela 1).

Tabela 1 - Constituintes fitoquímicos identificados na triagem fitoquímica nos extratos metanólicos de diferentes partes de *Physalis angulata*.

Parte da planta	Metabólitos secundários							
	Esteroides	Terpenoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Flavonoides	Antraquinonas	Cumarinas
Folha	+++	+++	++	-	-	-	-	-
Caule	+	+	-	-	-	-	-	+
Raiz	-	-	-	-	-	-	-	++
Fruto	+	-	-	-	++	-	-	-

-: negativo, +: fraco positivo, ++: positivo, +++: forte positivo.

O teor máximo de conteúdo fenólicos (TCF) foi obtido na raiz (30,63 mg EAG/g) e o menor nos extratos dos frutos (26,28 mg EAG/g), (Tabela 2). A equação de ácido gálico e a calibração da curva foi $y = 0.0051x + 0.0802$ ($R^2 = 0.9988$) (Figura 5). A ordem de TCF obtido no extrato foi raiz>caule>folha>fruto, Tabela 2.

Tabela 2 - Conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides presentes em extratos metanólicos de diferentes partes da *P. angulata*.

Parte da planta	Metabólitos secundários	
	Fenólicos (mg EAG / g ext. seco)	Flavonoides (mg EQ / g ext. seco)
Folha	27,39 ± 0.08	32,41 ± 0,015
Caule	30,24 ± 0.056	9,91 ± 0,003
Raiz	30,63 ± 0,058	n.d.
Fruto	26,28 ± 0,055	n.d.

Valores expressos média e desvio padrão (n = 5); n.d.= não determinado; GAE = equivalente de ácido gálico; QE = equivalente quercetina.

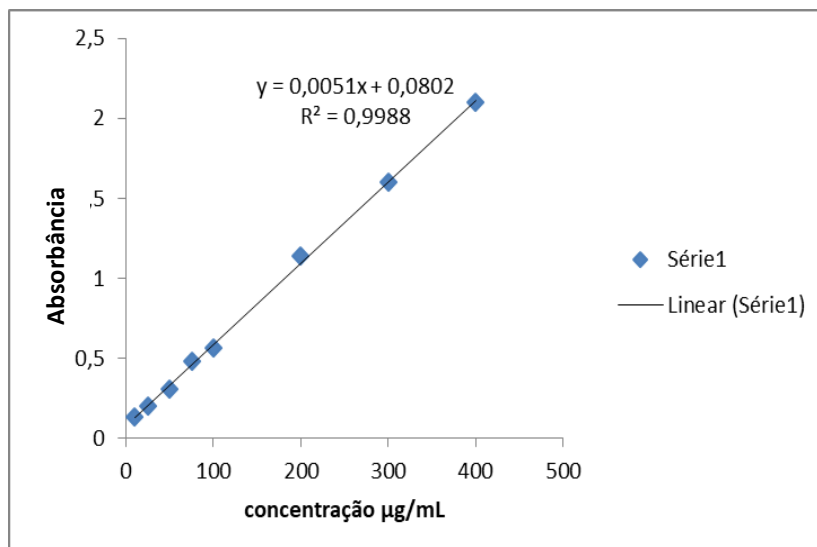


Figura 5 - Curva de calibração obtida com o padrão de *ácido gálico*

Tabela 3 - Parâmetros de validação do método da curva de calibração da do *acido gálico*

Parâmetros	Valores
LQ	8,82 µg.mL ⁻¹
LD	2,91 µg.mL ⁻¹
R ²	0,9988

O limite de detecção (LD) que representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada e o limite quantificação (LQ) que representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental ⁽⁵⁹⁾ foram obtidos através das equações (1) e (2).

$$LD = 3,3 \times Sb/a \quad (1)$$

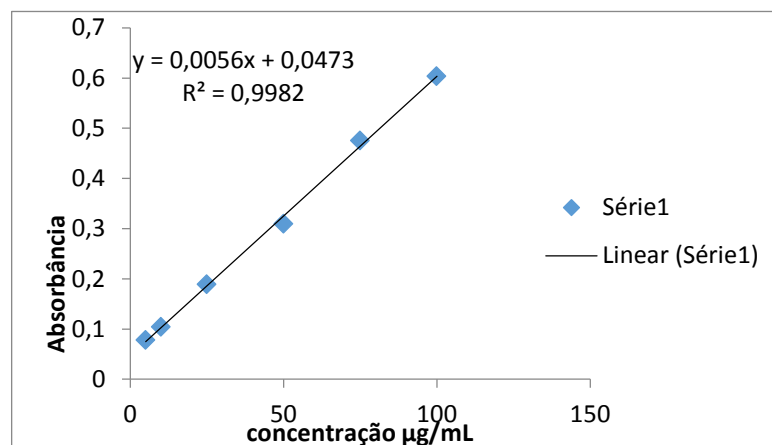
$$LQ = 10 \times Sb/a \quad (2)$$

Em que,

Sb –desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração

a-coeficiente angular da curva de calibração

O extrato da folha apresentou o mais alto conteúdo de flavonoide CTF (32,41 mg EQ/ g de extrato), enquanto nas raízes e frutos foram ausentes, Tabela 2. A equação para Solução padrão de quercetina foi uma curva de calibração: $y = 0,0056x + 0,0473$ ($R^2 = 0,9982$) (Figura 6).

**Figura 6** - Curva de calibração obtida com o padrão de quercetina.

A maior capacidade antioxidante (CA) foi encontrada nos extratos da folha e frutos da *P. angulata* (Tabela 4).

Tabela 4 - Capacidade antioxidante dos extratos dos órgãos de *P. angulata* via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de extratos metanólicos de *Physalis angulata*.

Parte da planta	DPPH (IC₅₀ mg/mL)
Folha	7,24 ± 0.012
Caule	38,05 ± 0.022
Raiz	15,25 ± 0.04
Fruto	8,34 ± 0.014

CI50 (concentração inibitória 50%);

Valores são expressos em média ± desvio padrão (n = 5).

CAPÍTULO 2

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Desenho Experimental

Tratou-se de um estudo experimental, de corte transversal, no intuito de comparar efeito de ação inibitória de Fisalina F e do extrato etanólico do caule da *Physalis angulata* em células de pacientes infectados pelo HTLV- 1.

7.1.1 Material vegetal

Os espécimes de *P. angulata* foram coletados e identificados durante estação seca (de junho a novembro) em Belém, Pará, Brasil. Um espécime de comprovante foi depositado no Herbário do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Pará (Voucher número 15).

7.1.2 Obtenção das fisalinas de *P. angulata*

A fisalina F e o extrato etanólico do caule de *Physalis angulata* foram obtidos através de uma colaboração com o Laboratório de engenharia Tecidual (LETI), Fiocruz. As plantas foram coletadas em Belém do Pará (Brasil). Os extratos foram preparados no Laboratório de Química de Produtos Naturais-PN2-Extração, Isolamento e Purificação, Farmanguinhos-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, como descrito em Soares e colaboradores⁽⁵⁾.

7.1.3 Pacientes

Para o estudo piloto, foram selecionados três indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico de HAM/TSP, provenientes do Centro de Referência de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), durante o período de agosto de 2017 até a abril de 2018. O diagnóstico de HAM/TSP foi determinado pelo neurologista, segundo os critérios de Castro e colaboradores⁽⁶³⁾. Foram excluídos indivíduos em uso de drogas imunomoduladoras (corticosteroides). Como controles (seis) foram selecionados indivíduos da Fundação de Hematologia e hemoterapia da Bahia – HEMOBA com sorologias para HIV, HTLV, Hepatites B e C negativas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da

Fiocruz e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos participantes do estudo.

7.1.4 Obtenção de células

Coletou-se 10 mL de sangue por punção venosa em tubos contendo heparina. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas por gradiente de Ficoll. Para obtenção de linfoblastos, PBMC de doadores não infectados pelo HTLV-1 foram cultivados em presença de 2 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) em meio RPMI e suplementadas com 1 unidade/mL de IL-2 no terceiro dia.

7.1.5 Ensaio da proliferação

As PBMCs dos indivíduo infectados pelo HTLV-1 e linfoblastos dos controles (2×10^5 células) foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640 completo (suplementado com 2 mM glutamina - Sigma, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina - Sigma, 100 µg/mL de HEPES-Invitrogen, 100 µg/mL de aminoácidos não essenciais em presença de diluições seriadas (0 a 100 µM) de Fisalina F e (0 a 100 µg/ml) do extrato de Fisalina e incubados por 48 horas em placas de 96 poços fundo U (COSTAR) a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida as células foram pulsadas por 18h com 1µCi 3H- Timidina. A 3H-Timidina incorporada foi mensurada com líquido de cintilação em beta-counter (Direct Beta Counter, Matrix 9600 – Packard). Os resultados foram apresentados em contagens por minuto (cpm). O índice de estimulação da proliferação foi calculado como mostra a fórmula abaixo:

IE = média CPM [3H] – Timidina incorporada com Fisalina F

IE = média CPM [3H] – Timidina incorporada com pool de Fisalina

IE = média CPM [3H] – Timidina incorporada sem a Fisalina F

IE = média CPM [3H] – Timidina incorporada sem o pool de Fisalina

7.2 Ciclo Celular

PBMC de pacientes com HTLV-1 foram cultivados em meio RPMI em placa de 24 poços, em triplicatas, na presença ou ausência da Fisalina F e do extrato do caule de Fisalinas por 48h a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução PBS-1x e incubadas em uma solução de PBS 1x-0,1 % de triton X-100 e 2 µg/mL de iodeto de propídeo, na ausência de luz por 30 minutos a 37°C. As células foram adquiridas imediatamente por citometria de fluxo FACS Fortessa (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) e analisadas através do software FlowJo (Treestar, Oregon, USA). As fases do ciclo celular estão representadas na Figura 1.

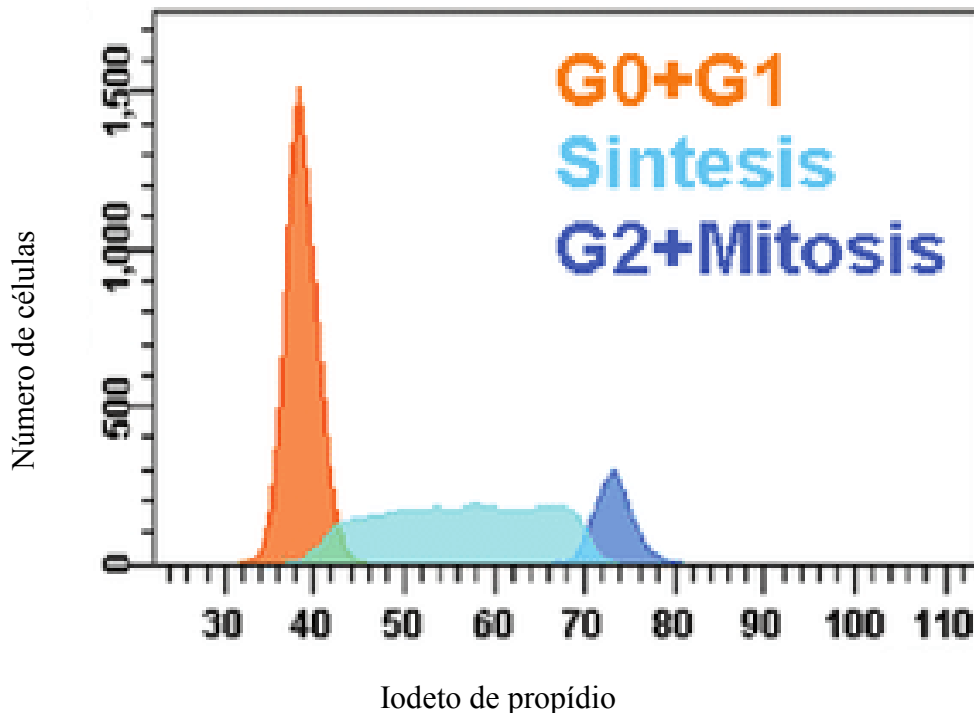


Figura 1 - Histograma representativo das fases do ciclo celular em células marcadas com iodeto de propídeo avaliadas por citometria de fluxo.

7.3 Análises dos dados

As variáveis foram descritas como porcentagem, médias e desvio padrão. Os softwares Graphpad Prism versão 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) e Flowjo (Tree Star) foram utilizados para as análises. A proliferação celular foi calculada considerando a média da

triplicata das cpm. O valor da IC50 foi determinado com base na porcentagem de inibição da proliferação celular e seu cálculo foi efetuado, utilizando-se regressão não-linear no programa GraphPad Prism versão 5.0.

8 RESULTADOS

8.1 Efeito da Fisalina F sobre a proliferação de PBMC de indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1

Quando avaliado o efeito da Fisalina F sobre a proliferação de linfoblastos (PBMC de controles não infectados), observou-se uma inibição superior a 80% nas concentrações de 6, 25 a 100 μM e de cerca de 60% de inibição da proliferação nas concentrações de 3,12 e 1,56 μM para indivíduos não infectados (Figura 2).

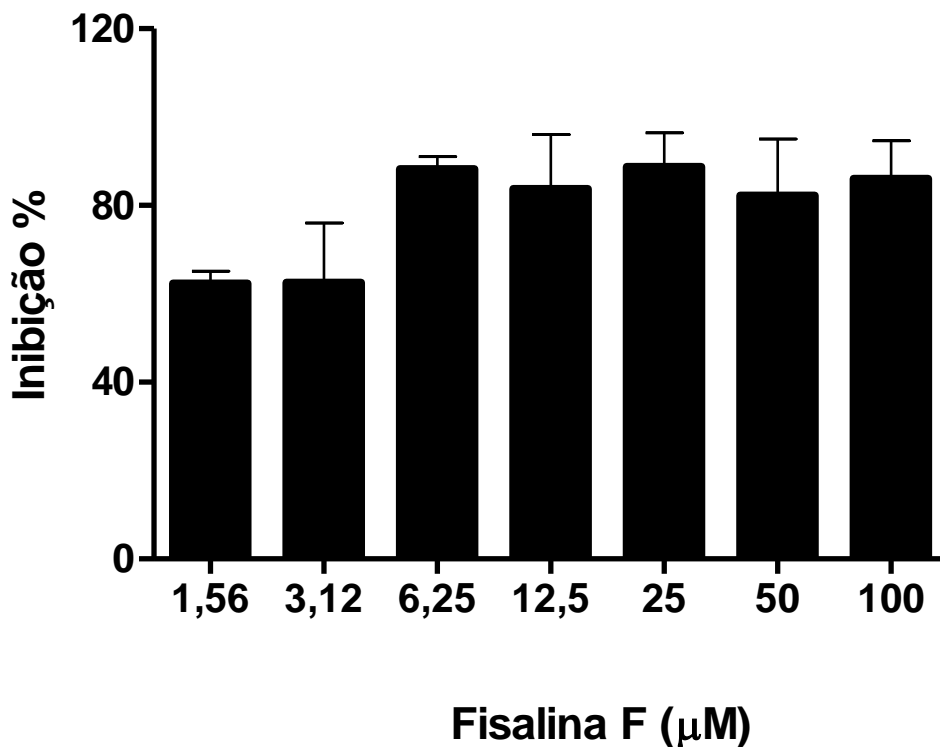


Figura 2 - Inibição da proliferação espontânea de indivíduos de PBMC não infectados pelo HTLV-1 por fisalina F. As PBMC isoladas de três pacientes com diagnóstico HAM/TSP foram cultivadas na ausência e presença de diferentes concentrações (1,56-100 μM) durante três dias. A proliferação celular foi medida por incorporação de 3H-timidina utilizando um contador de radiação b. Valores representam as médias \pm desvio padrão de três pacientes.

Em células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 a Fisalina F inibiu cerca de 100% de proliferação nas concentrações de 100 a 3,12 μM , enquanto que a concentração de 1,56 μM inibiu 54% da proliferação (Figura 3).

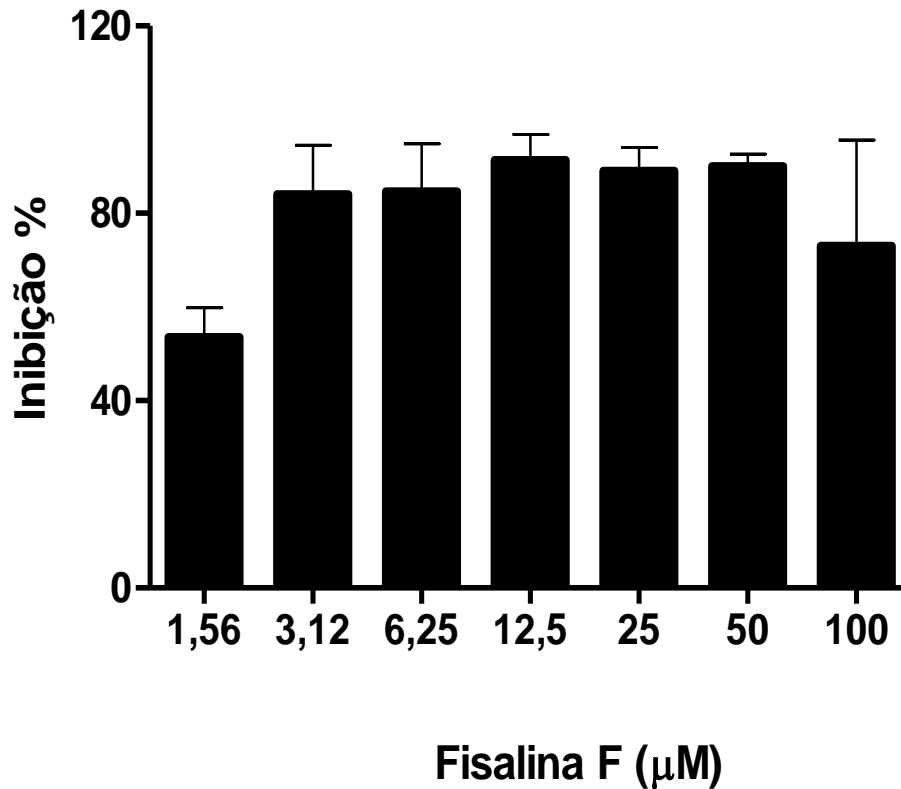


Figura 3 - Inibição da proliferação espontânea de indivíduos de PBMC infectados com HAM/TSP por fisalina F. As PBMC isoladas de três pacientes com diagnóstico HAM/TSP foram cultivadas na ausência e presença de diferentes concentrações (1,56-100 µM) durante três dias. A proliferação celular foi medida por incorporação de 3H-timidina utilizando um contador de radiação b. Valores representam as médias ± desvio padrão de três pacientes.

Para melhor determinar a IC50 da Fisalina F, foi realizada uma nova avaliação com diluições menores que as anteriores, de 0,15 a 10 µM, em que foi possível estabelecer a IC50 de 3,0 µM.

Analisando o ciclo celular na presença de Fisalina F a IC50 3,0 µM (Figura 4, tabela 5), foi possível observar uma diminuição da frequência de células na fase G2/M no PBMC do indivíduo infectado em comparação às PBMC na ausência de Fisalina F e aumento na frequência de células na fase subG0.

Ciclo celular

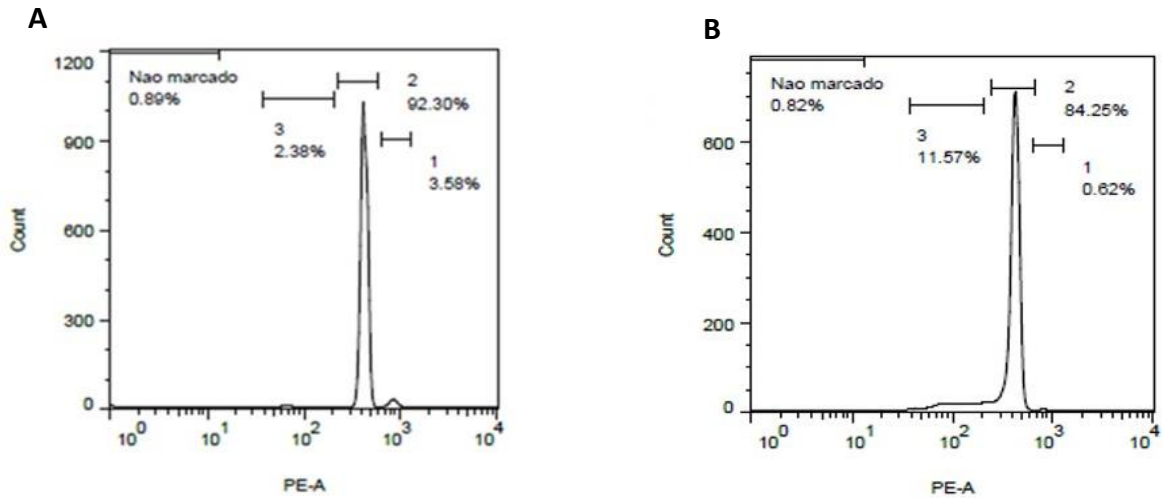


Figura 4 - Efeito da Fisalina F sobre o ciclo celular de um indivíduo infectado pelo HTLV-1: A- PBMC do indivíduo infectado cultivado em meio de cultura por 48 horas (controle), B- PBMC do indivíduo infectado cultivado na presença de (IC50) 3,0 μ M de Fisalina F por 48 horas. 3= fase subG0, 2= fase G0/G1 e 1= fase G2/M.

8.2 Efeito do extrato etanólico do caule de *Physalis angulata* sobre a proliferação de PBMC de indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1

O extrato etanólico do caule de *Physalis* demonstrou uma atividade de inibição de quase 50% com a menor concentração avaliada (1,56 μ g) e mais de 60% a partir de 3,12 μ g em células de controles não infectados pelo HTLV-1 (Figura 5).

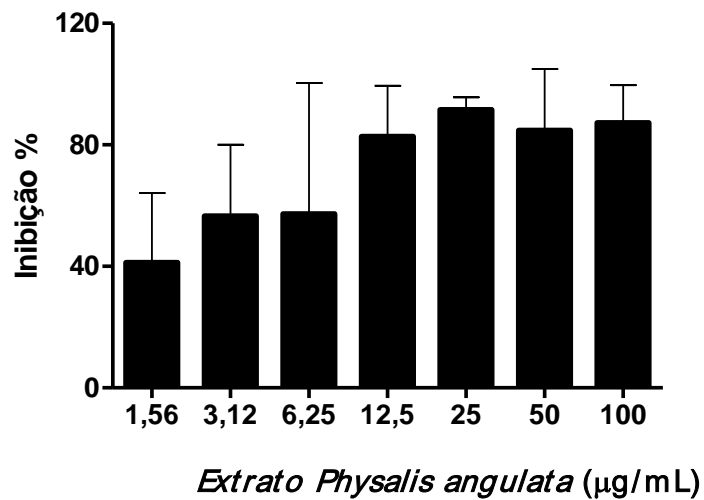


Figura 5: Inibição da proliferação espontânea de PBMC de indivíduos não infectados pelo HTLV-1 pelo extrato de *Physalis angulata*. As PBMC isoladas de três pacientes com diagnóstico HAM/TSP foram cultivadas na ausência e presença de diferentes concentrações (1,56-100 µM) durante três dias. A proliferação celular foi medida por incorporação de 3H-timidina utilizando um contador de radiação b. Valores representam as médias ± desvio padrão de três pacientes.

Em células de indivíduos infectados pelo HTLV, a inibição foi cerca de 70% para todas as concentrações avaliadas (Figura 6).

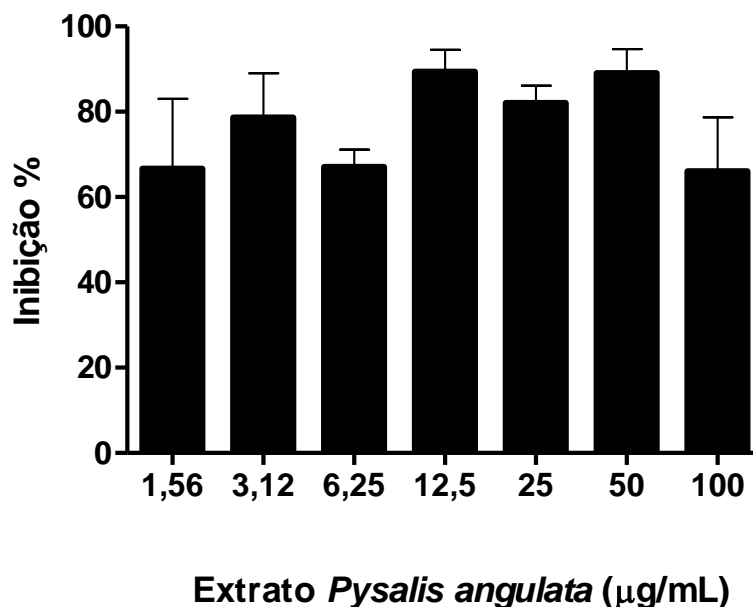


Figura 6: Inibição da proliferação espontânea de PBMC de indivíduos com HAM/TSP pelo extrato de *Physalis angulata*. As PBMC isoladas de três pacientes com diagnóstico HAM/TSP foram cultivadas na ausência e presença de diferentes concentrações (1,56-100 µM) durante três dias. A proliferação celular foi medida por incorporação de 3H-timidina utilizando um contador de radiação b. Valores representam as médias ± desvio padrão de três pacientes.

Para melhor determinar a IC50 do extrato de *P. angulata* foi realizada uma nova avaliação com diluições menores que as anteriores, de 0 a 10 μM , em que foi possível estabelecer a IC50 de 7,0 μg .

Analisando o ciclo celular na presença de extrato de *P. angulata* a IC50 7,0 μg (Figura 7, tabela 5), foi possível observar uma diminuição da frequência de células na fase G2/M no PBMC do indivíduo infectado em comparação às PBMC na ausência de Fisalina F e aumento na frequência de células na fase subG0.

Ciclo celular

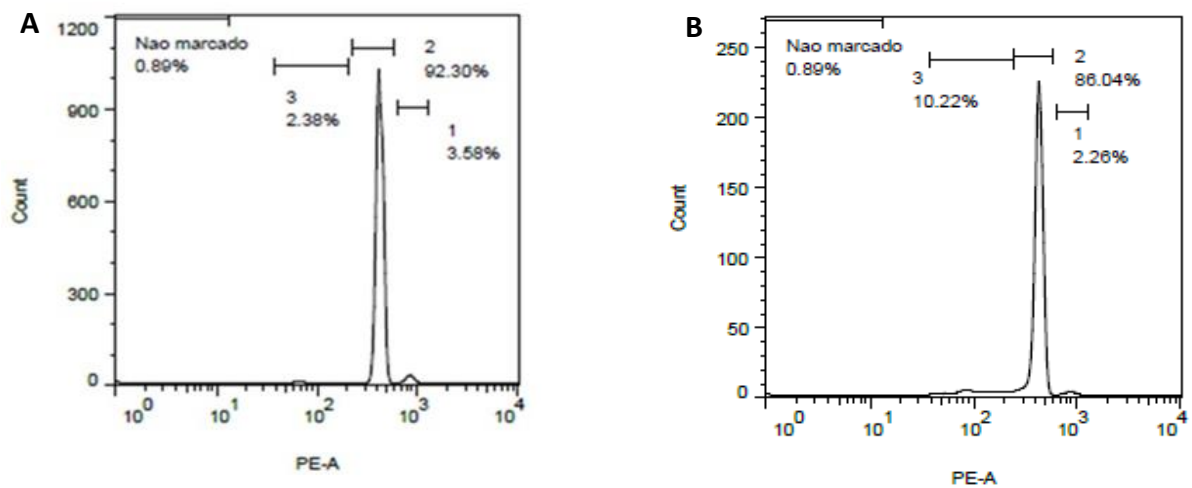


Figura 7: Efeito do extrato etanólico do caule de *P. angulata* sobre o ciclo celular de um indivíduo infectado pelo HTLV-1. : A- PBMC do indivíduo infectado cultivado em meio de cultura por 48 horas (controle), B- PBMC do indivíduo infectado cultivado na presença de (IC50) 7,0 μM de Fisalina F por 48 horas. 3= fase subG0, 2= fase G0/G1 e 1= fase G2/M.

Tabela 5: Valores comparativos das fases de divisão do ciclo celular da Fisalina F e do extrato etanólico do caule da *P. angulata*.

Condição	Fase sub G0	Fase G1	Fase G2M
Controle	2,38 %	92,30%	3,58%
Fisalina F	11,57%	84,25%	0,62%
Extrato etanólico do caule de <i>P.angulata</i>	10,22%	86,04%	2,26%

9 DISCUSSÃO

Até o momento, apenas alguns estudos anatômicos foram relatados em *P. angulata* e estes são baseados exclusivamente em microscopia óptica (64-66). Neste trabalho, uma descrição anatômica abrangente de *P. angulata* foi realizada por meio de análise por microscopia eletrônica de varredura. De acordo com relatos anteriores sobre *P. angulata*, estômatos foram encontrados em ambas as faces da epiderme foliar, com maior número na face abaxial (64-67). Fatores ambientais como clima pode interferir na distribuição, na morfologia e densidade dos estômatos. No presente estudo, os estômatos foram identificados como anisocíticos e protrusivos, divergindo dos demais relatos que também encontraram estômatos anomocíticos esporadicamente (64). O tipo de estômato é considerado constante, já que é uma característica genética da espécie, no entanto pode ocorrer uma variação de tipo de estômatos no decorrer do desenvolvimento e na maturidade do vegetal em alguns táxons (68). Os tipos de seções realizadas no limbo foliar, para observação dos tipos de estômatos, também podem apontar uma diferença quando comparadas as metodologias utilizadas nos estudos sobre classificação de estômatos.

Os tricomas glandulares desempenham um papel central na produção de produtos químicos e farmacêuticos úteis. No presente estudo, os tricomas glandulares capitados e os tricomas tectores foram agregados na nervura média dos pecíolos e dos caules. Este padrão de distribuição está presente na *Withania somnifera* da família Solanaceae e tem sido associado à proteção do tecido vascular subjacente (69). Além disso, esse padrão pode estar associado a um melhor acesso a nutrientes e produtos químicos provenientes dos feixes vasculares, já que os metabólitos primários que circulam nos vasos condutores auxiliam na formação dos metabólitos secundários. Dentro de Solanaceae, metabólitos secundários como alcaloides e compostos fenólicos são sintetizados nas raízes e transportados para as folhas. Os tricomas glandulares estão, portanto, localizados nas veias médias para facilitar o sequestro desses compostos (69).

Na estrutura da flor da *P. angulata* foram evidenciados tricomas tectores nas margens das sépalas, pétalas e dispersos no ovário. No geral, poucos tricomas tectores e glandulares foram observados em todas as partes de *P. angulata*. Eles estão em menor número quando comparados com outras espécies de *Physalis* (*P. peruviana* e *P. pubescens*) ou outras espécies

de Solanaceae^(65,70). No entanto, a presença de tricomas simples descritas por Silva e Wahua^(65, 66) não foi observada no presente estudo.

Os tricomas são estruturas especializadas distribuídas na epiderme das plantas, enquanto os tricomas tectores regulam a transpiração, os glandulares estão envolvidos na secreção e / ou armazenamento de vários metabólitos secundários, como terpenoides, alcaloides, taninos⁽⁷¹⁾. Os metabólitos secundários podem proteger a planta pela repelência de herbívoros e patógenos, ou promover a disseminação da amostra através de um efeito alelopático nas plantas vizinhas. Mais importante, esses metabólitos secundários têm um grande potencial farmacológico.

A anatomia do parênquima da folha, caule e raiz foi semelhante à descrita anteriormente⁽⁶⁴⁾. Em relação às estruturas vasculares, feixes bicolaterais foram encontrados em folhas e caules de *P. angulata*, como relatado anteriormente em Solanaceae⁽⁷²⁾. No presente estudo, a medula dos caules apresentou fistulada em todas as partes avaliadas (ápice, meio e base), o que contrasta com o relato anterior de medula preenchida⁽⁶⁵⁾. Vale ressaltar que diferenças anatômicas entre estudos podem ser atribuídas a fatores abióticos de ambientes diversos, além de cortes histoquímicos podem apresentar diferenças entre caules jovens e maduros.

Vários cristais de oxalato de cálcio em forma de drusas foram encontrados no tecido do parênquima das folhas e do córtex do caule da *P. angulata*, enquanto cristais prismáticos foram apresentados no córtex da raiz. A formação de cristais é um processo fisiológico observado em espécies de plantas que regulam a dinâmica do cálcio em tecidos e órgãos. Esse processo tem um papel na proteção contra herbivoria e a desintoxicação de metais pesados⁽⁷³⁾. Cristais prismáticos tem sido observados em tecidos de folhas de espécies das Solanaceas como o tomate (*Solanum lycopersicum*) e o tabaco (*Nicotiana tabacum*)⁽⁷⁴⁾.

É bem conhecido que a composição química dos extratos dos gêneros das Solanaceas apresenta variação qualitativa e quantitativa bem como em tecidos da mesma espécie⁽⁷⁵⁾. Do ponto de vista da bioprospecção, é importante determinar a composição fitoquímica de diferentes tecidos dentro da mesma espécie, para permitir procedimentos de isolamento dos compostos mais eficientes. Portanto, verificou-se por triagem qualitativa a presença de categorias de metabólitos secundários em órgãos específicos de *P. angulata*, facilitando assim

futuros estudos farmacológicos. Foram verificadas presença de esteroides, terpenoides e taninos principalmente nas folhas de *P. angulata* (Tabelas 1 e 2).

Esses resultados estão de acordo com estudos fitoquímicos que revelaram que os vitanolideos (esteroides) são marcadores quimiotaxonômicos bem estabelecidos em Solanaceae⁽⁷⁶⁾. Os vitanolideos são os principais tipos de metabólitos secundários de *Physalis* sp com cerca de 60 tipos sintetizados, especialmente fisalinas, ixocarbalactonas e acnistinas^(75,77). As propriedades biológicas dos vitanolideos incluem ações contra células tumorais^(6,7,78,79) parasitas como *T. cruzi* and *Leishmania*⁽⁹⁾, além das ações antimicrobianas⁽⁷⁰⁾; atividades imunomoduladoras e anti-inflamatórias⁽⁸⁰⁾. Outros esteroides como β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e metileno-colesterol podem também ser encontrados no gênero⁽⁴⁾.

Os alcaloides são uma classe de metabólitos secundários abundantes nas Solanaceas, particularmente os variantes tropânicos, esteroidais, indólicos, pirrolidínicos e imidazóis⁽⁷⁶⁾. O processo de isolamento e identificação de alcaloides em *Physalis* pode ser um desafio, pois o isolamento e a identificação de alcaloides N-trans-Feruloiltiramina, N-p-Coumaroiltiramina e figrina foram relatados em pelo menos uma espécie do gênero (*P. alkekengi* var. *franchetii*)^(75,81).

No presente estudo, no entanto, alcaloides não foram detectados em todos os tecidos investigados (Tabela 1). Isto sugere que a concentração de alcaloides em *P. angulata* pode estar muito baixa e, portanto, não detectado pelo método empregado⁽⁸²⁾. Variações sazonais também interferem no conteúdo químico do vegetal, afetando a síntese dos metabólitos secundários.

O presente estudo identificou a presença de terpenóides em folhas de *P. angulata*. Terpenoides são essenciais para sobrevivência da planta. Estes compostos foram associados as propriedades antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, antiviral e antihiperglicêmica, anti-hipoglicêmicas, antiinflamatórias e imunomoduladoras⁽⁸²⁾. Exceto para carotenoides, os terpenoides são raros em *P. angulata*, em contraste, dois estudos têm isolado diterpenoides labdano de *P. coztomatl* e *P. sordida*^(83, 84).

Do ponto de vista farmacológico, as fisalinas (vitanolideos) são os compostos mais atrativos em *P. angulata*. Estes compostos esteroides são derivados do metabolismo dos terpenoides. A

presença de terpenoides em tricomas vegetais tem sido bem documentada em Solanaceae⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾, bem como outras famílias de plantas, incluindo Lamiaceae⁽⁸⁸⁾ e Asteraceae⁽⁸⁹⁾. Outras espécies, como *Petunia hybrida*, acumulam compostos esteroides funcionais (inseticidas) em tricomas⁽⁹⁰⁾. Portanto, é possível que os tricomas glandulares em *P. angulata* abriguem o local para a síntese de fisalinas.

Este estudo encontrou que os tricomas em *P. angulata* estão em menor número quando comparados com outras espécies de *Physalis* (*P. peruviana* e *P. pubescens*) ou outras espécies de Solanaceae^(64, 65). Esta observação aponta para uma perspectiva de utilizar a engenharia genética para aumentar a densidade do tricomas na *P. angulata*^(86, 91) e consequentemente a produção de fisalina. Esta abordagem tem sido usada com sucesso em canola transgênica^(91, 92). Esta aplicação prática prospectiva destaca a importância de estudos anatômicos acoplados à caracterização qualitativa fitoquímica em espécies com potencial farmacológico.

Compostos fenólicos (incluindo flavonoides) são metabólitos secundários que podem reagir com radicais livres na célula, conferindo propriedades antioxidantes que têm o potencial de inibir processos patológicos e degenerativos, como o câncer. A quantidade de compostos fenólicos totais e flavonoides, bem como a capacidade antioxidante encontrada no presente estudo foram ligeiramente inferiores aos relatados conforme (Quadro 1). Uma comparação dos valores absolutos entre esses estudos é limitada devido a diferenças metodológicas na quantificação de compostos, produção de extrato e tipos de partes de plantas estudadas. Anteriormente, extratos de *P. angulata* demonstraram possuir atividade antioxidante relevante, apresentando um efeito antitumoral em células humanas de câncer bucal⁽⁹³⁾ e na inflamação intestinal em um modelo de camundongo⁽⁹⁴⁾.

Um mecanismo para a possível inibição da carcinogênese por compostos fenólicos ainda não está claro; no entanto, as propriedades antioxidantes podem desempenhar um papel importante bloqueando os eventos moleculares envolvidos em todos os estágios do desenvolvimento do câncer⁽⁹⁵⁾.

Quadro 1 - Valores de conteúdos totais de fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante encontrados nos estudos em referências.

Partes	CFT*	CTF	Capacidade antioxidante	Referencia
Folhas	40,51 mg equivalentes de ácido gálico/g tecido seco	23,036 mg/g de tecido seco	2,44 mg de equivalentes de ácido ascorbico/ mL	(60)
Folhas	0,47 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato aquoso 0,49 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato etanólico	Não realizada	2,875 mg de extrato aquoso/g equivalentes de BHA 4,311 mg extrato etanólico/g equivalentes de BHA	(61)
Frutos	36,92 mg equivalentes de ácido gálico/g de tecido seco	Não detectável	0,92 mg equivalentes de ácido ascorbico/mL	(60)
Frutos	0,46 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato aquoso 0,51 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato etanólico	Não realizada	1,575 mg extrato aquoso/g equivalentes de BHA. 2,258 mg de extrato etanólico/g equivalentes de BHA.	(61)
Cálices	33,18 mg equivalentes de ácido gálico/g de tecido seco	8,829 mg/g de tecido seco	2,10 mg equivalentes ácido ascórbico//mL	(52)
Caules jovens, folhas e frutos	0,20 mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco	Não realizada	0,41 µmol de Trolox equivalentes em capacidade antioxidante por grama de peso fresco	(62)

CFT: Conteúdo fenólico total; CTF: Conteúdo total de flavonoides; * BHA= terc-butil-hidroxianisol

Neste estudo, a maior capacidade antioxidante foi identificada em extratos obtidos de folhas e frutos de *P. angulata*. Níveis de capacidade antioxidante estão positivamente associados com a quantidade de fenólicos, como derivados de flavonoides, taninos e tetraterpenos (carotenoides) e compostos aromáticos presentes em um determinado extrato. Curiosamente, os flavonoides não foram detectados em frutos e raízes, isso é consistente com os achados de Medina-Medrano⁽⁶⁰⁾, que também não acusaram flavonoides em frutos de *P. angulata* (Tabela 4).

Assim, outros compostos, como os carotenoides, podem ser responsáveis pela capacidade antioxidante observada nesses extratos. Os extratos que apresentaram as maiores atividades antioxidantes (IC50 7,24±0,0012 em folhas; 8,34±0,014 em frutos) apresentou também maior

conteúdo de flavonoides nas folhas ($32,41 \pm 0,015$). Estudos sobre determinação de conteúdo fenólico ou capacidade antioxidante em espécies de *Physalis* têm sido focados principalmente em frutas. Por exemplo, a *Golden berry* (fruta da *P. peruviana*) é um dos frutos tropicais mais promissores em termos de exploração comercial, por ser uma fruta exótica que tem muitas aplicações medicinais e alimentares^(60, 96).

No presente estudo foi possível igualmente avaliar o efeito do extrato etanólico do caule da *P. angulata* e da Fisalina F sobre a linfoproliferação de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

A IC₅₀ para Fisalina F foi de 3,0 μ M. Autores averiguaram IC₅₀ mais baixo de 0,97 μ M de Fisalina F, em atividades de redução de proliferação em células infectadas pelo HTLV-1⁽¹⁰⁾. A Fisalina F mostrou uma potente atividade sobre a proliferação de células de indivíduos infectados, induzindo a apoptose de PBMCs e reduzindo a produção de IL-2, IL-6, IL-10, TNF e IFN-gama⁽¹¹⁾. Verificou-se que pesquisa com Fisalina F em atividade de inibição em células de HTLV 1 é escassa. O potencial de inibição de Fisalina F vem sendo analisado em várias atividades antitumoral em camundongos, além de atividades antineoplásicas em linhagens de células cancerígenas humanas⁽⁷⁸⁾.

O IC₅₀ do extrato etanólico do caule foi de 7,0 μ g/ml e não se registram pesquisas com extratos de *P. angulata*, em atividade de inibição em células de HTLV 1. Os estudos com potencial de inibição dos extratos de *P. angulata* foram verificados em várias atividades anti-*T.cruzi*, apresentando valores de IC₅₀ de 2,9 e 7,4 μ g/ml na inibição da proliferação em epimastigotas. Outros estudos realizados com extrato de *P. angulata* tratam-se de atividade anti-leishmania⁽⁹⁷⁾ e atividade anti-inflamatória intestinal⁽⁹⁴⁾.

A Fisalina F e o extrato etanólico do caule de *P. angulata* foram igualmente capazes de inibir a proliferação de linfoblastos (células não infectadas pelo HTLV-1) estimuladas pelo mitógeno fitohemaglutinina.

O extrato de *Physalis* apresentou um efeito inibitório sobre a proliferação de indivíduos infectados pelo HTLV-1, aumentando a proporção de células em fase G₀/G₁, em repouso, inibindo a proliferação e reduzindo a porcentagem de células em mitose.

O custo e a facilidade da obtenção do extrato de *P. angulata* constituem-se em alternativa viável para a pesquisa em relação a obtenção de fisalina isolada, em que o isolamento além de ser dispendioso proporciona baixo rendimento.

10 CONCLUSÕES

- 1) A análise anatômica de *P. angulata* demonstrou a distribuição de tricomas tectores e glandulares no pecíolo, caule, sépalas e pétalas, estruturas que podem ser o local de produção e acúmulo de fisalinas;
- 2) Os vitaesteroides encontrados nos extratos, principalmente na folhas, da *P. angulata*, destacam-se como grandes potenciais para atividades anti-inflamatória, iminomoduladora e antitumorais.
- 3) As propriedades antioxidantes da *P. angulata* confirmam o potencial desta planta como fonte de compostos úteis que poderiam ser usados contra patologias relacionadas ao desequilíbrio oxidativo celular, como alguns tipos de câncer;
- 4) O extrato do caule de *P. angulata* apresenta um efeito inibitório sobre células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 semelhante a Fisalina F, diminuindo a proporção de células em divisão celular.

11 PERSPECTIVAS

Quantificar o teor de Vitamina C e carotenoides no extrato da raiz, caule, folha e fruto na *P. angulata*;

Comparar o potencial farmacológico da *P. angulata* com outras espécies de *Physalis* (*P. ixocarpa* e *P. peruviana*);

Aumentar o número de indivíduos avaliados para confirmar o efeito inibitório do extrato do caule da *Physalis angulata* sobre células infectadas pelo HTLV-1;

Determinar o grau de necrose e apoptose induzidas pelo extrato do caule da *P. angulata* sobre células infectadas pelo HTLV-1.

REFERÊNCIAS

1. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. 2^{sd} ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum; 2008.
2. Lan Y-H, Chang F-R, Pan M-J, Wu C-C, Wu S-J, Chen S-L, et al. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. Food Chem. 2009 2009/09/15/;116(2):462-9.
3. Lashin II, Elhaw MH. Evaluation of secondary metabolites in callus and tissues of *Physalis peruviana*. J Mod Bot. 2016;6(1):10-7.
4. Tomassini TCB, Barbi NS, Ribeiro IM, Xavier DCD. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. Química Nova. 2000;23:47-57.
5. Soares MB, Bellintani MC, Ribeiro IM, Tomassini TC, Ribeiro Dos Santos R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. European Journal of Pharmacology. 2003 Jan 10;459(1):107-12.
6. Chiang HC, Jaw SM, Chen PM. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. Anticancer Res. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1992 Jul-Aug;12(4):1155-62.
7. Wu SJ, Ng LT, Chen CH, Lin DL, Wang SS, Lin CC. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. Life Sci. [Comparative Study]. 2004 Mar 5;74(16):2061-73.
8. Meira CS, Guimaraes ET, Bastos TM, Moreira DR, Tomassini TC, Ribeiro IM, et al. Physalins B and F, seco-steroids isolated from *Physalis angulata* L., strongly inhibit proliferation, ultrastructure and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 2013 Dec;140(14):1811-21.
9. Guimaraes ET, Lima MS, Santos LA, Ribeiro IM, Tomassini TB, Ribeiro Dos Santos R, et al. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. J Antimicrob Chemother. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Jul;64(1):84-7.
10. Sa MS, De Menezes MN, Krettli AU, Ribeiro IM, Tomassini TC, Ribeiro Dos Santos R, et al. Antimalarial activity of physalins B, D, F, and G. J Nat Prod. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Oct 28;74(10):2269-72.
11. Pinto LA, Meira CS, Villarreal CF, Vannier-Santos MA, De Souza CV, Ribeiro IM, et al. Physalin F, a seco-steroid from *Physalis angulata* L., has immunosuppressive activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV1-associated myelopathy. Biomed Pharmacother. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2016 Apr;79:129-34.
12. Asquith B, Bangham CR. Quantifying HTLV-I dynamics. Immunol Cell Biol. 2007 Jun;85(4):280-6.

13. Gessain A, Vernant J, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender AD. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *The Lancet*. 1985;326(8452):407-10.
14. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(10):6476-80.
15. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res*. 1992;83(3):236-9.
16. Lagrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1990 Dec 1;336(8727):1345-7.
17. Taylor GP. Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. Sexually transmitted infections. [Review]. 1998 Oct;74(5):316-22.
18. Rafatpanah H, Rezaee A, Etemadi MM, Hosseini RF, Khorram B, Afsahr L, et al. The impact of interferon-alpha treatment on clinical and immunovirological aspects of HTLV-1-associated myelopathy in northeast of Iran. *Journal of neuroimmunology*. [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Sep 15;250(1-2):87-93.
19. Waclawik AJ, Fadic R, Lotz BP, Beinlich BR, Lewandoski PJ, Sanjak M, et al. CD8 and CD4 T cell-mediated polymyositis complicating the HTLV-1 associated myelopathy. Quantitative evaluation of corticosteroid treatment. *Acta neurologica Scandinavica*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1996 Aug;94(2):115-9.
20. Fournet A, Mahieux R, Fakhfakh MA, Franck X, Hocquemiller R, Figadere B. Substituted quinolines induce inhibition of proliferation of HTLV-1 infected cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2003 Mar 10;13(5):891-4.
21. Grassi F, Guimaraes Correa AB, Mascarenhas RE, Galvao B, Seon-Meniél B, Schmidt F, et al. Quinoline compounds decrease in vitro spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-infected patients. *Biomed Pharmacother*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Sep;62(7):430-5.
22. Lanna JM, Da Silva LaE, Morim MP, Leitman PM, Queiroz NO, Filardi FLR, et al. Herbarium collection of the Rio de Janeiro Botanical Garden (RB), Brazil. *Biodiversity data journal*. 2018(6):e22757.
23. Coppetec-Ufrj. Redeflora. 2010 [cited 2018 15 de janeiro]; Available from: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=62D440FB1AE47605BE0C1638B66FE657>.
24. Su B-N, Misico R, Jung Park E, Santarsiero BD, Mesecar AD, Fong HHS, et al. Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. *Tetrahedron*. 2002 2002/04/22/;58(17):3453-66.

25. Qiu L, Zhao F Fau - Jiang Z-H, Jiang Zh Fau - Chen L-X, Chen Lx Fau - Zhao Q, Zhao Q Fau - Liu H-X, Liu Hx Fau - Yao X-S, et al. Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their inhibitory effects on nitric oxide production. 2008(0163-3864 (Print)).
26. Eich E. Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Wyd XIV, Berlin. 2008:153–60.
27. De Rosso VV, Mercadante AZ. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. 2007(0021-8561 (Print)).
28. He QP, Ma L Fau - Luo J-Y, Luo Jy Fau - He F-Y, He Fy Fau - Lou L-G, Lou Lg Fau - Hu L-H, Hu LH. Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* L. 2007(1612-1880 (Electronic)).
29. Damu AG, Kuo Pc Fau - Su C-R, Su Cr Fau - Kuo T-H, Kuo Th Fau - Chen T-H, Chen Th Fau - Bastow KF, Bastow Kf Fau - Lee K-H, et al. Isolation, structures, and structure - cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. 2007(0163-3864 (Print)).
30. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980;77(12):7415-9.
31. Kalyanaraman V, Sarngadharan M, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo R. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science. 1982;218(4572):571-3.
32. Calattini S, Chevalier S, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. Retrovirology. 2005;2(1):30.
33. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(22):7994-9.
34. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front Microbiol. [Review]. 2012 2012-November-15;3.
35. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene. 2005;24(39):6058-68.
36. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, Da Gloria Teixeira M, Galvao-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. J Acquir Immune Defic Syndr. 2003;34(5):527-31.
37. Mueller N. The epidemiology of HTLV-I infection. 1991(0957-5243 (Print)).

38. S Andrade-Filho A, Brites C, Dos-Santos SRS, Harrington Júnior W, Reinhardt ICB, Freitas FMS, et al. HTLV-I/II as a common etiology of myelopathies in Bahia, Brazil 1996.
39. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 1326, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de agosto de 1989, que aprova normas técnicas para a coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados; e dá outras providências [Internet]. Brasília: Agência de Vigilância Sanitária; 1993. 1993: Available from: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1376-93.pdf>.
40. Nunes D, Boa-Sorte N, Grassi MF, Taylor GP, Teixeira MG, Barreto ML, et al. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171303.
41. Mota A, Nunes C, Melo A, Romeo M, Boasorte N, Dourado I, et al. A case-control study of HTLV-infection among blood donors in Salvador, Bahia, Brazil - associated risk factors and trend towards declining prevalence. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2006;28:120-6.
42. Moxoto I, Boa-Sorte N, Nunes C, Mota A, Dumas A, Dourado I, et al. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007;40:37-41.
43. Mf; G, Rem; M, Bg C. Imunossupressão em indivíduos em indivíduos infectados pelo htl: possíveis mecanismos imunológicos. *Gaz méd Bahia* 2009;79(1):56-60.
44. Prince HE, York J, Golding J, Owen SM, Lal RB. Spontaneous lymphocyte proliferation in human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infection: T-cell subset responses and their relationships to the presence of provirus and viral antigen production. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1994;1(3):273-82.
45. Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LC, et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J Med Virol*. 2011;83(7):1269-74.
46. Olindo S, Lezin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana Kaptue M, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J Neurol Sci*. 2005;237(1-2):53-9.
47. Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology*. 2004;1:20.
48. Carvalho EM, Bacellar O Fau - Porto AF, Porto Af Fau - Braga S, Braga S Fau - Galvao-Castro B, Galvao-Castro B Fau - Neva F, Neva F. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. 2001(1525-4135 (Print)).

49. Mascarenhas RE, Brodskyn C, Barbosa G, Clarencio J, Andrade-Filho AS, Figueiroa F, et al. Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. *Clin Vaccine Immunol.* [Clinical Trial Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 May;13(5):547-52.
50. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *The Lancet.* 1986;327(8488):1031-2.
51. Osame M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. *Human retrovirology: HTLV.* 1990;1:191-7.
52. Muniz AL, Rodrigues Jr. W, Santos SB, Jesus ARD, Porto AF, Castro N, et al. Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 2006;64:217-21.
53. Metcalf CR, Chalk L. *Anatomy of the dicotyledons.* Oxford: Claredon Press; 1950.
54. Aguiar TV, Sant'anna-Santos BF, Azevedo AA, Ferreira RSU. ANATI QUANTI: quantitative analysis software for plant anatomy studies [ANATI QUANTI: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal]. *Planta Daninha.* 2007;25:649-59.
55. Trease G, Evans W. *Pharmacognosy.* 12th ed. London: Bailliere Tindall; 1983.
56. Malterud KE, Farbrot TL, Huse AE, Sund RB. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology.* 1993 Oct;47 Suppl 1:77-85.
57. Bobo-Garcia G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Virseda P, Marin-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Validation Studies]. 2015 Jan;95(1):204-9.
58. Chatatikun M, Chiabchalard A. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts 2013.
59. Santos RaF. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Clitoria fairchildiana* (Tese em Química Orgânica) – PPGQUIM, UFBA, Salvador; 2014.
60. Medina-Medrano JR, Almaraz-Abarca N, Gonzalez-Elizondo MS, Uribe-Soto JN, Gonzalez-Valdez LS, Herrera-Arrieta Y. Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae). *Bot Stud.* 2015 Dec;56(1):24.
61. Kusumaningtyas RW, Laily N, Limandha P. Potential of Ciplukan (*Physalis angulata* L.) as Source of Functional Ingredient. *Procedia Chem.* 2015;14:367-72.

62. Tukun AB, Shaheen N, Banu CP, Mohiduzzaman M, Islam S, Begum M. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014;7:S568-S73.
63. De Castro-Costa CM, Araujo AQ, Barreto MM, Takayanagui OM, Sohler MP, Da Silva EL, et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22(10):931-5.
64. Silva KN, Agra MF. Comparative pharmacobotanical study on *Nicandra physalodes* and *Physalis angulata* (Solanaceae) [Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae)]. *Rev Bras Farmacognosia*. 2005;15:344-51.
65. Da Silvia DF, Strassburg RC, Villa F. Stem morphoanatomy of species of the genus *Physalis* [Morfoanatomia do caule de espécies do gênero *Physalis*]. *Rev Ci Agrovet*. 2015;14(1):38-45.
66. Wahua C, Sam SM. Comparative chemotaxonomic investigations on *Physalis angulata* Linn. and *Physalis micrantha* Linn. (Solanaceae). *Asian J Appl Sci*. 2013;1(5):220-8.
67. Thepsithar C, A. T. Comparative micro-morphology, anatomy and architecture of leaf of *Physalis*. *Int J Bioeng Life Sci* 2013;7:806-10.
68. Mauseth JD. *Plant Anatomy*. University of Texas A, editor 1988.
69. Munien P, Naidoo Y, Naidoo G. Micromorphology, histochemistry and ultrastructure of the foliar trichomes of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae). *Planta*. 2015 Nov;242(5):1107-22.
70. Silva MT, Simas SM, Batista TG, Cardarelli P, Tomassini TC. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Nov;100(7):779-82.
71. Levin DA. The role of trichomes in plant defense. *Q Rev Biol*. 1973;48(1):3-15.
72. Fahn A. *Plant anatomy*: Pergamon Press; 1990.
73. Franceschi VR, Nakata PA. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. 2005;56:41-71.
74. Bouropoulos N, Weiner S, Addadi L. Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: morphology and in vitro interactions of crystal-associated macromolecules. *Chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 May 4;7(9):1881-8.
75. Zhang WN, Tong WY. Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Physalis*. *Chem Biodivers*. [Review]. 2016 Jan;13(1):48-65.
76. Pigatto AGS, Blanco CC, Mentz LA, Soares GLG. Tropane alkaloids and calystegines as chemotaxonomic markers in the Solanaceae. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87:2139-49.

77. Maldonado E, Hurtado NE, Perez-Castorena AL, Martinez M. Cytotoxic 20,24-epoxywithanolides from *Physalis angulata*. *Steroids*. 2015 Dec;104:72-8.
78. Chiang HC, Jaw SM, Chen CF, Kan WS. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Res. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 1992 May-Jun;12(3):837-43.
79. Magalhaes HI, Veras MI Fau - Torres MR, Torres Mr Fau - Alves APNN, Alves Ap Fau - Pessoa ODL, Pessoa Od Fau - Silveira ER, Silveira Er Fau - Costa-Lotufo LV, et al. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. 2006(0022-3573 (Print)).
80. Soares MB, Bellintani MC, Ribeiro IM, Tomassini TC, Ribeiro Dos Santos R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *Eur J Pharmacol*. 2003 Jan 10;459(1):107-12.
81. Basey K, McGaw BA, Woolley JG. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. *Phytochemistry*. 1992;31(12):4173-6.
82. Singh B, Sharma RA. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*. 2015 Apr;5(2):129-51.
83. Perez-Castorena AL, Martinez M, Maldonado E. Labdanes and sucrose esters from *Physalis sordida*. *J Nat Prod*. 2010 Jul 23;73(7):1271-6.
84. Perez-Castorena AL, Oropeza RF, Vazquez AR, Martinez M, Maldonado E. Labdanes and withanolides from *Physalis coztomatl*. *J Nat Prod. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2006 Jul;69(7):1029-33.
85. Bergau N, Bennewitz S, Syrowatka F, Hause G, Tissier A. The development of type VI glandular trichomes in the cultivated tomato *Solanum lycopersicum* and a related wild species *S. habrochaites*. *BMC Plant Biol*. 2015 Dec 12;15:289.
86. Glas JJ, Schimmel BC, Alba JM, Escobar-Bravo R, Schuurink RC, Kant MR. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):17077-103.
87. Balcke GUa-OHOO, Bennewitz S, Bergau N, Athmer B, Henning A, Majovsky P, et al. Multi-Omics of Tomato Glandular Trichomes Reveals Distinct Features of Central Carbon Metabolism Supporting High Productivity of Specialized Metabolites. 2017(1532-298X (Electronic)).
88. Trikka FA, Nikolaidis A, Ignea C, Tsaballa A, Tziveleka L-A, Ioannou E, et al. Combined metabolome and transcriptome profiling provides new insights into diterpene biosynthesis in *S. pomifera* glandular trichomes. *BMC Genomics*. 2015/11/14;16(1):935.
89. Aschenbrenner AK, Amrehn E, Bechtel L, Spring O. Trichome differentiation on leaf primordia of *Helianthus annuus* (Asteraceae): morphology, gene expression and metabolite profile. *Planta*. 2015 Apr;241(4):837-46.

90. Sasse J, Schlegel M, Borghi L, Ullrich F, Lee M, Liu GW, et al. *Petunia hybrida* PDR2 is involved in herbivore defense by controlling steroidal contents in trichomes. *Plant Cell Environ.* 2016 Dec;39(12):2725-39.
91. Alahakoon UI, Taheri A, Nayidu NK, Epp D, Yu M, Parkin I, et al. Hairy Canola (*Brassica napus*) re-visited: Down-regulating TTG1 in an AtGL3-enhanced hairy leaf background improves growth, leaf trichome coverage, and metabolite gene expression diversity. *BMC Plant Biol.* 2016 Jan 6;16:12.
92. Bloomer RH, Lloyd AM, Symonds VV. The genetic architecture of constitutive and induced trichome density in two new recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana*: phenotypic plasticity, epistasis, and bidirectional leaf damage response. *BMC Plant Biol.* 2014 May 5;14:119.
93. Lee HZ, Liu WZ, Hsieh WT, Tang FY, Chung JG, Leung HW. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food Chem Toxicol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Mar;47(3):561-70.
94. Almeida Junior LD, Quaglio AEV, De Almeida Costa CaR, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of Ground Cherry (*Physalis angulata* L.) standardized CO₂ phytopharmaceutical preparation. *World J Gastroenterol.* 2017 Jun 28;23(24):4369-80.
95. Olivares-Tenorio M-L, Dekker M, Verkerk R, Van Boekel MaJS. Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): review from a supply chain perspective. *Trends Food Sci Technol.* 2016 2016/11/01;57:83-92.
96. Valdenegro M, Fuentes L, Herrera R, Moya-León MA. Changes in antioxidant capacity during development and ripening of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruit and in response to 1-methylcyclopropene treatment. *Postharvest Biol Technol.* 2012 2012/05/01;67:110-7.
97. Da Silva RR, Da Silva BJ, Rodrigues AP, Farias LH, Da Silva MN, Alves DT, et al. In vitro biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2015(1472-6882 (Electronic)).

APÊNDICE

Apêndice 1 – Artigo submetido

Message sent on Wednesday, May 30, 2018
Please add editor.phcogres@journalonweb.com as a contact in your E-mail client to ensure that this mail is not considered as a junk mail.

Dear Ms. Ferreira,

Pharmacognosy Research has received your manuscript entitled "Anatomical and phytochemical characterization of *Physalis angulata* L., a plant with therapeutic potential" for consideration for publication. The reference number for this manuscript is "pr_97_18". Kindly quote this in correspondence related to this manuscript.

Meanwhile, you can fill authorship form via this link
<https://docs.google.com/forms/d/1aTwhHMpfaDhKhKaa-Eb9pmDQot0FHLeOTN5CdEjnE6Q/viewform>

The manuscript is being reviewed for possible publication with the understanding that it is being submitted to one journal at a time and have not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere either as a whole or in part. Online submission of this article implies that the corresponding author has the written consent from all the contributors to act as corresponding author.

You are requested to send the signed copyright/contributor form within two weeks. The form can be uploaded as an scanned image from your area. The decision about the manuscript will be conveyed only on receipt of the form. High resolution images are required at the time of acceptance, you should be notified separately for the same, if images uploaded by you are not of printable quality.

The Editors will review the submitted manuscript initially. If found suitable, it will follow a double-blinded peer review. We aim to finish this review process within a short time frame, at the end of which a decision on the suitability or otherwise of the manuscript will be conveyed to you via this system. During this process you are free to check the progress of the manuscript through various phases from our online manuscript processing site <http://www.journalonweb.com/pr>.

The journal allows free access (Open Access) to its contents and permits authors to self-archive final accepted version of the articles on any OAI-compliant institutional / subject-based repository.

Due to high publishing cost and other financial constraints in the year 2015, Articles clearing in peer review process or upon acceptance, Authors are required to pay Article Processing Charges to Either Publisher or Phcog.Net, INDA

Download Factsheet : http://www.phcog.net/files/factsheet_PR.pdf

For more details visit <http://journalonweb.com/pr> >> Policies

We thank you for submitting your valuable work to the Pharmacognosy Research.

Yours sincerely,
Editor, Phcog Res
Pharmacognosy Research

TYPE OF ARTICLE: Original

TITLE OF THE ARTICLE: Anatomical and phytochemical characterization of *Physalis angulata* L., a plant with therapeutic potential

RUNNING TITLE Anatomical-phytochemical characterization of *P. angulata*

ABSTRACT

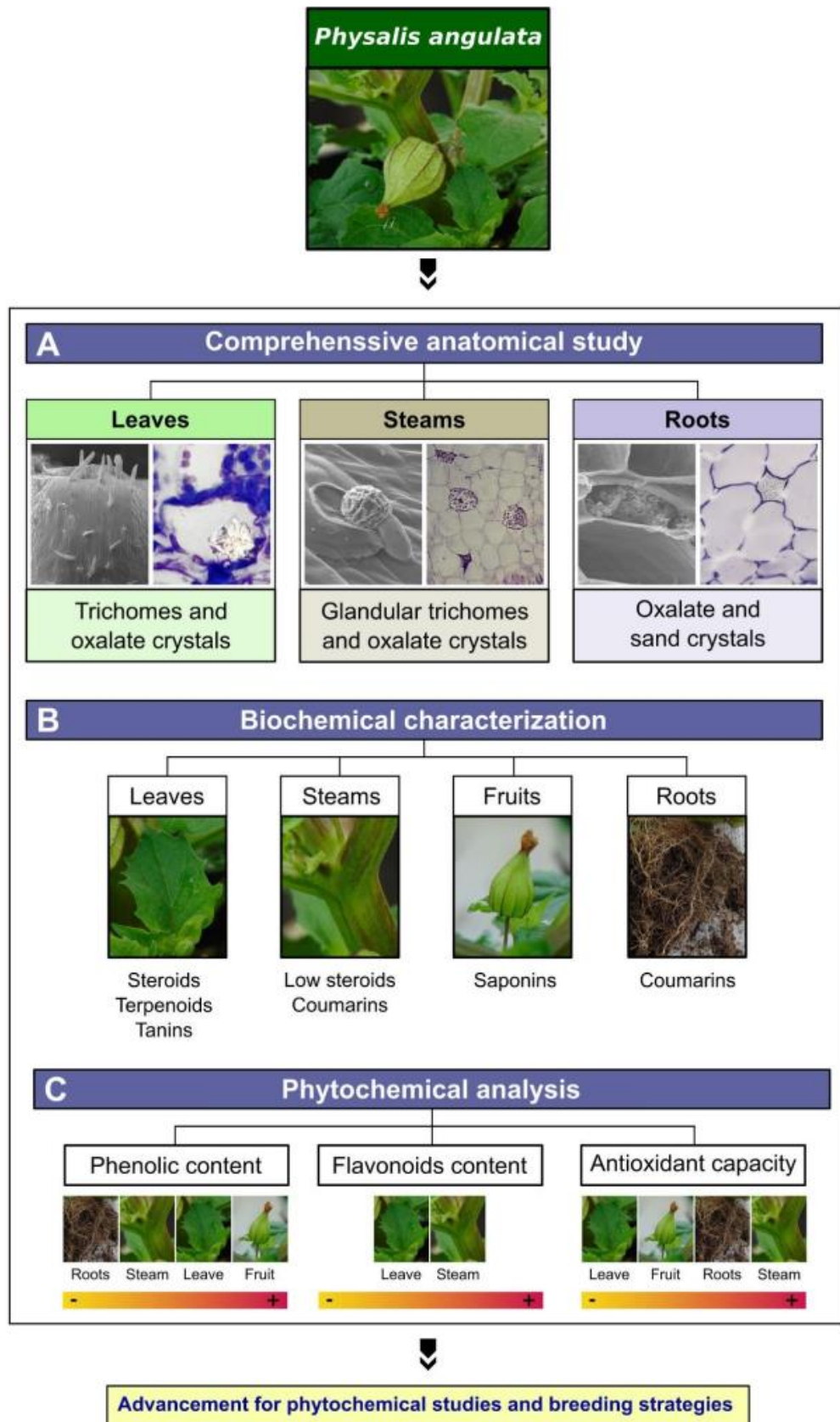
Background: *Physalis angulata* L. is widely used in folk medicine. Secondary metabolites with pharmacological potential, including physalins that exhibits anti-inflammatory/immunomodulatory and antiparasitic activities, have been identified in this specie. To date, few studies have investigated storage sites for secondary metabolites in *P. angulata*. **Objective:** To characterize the anatomical structures and determine the phytochemical composition of the vegetative organs of *P. angulata*. **Material Methods:** Electron and conventional optical microscopy were used for the anatomical characterization of *P. angulata* organs (leaf, root, stem and fruits). Methanolic extracts from leaves, roots, stem and fruits were chemically characterized for the presence of steroids, terpenoids, tannins, alkaloids, saponins, flavonoids, anthroquinones, coumarins and phenolic compounds. Phenolic compounds, flavonoids contents and antioxidant capacity of these extracts were determined by DPPH free radical scavenging activity. **Results:** Abaxial leaf stomata were more abundant than the adaxial stomata. Trichomes were more abundant along veins in the petiole, stems, beyond the margin in the sepals and petals and dispersed in the ovary. Steroids and terpenoids were present in leaves, stems and fruits of *P. angulata*. Saponins were exclusive to fruits. Phytochemical screening did not detect flavonoids, anthraquinones and alkaloids in all tested plant parts. The highest antioxidant capacities were identified in leaf and fruit extracts, possibly due to the presence of phenolic compounds in these organs. **Conclusion:** This study describes

anatomical and biochemical features from *P. angulata* that will assist in future phytochemistry and pharmacological studies, particularly pointing toward organs abundant in antioxidants (leaf and fruit) and steroids (possibly physalins; leaves).

KEY-WORDS: *Physalis angulata*, anatomy, botany, photochemistry, electron microscopy

SUMMARY: This work describes the anatomy and chemical composition of *Physalis angulata* organs and serves as a springboard for future phytochemical studies on physalins, assisting a range of fields including plant breeding and pharmacognosy.

PICTORIAL ABSTRACT



INTRODUCTION

Physalis angulata L., a member of the Solanaceae family, is an annual herbaceous species distributed in tropical and subtropical areas worldwide. In Brazil, *P. angulata* is found in all regions and is widely used in popular medicine to treat chronic rheumatism, kidney, bladder, liver and skin diseases, as well as for its sedative, antipyretic and antiemetic properties [1].

The wide range of biological activities presented by the genus *Physalis* is possibly due to the vast metabolic and structural diversity of compounds present in these plants. Several secondary metabolites with pharmacological properties have been identified in the genus *Physalis*, such as alkaloids, flavonoids, glycosides, saponins, tannins, terpenoids, physalins and withanolides, especially a series of C28 steroidal lactones [2,3]. Studies with seco-steroids purified from extracts of *P. angulata* (physalins B, F or G) or extracts prepared from roots showed potent anti-inflammatory/immunomodulatory [4] and antineoplastic [5, 6] activities. Particularly, physalin F has been identified as a substance with pharmacological potential, presenting an immunosuppressive effect on the proliferation of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-infected cells [7] and *Trypanosoma cruzi* [8], as well as antileishmanial [9] and antiplasmodial [10] activities.

Few studies have characterized the anatomical structure of *P. angulata* and the tissular distribution of secondary metabolites in the species. Glandular trichomes located in the epidermis of plants are important sites of synthesis, secretion and/or storage of compounds such as terpenoids, alkaloids and tannins [11, 12].

In order to determine the secondary metabolites with pharmacological properties in *P. angulata* a comprehensive anatomical description and phytochemical characterizations of

the vegetative organs was conducted. This work sheds light on functional aspects of the secretory structures and might contribute to improve the bioprospecting process and consequently the plant's pharmacological potential.

MATERIALS AND METHODS:

Plant materials

Adult *P. angulata* individuals (Figure 1 A-C) were collected in summer (November, 2017) at the Horto Florestal Experimental Unit of the Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brazil. Specimens were harvested at physiological maturity. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of UEFS (Voucher number 110448).

Anatomical analysis

Tissue from three *P. angulata* individuals were fixed in FAA70 (formaldehyde, acetic acid, ethanol) and stored in 70% alcohol. The leaf (apex, base, and central portion), petioles, stems and roots were embedded in methacrylate (Historesin; Leica Biosystems, Nussloch, Germany) in accordance with manufacturer's instructions, and then sectioned on a rotary microtome using disposable steel razors. Sections were stained with 0.05% toluidine blue to detect cellulose and lignin in cross-sections and slides mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). The description of anatomical structure was done according to Metcalfe & Chalk ^[13]. The measurement of stomatal density was performed using the ANATI QUANTI software ^[14]. The paradermal sections, were obtained by dissociation and stained with safranin to give contrast in the paradermal cut. The Material was photographed on a QImaging Go-3 camera coupled to the Olympus BX41 optical photomicroscope.

Crystal tests

Histochemical acid solubility was employed to characterize the anionic saline nature of the crystals, by subjecting the crystals of the test material to acetic acid PA and hydrochloric acid 10% (v / v) aqueous in roots, stems and leaves of *P. angulata*. The

calcium oxalate crystals were insoluble in acetic acid and soluble in hydrochloric acid, without producing effervescence.

Phytochemical tests

Roots, stems, leaves and fruits were separated, dried to a constant weight in a 36 ± 2 °C oven (Fanem, Mod. 320-SE) and then ground in a Wilye millgrinder (Tecnal, TE 650). Powdered samples (30g) were extracted by maceration with 300 ml of methanol for 72 h at room temperature (30 °C). The extracts were filtered (using Whatman no.1 filter paper) and concentrated under reduced pressure using a rotate evaporator (IKA RV 10 digital) at 40 ± 2 °C. The yields of the methanol extracts were between 3.1% and 9.6% by dry weight. All dry crude extracts obtained were stored at 8 °C in airtight containers until analysis. A stock solution of crude extract (3.0 mg/mL) was dissolved in 10 mL of methanol for phytochemical screening. Qualitative screening for secondary metabolites such as flavonoids, coumarins, tannins, saponosids, steroids and terpenoids, anthraquinones, and alkaloids were carried out according to Trease and Evans, 1983 and Harborne, 1998 [15, 16].

Antioxidant activity (AC)

The antioxidant activity of extracts was determined using the *in vitro* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging radical method [17]. In short, serial dilutions of the extracts of parts of *P. angulata* were prepared in methanol (0.625, 1.25, 2.5 and 5.0 mg/mL), 50 µl of the samples was added to 200 µl DPPH (0.2 mM) in methanol in 96-well microtiter plates. Quercetin was used as a reference/standard compound. DPPH solution and methanol served as blank. Absorbance was determined at 517 nm using a microtiter plate reader (BioRad Elx800), and the percentage of DPPH radical scavenging activity (% RSA) was calculated according to the following equation:

$\%RSA = 100 \times [(absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample) / absorbance\ of\ control]$.

Determination of total phenolic content (TPC)

The determination of the phenolic compounds was performed with the Folin-Ciocalteu method using Gallic acid as standard [18]. Briefly, 20 μ L of each extract (300 mg L⁻¹ in methanol) were mixed with 100 μ L of the Folin-Ciocalteu reagent in a microplate and shaken for 4 minutes followed by the addition of 75 μ L of sodium carbonate (100 g L⁻¹). After a 2 h incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 750 nm on the BioRad Elx800 microplate reader. The reaction blank was prepared with distilled H₂O. All assays were performed in triplicate.

Determination of total flavonoids content (TFC)

TFC was measured using a modified spectrophotometric method, as proposed by Chatatikun and Chiabchalard [19]. Briefly, 50 μ L of extracts (1000 mg L⁻¹) or quercetin were added to 10 μ L of a 10% aluminum chloride solution followed by the addition of 150 μ L of 95% ethanol. The blank was prepared with 80% ethanol. 10 μ L of 1 M sodium acetate was added to the mixture in a 96-well microplate and incubated for 40 minutes at room temperature protected from light. The absorbance was measured at 415 nm on a BioRad Elx800 microplate reader. The TFC was calculated using a quercetin standard curve. The results were expressed as mg quercetin equivalent g of extract (mg EQ / g extract). All samples were analyzed in triplicate.

Scanning electron microscopy (SEM) analysis

Fragments of the vegetative and reproductive parts of *P. angulata* were fixed with 2.0% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) for 1 h at room temperature. After fixation, samples were washed

three times with sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2). Cells were then post-fixed with a solution of osmium tetroxide for 30 min and dehydrated in increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90 and 100%). The samples were dried until the critical point, method with CO₂, mounted on aluminum stubs, metallized with gold and analyzed in a JEOL JSM-6390LV scanning electron microscope.

Statistical analyses

A linear regression was used for calculating IC₅₀ values. Results were considered statistically significant when $P < 0.05$. All analyses were performed using Analyze-it software regression method (Leeds, United Kingdom).

RESULTS

Leaves anatomy

Stomata

The leaf epidermal surfaces of *P. angulata* exhibit uniseriate cells with sinuous walls. The specie is amphistomatic (stomata on both surfaces) with anisocytic type stomata (surrounded by three subsidiary cells) in the epidermis presenting striated cuticle (Figure 2 A). Higher concentration of stomata was observed in the abaxial face ($370.1 \pm 152.8 \text{ mm}^2$) compared to the adaxial surface ($269.2 \pm 167.2 \text{ mm}^2$).

Trichomes

A comprehensive analysis of types and quantities of trichomes in the different plant tissues was conducted. Multicellular tectorial and glandular capitate trichomes with single-celled stalks were more abundant along veins in the petiole (Figures 2 B-C) and stems (Figures 2 D-E), beyond the margin in the sepals (Figure 2 F) and petals (Figure 2 G) and dispersed in the ovary (Figure 2 H). Scattered tectorial (Figure 2 I) and glandular (Figure 2 J) trichomes were observed in adaxial and abaxial surfaces of the leaf blade.

Mesophyll

The mesophyll structure is characterized by a dorsiventral organization (palisade and spongy parenchyma), comprising one layer of palisade parenchyma and three layers of spongy parenchyma (Figures 3 A-B). The vascular bundles were bicolateral, i.e. the xylem is found between layers of phloem (Figure 3C). Numerous crystals of calcium oxalate, druses, were found in the mesophyll (palisade and spongy parenchyma) (Figure 3D).

Stem anatomy

The collenchyma was angular with two layers of cells, the cortex presents three layers of cells, the stem was hollow (Figure 4 A) and numerous crystals of prismatic calcium oxalate were observed in the parenchyma (Figure 4 B).

Root anatomy

The cortex exhibits about 3-4 layers of cells, the medulla was filled with parenchyma cells (Figure 4 C). Numerous crystalline sands and crystals of prismatic calcium oxalate were observed in the cortex (Figure; 4 D-F).

Phytochemical composition

The phytochemical screening of leaf, stem, root and fruit of *P. angulata* revealed the presence of steroids, terpenoids and tannins mainly in the leaf. Saponins were found only in the fruits. Flavonoids, anthraquinones and alkaloids were absent in all parts of the plant (Table 1).

The maximum amount of TPC was observed in the root (30.63 mg GAE/g) and the lowest in the fruit (26.28 mg GAE/g) extracts (Table 2). The equation for the Gallic acid standard calibration curve was $y = 0.0051x + 0.0802$ ($R^2 = 0.9988$). The content of TPC followed the pattern: root > stem > leaf > fruit.

The leaf extract yielded the highest amounts of TFC (32.41 mg QE/ g extract), whereas none was detected in roots and fruits (Table 2). The equation for the quercetin standard calibration curve was $y = 0.0056x + 0.0473$ ($R^2 = 0.9982$).

The highest AC was found in leaf and fruit extracts of *P. angulata* (Table 3).

DISCUSSION

To date, only a few anatomical studies have been reported on *P. angulata* and these are exclusively based on optical microscopy [20-22]. In this work, a comprehensive anatomical description of *P. angulata* was performed using scanning electron microscopy analysis. In agreement with previous reports on *P. angulata*, stomata were found in both faces of the leaf epidermis, with a higher number in the abaxial face [22-24]. The stomata was anisocytic and protrusive, diverging from other reports that found sporadically anomocytic stomata [20, 25].

Glandular trichomes are crucial in the production of chemicals. In this study, glandular capitate and tectorial trichomes were observed on the mid-veins of petioles and the stems. This pattern of distribution is present in the Solanaceae *Withania somnifera* and has been associated with the protection of the underlying vasculature [26] and, to an improved access to nutrients and chemicals originated from the vascular bundles. Within Solanaceae, alkaloids and phenolic compounds are synthesized in the roots and transported to the leaves. Glandular trichomes are therefore located on mid-veins for easy sequestration of these compounds [26].

The parenchyma of leaf, stem and root was similar to that previously described for *P. angulata* [20]. Regarding the vascular structures, bicollateral bundles were found in leaves and stems, as reported previously for Solanaceae [27]. However, the stem was hollow in all evaluated parts (apex, middle and base), which contradicts a previous report of solid stem [21].

Several oxalate crystals in the form of druses were found in the parenchyma of leaves and in the cortex of *P. angulata* stems, while crystals with a prismatic shape were present mainly in the root cortex. The formation of crystals is a physiological process that

regulates the calcium dynamics in plants and has an additional role in the protection against herbivores and in the detoxification of several heavy metals [28]. Prismatic crystals have been reported in the leaves of other species of Solanaceae, such as tomato and tobacco [29].

The chemical composition of plant extracts found among species of Solanaceae varies both in quality and in quantity [30]. Determining the phytochemical tissue composition of a species improves compound isolation procedures and bioprospection. The presence of secondary metabolites in parts of *P. angulata* was determined. Steroids, terpenoids and tannins were present mainly in leaves of *P. angulata* (Table 1).

These results corroborate phytochemical studies that revealed withanolides (steroids) and chemotaxonomic markers in Solanaceae [31]. The withanolides are the main secondary metabolites in *Physalis* spp. with almost 60 types synthesized, especially physalins, ixocarpalactones and acnistins [30, 32]. The biological properties of withanolides include action against tumor cells [5, 6, 33], parasites such as *T. cruzi* [8] and *Leishmania* [9]; in addition to antimicrobial [23]; immunomodulatory/antiinflammatory activities [4]. Other common steroids like β -sitosterol, stigmasterol, campesterol and methylene-cholesterol can also be found in *Physalis* spp [4].

The alkaloids are abundant in Solanaceae, particularly tropane, steroidal, indole, pyrrolidine, and imidazole variants [31]. The isolation and identification of alkaloids in *Physalis* can be challenging. The isolation and identification of the alkaloids N-trans-Feruloyltyramine, N-p-Coumaroyltyramine and phygrine have been reported in at least one species of the genus [(*P. alkekengi* var. *franchetii*) [4, 30, 34]. In the present study, however, alkaloids were not detected in any investigated parts (Table 1). This suggests that the concentrations of alkaloids in *P. angulata* might be very low and thus not

detectable by the method employed or, alternatively, that these plants do not synthesize this class of chemicals.

The present study identified terpenoids in leaves of *P. angulata*. Terpenoids are essential for plant survival. These compounds have been associated with antimicrobial, antifungal, antiparasitic, antiviral, antihyperglycemic, antihypoglycemic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties [35]. Except for carotenoids, terpenoids are rare in *P. angulata*, in contrast two studies have isolated labdane diterpenoids from *P. coztomatl* and *P. sordida* [36, 37].

The presence of terpenoids in trichomes have been well documented in Solanaceae [38-40] as well as other plant families including Lamiaceae [41] and Asteraceae [42]. Other species such as *Petunia hybrida* accumulate functional (insecticidal) steroidal compounds in trichomes [43]. Therefore, it is possible that glandular trichomes in *P. angulata* harbor the site for the synthesis of terpenoid-derived physalins [20]. This study found that trichomes in *P. angulata* are in lower numbers as compared with other species of *Physalis* (*P. peruviana* and *P. pubescens*) or other Solanaceae [20, 21]. Genetic engineering would be alternative to increase trichome density on *P. angulata* [39, 44], and consequently physalin production. This approach has been successfully used in transgenic Canola [44, 45]. This highlights the importance of anatomical studies coupled to phytochemical characterization in plant with therapeutic potential.

Phenolic compounds (including flavonoids) may react with free radicals in the cell, conferring antioxidant properties that have the potential to inhibit pathological and degenerative processes, such as cancer. The amount of total phenolic and flavonoid compounds, as well as the antioxidant capacity found in the present study, were slightly lower than those reported previously (Table 4). A comparison of the absolute values

among these studies is limited due to methodological differences in compound quantification, extract production, as well as types of plant parts studied. Previously *P. angulata* extracts were shown to have relevant antioxidant activity, presenting an antitumor effect on human oral cancer cells [46] and on intestinal inflammation in a rat model [47]. A mechanism for the possible inhibition of carcinogenesis by phenolic compounds remains unclear; however, the antioxidant properties might play an important role blocking the molecular events involved in all stages of cancer development [48]. In this study the highest antioxidant capacity was identified in extracts obtained from leaves and fruits of *P. angulata*. The antioxidant capacity are positively associated with the amount of phenolic, flavonoids and aromatic compounds present in a given extract. Interestingly, flavonoids were not detected in fruits and roots, this is consistent with findings from Medina-Medrano et al. (2015) [49] which were also unable to detect flavonoids in fruits of *P. angulata* (Table 4). Thus, other compounds might be responsible for the antioxidant capacity observed in these extracts. The extracts that presented the greatest antioxidant activities were precisely those that show greater phenolic content. Phenolic contents or antioxidant capacity in species of *Physalis* have been mainly focused on fruits. For example, goldenberry (fruit of *P. peruviana*) is one of the most promising tropical fruit for its medicinal and edible uses [49-52].

In summary, the anatomical analysis of *P. angulata* presents new and relevant information regarding the distribution of tectorial and glandular trichomes in the petiole, stem, sepals and petals. These structures might be the site of production and accumulation of physalins, potentially the most useful compound in this plant. *P. angulata* antioxidant properties confirm the therapeutic potential of this plant. The current findings may support future breeding programs and biotechnological approaches for the optimization of useful compound production from *P. angulata*.

ACKNOWLEDGEMENT:

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB). The authors are grateful for the electronic microscopy platform of the Gonçalo Moniz Institute (Fiocruz) for technical assistance, to Professor Claudinéia Regina Pelacani Cruz (UEFS) for assigning the individuals of *P. angulata* and Romeu da Silva Leite and Gustavo Surlo Nascimento for providing the illustration and photos of *P. angulata*.

ABBREVIATIONS

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

HTLV-1: Human T-lymphotropic virus type 1

TPC: Total phenolic content

TFC: total flavonoids content

SEM: Scanning electron microscopy

CONFLICTING INTEREST

No conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. 2nd ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum; 2008.
2. Lashin II, Elhaw MH. Evaluation of secondary metabolites in callus and tissues of *Physalis peruviana*. *J Mod Bot*. 2016;6:10-17.
3. Lan Y-H, Chang F-R, Pan M-J, et al. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. *Food Chem*. 2009;116:462-469.
4. Soares MB, Bellintani MC, Ribeiro IM, Tomassini TC, Ribeiro dos Santos R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*. 2003;459:107-112.
5. Wu SJ, Ng LT, Chen CH, Lin DL, Wang SS, Lin CC. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sci*. 2004;74:2061-2073.
6. Chiang HC, Jaw SM, Chen PM. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. *Anticancer Res*. 1992;12:1155-1162.
7. Pinto LA, Meira CS, Villarreal CF, et al. Physalin F, a seco-steroid from *Physalis angulata* L., has immunosuppressive activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV1-associated myelopathy. *Biomed Pharmacother*. 2016;79:129-134.
8. Meira CS, Guimaraes ET, Bastos TM, et al. Physalins B and F, seco-steroids isolated from *Physalis angulata* L., strongly inhibit proliferation, ultrastructure and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2013;140:1811-1821.
9. Guimaraes ET, Lima MS, Santos LA, et al. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:84-87.
10. Sa MS, de Menezes MN, Krettli AU, et al. Antimalarial activity of physalins B, D, F, and G. *J Nat Prod*. 2011;74:2269-2272.
11. Levin DA. The role of trichomes in plant defense. *Q Rev Biol*. 1973;48:3-15.
12. Schilmiller AL, Last RL, Pichersky E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J*. 2008;54:702-711.
13. Metcalf CR, Chalk L. *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press; 1950.
14. Aguiar TV, Sant'anna-Santos BF, Azevedo AA, Ferreira RSU. ANATI QUANTI: quantitative analysis software for plant anatomy studies [ANATI QUANTI:

- software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal]. *Planta Daninha*. 2007;25:649-659.
15. Harborne JB. *Phytochemical Methods a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Germany: Springer Science & Business Media; 1998.
 16. Trease G, Evans W. *Pharmacognosy*. 12th ed. London: Bailliere Tindall; 1983.
 17. Malterud KE, Farbrot TL, Huse AE, Sund RB. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology*. 1993;47 Suppl 1:77-85.
 18. Bobo-Garcia G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Virseda P, Marin-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*. 2015;95:204-209.
 19. Chatatikun M, Chiabchalard A. *Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (Daucus carota Linn.) root crude extracts* 2013.
 20. Silva KN, Agra MF. Comparative pharmacobotanical study on *Nicandra physalodes* and *Physalis angulata* (Solanaceae) [Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae)]. *Rev Bras Farmacognosia*. 2005;15:344-351.
 21. da Silvia DF, Strassburg RC, Villa F. Stem morphoanatomy of species of the genus *Physalis* [Morfoanatomia do caule de espécies do gênero *Physalis*]. *Rev Ci Agrovet*. 2015;14:38-45.
 22. Wahua C, Sam SM. Comparative chemotaxonomic investigations on *Physalis angulata* Linn. and *Physalis micrantha* Linn. (Solanaceae). *Asian J Appl Sci*. 2013;1:220-228.
 23. Silva MT, Simas SM, Batista TG, Cardarelli P, Tomassini TC. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:779-782.
 24. Thepsithar C, Thongpukdee A. Comparative micro-morphology, anatomy and architecture of leaf of *Physalis*. *Int J Bioeng Life Sci*. 2013;7:806-810.
 25. da Silva BJ, Rodrigues AP, Farias LH, Hage AA, Do Nascimento JL, Silva EO. *Physalis angulata* induces in vitro differentiation of murine bone marrow cells into macrophages. *BMC Cell Biol*. 2014;15:37.
 26. Munien P, Naidoo Y, Naidoo G. Micromorphology, histochemistry and ultrastructure of the foliar trichomes of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Solanaceae). *Planta*. 2015;242:1107-1122.

27. Fahn A. *Plant anatomy*: Pergamon Press; 1990.
28. Franceschi VR, Nakata PA. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol.* 2005;56:41-71.
29. Bouropoulos N, Weiner S, Addadi L. Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: morphology and in vitro interactions of crystal-associated macromolecules. *Chemistry.* 2001;7:1881-1888.
30. Zhang WN, Tong WY. Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Physalis*. *Chem Biodivers.* 2016;13:48-65.
31. Pigatto AGS, Blanco CC, Mentz LA, Soares GLG. Tropane alkaloids and calystegines as chemotaxonomic markers in the Solanaceae. *An Acad Bras Cienc.* 2015;87:2139-2149.
32. Maldonado E, Hurtado NE, Perez-Castorena AL, Martinez M. Cytotoxic 20,24-epoxywithanolides from *Physalis angulata*. *Steroids.* 2015;104:72-78.
33. Chiang HC, Jaw SM, Chen CF, Kan WS. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Res.* 1992;12:837-843.
34. Basey K, McGaw BA, Woolley JG. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. *Phytochemistry.* 1992;31:4173-4176.
35. Singh B, Sharma RA. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech.* 2015;5:129-151.
36. Perez-Castorena AL, Martinez M, Maldonado E. Labdanes and sucrose esters from *Physalis sordida*. *J Nat Prod.* 2010;73:1271-1276.
37. Perez-Castorena AL, Oropeza RF, Vazquez AR, Martinez M, Maldonado E. Labdanes and withanolides from *Physalis coztomatl*. *J Nat Prod.* 2006;69:1029-1033.
38. Bergau N, Bennewitz S, Syrowatka F, Hause G, Tissier A. The development of type VI glandular trichomes in the cultivated tomato *Solanum lycopersicum* and a related wild species *S. habrochaites*. *BMC Plant Biol.* 2015;15:289.
39. Glas JJ, Schimmel BC, Alba JM, Escobar-Bravo R, Schuurink RC, Kant MR. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int J Mol Sci.* 2012;13:17077-17103.
40. Balcke GU, Bennewitz S, Bergau N, et al. Multi-Omics of Tomato Glandular Trichomes Reveals Distinct Features of Central Carbon Metabolism Supporting High Productivity of Specialized Metabolites. *Plant Cell.* 2017;29:960-983.
41. Triikka FA, Nikolaidis A, Ignea C, et al. Combined metabolome and transcriptome profiling provides new insights into diterpene biosynthesis in *S. pomifera* glandular trichomes. *BMC Genomics.* 2015;16:935.

42. Aschenbrenner AK, Amrehn E, Bechtel L, Spring O. Trichome differentiation on leaf primordia of *Helianthus annuus* (Asteraceae): morphology, gene expression and metabolite profile. *Planta*. 2015;241:837-846.
43. Sasse J, Schlegel M, Borghi L, et al. *Petunia hybrida* PDR2 is involved in herbivore defense by controlling steroidal contents in trichomes. *Plant Cell Environ*. 2016;39:2725-2739.
44. Alahakoon UI, Taheri A, Nayidu NK, et al. Hairy Canola (*Brassica napus*) revisited: Down-regulating TTG1 in an AtGL3-enhanced hairy leaf background improves growth, leaf trichome coverage, and metabolite gene expression diversity. *BMC Plant Biol*. 2016;16:12.
45. Bloomer RH, Lloyd AM, Symonds VV. The genetic architecture of constitutive and induced trichome density in two new recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana*: phenotypic plasticity, epistasis, and bidirectional leaf damage response. *BMC Plant Biol*. 2014;14:119.
46. Lee HZ, Liu WZ, Hsieh WT, Tang FY, Chung JG, Leung HW. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*: induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:561-570.
47. Almeida Junior LD, Quaglio AEV, de Almeida Costa CAR, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of Ground Cherry (*Physalis angulata* L.) standardized CO₂ phytopharmaceutical preparation. *World J Gastroenterol*. 2017;23:4369-4380.
48. Olivares-Tenorio M-L, Dekker M, Verkerk R, van Boekel MAJS. Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): review from a supply chain perspective. *Trends Food Sci Technol*. 2016;57:83-92.
49. Medina-Medrano JR, Almaraz-Abarca N, Gonzalez-Elizondo MS, Uribe-Soto JN, Gonzalez-Valdez LS, Herrera-Arrieta Y. Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae). *Bot Stud*. 2015;56:24.
50. Valdenegro M, Fuentes L, Herrera R, Moya-León MA. Changes in antioxidant capacity during development and ripening of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruit and in response to 1-methylcyclopropene treatment. *Postharvest Biol Technol*. 2012;67:110-117.
51. Kusumaningtyas RW, Laily N, Limandha P. Potential of Ciplukan (*Physalis angulata* L.) as Source of Functional Ingredient. *Procedia Chem*. 2015;14:367-372.
52. Tukun AB, Shaheen N, Banu CP, Mohiduzzaman M, Islam S, Begum M. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014;7:S568-S573.

Table 1 Phytochemical constituents of methanolic extracts from different parts of *P. angulata*.

Part	Steroids	Terpenoids	Tannins	Alkaloids	Saponins	Flavonoids	Anthraquinones	Coumarins
Leaves	+++	+++	++	-	-	-	-	-
Stems	+	+	-	-	-	-	-	+
Roots	-	-	-	-	-	-	-	++
Fruits	+	-	-	-	++	-	-	-

-: negative, +: mild positive, ++: positive, +++: highly positive.

Table 2. Total phenolic and flavonoids content present in *P. angulata*.

Part	mg GAE / g extract	mg QE / g extract
Leaves	27.39 ± 0.08	32.41 ± 0.015
Stems	30.24 ± 0.056	9.91 ± 0.003
Roots	30.63 ± 0.058	n.d.
Fruits	26.28 ± 0.055	n.d.

Values were expressed as mean ± S.D. (n = 5); n.d., not determined. GAE = equivalent of Gallic acid; QE = quercetin equivalent.

Table 3 - IC50 values of DPPH free radical scavenging activity of extracts of *P. angulata*

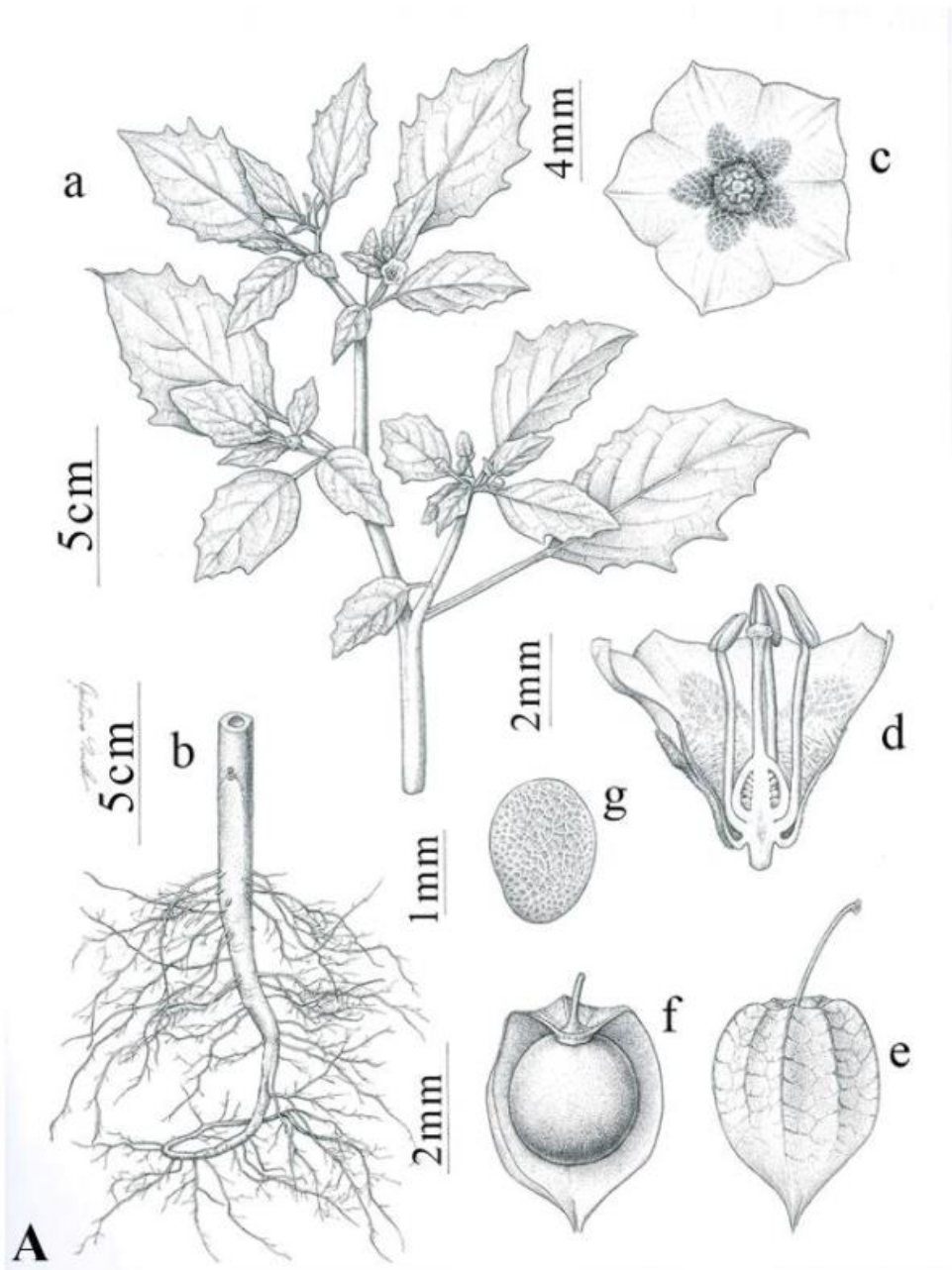
Part	DPPH (IC50 mg/mL)
Leaves	7.24 ± 0.012
Stems	38.05 ± 0.022
Roots	15.25 ± 0.04
Fruits	8.34 ± 0.014

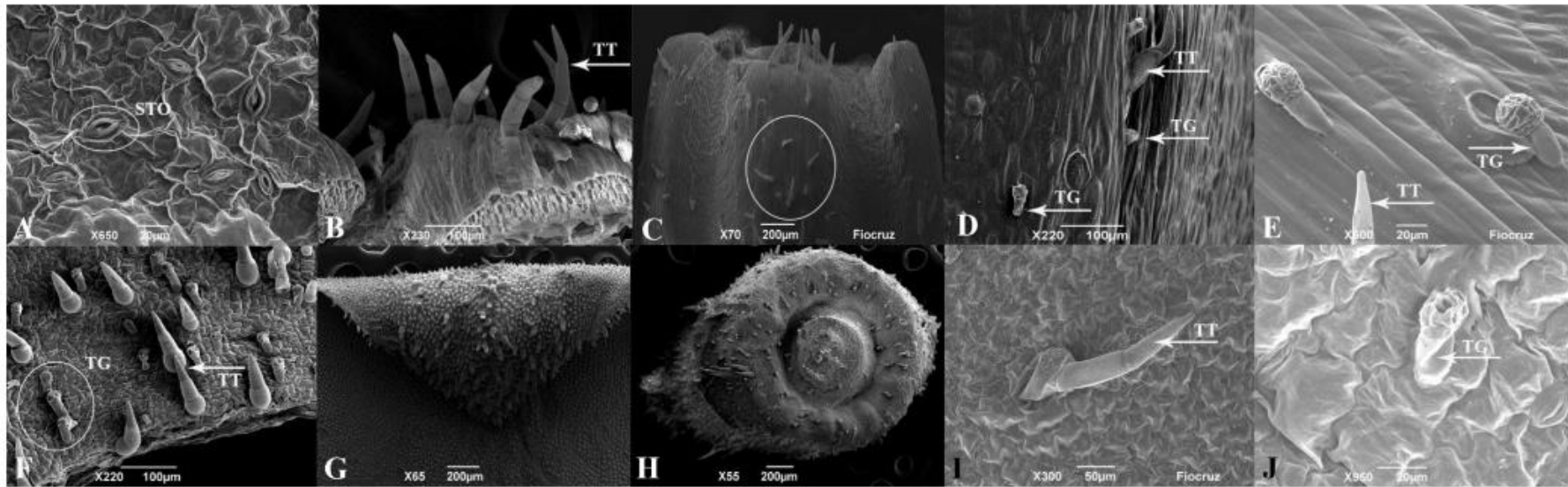
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Values were expressed as mean ± S.D. (n = 5)

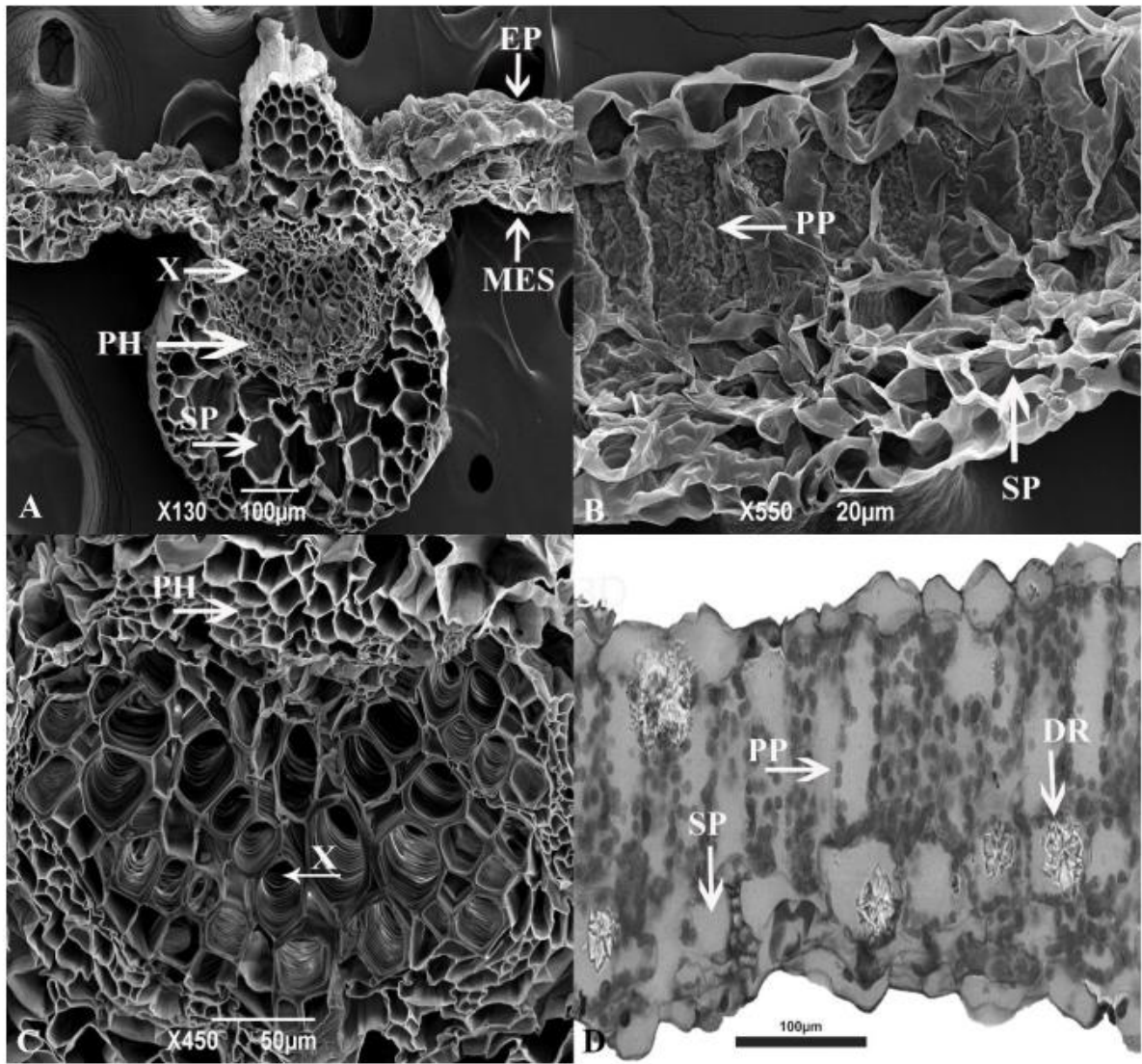
Table 4 – Values of phenolic, flavonoid contents and antioxidant capacity found in reference studies

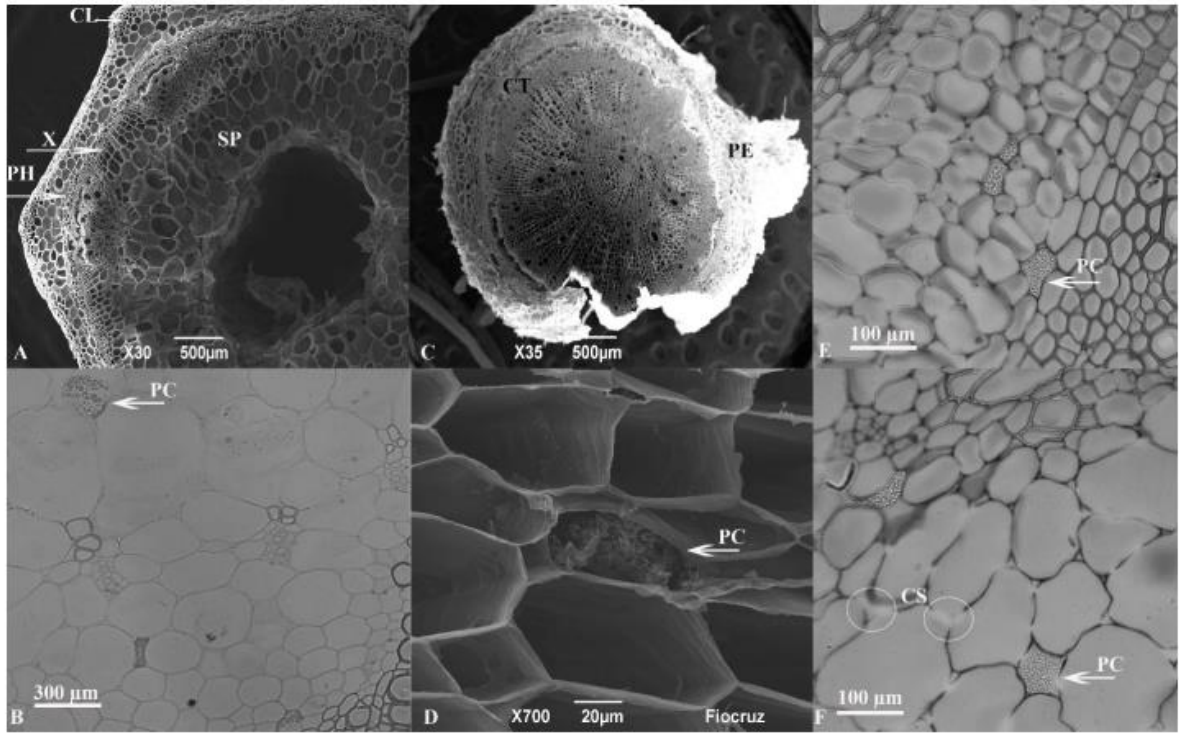
Part	TPC*	TFC	Antioxidant capacity	Reference
Leaves	40.51 mg equivalents/g dry tissue	23.036 mg/g (dry tissue)	2.44 mg of ascorbic acid equivalents/mL	[49]
Leaves	0.47 mg equivalent /g (water extract) 0.49 mg equivalent /g (ethanolic extract)	Not performed	2,875 mg of water extract/g of BHA equivalent 4,311 mg of ethanolic extract/g of BHA equivalent	[51]
Fruits	36.92 mg equivalents/g (dry tissue)	Absent	0.92 mg of ascorbic acid equivalents/mL	[49]
Fruits	0.46 mg equivalent /g (water extract) 0.51 mg equivalent /g (ethanolic extract)	Not performed	1,575 mg of water extract/g of BHA equivalent 2,258 mg of ethanolic extract/g of BHA equivalent	[51]
Calyces	33.18 mg equivalents/g (dry tissue)	8.829 mg/g (dry tissue)	2.10 mg of ascorbic acid equivalents/mL	[49]
Tender stem, leaves & fruits	0.20 mg equivalent per gram (fresh weight)	Not performed	0.41 μ mol Trolox equivalent antioxidant capacity per gram of fresh weight	[52]

TPC: Total phenolic contents; TFC: Total flavonoid contents; * Gallic acid









LEGENDS

Figure 1: Structure of *Physalis angulata* L. A Plant parts = a= general aspect of the branch; b= primary and secondary roots; c= corolla in front view; d=reproductive structures: stamens and pistil (ovary and stigma); e= Fruit wrapped in the fruitful cup; f=fruit; g=seed. B= Flower, C = Fruit. *P. angulata* growing in an experimental field at the Horto Florestal Experimental Unit of the Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brazil.

Figure 2: Transmission electron microscopy images of the epidermis of *Physalis angulata* L.

Stomatas in leaf (A). Tectorial trichomes in petiole (B). Trichomes aggregated on the mid-veins of petioles (C) and in stems (D). Detail of tectorial and capitate glandular trichomes (E); Distribution of trichomes on sepal (F), petal (G) ovary (H). Detail of tectorial (I) and glandular (J) trichomes in leaf blade.

STO = stomata; TT= tectorial trichome; GT=glandular trichome.

Figure 3: Anatomical details of the leaf of *Physalis angulata* L.

Transmission electron microscopy images of palisade and spongy parenchyma with xylem and phloem (A); detail of parenchyma and (B) central vein (C). Optical microscopy of druses in mesophyll (D).

EP= epidermis; MES=mesophyll, PP=palisade parenchyma; SP=spongy parenchyma; X=xylem; Ph=phloem; DR=druse.