

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Avaliação da variação morfológica, anatômica e fitoquímica de *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.v. Morton e *Psychotria viridis* Ruiz & Pav em diferentes ambientes, teor de alcaloides e citotoxicidade do chá Ayahuasca

Ordilena Ferreira de Miranda

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2021**

Ordilena Ferreira de Miranda
Bióloga

Avaliação da variação morfológica, anatômica e fitoquímica de *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.v. Morton e *Psychotria viridis* Ruiz & Pav em diferentes ambientes, teor de alcaloides e citotoxicidade do chá Ayahuasca

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Coorientadora:
Profa. Dra. **MARY ANN FOGLIO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Miranda, Ordilena Ferreira de

Avaliação da variação morfológica, anatômica e fitoquímica de *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.v. Morton e *Psychotria viridis* Ruiz & Pav em diferentes ambientes e teor de alcaloides e citotoxicidade do chá ayahuasca / Ordilena Ferreira de Miranda. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

137 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Banisteriopsis caapi* 2. *Psychotria viridis* 3. Citotoxicidade 4. Ayahuasca
5. Desidratação I. Título

Este trabalho é dedicado:

Ao Mestre José Gabriel da Costa pela inspiração e auxílio em todas as horas

A Roberto Evangelista (In memoriam) um mestre, um pai, um amigo por sua forte e gentil presença, apoio e incentivo

A meus filhos e netos por serem a luz dos meus olhos

As comunidades tradicionais da Amazônia, berço de tanta sabedoria

A todos os Caianhinhos...

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir experienciar sua bondade infinita através da pesquisa científica em fisiologia de plantas.

À Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” – ESALQ/USP e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas por oportunizar a realização do curso de doutorado.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação – INPA/MCTIC pela liberação para capacitação de doutorado e apoio financeiro.

Ao Centro Espirita Beneficente “União do Vegetal” – CBUDV no Brasil, pelo apoio logístico e todo material vegetal que compõe essa pesquisa.

Ao Centro Espirita Beneficente “União do Vegetal” – CBUDV nos Estados Unidos da América - USA, pelo apoio financeiro.

Ao prof. Dr. Marcilio de Almeida por aceitar me acompanhar nesta jornada, por toda paciência e generosidade na orientação da tese.

À prof^a. Dr^a. Mary Ann Foglio do Laboratório de Fitoquímica Farmacologia e Toxicologia Experimental – LAFTex da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP pela coorientação, profissionalismo e boa amizade.

À Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela realização das análises antiproliferativas, parceria e correções.

Ao Dr. José Luis da Costa do Centro de Informação e Assistência Toxicológica-CIATox pela realização das análises fitoquímicas.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica “Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima - ESALQ/USP, pelo uso dos equipamentos.

À todo o grupo de pesquisa do Laboratório de Morfogênese e Reprodução de Plantas pela boa convivência, em especial à Dra. Eveline Calderan Meneghetti pela parceria e apoio nas análises morfológicas.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica Farmacologia e Toxicologia Experimental – LAFTex, pela excelente convivência e amizade, em especial à Dra. Ilza Maria de Oliveira Sousa pela amizade e parceria, e à Daiana pelo auxílio nas análises fitoquímicas.

Aos mestres da União do Vegetal Júlio Alves (2^a região), Evandro de Jesus (2^a região) e Aloísio Pinto (16^a região), pela parceria, auxílio logístico nas coletas e pela preparação do chá Hoasca (Ayahuasca) utilizado na pesquisa.

Ao coletor e sábio da floresta amazônica Carlos Memória da Paz pela boa convivência na floresta e contribuição fundamental em todas as coletas.

À amiga Raquel Medeiros pelo auxílio, parceria, valiosa amizade e boas risadas.

À amiga Zélia Braga pela boa amizade, que tornou minha jornada de doutorado mais feliz.

*“O trabalho do homem científico é plantar para o futuro.
Seu dever é estabelecer as bases para aqueles que estão por vir”.*

Nikola Tesla

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. INFLUÊNCIA DO AMBIENTE SOBRE A MORFO-ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DA AYAHUASCA: POPULAÇÕES CULTIVADAS EM REGIÕES EXTRA-AMAZÔNICAS	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT	21
2.1 INTRODUÇÃO.....	22
2.2 MATERIAL VEGETAL.....	23
2.2.1 Caracterização morfológica.....	24
2.2.2 Determinação da área foliar	24
2.2.3 Análise estomática	24
2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	25
2.2.5 Análise histológica.....	25
2.2.6 Análises histoquímicas.....	26
2.3 RESULTADOS.....	26
2.3.1 Organográficos e anatômicos	26
2.3.2 Histoquímicos	31
2.4 DISCUSSÃO	32
2.5 CONCLUSÃO	35
3. TEOR DE NN-DIMETILTRIPTAMINA (DMT) EM <i>PSYCHOTRIA VIRIDIS</i> - EVIDÊNCIAS DA CONTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FOLIARES E DA DISPONIBILIDADE HÍDRICA (DMT) EM <i>PSYCHOTRIA VIRIDIS</i> CULTIVADA EM ECOSISTEMAS AMAZÔNICOS	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT	41
3.1 INTRODUÇÃO.....	42
3.1.1 Áreas de estudo.....	44
3.1.2 Material vegetal.....	44
3.1.3 Características morfológicas	45
3.1.4 Análises anatômicas e histoquímica	46
3.1.5 Análise fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	46
3.1.6 Coleta e análises de solo	47
3.1.7 Área de coleta e dados climáticos.....	47
3.1.8 Análise estatística	48
4. CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS ADAPTATIVAS E TEOR DE ALCALOIDES EM CAULE DE <i>BANISTERIOPSIS CAAPI</i> (SPRUCE EX GRISEB.) CV MORTON COMO RESPOSTA AO AMBIENTE	79
RESUMO.....	79
ABSTRACT	79
4.1 INTRODUÇÃO.....	80
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	81
4.2.1 Áreas de coletas	81
4.2.2 Coleta e análises de solo	82
4.2.3 Material botânico.....	82
4.2.4 Análises morfológicas e histoquímicas.....	83

4.2.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	84
4.2.6	<i>Análise fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)</i>	84
4.2.7	<i>Análise Estatística</i>	85
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.3.1	<i>Características ambientais e adaptativas</i>	85
4.3.2	<i>Morfologia e macroanatomia do caule</i>	89
4.3.3	<i>Morfologia do ritidoma, floema condutor e não condutor</i>	91
4.3.4	<i>Xilema</i>	94
4.3.5	<i>Local de acúmulo de alcaloides</i>	96
4.3.6	<i>Quantificação de HRM, HRL e THH</i>	97
4.4	CONCLUSÃO.....	99
5.	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AMBIENTE DE ORIGEM E CONDIÇÃO DE SECAGEM DAS PLANTAS DO NA CONCENTRAÇÃO DOS ALCALOIDES E POTENCIAL CITOTÓXICO DO CHÁ AYAHUASCA SOBRE CÉLULAS DE QUERATINÓCITOS HUMANOS.....	107
	RESUMO.....	107
	ABSTRACT.....	108
5.1	INTRODUÇÃO.....	108
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	111
5.2.1	<i>Áreas de coletas e material vegetal</i>	111
5.2.2	<i>Pré-processamento das plantas e preparo de Ayahuasca</i>	112
5.2.3	<i>Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)</i>	115
5.2.3.1	Preparo das amostras.....	115
5.2.3.2	Preparo das Soluções padrão.....	116
5.2.3.3	Condições de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	116
5.2.4	<i>Avaliação da citotoxicidade in vitro</i>	116
5.2.4.1	Linhagem Celular.....	116
5.2.4.2	Avaliação da citotoxicidade	117
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
5.4	CONCLUSÃO	128
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	137

RESUMO

Avaliação da variação morfológica, anatômica e fitoquímica de *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.v. Morton e *Psychotria viridis* Ruiz & Pav em diferentes ambientes, teor de alcaloides e citotoxicidade do chá Ayahuasca

B. caapi e *P. viridis* são plantas de origem amazônica e as principais espécies preconizadas para preparação do chá Ayahuasca. Um chá com efeitos enteogênico e psicotrópico de uso milenar pelos povos indígenas da Amazônia, preparado pela decocção de caules de *B. Caapi*, que apresenta os alcaloides β -carbolínicos harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetrahydrohramina (THH), e folhas de *P. viridis* que contém o alcaloide NN- dimetiltryptamina (DMT). Atualmente, Ayahuasca está em crescente expansão de uso como sacramento religioso em nível mundial, e junto com seu potencial farmacológico no campo da neurologia e psiquiatria tem fomentado um número expressivo de pesquisas científicas. Os resultados científicos têm evidenciado que Ayahuasca consumido em nível mundial, principalmente Europa e América do Norte, apresenta uma ampla variação no teor dos alcaloides bioativos, que afeta diretamente o potencial enteogênico e farmacológico do chá. Porém, a despeito da importância desse chá e das plantas que o compõem, até recentemente, as pesquisas científicas eram focadas somente no chá Ayahuasca, não havia estudo da relação planta-ambiente e das alterações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas, que podem ser as causas subjacentes das variações no teor dos alcaloides na Ayahuasca preparado com plantas de diversos ambientes. Da mesma forma, não foi encontrado nenhum estudo desenvolvendo um método de pré-processamento e secagem das plantas da Ayahuasca que permita sua exportação e contribua com a segurança de uso desse chá. Portanto, os objetivos desse trabalho foram: i. Avaliar as alterações nas características organográficas, anatômicas e histoquímicas das folhas de três populações de *P. viridis* cultivadas em diferentes condições ambientais no estado de São Paulo; ii. Verificar as variações na morfologia, anatomia, histoquímica e teor de alcaloides apresentadas por folhas de *P. viridis* cultivadas em ecossistemas de Terra-firme (TF) e Campinarana (CAMP) do bioma Amazônia; iii. Verificar as diferenças morfológicas, anatômicas, histoquímicas e a variação no teor dos alcaloides em caules de *B. caapi* coletados em dois ecossistemas com diferentes características ambientais na Amazônia; iv. Determinar os parâmetros para a padronização da matéria-prima vegetal utilizadas no preparo do chá Ayahuasca tradicional: temperatura ideal de secagem para as plantas, teor e proporção dos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH em Ayahuasca preparado com plantas após processo de secagem, além de avaliar o potencial citotóxico de Ayahuasca preparado com plantas *in natura* e desidratadas sobre células de HaCaT (queratinócitos humanos). Para todas as análises morfológicas, anatômicas e histoquímicas de caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis* foram utilizados microscópio de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV); As análises fitoquímicas foram realizadas usando extratos etanólicos de folhas e caules separadamente, e chá Ayahuasca preparado com plantas *in natura* e após processamento de secagem sob temperaturas de 40, 43, 45, 50, 60 °C e ao sol. A concentração dos compostos bioativos foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), a citotoxicidade *in vitro* foi avaliada com exposição das amostras de chá Ayahuasca em células HaCaT e, o agente antineoplásico cloridrato de doxorrubicina foi usado como controle positivo. Em folhas de *P. viridis* tanto de regiões extra-amazônica quanto amazônica as alterações encontradas estão diretamente relacionadas ao esforço adaptativo da espécie à disponibilidade hídrica do ambiente e mostram que, estresse hídrico prolongando causa alterações anatômicas que interferem no teor de alcaloides na espécie. Com relação a *B.caapi*, foram encontradas alterações no sistema condutor relacionados à alterações nas características do ambiente, além disso, as plantas do ecossistema de Campinarana exibiram teor de alcaloides mais elevado, revelando relação positiva do teor dos alcaloides β -carbolínicos com a disponibilidade hídrica do ambiente. As variações nas concentrações de DMT, HRL,

HRM e THH no chá Ayahuasca sofrem influências do ambiente de origem das plantas. O processo de secagem mais adequado, foi alcançado em estufa de circulação forçada com temperaturas de 43 °C para folhas e 45 °C para caules. A Ayahuasca, nas concentrações testadas, não apresenta citotoxicidade celular relacionada a DMT, HRM, HRML e THH para queratinócitos humanos.

Palavras-chave: Ayahuasca, *Banisteriopsis caapi*, *Psychotria viridis*, Citotoxicidade, Ayahuasca, *NN*-dimetiltriptamina (DMT)

ABSTRACT

Evaluation of the morphological, anatomical and phytochemical variation of *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.V.Morton and *Psychotria viridis* Ruiz & Pav in different environments, content of alkaloids and cytotoxicity of Ayahuasca tea

B. caapi and *P. viridis* are plants of Amazonian origin and the main species recommended for the preparation of Ayahuasca tea. A tea, with entheogenic and psychotropic effects, of ancient use by indigenous peoples of the Amazon, prepared by the decoction of stems of *B. Caapi*, which presents the alkaloids β - carbolinic harmine (HRM), harmaline (HRL) and tetrahydrodramine (THH), and leaves of *P. viridis* that contain the alkaloid *NN*- Dimethyltryptamine (DMT). Currently, Ayahuasca is in a growing expansion of use as a religious sacrament worldwide and, together with its pharmacological potential in the field of neurology and psychiatry, has fostered a significant number of scientific researches. Scientific results have shown that Ayahuasca, consumed worldwide, mainly Europe and North America, has a wide variation in the content of bioactive alkaloids, which directly affects the entheogenic and pharmacological potential of the tea. However, despite the importance of this tea and the plants that make it up, until recently, scientific research was focused only on Ayahuasca tea, there was no study of the plant-environment relationship and the morphological, anatomical and phytochemical changes, which may be the underlying cause of variations in alkaloid content in Ayahuasca prepared with plants from different environments. Likewise, there was no study of a method for pre-processing and drying Ayahuasca plants to allow their exportation and contribute for its safe use. Therefore, the objectives of this work were: i. Evaluate the changes in organographic, anatomical and histochemical characteristics of the leaves of three populations of *P. viridis* grown under different environmental conditions, in the state of São Paulo; ii. Verify morphological, anatomical and histochemical variations of *P. viridis* leaves cultivated in *Terra-firme* (TF) and *Campinarana* (CAMP) ecosystems of the Amazon biome; iii. Verify the morphological, anatomical, histochemical differences and the variation in the content of the alkaloids in stems of *B. caapi* collected in two ecosystems of the Amazon biome with different environmental characteristics; iv. Determine the parameters for the standardization of the inputs used in the preparation of Ayahuasca tea, such as: ideal drying temperature for the plants, content and proportion of the alkaloids DMT, HRM, HRL and THH, prepared with plants after drying process, and evaluate the cytotoxic potential of Ayahuasca prepared with fresh and dehydrated plants on HaCaT cells (human keratinocytes). For all morphological, anatomical and histochemical analyzes of *B. caapi* stems and *P. viridis* leaves, a light microscope and scanning electron microscopy (SEM) were used. Phytochemical analyzes were performed on ethanolic extracts of leaves and stems separately, and on Ayahuasca tea prepared with fresh plants and after drying processing, under temperatures of 40, 43, 45, 50, 60° C and in the sun. The concentration of bioactive compounds was determined by High Performance Liquid Chromatography with UV-vis Diode Arrangement Detector (HPLC-DAD). *In vitro* cytotoxicity was evaluated exposing Ayahuasca tea samples in HaCaT cells and the antineoplastic agent hydrochloride of doxorubicin was used as a positive control. In *P. viridis* leaves from both extra-Amazonian and Amazonian regions, the changes found are directly related to the species' adaptive effort to the water availability of the environment and show that prolonged water stress causes anatomical changes that interfere in the alkaloids content in the species. With respect to *B. caapi*, changes were found in the conductive system related to changes in the characteristics of the environment, in addition, the plants of the *Campinarana* ecosystem exhibited higher alkaloids content, revealing a positive relationship of β - carbolinic alkaloids with the water availability of the environment. Variations in the concentrations of DMT, HRL, HRM and THH in Ayahuasca tea, are influenced by the environment source of the plants. The most suitable drying process was achieved in a forced circulation oven with temperatures of 43 °C for

leaves and 45 °C for stems. Ayahuasca, at the concentrations tested, does not show cellular cytotoxicity for human keratinocytes.

Keywords: *Banisteriopsis caapi*; *Psychotria viridis*; cytotoxicity; Ayahuasca; *NN*-dimethyltryptamine.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Banisteriopsis caapi (Spruce ex Griseb.) C.v. Morton e *Psychotria viridis* Ruiz & Pav são plantas das famílias Malpighiaceae e Rubiaceae respectivamente com centro de dispersão em florestas tropicais amazônicas e ampla distribuição em florestas tropicais da América do Sul (Mabberley, 1997). *B. caapi* é uma liana gigante que escala as grandes árvores para atingir o dossel (Schultes, 1970). Enquanto *P. viridis* é uma espécie arbustiva que se adapta bem em locais sombreados com boa disponibilidade hídrica (Blackledge and Taylor, 2003; Miranda et al., 2020; Taylor et al., 2015).

Caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis*, juntos, são usados no preparo da Ayahuasca: um decocto (mais conhecido como chá) de efeito enteogênico (Ruck et al., 1979; Tupper, 2009) e psicotrópico (Domínguez-Clavé et al., 2016) que é a base de rituais e curas para diversos povos indígenas (Naranjo, 1986) desde épocas imemoriais. *P. viridis* contém, principalmente em suas folhas, o alcaloide indólico *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) (Soares et al., 2017) responsável pelos efeitos enteogênicos e psicotrópicos apresentados pelo chá Ayahuasca (Callaway et al., 1999; Costa et al., 2005; Rodrigues et al., 2019), os caules de *B. caapi* por sua vez, apresentam os alcaloides β -carbolínicos harmina (HRM) harmalina (HRL) e tertrahidroharmina (THH) (Mckenna, 2004). O efeito enteogênico da Ayahuasca ativado pelo DMT é inativado, por via oral, devido à degradação deste composto pela monoamina oxidase visceral (MAO) (Callaway et al., 1999). Essa degradação é inativada pela ação das β -carbolinas que são inibidores reversíveis altamente ativos da MAO podendo proteger o DMT da desaminação viabilizando seu uso oral (Mckenna, 2004).

O uso da Ayahuasca emergiu das florestas amazônicas e se tornou o veículo sacramental para novos movimentos religiosos sincréticos que estão se difundindo de seu centro de origem no Brasil para a Europa, Estados Unidos e todo o mundo (Kaasik and Kreegipuu, 2020; McKenna et al., 1998). Porém, a maioria do chá Ayahuasca consumido em países extra-amazônicos são produzidos em regiões amazônicas, a partir de coletas realizadas em florestas nativas ou plantios, geralmente pertencentes a religiões que usam o chá como sacramento, e transportados para os países de consumo (Miranda et al., 2020).

Os estudos dos compostos bioativos do chá de Ayahuasca (Callaway et al., 1999; Pires et al., 2009; Santos et al., 2017; Souza et al., 2019) e das plantas que o compõem foram impulsionados pelo aumento do uso religioso e terapêutico da Ayahuasca nos Estados Unidos e diversos países da Europa (Dos Santos et al., 2016; Hamill et al., 2019; Kaasik and Kreegipuu,

2020) e também, pela tendência global na pesquisa de terapia psicodélica. Contudo, as pesquisas têm relatado uma ampla variação no teor dos alcaloides bioativos no chá consumido em nível mundial (Callaway, 2005; Kaasik and Kreegipuu, 2020; Santos and Hallak, 2020). A origem e a proporção das plantas usadas na preparação da Ayahuasca, foram sugeridas como possíveis causas dessas variações (McKenna, 2004). Porém, a maioria dos estudos tem focado somente no teor dos alcaloides no chá e, na maioria das vezes as análises são realizadas com Ayahuasca de várias fontes religiosas (Callaway, 2005; Callaway et al., 2005; Kummrow et al., 2019), sem considerar as características ambientais de origem ou as proporções das plantas usadas na preparação da Ayahuasca analisado.

É sabido que as plantas têm estreita relação com o ambiente no qual estão inseridas, e que as variações ambientais exercem forte influência sobre a variabilidade genética e a qualidade dos compostos fitoquímicos das espécies (Figueira et al., 2010; Gupta et al., 2017). As variações nas condições de luz, na temperatura e na umidade tanto de curto quanto de longo termo, afetam a composição dos metabolitos secundários (Akula and Ravishankar, 2011; Liebelt et al., 2019; Osbourn et al., 2003). Ainda, as plantas podem alterar suas características morfológicas e anatômicas em função da disponibilidade de recursos do meio (Avalos et al., 2014; Oliveira et al., 2018; Venegas-González et al., 2017), uma característica que é determinante para a existência de representantes de uma espécie em diversos ambientes (Mitchell et al., 2015; Schlichting, 1986).

Os primeiros estudos que abordam a variação dos alcaloides nas espécies da Ayahuasca, com base no local de origem das plantas foram publicados recentemente. Folhas de *P. viridis* coletadas em diversos biomas brasileiros revelaram variabilidade no teor de DMT (Cavalcante et al., 2018) assim como, caules de *B. caapi* revelaram ampla variação no teor de HRM, HRL e THH (Santos et al., 2020). No entanto, apenas um estudo indica as alterações morfológicas e anatômicas em *P. viridis* como causas subjacentes da variação no teor de alcaloides nas plantas com efeito no chá Ayahuasca (Miranda et al., 2020). Enquanto, para caules de *B. caapi*, até onde podemos saber, não há nenhum relato dessas alterações que podem ter resposta na concentração das β -carbolinas no chá. O Brasil é um país de dimensão continental que abrange diversos biomas e, em quase todos eles encontramos o cultivo das plantas da Ayahuasca, como demonstrado em estudos de Cavalcante et al., (2018) e Santos et al. (2020) o que aumenta a possibilidade de variações dos alcaloides nas plantas e no chá em função das características do ambiente.

Diversos estudos tem mostrado, que mesmo apresentando ampla variação no teor de DMT, HRM, HRL e THH o consumo de Ayahuasca, utilizado em ritual indígena tradicional

e nas religiões ayahuasqueiras, que se baseiam em ritual indígena tradicional, é fisiológica e psicologicamente seguro (Inserra, 2018; Palhano-Fontes et al., 2018; Silveira et al., 2020), não apresenta citotoxicidade em uso agudo ou subagudo (Dos Santos et al., 2016) e sua dose letal é 50 vezes maior que uma dose usada em ritual religioso da União do Vegetal - UDV ($\cong 150$ ml/ para um adulto de 70 Kg) (Pic-Taylor et al., 2015). No entanto, análises em amostras de Ayahuasca consumido por alguns grupos nos Estados Unidos e Europa foram detectadas várias substâncias, que não estão preconizadas na composição do chá Ayahuasca, inclusive produto sintético (Kaasik and Kreegipuu, 2020) fato que coloca em risco os usuários de Ayahuasca, principalmente, em países extra-amazônicos. Atualmente, não existe um caminho que possibilite o preparo *in loco* da Ayahuasca nos países da América do Norte, Europa e Oceania, devido a não ocorrência das espécies nestas regiões e por falta de método de pré-processamento das plantas que permita sua exportação. Assim, fazer chegar as plantas de preparo da Ayahuasca até o local de consumo pode ser uma solução viável, e isto necessariamente envolve processo de secagem das plantas. A secagem leva a um produto estável e facilmente transportável que está disponível durante todo o ano (Orphanides et al., 2016). Porém, apesar de ser considerado um dos processos mais usuais e fundamentais de preservação de plantas, a secagem também pode levar a perda exacerbada de compostos bioativos dependendo da técnica aplicada (Chua et al., 2019).

Considerando todo o expostos acima, e a crescente expansão de uso deste chá em nível mundial, há a necessidade de estudos para obter uma compreensão mais abrangente dos mecanismos envolvendo a relação planta-ambiente que promove as variações nos teores dos alcaloides no chá Ayahuasca com ênfase nas alterações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas de adaptação das plantas nos diversos ambientes, o que poderá, também, contribuir para a correta identificação botânica das plantas principalmente, *B. caapi* que pertence à um grupo de taxonomia complexa. Outrossim, é urgente a necessidade de assegurar que a Ayahuasca consumido em países fora das regiões amazônicas contenham somente as plantas preconizadas para preparação da Ayahuasca, de modo que o consumo deste chá seja seguro para seus usuários. Isto pode ser possibilitado a partir do desenvolvimento de métodos de processamento de secagem das plantas, que assegure a qualidade fitoquímica do material vegetal e permita a estabilidade e a proporcionalidade ideais dos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH no chá Ayahuasca. Portanto, com o intuito de preencher essas lacunas, este estudo levantou as seguintes questões:

Quais as alterações nas características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de três populações de *P. viridis* cultivadas em diferentes condições ambientais no Estado de São Paulo;

Quais as variações morfológicas, anatômicas e histoquímicas apresentadas por folhas de *P. viridis* cultivadas em ecossistemas de Terra-firme e Campinarana do bioma Amazônia;

Quais as diferenças morfológicas, anatômicas e histoquímicas em amostras de *B. caapi* coletadas em dois ecossistemas com diferentes características ambientais na Amazônia e, qual o teor dos alcaloides nas plantas de cada ecossistema.

Quais são os parâmetros para a padronização da matéria-prima vegetal utilizadas no preparo do chá Ayahuasca? Para essa questão, avaliamos:

O teor e a proporção dos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH no chá Ayahuasca preparado com plantas *in natura* e desidratadas, coletadas em dois ecossistemas do bioma Amazônia;

A temperatura ideal de secagem de caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis* com manutenção do potencial fitoquímico do material vegetal;

O potencial citotóxico do chá Ayahuasca, preparado com plantas *in natura* e submetidas ao processo de secagem, sobre células de queratinócitos humanos (HaCaT).

Para responder estas questões, a tese foi dividida em 4 capítulos da forma que se considera para publicação:

Capítulo 2: Influência do ambiente sobre a morfo-anatômica e histoquímica da folha de Ayahuasca: Populações cultivadas em regiões extra-amazônicas. Já publicado na revista *Acta Scientiarum Biological Sciences*. Intitulado: Influence of environment on the leaf morphology and histochemical of the ayahuasca leaf: Populations cultivated in extra-Amazonian regions. DOI: 0.4025/actascibiols.v42i1.50369;

Capítulo 3: Características foliares e teor de *NN*-dimetiltryptamina (DMT) em *Psychotria viridis* cultivada em ecossistemas amazônicos . Já submetido para publicação na revista *Acta Botânica Brasilica*. Intitulado: leaf traits and content of *NN*-dimethyltryptamine (DMT) in *Psychotria viridis* cultivated in Amazonian ecosystems;

Capítulo 4: Características anatômicas adaptativas e teor de alcaloides em caule de *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) CV Morton como resposta ao ambiente;

Capítulo 5: Avaliação da influência do ambiente de origem e condição de secagem das plantas na concentração dos alcaloides e potencial citotóxico do chá Ayahuasca sobre células de queratinócitos humanos (HaCaT).

Referências

- Akula, R., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants 6, 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Avalos, G., Mulkey, S.S., Avalos, G., 2014. Photosynthetic and morphological acclimation of seedlings of tropical lianas to changes in the light environment. *American Journal of Botany* 101, 2068–2078. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400127>
- Blackledge, R.D., Taylor, C.M., 2003. Psychotria Viridis –A Botanical Source of Dimethyltryptamine (DMT). *Microgram Journal* 1, 18–22.
- Callaway, J., McKenna, D., Grob, C., Brito, G., Raymon, L., Poland, R., Andrade, E., Andrade, E., Mash, D., 1999. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 243–256. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00168-8)
- Callaway, J.C., 2005. Various alkaloid profiles in decoctions of banisteriopsis caapi. *Journal of Psychoactive Drugs* 37, 151–155. <https://doi.org/10.1080/02791072.2005.10399796>
- Callaway, J.C., Brito, G.S., Neves, E.S., 2005. Phytochemical Analyses of Banisteriopsis Caapi and Psychotria Viridis. *Journal of Psychoactive Drugs* 37, 37–41.
- Callaway, J.C., McKenna, D.J., Grob, C.S., Brito, G.S., Raymon, L.P., Poland, R.E., Andrade, E.N., Andrade, E.O., Mash, D.C., 1999. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 243–256. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00168-8)
- Cavalcante, A.D., Cardoso, G.A., Oliveira, F.L.P. De, Bearzoti, E., Okuma, A.A., Duarte, L.P., Vieira-filho, S.A., 2018. Influence of Environmental Factors and Cultural Methods on the Content of. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 00, 1–11.
- Costa, M.C.M., Figueiredo, M.C., Cazenave, S. de O.S., 2005. Ayahuasca : Uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. *Revista de psiquiatria clinica* 32, 310–318.
- Domínguez-Clavé, E., Soler, J., Elices, M., Pascual, J.C., Álvarez, E., de la Fuente Revenga, M., Friedlander, P., Feilding, A., Riba, J., 2016. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. *Brain Research Bulletin* 126, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.002>
- Dos Santos, R.G., Balthazar, F.M., Bouso, J.C., Hallak, J.E., 2016. The current state of research on ayahuasca: A systematic review of human studies assessing psychiatric symptoms, neuropsychological functioning, and neuroimaging. *Journal of Psychopharmacology* 30, 1230–1247. <https://doi.org/10.1177/0269881116652578>

- Figueira, G.M., Ramelo, P.R., Ogasawara, D.C., Montanari, I., Zucchi, M.I., Cavallari, M.M., Foglio, M.A., 2010. A set of microsatellite markers for *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae), a medicinal liana from the Neotropics. *American Journal of Botany* 97, 63–64.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1000145>
- Gupta, A.K., Mishra, R., Singh, A.K., Srivastava, A., Lal, R.K., 2017. Genetic variability and correlations of essential oil yield with agro-economic traits in *Mentha* species and identification of promising cultivars. *Industrial Crops and Products* 95, 726–732.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.041>
- Hamill, J., Hallak, J., Dursun, S.M., Baker, G., 2019. Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. *Current Neuropharmacology* 17, 108–128.
<https://doi.org/10.2174/1570159X16666180125095902>
- Inserra, A., 2018. Hypothesis: The psychedelic Ayahuasca Heals traumatic memories via a sigma 1 receptor-mediated Epigenetic-Mnemonic process. *Frontiers in Pharmacology* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00330>
- Kaasik, H., Kreegipuu, K., 2020. Ayahuasca Users in Estonia: Ceremonial Practices, Subjective Long-Term Effects, Mental Health, and Quality of Life. *Journal of Psychoactive Drugs* 00, 1–9. <https://doi.org/10.1080/02791072.2020.1748773>
- Kummrow, F., Maselli, B.S., Lanaro, R., Costa, J.L., Umbuzeiro, G.A., Linardi, A., 2019. Mutagenicity of Ayahuasca and Their Constituents to the Salmonella/Microsome Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60, 269–276.
<https://doi.org/10.1002/em.22263>
- Liebelt, D.J., Jordan, J.T., Doherty, C.J., 2019. Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews* 18, 1409–1433.
<https://doi.org/10.1007/s11101-019-09617-z>
- Mabberley, D.J., 1997. *The plant-book : a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press.
- McKenna, D.J., 2004. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca : rationale and regulatory challenges. *Pharmacology & Therapeutics* 102, 111–129.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.03.002>
- McKenna, D.J., 2004. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics* 102, 111–129.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.03.002>

- McKenna, D.J., Callaway, J.C., Grob, C.S., 1998. The scientific investigation of ayahuasca: A review of past and current research. *Heffter Review of Psychedelic Research* 1, 65–76.
- Miranda, O.F., Souza, S.E.X.F., Milan, R.J., Bueno, A.B., Almeida, M., 2020. Influence of environment on the leaf morpho-anatomy and histochemical of the ayahuasca leaf: Populations cultivated in extra-Amazonian regions. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 42, 1–12. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v42i1.50369>
- Mitchell, N., Moore, T.E., Mollmann, H.K., Carlson, J.E., Mocko, K., Martinez-Cabrera, H., Adams, C., Silander, J.A., Jones, C.S., Schlichting, C.D., Holsinger, K.E., 2015. Functional Traits in Parallel Evolutionary Radiations and Trait-Environment Associations in the Cape Floristic Region of South Africa. *The American Naturalist* 185, 525–537. <https://doi.org/10.5061/dryad.sc286>
- Naranjo, P., 1986. El ayahuasca en la arqueología ecuatoriana. *América Indígena* 46, 117–127.
- Oliveira, M.I.U., Rebouças, D.A., Leite, K.R.B., de Oliveira, R.P., Funch, L.S., 2018. Can leaf morphology and anatomy contribute to species delimitation? A case in the *Campomanesia xanthocarpa* complex (Myrtaceae). *Flora* 249, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.10.004>
- Osbourn, A.E., Qi, X., Townsend, B., Qin, B., 2003. Dissecting plant secondary metabolism - constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* 159, 101–108. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00759.x>
- Palhano-Fontes, F., Barreto, D., Onias, H., Andrade, K.C., Novaes, M.M., Pessoa, J.A., Mota-Rolim, S.A., Osório, F.L., Sanches, R., Dos Santos, R.G., Tófoli, L.F., De Oliveira Silveira, G., Yonamine, M., Riba, J., Santos, F.R., Silva-Junior, A.A., Alchieri, J.C., Galvão-Coelho, N.L., Lobão-Soares, B., Hallak, J.E.C., Arcoverde, E., Maia-De-Oliveira, J.P., Araújo, D.B., 2018. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial 49, 655–663. <https://doi.org/10.1017/S0033291718001356>
- Pic-Taylor, A., da Motta, L.G., de Moraes, J.A., Junior, W.M., Santos, A. de F.A., Campos, L.A., Mortari, M.R., von Zuben, M.V., Caldas, E.D., 2015. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behavioural Processes* 118, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.05.004>

- Rodrigues, A.V.S.L., Almeida, F.J., Vieira-Coelho, M.A., 2019. Dimethyltryptamine: Endogenous Role and Therapeutic Potential. *Journal of Psychoactive Drugs* 51, 299–310. <https://doi.org/10.1080/02791072.2019.1602291>
- Ruck, C.A.P., Bigwood, J., Staples, D., Ott, J., Wasson, G., 1979. Entheogens. *Journal of Psychoactive Drugs* 11, 145–146. <https://doi.org/10.1080/02791072.1979.10472098>
- Santos, B.W.L., Oliveira, R.C. de, Sonsin-Oliveira, J., Fagg, C.W., Barbosa, J.B.F., Caldas, E.D., 2020. Biodiversity of β -Carboline Profile of *Banisteriopsis caapi* and Ayahuasca, a Plant and a Brew with Neuropharmacological Potential. *Plants* 9, 870. <https://doi.org/10.3390/plants9070870>
- Santos, R.G. dos, Hallak, J.E.C., 2020. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. *Epilepsy & Behavior journal*. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.04.053>
- Schlichting, C.D., 1986. The Evolution of Phenotypic Plasticity in Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 667–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.003315>
- Schultes, R.E., 1970. The botanical and histochemical distribution of hallucinogens. *Annual Review of Plant Physiology* 21, 571–598.
- Silveira, G. de O., Santos, R.G. dos, Rebello, L.F., Rossi, G.N., Hallak, J.E.C., Yonamine, M., 2020. Stability evaluation of DMT and Harmala alkaloids in ayahuasca tea samples. *Molecules* 25, 5–7. <https://doi.org/10.3390/molecules25092072>
- Soares, D.B.S., Duarte, L.P., Cavalcanti, D., Silva, Fernando C, Braga, A.D., Lopes, M.T.P., Takahashi, J.A., Vieira-Filho, S.A., Silva, Fernando César, 2017. *Psychotria viridis*: Chemical constituents from leaves and biological properties. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89, 927–938. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160411>
- Taylor, C., Gomes, M., Zappi, D., 2015. *Psychotria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil [WWW Document]. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. URL <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB24581> (accessed 6.21.19).
- Tupper, K.W., 2009. Entheogenic healing: The spiritual effects and therapeutic potential of ceremonial ayahuasca use., in: Ellens, J.H. (Ed.), *The Healing Power of Spirituality: How Faith Helps Humans Thrive*. Praeger., Westport, pp. 269–282.
- Venegas-González, A., Brancalion, P.H.S., Albiero, A., Chagas, M.P., Anholetto, C.R., Chaix, G., Tomazello Filho, M., 2017. What tree rings can tell us about the competition between trees and lianas? A case study based on growth, anatomy, density, and carbon accumulation. *Dendrochronologia* 42, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2016.11.001>

2. INFLUÊNCIA DO AMBIENTE SOBRE A MORFO-ANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DA AYAHUASCA: POPULAÇÕES CULTIVADAS EM REGIÕES EXTRA-AMAZÔNICAS

RESUMO

Psychotria viridis Ruiz & Pav. é uma espécie da família Rubiaceae presente em toda a Amazônia, tradicionalmente utilizada pelas comunidades indígenas e nas últimas décadas incorporada ao uso religioso em contexto urbano. A espécie é conhecida e cultivada em diversas regiões do Brasil por possuir alcaloides bioativos. Suas características morfoanatômicas e histoquímicas foram descritas e avaliadas neste trabalho com a finalidade de avaliar a presença de alterações intraespecíficas nas folhas das plantas de três populações cultivadas no Estado de São Paulo. Todas as plantas apresentaram estípula terminal e padrão morfoanatômico foliar básico, consistente com a maioria das espécies do gênero, com mesofilo heterogêneo dorsiventral. Ambas epidermes unisseriadas apresentam células grandes com vacúolo proeminentes e drusas. Tricomas tectores unicelulares e multicelulares estrelados presentes nas nervuras primárias e secundárias. Padrão anfi-hipoestomático foliar, ainda não citados na literatura para a espécie, foi comum em todas as plantas estudadas. A variação na presença de domácias em uma mesma população indica que essa estrutura não pode ser usada para determinação taxonômica de *P. viridis*, como já descritas para outras espécies do gênero. Presença de ductos secretores, variação na densidade estomática, e área foliar; representam as principais alterações morfoanatômicas entre as plantas estudadas. Os testes histoquímicos foram positivos para alcaloides, polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos, sendo negativo para amido, mas somente em plantas de uma das populações submetidas a estresse hídrico. Nosso estudo considera que as alterações morfoanatômicas e histoquímicas encontradas, estão diretamente relacionadas ao esforço adaptativo ao déficit hídrico sazonal e à capacidade da espécie em manter ou atrair organismos mutualistas.

Palavras-chave: Caracterização; Alcalóide; Tricoma; Ducto secretor; Domácia.

ABSTRACT

Psychotria viridis Ruiz & Pav. (Rubiaceae) occurs naturally throughout the Amazon and it is traditionally used by indigenous communities, being incorporated into religious use in urban contexts over the last few decades. It is known and cultivated in many regions of South America for possessing valuable bioactive alkaloids. In this paper, we described *P. viridis* leaf morphology, anatomy and histochemistry from three populations cultivated in the southeastern Brazil, in order to identify possible adaptations to local environment and management. All plants presented terminal stipules and basic morpho-anatomical patterns of leaves, consistent with most species of the genus, as heterogeneous dorsiventral mesophyll, uniseriate

epidermis, presents large cells with prominent vacuoles and druses. Unicellular non-glandular trichomes and multicellular starry trichomes were present in the primary and secondary veins. Amphi-hypostomatic leaf pattern, not yet described for the species, was common in all studied plants. Variation in the presence of domatia in the same population indicates that this structure cannot be used for taxonomic determination of *P. viridis*, as already described for other species of the genus. Presence of secretory ducts and reduction in stomata density and leaf area represent the main morpho-anatomic adaptations of plants from drier and warmer climates. Histochemical tests were positive for alkaloids, polysaccharides, proteins and phenolic compounds, being negative for starch only in plants subjected to water stress. We concluded that the morpho-anatomical and histochemical alterations found in the plants of this study resulted from seasonal water deficit adaptations and to maintain or attract mutualistic organism.

Keywords: Description; Alkaloid; Trichome; Secretory duct; Domatia.

2.1 Introdução

Rubiaceae é a quarta maior família de angiospermas (Robbrecht, 1988) destacando-se entre as principais plantas de interesse medicinal, ornamental e econômico (Gonçalves e Lorenzi, 2007). O gênero *Psychotria* é pantropical com aproximadamente 2000 espécies, sendo a maioria arbórea (Moraes et al., 2011). Em território brasileiro o gênero encontra-se distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, com cerca de 46 espécies no estado de São Paulo (Jung-Mendaçolli, 2007).

Na caracterização morfoanatômica das espécies têm sido considerados, entre outros, os seguintes caracteres: presença de alcaloides, cristais estiloides, contorno do pecíolo, ornamentação da cutícula e presença de tricomas nos tecidos foliares (Moraes et al., 2011). Estudos de morfologia interna e externa têm sido realizados e mostram que, espécies do gênero *Psychotria* possuem grande variação anatômica e organográfica, as quais têm sido relacionadas diretamente com sua estratégia de adaptação ao ambiente. Como demonstrado para *Psychotria schlechtendaliana*, que apresentou ajustes na estrutura anatômica da folha e da madeira, relacionados à distribuição de luz e disponibilidade de água nos diferentes estágios de sucessão ecológica em floresta tropical (Campbell et al., 2018).

A espécie *P. viridis*, apresenta distribuição pelas regiões Norte (Amazonas) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) do Brasil (Pic-Taylor et al., 2015) tem grande importância cultural devido a sua utilização em cerimônias religiosas, e vem despertando interesse farmacológico devido à presença de alcaloides bioativos (Soares et al., 2017). As variações na morfologia

interna e externa impulsionadas pelo ambiente, ainda não foram estudadas para a espécie. Domácias e drusas registradas em plantas cultivadas na zona de amortecimento do Parque Estadual dos Três Picos (Estado do Rio de Janeiro) foram consideradas características exclusivas desta espécie em relação à outras da família Rubiaceae (Quinteiro et al., 2006). Porém, outras espécies de *Psychotria* da Floresta Atlântica apresentaram domácias, sendo consideradas dentre os caracteres taxonômicos que auxiliam na determinação do gênero (Moraes et al., 2011). No entanto, a presença destas estruturas pode estar relacionada à presença de ácaros predadores (Agrawal e Karban, 1997). Claramente, as variações ou alterações morfológicas de caráter taxonômico e adaptativo apresentadas em *P. viridis* cultivadas em diferentes ambientes necessitam de melhor compreensão.

O objetivo do trabalho foi apresentar as alterações de características organográficas, anatômicas e histoquímicas das folhas de três populações de *P. viridis* cultivadas em diferentes condições ambientais, no estado de São Paulo, permitindo assim gerar informações importantes para melhor entendimento da adaptação da espécie em cultivos fora da região natural de ocorrência, podendo contribuir ainda para estratégias de manejo das populações plantadas, bem como para a elucidação de características vegetativas de importância para determinação taxonômica da espécie.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Área de estudo

As populações de *P. viridis* amostradas neste estudo localizam-se em três municípios da região Sudeste do Brasil, Campinas (22°45'49" S; 46°58'50" W), Mairiporã, especificamente na Serra da Cantareira (23°22'44" S; 46°35'18" W) e Piracicaba (22°42'0.47" S; 47°17'7.54" W). Elas foram plantadas em florestas secundárias ou, em pastagens abandonadas, e em diferentes momentos: entre 10 e 40 anos atrás. A vegetação é predominantemente Floresta Ombrófila densa em Campinas e Cantareira e floresta estacional semidecidual em Piracicaba. O clima destas regiões é classificado como zona subtropical úmida, recebendo em média 1.200 a 1.400 mm anuais de chuva. Em Piracicaba o inverno é seco, e o verão quente (tipo Cwa, conforme a classificação de Köppen) (Alvares et al., 2013), com temperaturas médias nos meses mais quentes, alcançando 24,5°C, e precipitação abaixo de 50 mm durante os seis meses mais frios (Sentelhas et al., 2003). Em Campinas, predomina

o subtipo climático sem estação seca e com verão quente (Cfa), onde a média de precipitação acumulada mensal é de 115 mm, sendo apenas dois meses com chuva abaixo de 50 mm (Sentelhas et al., 2003). Na região da Serra da Cantareira, também não há estação seca, porém possui verão temperado (tipo Cwb de Köppen), onde a temperatura média anual não passa de 23°C nos meses mais quentes, e a chuvas se concentra entre os meses de outubro e março, chegando aos 240 mm em Janeiro (Sentelhas et al., 2003).

2.2.2 Material vegetal

As plantas analisadas são provenientes da região amazônica e cultivadas sob sombreamento natural nas regiões de São Paulo já descritas. Foram selecionados trinta indivíduos adultos de *P. viridis*, obedecendo um padrão de uniformidade quanto ao tamanho, estado fenológico, aspecto vegetativo e classe diamétrica. Folhas completamente expandidas do terço médio da copa de cada planta foram coletadas aleatoriamente para todas as análises. Os materiais coletados foram identificados e registrados sob os números ESA 141418, 141419, 141420 e ESA 141421 no Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Departamento de Ciências biológicas na cidade de Piracicaba SP-Brasil.

2.2.3 Caracterização morfológica

Realizada em campo sob vista desarmada e em laboratório com o auxílio de estereomicroscópio e super lupa, seguindo descrições de (Metcalf e Chalk, 1979; Gonçalves e Lorenzi, 2007; Almeida e Almeida, 2018).

2.2.4 Determinação da área foliar

O comprimento foi medido a partir da ponta da folha até o ponto de inserção na base da lâmina com o ápice do pecíolo e a largura corresponde à medida perpendicular no ponto mais largo da região do terço médio da folha. As medidas foram feitas utilizando um paquímetro. A área foliar foi obtida através da equação ($\hat{Y}=0,66256(\text{Comp.Larg.})^{1,01156}$) desenvolvida e recomendada por Antunes et al. (2008). Como o desenho amostral e o padrão de distribuição dos dados de área foliar estimada de *P. viridis* cumpriram com as premissas estatísticas, prosseguimos com a análise de variância simples, seguida do teste de Tukey.

2.2.5 Análise estomática

Na caracterização do tipo e densidade dos estômatos foi utilizado o método de impressão epidérmica (Segatto et al., 2004), empregando adesivo instantâneo. As amostras foram coletadas no lado direito da nervura principal até a margem, tomando como referência a superfície adaxial, na região do terço mediano das folhas. Foram analisadas 10 folhas (1 folha/planta) de cada área e 3 campos microscópicos para cada folha de cada superfície (abaxial e adaxial), totalizando 180 campos analisados. Os Campos de 1mm^2 foram analisados em microscópio de luz e as imagens capturadas de maneira totalmente aleatória, com auxílio do software TsView. Como os dados do número de estômatos por mm^2 apresentaram características da função de distribuição de *Poisson*, ajustamos um modelo linear generalizado, seguido do teste de Tukey para comparação múltipla entre as médias das diferentes localidades.

2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras teciduais de aproximadamente 1,5 cm foram retiradas do terço médio de folhas e imediatamente fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) modificado com tampão fosfato pH 7,2 por 24 horas. Após esse período, uma parte das amostras foi mantida no glicerol a 30% durante 4 horas, em seguida mergulhada em nitrogênio líquido e criofaturada com lâmina sobre peça metálica. Todas as amostras foram submetidas à desidratação seriada, seguida da secagem ao ponto crítico de CO_2 (Horridge e Tamm, 1969), no processo de metalização, as amostras foram montadas sobre suportes de alumínio (Stubbs) usando fita de carbono dupla face e, com uso de um metalizador cobertas com camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e as eletromicrografias feitas ao microscópio eletrônico de varredura modelo LEO VP 435, operado a 20 kV.

2.2.7 Análise histológica

Cortes transversais, em material fresco, foram realizados à mão livre com auxílio de lâmina de barbear no terço médio da nervura central e borda direita da região mediana da lâmina foliar. As amostras foram coradas com azul de Astra e Fucsina básica para análise da estrutura anatômica e montadas com glicerina 50% entre lâmina e lamínula. As secções histológicas foram fotomicrografadas usando microscopia de luz, e as imagens capturadas na mesma escala usando câmera SAMSUNG (SDC-313).

2.2.8 Análises histoquímicas

A natureza química das substâncias ergásticas foi determinada em cortes transversais à mão livre, corados com Dragendorff para alcaloides e identificados pela cor castanho. Dupla coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) e naftol blue back (Fisher, 1968) foi usado para identificar os polissacarídeos pela cor rosa claro, amido em rosa intenso, compostos fenólicos de cor laranja e proteínas identificadas na cor azul. As secções histológicas foram montadas entre lâmina e lamínula com glicerina 50%, analisadas em microscópio de luz e as imagens capturas na mesma escala em câmera SAMSUNG (SDC-313).

2.3 Resultados

2.3.1 Organográficos e anatômicos

As plantas das três populações observadas neste estudo, apresentam porte arbustivo-arbóreo de 2-5m de altura, ramos cilíndricos, glabros, cor variando entre verde a marrom esverdeado com linhas de lenticelas bem destacadas; filotaxia oposta cruzada. As folhas são simples, lanceoladas, com face adaxial glabra, face abaxial pubescente somente nas nervuras principal e secundárias, margem inteira, ápice acuminado, base atenuada, penínérvea, padrão de venação do tipo Broquidódroma, 6-11 pares de nervuras secundárias, variando de opostas a alternas na mesma folha (Fig. 1A, B), não diferindo entre as plantas das diferentes localidades.

Na superfície foliar abaxial das três populações avaliadas houve variação da presença de domácias. Quando presentes são do tipo cripta, localizadas na interseção da nervura principal com a secundária (Fig. 1C, D), isoladas ou aos pares (2-4) com cavidade ampla e abertura restrita a uma fenda, recoberta por tricomas (Fig. 1E, F). Folhas curto pecioladas, sendo o pecíolo convexo e de comprimento médio, variando de 0,5 a 1,5 cm de nas três populações (Fig. 1G). Na face abaxial do limbo foliar observamos tricomas localizados apenas nas regiões das nervuras principal e secundárias, semelhantes nas folhas das três populações do estudo (Fig. 1I-N). Registramos a capacidade de propagação vegetativa pela indução e desenvolvimento de raízes adventícias nas regiões distal e proximal do pecíolo nas plantas das três populações avaliadas (Fig. 1H). Plantas submetidas a estresse sazonal apresentaram enrolamento da folha no sentido adaxial nos horários de alta luminosidade.

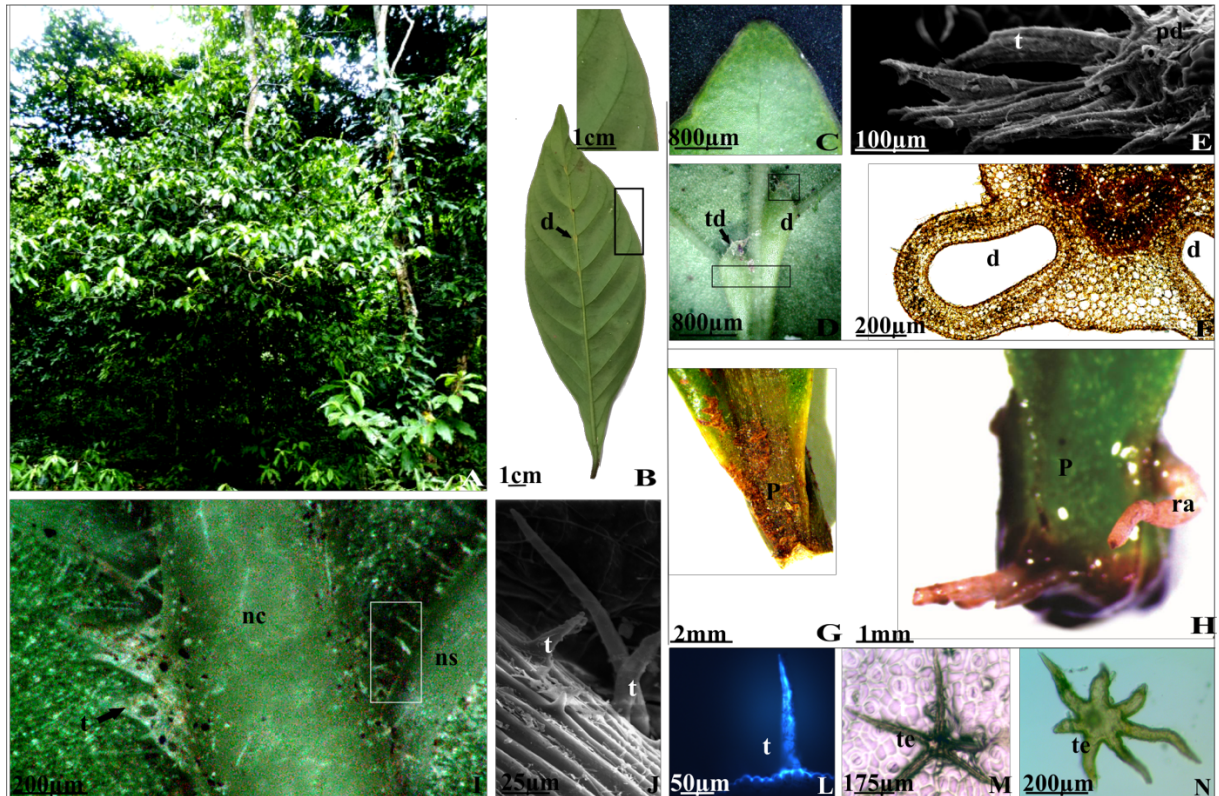


Figura 1. Morfologia externa de três populações de *P. viridis* cultivadas no Estado de São Paulo (A) Arbusto de *P. viridis*. (B) Folha de *P. viridis*, evidenciando no retângulo a venação broquidódroma. (C) Ápice foliar. (D) Domácias na face abaxial. A ponta da domácia mostrada no quadrado é evidenciada na fig. E, e a região central mostrada no retângulo evidenciada na fig. F. (E) Abertura de domácia recoberta por tricomas. (F) Seção transversal mostrando a cavidade interna da domácia na região mais ampla. (G) Pecíolo. (H) Raiz adventícia emitida do pecíolo. (I) Nervura principal e secundária evidenciando a presença de tricomas. (J) MEV de tricoma tector na nervura primária. (L) Captura em luz polarizada de tricoma tector unicelular. (M e N) Tricoma tector do tipo estrelar. Abreviações: d, domácia; nc, nervura central; ns, nervura secundária; pd, ponta de domácia; p, pecíolo; ra, raiz adventícia; t, tricoma; td: tricoma em domácia; te, tricoma estrelar.

Quanto à área foliar, as amostras das três populações foram consideradas significativamente diferentes entre si ($F=24,035$; $gl=2$; $p=0$), sendo as folhas da população de Piracicaba significativamente menores que as das outras localidades ($p<0,01$), ao passo que as amostras das populações de Campinas e Cantareira podem ser consideradas estatisticamente semelhantes ($p=0,1479$) (Fig. 2A). O comprimento do pecíolo não diferiu estatisticamente entre as amostras ($F=3,0124$; $gl=2$; $p=0,0659$). Com relação à densidade estomática, verificamos que a população de Piracicaba obteve densidade significativamente menor que as dos demais locais ($p<0.01$) (Fig. 2B).

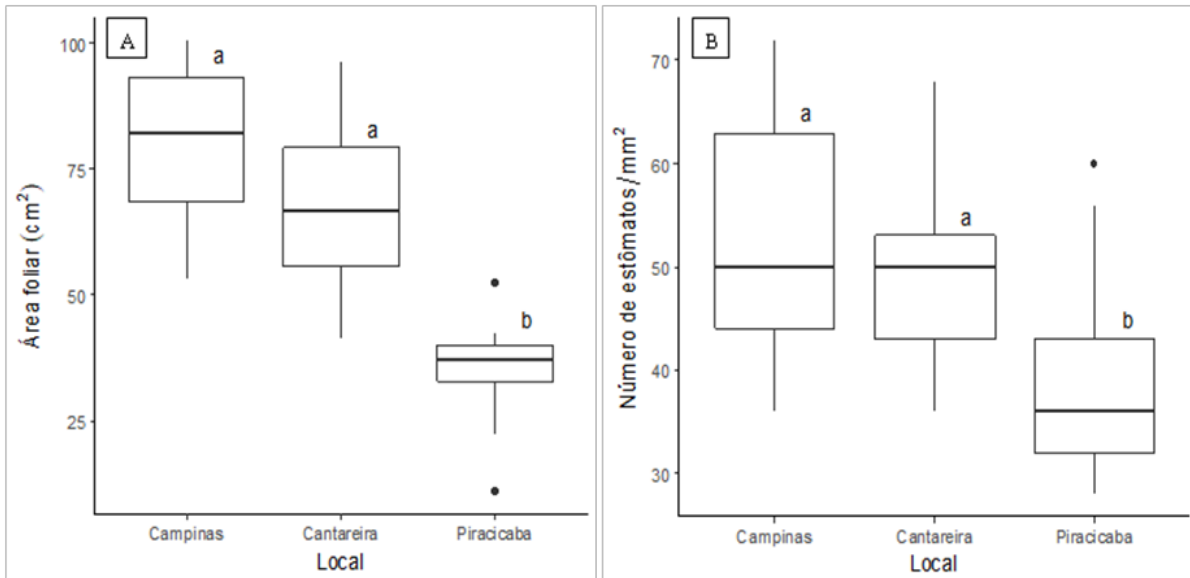


Figura 2. Comparação de área foliar e densidade estomática em folhas de *P. viridis* dos três locais de estudo. (A) área foliar (cm²); (B) densidade estomática (n/mm²). Barras horizontais são as medianas, caixas representam 50% dos dados (50° quantil), linhas são 95° quantil e pontos são “outliers”. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey

Análises de superfície foliar em MEV, super lupa e microscopia de luz revelaram o mesmo padrão básico para folhas de *Psychotria viridis* das três áreas estudadas (Fig. 3A-M). Em visão frontal as células epidérmicas são poligonais com parede anticlinal reta (Fig. 3A). Os estômatos anfi-hipoestomático, paracítico, apresentam distribuição aleatória em ambas as superfícies adaxial e abaxial (Fig. 3B-E) com célula guarda reniforme e câmara subestomática logo abaixo (Fig. 3I). Nas três regiões de estudo a espécie apresenta padrão de cera epicuticular lisa e granular na face adaxial (Fig. 3E, F), canículada e papilar na abaxial (Fig. 3G, H). Observou-se a presença de estípula terminal, que em secção longitudinal evidenciou a presença de coléteres dendróides recobertos por tricomas tectores unicelulares e multicelulares estrelados (Fig. 3J-M).

As secções transversais das folhas de *P. viridis* das três populações estudadas apresentam epiderme unisseriada em ambas as superfícies, com células evidenciando o vacúolo bem desenvolvido e frequente presença de drusas, possivelmente de oxalato de cálcio (Fig. 4A-C), mesofilo heterogêneo dorsiventral, com parênquima clorofiliano paliçádico unisseriado, composto por uma única camada de células alongadas e justapostas na superfície adaxial, e parênquima lacunoso presente na face abaxial apresentando 4-6 camadas de células de tamanhos variados, com espaços intercelulares irregulares e reduzidos (Fig. 4A-C).

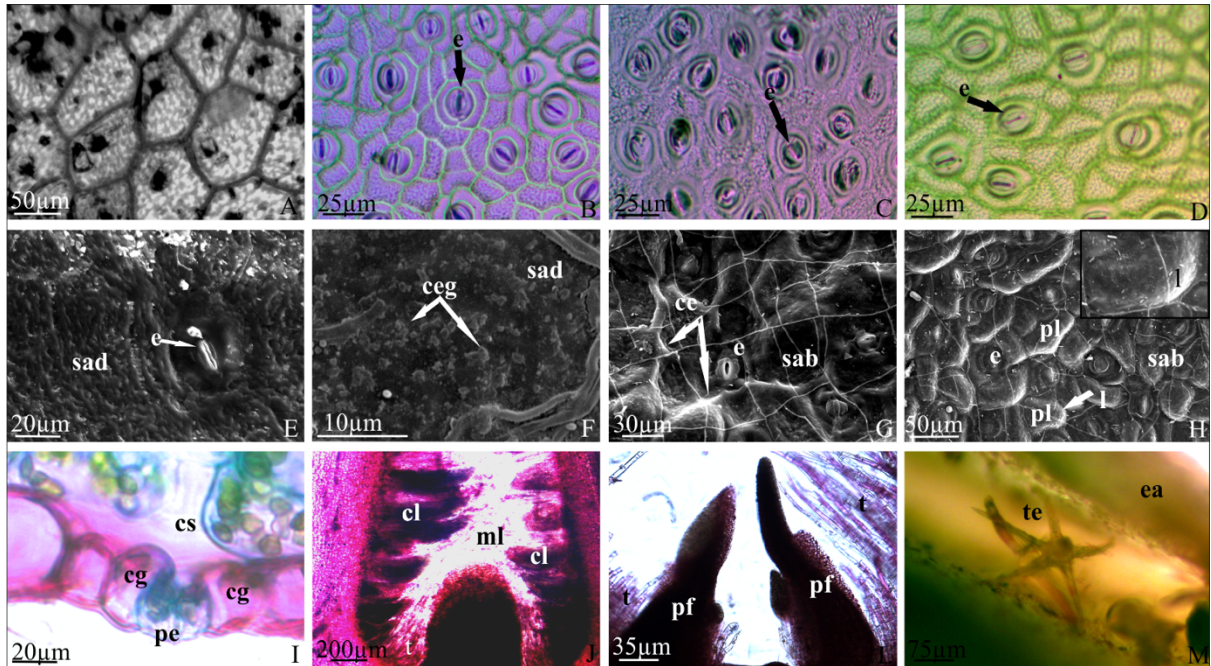


Figura 3. Observação em MEV, super lupa e microscopia de luz da superfície foliar de *P. viridis* em três populações da região Sudeste do Brasil. (A-C) vista superficial de folhas. (A) Face adaxial mostrando células com padrão poligonal e parede anticlinal reta. (B-D) Padrão e densidade de estômatos de *P. viridis*. (B, C) população de Campinas e Serra da Cantareira. (D) Evidenciando menor densidade estomática na população de Piracicaba. (E-H) imagens de MEV da superfície foliar de *P. viridis*. (E) Estômato na face adaxial e cera epicuticular lisa. (F) face adaxial mostrando cera epicuticular granular. (G) Face abaxial com cera epicuticular canaliculada. (H) Superfície abaxial evidenciando o lóbulo da papila epicuticular. (I) Secção transversal de estômato. (J-M) Secção longitudinal da estipula apical. (J, L) Evidenciando os coléteres e tricomas. (M) tricoma estrelado na face adaxial da estipula. Abreviações: cs, câmara subestomática; cl, coléter; ce, cera epicuticular; cg, célula guarda; ceg, cera epicuticular granular; e, estômato; ea, estipula apical; ml, mucilagem; l, lóbulo; pf, primórdio foliar; pl, papila; pe, poro estomático; sab, superfície abaxial; sad, superfície adaxial; te, tricoma estrelado.

O sistema vascular em forma de arco convexo voltado à face adaxial da folha, com projeções terminais convexas, voltadas à face abaxial. Projeções terminais do arco vascular apresentam fragmentação das extremidades com formação de aglomerados de xilema e floema no interior (Fig. 4 D-F).

Presença de células colenquimáticas angular imediatamente abaixo da epiderme adaxial (Fig. 4 F). As células do xilema apresentando disposição radiada separados por raios parenquimáticos (Fig. 4F). Bainha esclerenquimática circundando o feixe principal e feixes adicionais presentes em número de 1-4 pares lateralmente à nervura principal (Fig.4 E -G). Na região central da nervura parênquima medular com idioblastos (Fig. 4 H). Domácias em plantas de Serra da Cantareira e Campinas (Fig. 4 I). Presença esporádica de ductos glandulares dispostos adjacentes e acompanhando a nervura central (Fig. 4 J, K).

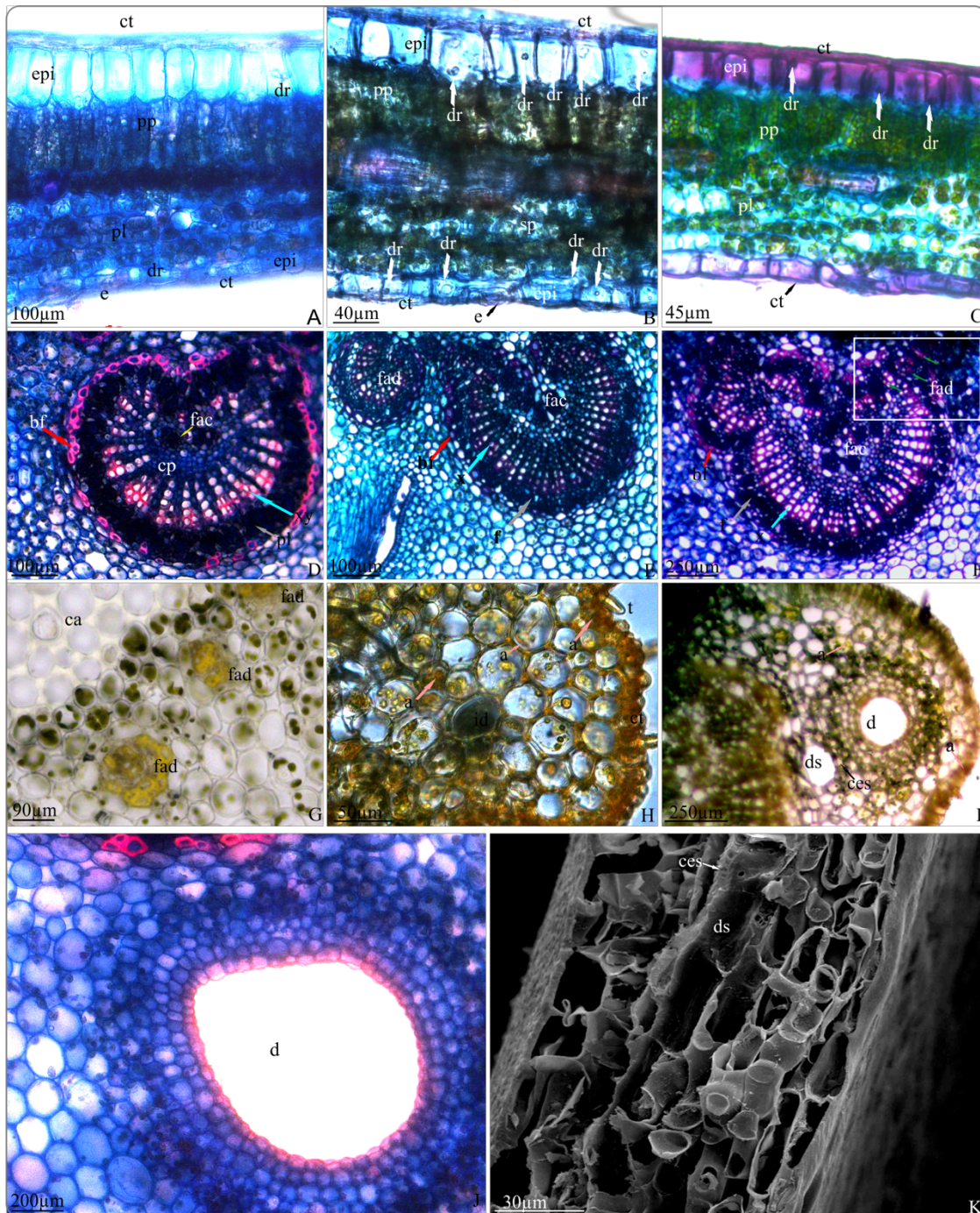


Figura 4. Secção transversal de folha de *P. viridis* de três populações cultivadas no Estado de São Paulo. (A- C) Mesófilo dorso-ventral, drusas em células da epiderme, do parênquima paliçádico e múltiplas camadas no parênquima lacunoso. (B) Várias drusas observadas nas células epidérmicas de plantas de Piracicaba. (C) Cutícula espessa e maior espaço intercelular nas folhas das plantas de Serra da Cantareira. (D) Região da nervura central mostrando bainha de fibras e feixes vasculares acessórios internos. (E, F) feixes adicionais. (G, H) Região do colênquima acima e abaixo da nervura central mostrando coloração positiva para alcaloides pelo reagente Dragendorff, destacando as células do colênquima e o padrão de feixes adicionais (fad), que foi semelhante nas três populações. (H) Presença de idioblastos e tricoma tector. (I) Presença de domácia e ducto secretor cercados por células do epitélio secretor na população de Piracicaba. (J) Forma interna da domácia em todas as populações. (K) Imagem de Microscopia eletrônica de varredura (SEM) mostrando ducto secretor em corte longitudinal. Abreviações: a, alcaloide (seta laranja); bf, bainha de fibra (seta vermelha); ca, colênquima angular (seta verde); ces, célula do epitélio secretor; cp, célula do parênquima; ct, cutícula; d, domácia; dr, drusa (seta branca); epi, epiderme; fac, feixes acessórios; fad, feixes adicionais; f, floema id, idioblastos; (seta cinza); ds, ducto secretor; t, tricoma; x, xilema (seta azul).

2.3.2 Histoquímicos

As análises histoquímicas realizadas com Dragendorff revelaram a presença de alcaloides na cutícula, na epiderme, nas células do colênquima, nos parênquimas paliçádico e lacunoso e nos tricomas (Fig. 5 A, B). O reativo de Schiff (PAS) revelou presença de compostos fenólicos em células do colênquima e parênquima lacunoso (Fig. 5 C, D), foram observados polissacarídeos nas paredes de células da epiderme e do colênquima, e presença de proteínas em células dos parênquimas paliçádico e lacunoso Fig. 5 C, D).

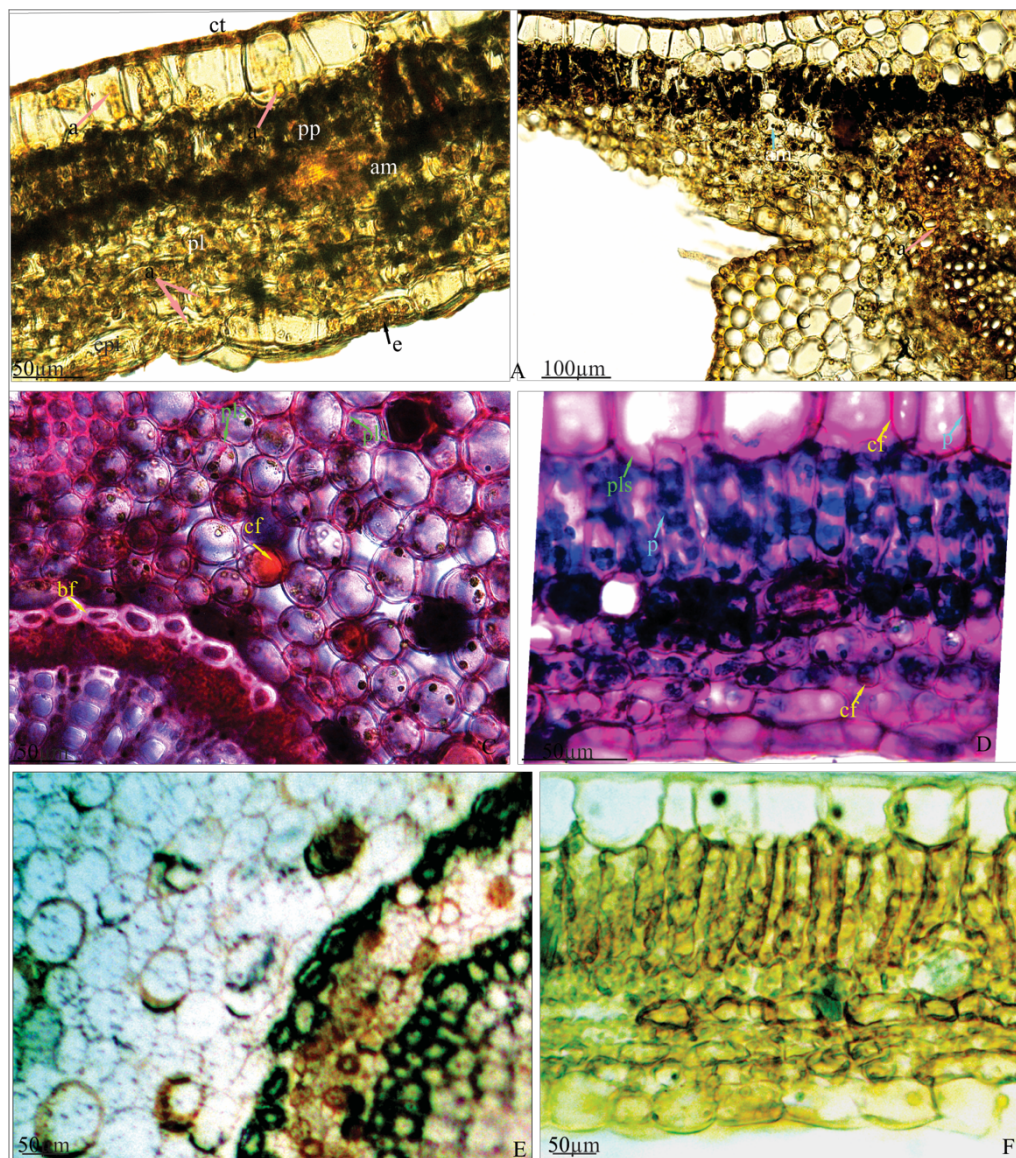


Figura 5. Seção transversal do terço médio das folhas de *P. viridis* mostrando o padrão histoquímico de três populações cultivadas no Estado de São Paulo. (A, B) O reagente Dragendorff revelou a presença de alcalóides na cutícula, vacúolo, parede celular e tricomas na nervura central para as três populações e amido nas células do colênquima, paliçádico e parênquima lacunoso nas folhas das populações de Campinas e Serra da Cantareira. (C, D) Reação positiva para compostos fenólicos, polissacarídeos e proteínas por coloração com PAS. (E, F) Controle. Abreviações: a, alcaloide; ct, cutícula; epi, epiderme; bf, bainha de fibra; p, proteína; cf, compostos fenólicos; pls, polissacarídeos; pp, parênquima paliçádico; am, amido; e, estômato t, tricoma.

2.4 Discussão

As folhas de *P. viridis* amostradas apresentam características morfológicas que, em sua maioria, são comuns ao gênero (Metcalf e Chalk, 1979; Quinteiro et al., 2006; Gonçalves e Lorenzi, 2007). No entanto, algumas características anatômicas apresentadas aqui estão sendo descritas e discutidas pela primeira vez para a espécie, tais como o padrão anfi-hipoestomático, variação intraespecífica da presença de domácias, área foliar e densidade de estômatos, bem como outras adaptações anatômicas que favorecem a economia hídrica de plantas sob estresse.

A formação de raiz adventícia no pecíolo com o conseqüente desenvolvimento de plântulas, permite inferir que estas apresentam conexão com o sistema vascular principal do pecíolo, como sugerido para *Camellia sinensis* (Koyuncu e Balta, 2004). A formação de raízes adventícias em tecidos foliares de *P. viridis* também foi registrada por Salgado et al. (2012), o que indica uma estratégia reprodutiva alternativa da espécie, conferindo a capacidade de propagação vegetativa a partir das folhas, quando se desprendem e chegam ao solo, e que pode ser de extrema importância quando os vetores de polinização e dispersão estão ausentes.

As domácias são recobertas por tricomas, se apresentam bem visíveis, a partir de visão desprovida, pouco proeminentes ou até mesmo ausentes entre indivíduos adultos de uma mesma população. Esta variação indica que a presença ou ausência dessas estruturas não constitui uma característica de determinação taxonômica para *P. viridis*, muito embora sejam citadas como estruturas importantes para a taxonomia da família Rubiaceae (Metcalf e Chalk, 1979; Judd et al., 2009) e do gênero *Psychotria* (Agrawal e Karban, 1997; Moraes et al., 2011). A presença de domácias nesta espécie pode estar mais relacionada à presença de ácaros predadores observados, somente em plantas de duas populações estudadas, usando essas estruturas como abrigo. Esse fato nos leva a sugerir que a presença de ácaros, desde o início da formação foliar, pode levar a necessidade de formação de domácias na folha que é beneficiada pela defesa indireta proporcionada por estes animais. Ao mesmo tempo em que a presença dessas estruturas na folha pode aumentar o recrutamento deste agente de defesa (Agrawal e Karban, 1997; O'Connell et al., 2010). Este tipo de relação, possivelmente mutualística, entre artrópodes e plantas já foi sugerida para outras espécies (Whiffin, 1972; Matos et al., 2006; Michelangeli, 2010). Mesmo assim, ainda é necessário um estudo mais detalhado que possibilite determinar a natureza mutualística desta relação para *P. viridis*.

Tricomas tectores unicelulares e pluricelulares localizados na estípula apical e nas nervuras primárias e secundárias em folhas de plantas dos três locais desse estudo indicam uma estratégia de economia hídrica da espécie. Os lipídios presentes nas paredes das células basais

dos tricomas contribuem para reduzir a perda apoplástica de água (Barros e Soares, 2013). Dessa forma, a localização estratégica dos tricomas em *P. viridis* pode contribuir para impedir a perda de água pelas células do feixe vascular e evitar a dessecação da estípula apical, e conseqüentemente, protegendo a gema apical tanto da desidratação quanto de choques mecânicos e, ataque de predadores e patógenos.

Coléteres dendroides em disposição longitudinal na face adaxial da estípula apical com alta densidade de tricomas e substância mucilaginosa foram encontrados nas três populações. Estes formam uma estrutura de proteção que evita o contato dos fungos, hospedeiros das folhas de *P. viridis*, com o primórdio foliar. Como a mucilagem tem função de lubrificação da gema apical (Fahn, 1979), a presença dessa substância pode facilitar o deslizamento de ácaros entre as superfícies do primórdio foliar, reforçando nossa sugestão para a relação de ácaros com a presença de domácias nas plantas deste estudo.

As folhas das três populações avaliadas neste estudo apresentaram-se anfi-hipoestomática, característica essa não relatada até o presente momento para *P. viridis*. A densidade estomática apresentou relação positiva com a área foliar e negativa com comprimento do pecíolo para todas as plantas avaliadas. Além disso, diferença significativamente menor em densidade dos estômatos foi exibida pelas plantas de Piracicaba. Uma vez que a densidade estomática é determinada pela iniciação dos estômatos durante a ontogênese (Salisbury, 1927) e regulada desde o seu desenvolvimento por sinais hormonais (Bergmann, 2004) associados às informações ambientais (Pompelli et al., 2010) assim, menor número de estômato por mm² na população de Piracicaba pode ser compreendido como um ajuste anatômico adaptativo em resposta ao estresse hídrico sazonal no qual as plantas desta população estão submetidas.

A cutícula é mais espessa na face adaxial do que na abaxial, não sendo observada influência do ambiente na espessura cuticular. Resultados semelhantes foram encontrados para outras espécies (Esau, 1976; Dickison, 2000) podendo ser atribuído a função de evitar a perda de água não estomática (Kosma e Rowland, 2016) independente da espessura da cutícula. A cera epicuticular na face abaxial apresenta padrão canicular filamentosos e papilar para as plantas das três populações avaliadas, sendo lisa ou granular na face adaxial, como descrito por Vieira e Gomes (1995) para *P. nuda*, *P. leiocarpa*, *P. stenocalyx*, and *P. tenuinervis*. No padrão granular, os grânulos formam agregados de distribuição irregular, observados somente, na face adaxial de plantas sob estresse hídrico sazonal. Epicutícula com padrão granular foi associado à dissolução da cera por enzimas secretadas pela flora micológica (Juniper e Jefree, 1983).

Porém, foi evidente em todas as plantas examinadas neste estudo, a maior incidência de fungos na face abaxial, onde não foi observado o padrão granular de ornamentação. Com base nestas observações, podemos inferir que o padrão de deposição de cera epicuticular para *P. viridis* pode, também, estar associado à estratégia adaptativa de manutenção hídrica da espécie.

Epiderme unisseriada com células apresentando paredes anticliniais maiores que as pericliniais na face adaxial do que na abaxial, onde apresenta tamanhos variados é considerada como uma característica comum em *Psychotria* (Metcalf e Chalk, 1979; Quinteiro et al., 2006; Zini et al., 2016). Idioblastos contendo alcaloides, drusas dispersas ao longo de todo o limbo foliar, principalmente em células epidérmicas, também foram encontradas em espécies de *Borreria* por Zini et al. (2016). Drusas tem papel importante na defesa contra herbívoros e de acordo com Franceschi e Nakata (2005) contribuem para ampliar o aproveitamento da luz durante a fotossíntese em plantas que crescem na sombra.

Sistema vascular em forma de arco, com a convexidade voltada para a face adaxial da folha e projeções terminais convexas voltados para face abaxial foram observadas para todas as plantas estudadas, semelhante ao observado para as diversas espécies de *Psychotria* (Moraes et al., 2011) Os feixes vasculares estão incluídos em um cilindro de fibras, constituindo uma bainha fibrosa, já descritos por Quinteiro et al. (2006) que confere maior resistência aos movimentos da folha (Cutler et al., 2011). Nas folhas das três populações foi observada a presença de feixes acessórios, que representam aglomerados de xilema e floema sem organização definida, formados a partir da fragmentação das extremidades do feixe principal (Mantovani et al., 1995). Estes são característicos de alguns membros do gênero, como em *P. carthagenensis* e *P. suturella* (Zini et al., 2016), *Irlbachia nemorosa* (Corrêa et al., 2014). Nas plantas deste estudo os feixes adicionais de conformação concêntrica e anficrival foram sempre observados em pares de 1-3, podendo apresentar raramente 4 pares que acompanham a nervura central, longitudinalmente, por toda a extensão do limbo foliar.

A diferença ambiental nos três locais estudados, principalmente quanto à disponibilidade hídrica, também levou a alterações anatômicas. Ductos glandulares acompanhando a nervura primária em sentido longitudinal por toda a extensão da folha foram registrados em amostras da população de Piracicaba que é sazonalmente submetida a estresse hídrico, semelhante ao encontrado por Esposito-Polesi et al. (2011) para *Eugenia glazioviana*. Possivelmente isto representa uma resposta adaptativa refletida em alteração anatômica irreversível, que segundo Esau (1976) pode ocorrer desde o primórdio da gema foliar. Sugerimos a possibilidade de que os ductos em *P. viridis* estejam envolvidos no processo de enrolamento no sentido adaxial da folha, em plantas sob estresse hídrico, como encontrado

neste estudo, e sua imediata expansão após irrigação, que se daria por meio da rápida entrada e saída de água ao longo desses ductos (Esposito-Polesi et al., 2011), assim representando uma estratégia à economia de água, não descrita até o presente momento para a espécie. Considerando os mecanismos de escape ao déficit hídrico (Begg e Turner, 1976) e a importância do enrolamento foliar para a manutenção hídrica (Kramer e Boyer, 1995), ductos e enrolamento da folha, tais como observados neste estudo, podem ser considerados uma habilidade de *P. viridis* para se ajustar ao déficit hídrico e evitar a abscisão foliar.

Substâncias ergásticas identificadas neste trabalho, mucilagem na estipula apical, compostos fenólicos, polissacarídeos, proteína e alcaloides em células epidérmicas e parenquimáticas do mesofilo foram comuns às três populações estudadas, já tendo sido citados por Quinteiro et al. (2006). A única exceção encontrada foi para amido, que não foi detectado durante as análises na população submetida a estresse hídrico sazonal. Redução na taxa de acúmulo de amido foi verificada em plantas de trigo sob estresse hídrico (Pan et al., 2007), e evidências de que o esgotamento prematuro de amido resulta em baixas taxas de crescimento de plantas são mostradas em revisão realizada por Stitt e Zeeman (2012). O amido é um carboidrato de reserva envolvido no desenvolvimento, crescimento e manutenção da planta, o esgotamento deste carboidrato pode ter desempenhado papel importante para redução da área foliar, como efeito negativo de uma fase de estresse hídrico das plantas.

2.5 Conclusão

A maioria das características morfoanatômicas e histoquímicas de *P. viridis* cultivadas em região extra-amazônica são consistentes com as já descritas para a espécie. As diferenças encontradas neste estudo como ductos glandulares possivelmente contendo substâncias osmorreguladoras, enrolamento foliar, redução de área foliar e esgotamento de amido é sugerido que estejam associadas com o conseqüente morfológico e fisiológico esforço adaptativo da espécie, principalmente, ao déficit hídrico sazonal.

As variações exibidas revelam a capacidade da espécie em adaptar-se à alta incidência de luz, desenvolver estratégias de tolerância à baixa disponibilidade hídrica e para atração e manutenção de organismos mutualistas. No entanto, consideramos a necessidade de estudos mais amplos, incluindo populações de outras localidades, principalmente de sua região original de dispersão, que poderão fornecer subsídios para entender melhor as respostas anatômicas desta espécie aos parâmetros ambientais.

Referências

- Agrawal, A. A., & Karban, R. (1997). Domatia mediate plant– arthropod mutualism. *Nature*, 387(5), 562–563.
- Almeida, M. de, & Almeida, C. V. de. (2018). Morfologia da folha de plantas com sementes.
- Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. L. de M., & Sparovek, G. (2013). Köppen’s climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6), 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Antunes, W. C., Pompelli, M. F., Carretero, D. M., & Damatta, F. M. (2008). Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). *Annals of Applied Biology*, 153, 33–40. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00235.x>
- Barros, I. O., & Soares, A. A. (2013). Adaptações anatômicas em folhas de marmeleiro e velame da caatinga. *Revista Ciência Agronômica*, 44(1), 192–198.
- Begg, J. E., & Turner, N. C. (1976). Crop Water Deficits (pp. 161–217). New York. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60555-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60555-6)
- Bergmann, D. C. (2004). Integrating signals in stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(26), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.10.001>
- Campbell, G., Mielke, M. S., Rabelo, G. R., & Da Cunha, M. (2018). Key anatomical attributes for occurrence of *Psychotria schlechtendaliana* (Müll.Arg.) Müll.Arg. (Rubiaceae) in different successional stages of a tropical moist forest. *Flora*, 246–247, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.07.004>
- Corrêa, M. M., Melo, G. A. M., Krahl, H. A., & Araújo, M. G. P. (2014). Morfoanatomia foliar de *Irlbachia nemorosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) Merr. (Gentianaceae: Helieae). *Biota Amazônia*, 4(2), 5–8.
- Cutler, D. F., Botha, T., & Stevenson, D. W. (2011). *Anatomia vegetal - uma abordagem aplicada*. Porto Alegre: Artmed.
- Dickison, W. C. (2000). *Integrative Plant Anatomy* (1st ed.). San Diego: Academic Press.
- Esau, K. (1976). *Anatomia de plantas com sementes* (1st ed.). São Paulo: Edgard Blücher.
- Esposito-Polesi, N. P., Rodrigues, R. R., & Almeida, M. (2011). Anatomia ecológica da folha de *Eugenia glazioviana* Kiaersk (Myrtaceae). *Revista Árvore*, 35(2), 255–263.
- Fahn, A. (1979). *Secretory tissues in plants* (1st ed.). New York: Academic Press.
- Fisher, D. B. (1968). Protein staining of ribboned epon section for light microscopy. *Histochemie*, 16, 92–96.

- Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). Calcium Oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 41–71.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>
- Gonçalves, E. G., & Lorenzi, H. (2007). *Morfologia Vegetal - Organografia e Dicionário Ilustrado de Morfologia das Plantas Vasculares (1ª)*. São Paulo.
- Horridge, G. A., & Tamm, S. L. (1969). Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. *Science (New York, N.Y.)*, 163(3869), 817–818.
<https://doi.org/10.1126/science.163.3869.817>
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (2009). *Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético - Walter S. Judd, Christopher S. Campbell, Elizabeth A. Kellogg, Peter F. Stevens, Michael J. Donoghue - Google Livros* (3rd ed.). Porto Alegre -RS: Artmed.
- Juniper, B. E., & Jeffrey, C. E. (1983). *Plant surfaces*. London: Edward Arnold.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27(15), 137. <https://doi.org/10.1038/srep27790>
- Kosma, D. K., & Rowland, O. (2016). Answering a four decade-old question on epicuticular wax biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 67(9), 2538–2540.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw144>
- Koyuncu, F., & Balta, F. (2004). Adventitious root formation in leaf-bud cuttings of tea (*Camellia sinensis* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 36(4), 763–768.
- Kramer, P. J., & Boyer, J. S. (1995). *Water relations of plants and soils*. Delaware: Academic Press.
- Mantovani, A., Gomes, M., Gomes, D. M. S., & Vieira, R. C. (1995). Anatomia foliar de *Rudgea decipiens* Mull. Arg. e *R. macophylla* Benth. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 9(2), 247–261.
- Matos, C. Helena C., Pallini, A., Bellini, L. L., & Freitas, R. C. P. de. (2006). Domácias e seu papel na defesa das plantas. *Ciência Rural*, 36(3), 1021–1026.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000300050>
- Metcalf, C. R., & Chalk, L. (1979). *Anatomy of the dicotyledons* (2nd ed.). New York.
- Michelangeli, F. (2010). An Annotated List and Key. *Proceeding of the California Academy Of Science*, 61(9), 409–449.
- Moraes, T. M. da S., Rabelo, G. R., Alexandrino, C. R., José, S., & Cunha, M. Da. (2011).

- Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest. *Acta Botanica Brasilica*, 25(1), 178–190.
- Moraes, T. M. da S., Rabelo, G. R., Alexandrino, C. R., Silva Neto, S. J. da, & Da Cunha, M. (2011). Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest. *Acta Botanica Brasilica*, 25(1), 178–190. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000100021>
- O’Connell, D. M., Lee, W. G., Monks, A., & Dickinson, K. J. M. (2010). Does microhabitat structure affect foliar mite assemblages? *Ecological Entomology*, 35(3), 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01185.x>
- Pic-Taylor, A., da Motta, L. G., de Moraes, J. A., Junior, W. M., Santos, A. de F. A., Campos, L. A., Caldas, E. D. (2015). Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behavioural Processes*, 118, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.05.004>
- Pompelli, M. F., Martins, S. C. V., Celin, E. F., Ventrella, M. C., & DaMatta, F. M. (2010). What is the influence of ordinary epidermal cells and stomata on the leaf plasticity of coffee plants grown under full-sun and shady conditions ? *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1083–1088.
- Quinteiro, M., Teixeira, D., Moraes, M., & Silva, J. (2006). Anatomia foliar de *Psychotria viridis* Ruiz & Pav.(Rubiaceae). *Revista Universidade Rural. Série Ciências Da Vida*, 26(2), 30–41.
- Robbrecht, E. (1988). *Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification* (Vol. 1). Belgium: Opera Botanica Belgica.
- Salgado, P. M. G., Furlan, M. R., Aoyama, E. M., Rodrigues, E., & Cruz, L. P. (2012). Asexual propagation of *Psychotria viridis* (RUIZ & Pavon) via leaf cutting. *Revista Em Agronegócios e Meio Ambiente*, 5(2), 383–396.
- Salisbury, E. J. (1928). On the causes and ecological significance of stomatal frequency. *Ecology*, IX(2), 1–65.
- Segatto, F. B., Benedetti, M., Rampelotto, M. V., & Nicoloso, F. T. (2004). Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata 1. *Ciência Rural*, 34(5), 1597–1601.
- Sentelhas, P. C., Marin, F. R., Ferreira, A. S., & Sá, E. J. S. (2003). Banco de Dados Climáticos do Brasil. Retrieved October 15, 2018, from

<https://www.cnpm.embrapa.br/projetos/bdclima/autoria.html>

Soares, D. B. S., Duarte, L. P., Cavalcanti, A. D., Silva, F. C., Braga, A. D., Lopes, M. T. P., ... Silva, F. C. (2017). *Psychotria viridis*: Chemical constituents from leaves and biological properties. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(2), 927–938.

<https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160411>

Stitt, M., & Zeeman, S. C. (2012, June). Starch turnover: Pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.016>

Taylor, C. M. (2007). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo Online. In G. J. Shepherd (Ed.), *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* (1st ed., pp. 411–412). São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo.

Vieira, R. C., & Gomes, D. M. S. (1995). Superfície da lâmina foliar de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra. *P. Leiocarpa* Cham. & Schltdl., *P. stenocalix* Mull. Arg. e *P. tenuinervis* Mull. Arg. (Rubiaceae). *Acta Bot. Bras.*, 9(2), 263–270.

Whiffin, T. (1972). Observations on some Amazonian Formicarial Melastomataceae. *Contributions to Botany*, 5(1), 33–41.

Zini, A. da S., Martins, S., Toderke, M. L., & Temponi, L. G. (2016). Anatomia foliar de Rubiaceae ocorrentes em fragmento florestal urbano de Mata Atlântica, PR, Brasil. *Hoehnea*, 43(2), 173–182. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-59/2015>

3. TEOR DE *NN*-DIMETILTRIPTAMINA (DMT) EM *PSYCHOTRIA VIRIDIS* - EVIDÊNCIAS DA CONTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FOLIARES E DA DISPONIBILIDADE HÍDRICA

RESUMO

Psychotria viridis é uma espécie arbustiva da família Rubiaceae, encontrada em regiões tropicais e cultivadas na maioria dos biomas brasileiros. O uso desta espécie se expandiu a nível mundial, em razão dos efeitos enteogênicos e farmacológicos que o alcaloide *N,N*-dimetiltriptamina (DMT), presente principalmente nas folhas, promove aos usuários do chá Ayahuasca. Diversos estudos já relataram uma ampla variação no teor de DMT em *P. viridis*. Este estudo foi realizado para verificar as causas subjacentes destas variações. Folhas de plantas cultivadas em dois ecossistemas da Amazônia: Terra-firme (TF) e Campinarana (CAMP) foram analisadas. Sinuosidade nas células da epiderme, ajustes nas células do mesófilo, expressiva presença de ráfides e drusas foram alterações morfológicas e anatômicas de ajustes ao estresse hídrico em plantas de CAMP; a análise histoquímica revelou o acúmulo de alcaloides em células coletoras, cutícula e espaços intercelulares como estratégias de defesa da espécie. O teor de DMT foi favorecido por maior funcionalidade estomática e afetado pela disponibilidade hídrica em plantas de CAMP. Nos ecossistemas de TF e CAMP a disponibilidade hídrica do ambiente causa alterações em características foliares que interferem no teor de alcaloides em *P. viridis*. Além disso, a presença de ácaros e fungos em todas as plantas estudadas sugere uma possível relação simbiótica com influência no potencial fitoquímico da espécie.

Palavras-chave: Ayahuasca; *N,N*-dimetiltriptamina (DMT); Ecossistemas Amazônicos; *Psychotria viridis*

ABSTRACT

Psychotria viridis is a shrub species of the Rubiaceae family, found in tropical regions and cultivated in most Brazilian biomes. Use of this species has expanded worldwide due to the entheogenic and pharmacological effects that the alkaloid *N,N*-Dimethyltryptamine (DMT), present mainly in the leaves, promotes to the users of Ayahuasca tea. Several studies have already reported a wide variation of DMT content in *P. viridis*. This study was carried out to verify the underlying causes of these variations. Leaves of plants grown in two Amazonian ecosystems, *Terra-firme* (TF) and *Campinarana* (CAMP) were analyzed. Sinuosity in epidermal cells, adjustments in mesophyll cells and notable presence of druses and raphides were the morphological and anatomical responses to water stress observed in CAMP plants. Immunohistochemical analysis revealed the alkaloid accumulation in the collecting cells, cuticle and intercellular spaces, as defense strategies of the species. The DMT content was favored by greater stomata functionality and affected by water availability in CAMP plants. In TF and CAMP ecosystems, the environment water availability causes changes in leaf characteristics that interfere in the alkaloids content in *P. viridis*. Moreover, the presence of mites and fungi in all

studied plants, suggests a possible symbiotic relationship, which could influence the phytochemical potential of the species.

Keywords: Ayahuasca; *N,N*-dimethyltryptamine (DMT); Amazonian ecosystem; *Psychotria viridis*

3.1 Introdução

A Amazônia comporta uma diversidade de ecossistemas que possuem características ambientais distintas. Neste bioma, as estações do ano variam de acordo com a sub região (Alvares et al. 2013) portanto, os períodos de inverno e verão são geograficamente heterogêneos (Weckmüller and Vicens 2011). Na Amazônia brasileira, destacam-se os ecossistemas de Terra-firme (TF) e Campinarana (CAMP) que possuem características distintas, tanto nas taxas pluviométricas anuais quanto nas propriedades físico-químicas do solo (Ab'Saber Rodrigues et al. 2001; Silva & Silva 2006). No entanto, estes ecossistemas sustentam uma rica biodiversidade de flora com potencial fitoterápico, de modo que várias espécies são tradicionalmente conhecidas e de utilização milenar.

Ayahuasca é uma bebida enteogênica preparada com caules de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) e folhas de *P. viridis*. Esta bebida é a base ritualística e medicinal de diversos povos tradicionais e indígenas da Amazônia, com evidências de uso remontando 1500-2000 a.C (McKenna 2004), e em ampla expansão em diversos países de todos os continentes (Gaujac 2013; Pires, Oliveira, and Yonamine 2010; Miranda et al. 2020). Os alcaloides presentes no chá Ayahuasca e nas plantas que o compõem, têm sido amplamente estudados com fins terapêuticos e medicinais (Callaway et al. 1999; Callaway, Brito, and Neves 2005; Wang et al. 2010; Cragg and Newman 2013; R. G. Santos et al. 2016; Soares et al. 2017), e tem sido mostrado que há variações no teor dos alcaloides, quando o chá é preparado com plantas de diferentes regiões (McKenna 2004; Grob et al. 1996; Callaway et al. 1999b; M. C. Santos, Navickiene, and Gaujac 2017).

Psychotria é um dos maiores gêneros da família Rubiaceae encontrado em regiões tropicais ao redor do mundo (Blackledge and Taylor 2003). *P. viridis* é uma espécie arbustiva que possui ampla distribuição na América do Sul (Mabberley 1997; Reynolds. 1980; Taylor, Gomes, and Zappi 2015) e, no Brasil, a Amazônia é o centro de dispersão da espécie (Flora do Brasil, 2020). A espécie é caracterizada pela produção de metabolitos bioativos com grande potencial farmacológico (Pires, Oliveira, and Yonamine 2010) entre eles *N,N*-dimethyltryptamine (DMT), um alcaloide indólico, presente principalmente nas folhas de *P.*

viridis (Soares et al. 2017), responsável pelos efeitos psicotrópicos apresentados pelo chá Ayahuasca (Costa, Figueiredo, and Cazenave 2005).

A produção de substâncias ativas em plantas é complexa (Ncube, Finnie, and Van Staden 2012) pois sua composição, metabolismo (Sutcliffe, 1980), biossíntese e acúmulo é fortemente correlacionada com as associações ambientais (Holopainen and Gershenzon 2010; Liu et al. 2016) e variam com as características ambientais envolvidas (Schlichting 1986). O solo, o clima e a disponibilidade de água são os principais fatores (Silva Neto et al. 2019) que desafiam a adaptação das plantas (Honda, Pilon, and Durigan 2019).

Variação na produção de alcaloides foi encontrada em várias espécies de *Psychotria* submetidas a estresse abiótico (Magedans et al. 2019) e também, folhas de *P. viridis* de diferentes regiões brasileiras, exibiram variação no teor de DMT (Cavalcante et al. 2018), na morfologia e histoquímica (Miranda et al. 2020).

Entretanto, ainda não há informações que explore as causas da variação de alcaloide em folhas desta espécie como resposta às variações nas características ambientais em seu local de ocorrência natural, isto pode dar suporte para compreender as bases das variações na produção de DMT na espécie em outros biomas.

Dado os efeitos do ambiente na plasticidade morfológica/fisiológica das plantas (Schlichting 1986) e a habilidade foliar em mediar tais efeitos (Guerra and Scremin-Dias 2018; Simioni et al. 2017; Pinheiro, Kolb, and Rossatto 2018), consideramos que a região de CAMP e TF fornecem características ideais para estudos com abordagem comparativa das relações planta-ambiente, pois a espécie quando inserida nesses dois ambientes fornece importantes respostas, expressas em alterações morfológicas foliares que contribuem para elucidar as causas das variações no teor de DMT em folhas de *P. viridis*.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar as alterações morfológicas, anatômicas, histoquímicas e fitoquímicas apresentadas em folhas de *P. viridis*, cultivadas em dois ecossistemas amazônicos (Florestas de Campinarana e Terra-firme), como respostas ao ambiente, e por fim avaliar como essas alterações podem ser correlacionadas ao teor de DMT na espécie.

Nossos resultados fornecem informações claras para estabelecer os principais parâmetros ambientais, que interferem na produção de DMT em *P. viridis*, contribuindo para selecionar e padronizar cultivos de alto rendimento, podendo ser uma ferramenta útil para outras espécies de plantas medicinais.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Áreas de estudo

As plantas foram coletadas em plantios localizados em região de floresta de Campinarana e em uma região de floresta de Terra-firme, com distância de aproximadamente 360 Km entre ambos. As duas regiões não apresentam clara estabilização das estações do ano, dado ao seu clima equatorial úmido *Af* segundo a classificação de Köppen (Zarur 1943), marcados por sazonalidade anual de chuvas (Alvares et al., 2013) sem alagação. O tipo de solo, taxa e período de precipitação pluviométrica anual são as diferenças ambientais mais expressivas entre os ecossistemas do estudo.

A região CAMP localizada ao Sul do Estado de Roraima (00° 57' 03" N e 59° 54' 39" O), apesar de ser caracterizada como Savana (IBGE, 2005; MAPSBIOMA, 2018) com solo do tipo latossolo vermelho-amarelo distrófico e textura arenosa média (IBGE, 2012), observa-se *in loco* e em análises de solo, que a área apresenta padrão ecológico predominante de Campinarana (Ab'Saber, 2002; Barbosa & Miranda, 2004, IBGE, 2005), com solo de baixa fertilidade (Moreira, 2016). Portanto, nossos dados nos permitem afirmar que, o plantio encontra-se em uma mancha de Campinarana (CAMP) dentro de uma região de Savana no Estado de Roraima, onde a maior concentração de chuva - o chamado inverno amazônico - ocorre a partir de maio se estendendo até setembro, com taxa pluviométrica anual de 1.847mm (Agritempo 2018).

Na região TF localizada no Estado do Amazonas (02° 02' 04" S; 60° 01' O), a maior incidência de chuvas ocorre no período de dezembro a maio (inverno) e a menor incidência de junho a novembro (verão), com precipitação pluviométrica anual de 2.585 mm (Agritempo 2018) e vegetação ombrófila densa. O solo, tipo latossolo amarelo distrófico típico, argiloso (IBGE, 2010), pobre em minerais e com alta lixiviação causada pela intensidade de chuvas (Rodrigues et al. 2001; J. A. C. da Silva and Silva 2006).

3.2.2 Material vegetal

As amostras das plantas foram coletadas em plantios com idade entre 15-17 anos pertencentes ao Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CBUDV). Foram coletadas folhas completamente expandidas do terço médio da copa de plantas sob sombreamento natural. As coletas foram realizadas entre 7:00 – 10:00 horas da manhã, no final das estações de inverno e verão que correspondem aos períodos de maior e menor intensidade de chuvas na Amazônia.

Em cada população, 10 plantas por estação foram amostradas, totalizando 40 plantas para as duas populações. As amostras foram cuidadosamente embaladas em sacos protegidos da luz e mantidos em caixa térmica. O material identificado e incorporado sob Voucher na coleção do Herbário INPA do Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia-INPA.

3.2.3 Características morfológicas

A descrição morfológica foi realizada em campo, e em laboratório com o auxílio de estereomicroscópio e super lupa, avaliando a filotaxia, tipo de folha, padrões foliares de ápice, base, margem, venação e área foliar (Marcílio Almeida and Almeida 2014; Gonçalves and Lorenzi 2007; Metcalf and Chalk 1979; Marcílio de Almeida and Almeida 2018).

Folhas completamente expandidas foram seccionadas e imediatamente fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965) modificado com tampão fosfato pH 7,2, desidratadas em série cetônica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao ponto crítico de CO₂, montadas em stubbs e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. Seguida de análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo LEO VP 435, operado a 20 kV, com eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas escalas, no Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP. Como características de superfície foliar, observadas em MEV, verificou-se a presença de tricomas, tipo de ornamentação da epicutícula e padrão estomático.

Para análises de densidade estomática (DE), índice estomático (IE) e eficiência estomática (EF) foi usado o método de impressão epidérmica (Segatto et al. 2004). A contagem dos estômatos e células epidérmicas foi realizada no terço mediano direito da superfície abaxial das folhas em campo equivalente a 0,35 mm². O índice estomático está calculado pela expressão: $I = S / (E + S) \times 100$, proposta por Salisbury (1927). Onde, I representa o valor do índice estomático, S o número de estômatos por unidade de área da folha, e o número de células epidérmicas na mesma área. A eficiência estomática foi verificada pela razão dos diâmetros polar e equatorial em 2.400 estômatos.

Para área foliar (AF), quatro folhas/planta, recentemente colhidas (n por população= 80, n total = 160) acompanhadas de régua graduada foram fotografadas usando câmera Canon EOS Rebel T6, as imagens digitalmente medidas com software Image J e determinado a sua AF em cm².

Verificou-se também a capacidade rizogênica em folhas de *P. viridis*, para tanto, cinco folhas de cada região tiveram a base de seus pecíolos imersos em água mineral sem tratamento adicional, por um período de 15 dias. A água foi trocada a cada dois dias, e acompanhado a emissão de raiz a partir do pecíolo.

3.2.4 Análises anatômicas e histoquímica

Amostras da região central do limbo e do pecíolo de folhas completamente expandidas previamente, fixadas em solução Karnovsky (1965) foram submetidas à bomba de vácuo, desidratadas em série alcoólica-etílica crescentes, inclusas em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica®, Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Seções transversais e longitudinais com 5-7 µm de espessura, obtidas por um micrótomo rotativo manual (E. Leitz, Wetzlar, Germany). Verificou-se a presença de tricomas, drusas, ductos, células coletoras e idioblastos.

As espessuras, da cutícula, dos tecidos correspondentes às epidermes adaxial e abaxial, parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso foram mensuradas, pelo programa Quant® padrão, em fotomicrografias capturadas em ocular com objetiva de 20x. As medidas de cada parâmetro foram repetidas 60 vezes por planta por período sazonal, correspondendo a 120 repetições para cada parâmetro avaliado por região.

As secções histológicas montadas entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan®) submetidas à coloração com o reagente ácido periódico de Schiff (Fisher, 1968) que, na presença de polissacarídeos nas paredes celulares e no citoplasma exibe coloração cor-de-rosa, e para compostos fenólicos cor laranja. Para detectar a presença e local de acúmulo de alcaloides usou-se o reagente de Dragendorff.

Todas as lâminas histológicas analisadas foram fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) e em estereomicroscópio Micronal®, e capturadas na mesma escala com câmera Premiere® MA88-300.

3.2.5 Análise fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Após coletadas, ainda no campo, mantiveram-se as amostras em sacos zip log, protegidas da luz e conservadas em caixa de refrigeração até o momento da secagem; realizada a 43 °C em

estufa de circulação forçada com renovação de ar e, as amostras pesadas a cada 12 horas até obter peso constante. Após moção, utilizou-se 35g de cada amostra para preparo dos extratos etanólicos, em sistema soxhlet. A concentração do extrato foi realizada em rota- evaporador modelo FISATON até atingir aproximadamente 10%, seguido de congelamento em freezer - 80°C e liofilizado a 4 ATM de pressão por cerca de 72 horas, modelo L101. O resíduo seco obtido foi armazenado em frasco âmbar e conservado em geladeira até o momento das análises fitoquímicas.

A análise por CLAE-DAD foi realizada em triplicata usando 1,0 mg do material vegetal liofilizado diluído em metanol (mg/ml) utilizando um sistema CLAE Prominence Shimadzu seguindo a metodologia de Lanaro et al. (2015). O cromatograma extraído a 279 nm para quantificação do DMT.

3.2.6 Coleta e análises de solo

Coletou-se as amostras de solo, dentro da área de projeção da copa das árvores de *P. viridis* durante o período vegetativo das plantas. Para cada área de estudo, as amostras foram compostas de 15 subamostras coletadas de 15 locais diferentes, nas camadas de 0,00-0,20 e 0,20-0,50 cm, sendo usado um trado holandês para todas as coletas. Depois de coletadas, as 15 subamostras foram misturadas e, aproximadamente 0,5 dm³ do material transferido para sacos plásticos, identificados e encaminhado para análises no Laboratório de solos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. As características físicas e químicas das amostras de solo foram realizadas com a fração de terra fina seca ao ar livre. As partículas (silte, areia e argila) foram analisadas pelo método da pipeta; pH (H₂O) solo:solução 1:2.5; Fe, Zn, Mn, P, K usando o método de extração de Mehlich-1; N pela digestão úmida de Kjeldahl; o conteúdo de matéria orgânica do solo segundo o método Walkley-Black; Al, Mg e Ca usando como extrator KCl 1M (Teixeira et al. 2017).

3.2.7 Área de coleta e dados climáticos

As estações verão e inverno que correspondem ao período seco e úmido nas áreas de coleta, tem configuração temporal e espacial opostas. A estação de inverno na região de TF ocorre nos meses de dezembro a junho, enquanto este período corresponde à estação de verão na região de CAMP, que efetivamente ocorrem nos meses de setembro a maio. CAMP também apresenta menor média anual de precipitação, e período seco mais prolongado. Este fato nos

permitiu fazer coletas nas duas regiões em diferentes estações do ano, porém na mesma semana. (Fig. 1 A, B).

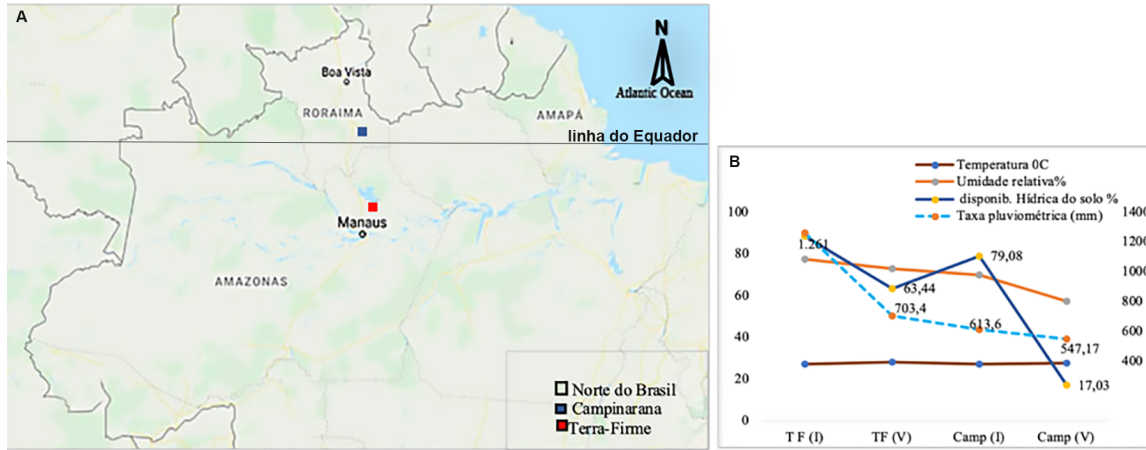


Figura 1. Local e dados climáticos das regiões de coleta do estudo. A. Área de estudo nos Estados do Amazonas e Roraima no Norte do Brasil; B. Gráfico climatológico da estação automática do INMET para o período entre maio de 2017 a maio 2019. Os pontos nas linhas representam a média para cada período em cada região.

3.2.8 Análise estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. Para as análises da densidade, índice estomático e espessura dos tecidos (item 2.3 e 2.4), as análises foram compostas de quatro repetições – planta –, com avaliação de três folhas/planta e cinco campos/folha, constituindo 120 campos/área nos dois períodos para cada região. Para análise estomática cada campo de contagem ($0,35\text{mm}^2$) constituiu-se de uma fotomicrografia (objetiva de 20X), na qual o número de estômatos foi contado em sua totalidade. A análise da funcionalidade estomática era composta das medidas (polar e equatorial) de 1.200 estômatos/região. A área foliar foi composta de dez repetições – planta –, tomando-se medidas de quatro folhas/planta e 40 folhas/região. Todas as análises foram realizadas em amostras coletadas nos períodos de inverno e verão em ambas as regiões de CAMP e TF.

Cada parâmetro foliar analisado submeteu-se, ao teste de Shapiro Wilk, para confirmar a normalidade dos dados, à análise de variância - ANOVA -, e ao teste de Tukey para verificar potenciais diferenças entre as populações, e a significância estatística ficou estabelecida em $P < 0,05$. Usamos para análises dos dados o software PAST 3.24 (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis). Quando necessário, os dados foram *log* transformados.

3.3 Resultados

As características de *P. viridis* avaliadas para as duas regiões compreendem plantas arbórea-arbustivas entre 3,0 e 5,0 m de altura e diâmetro de copa entre 1,5 a 2,3 m, as plantas têm filotaxia alterna espiralada com folhas simples, lâmina inteira, oblonga, ápice acuminado, base atenuada caracterizada pelo prolongamento do limbo na região proximal do pecíolo. A venação secundária é broquidódroma com seis a onze pares de nervuras opostas e alternas na mesma folha com espaçamentos regulares (Fig. 2 A). A superfície foliar adaxial é glabra e a abaxial levemente pubescente, a margem foliar apresentando mucilagem pegajosa com tricomas diminutos (Fig. 2 A e C) somente para região de CAMP. A área foliar não apresentou diferença ao nível de 0,05% para as duas regiões (Tab. 1). Em ambas as regiões, os locais de maior ocorrência de tricomas foram as nervuras das folhas (Fig. 2 B).

No terço superior da superfície abaxial encontram-se domácias axilares solitárias ou em pares, presença de dois a quatro pares, com entrada obstruída por tufo de tricomas (Fig. 2 B), onde também se observou a presença de ácaros. Novos fitômeros (folhas, nó, entre nó e gema) se desenvolvem dentro de estípulas terminais, protegidos por coléteres dendróides (Fig. 2 D). Em relação a morfologia interna, na mesma região, as domácias presentes nas folhas exibem duas a quatro camadas de células (Fig. 2 E, F). Os coléteres que protegem o desenvolvimento dos novos fitômeros são recobertos por emaranhado de tricomas (Fig. 2 G, H). O pecíolo é biconvexo em todas as plantas, mostrando concavidade adaxial e a vascularização realizada por um feixe vascular central com dois a quatro pares de feixes adicionais (Fig. 2 I).

As folhas após 7 dias (TF) e 15 dias (CAMP) de imersão do terço basal dos pecíolos em água destilada, sem adição de reguladores de crescimento, apresentaram formação de raízes adventícias (Fig. 3 A e B) a partir de divisões periclinais em células do parênquima cortical, que apresentaram comportamento semelhante às células de periciclo em raízes típicas durante o desenvolvimento do meristema apical das radículas (Fig. 3 C-F).

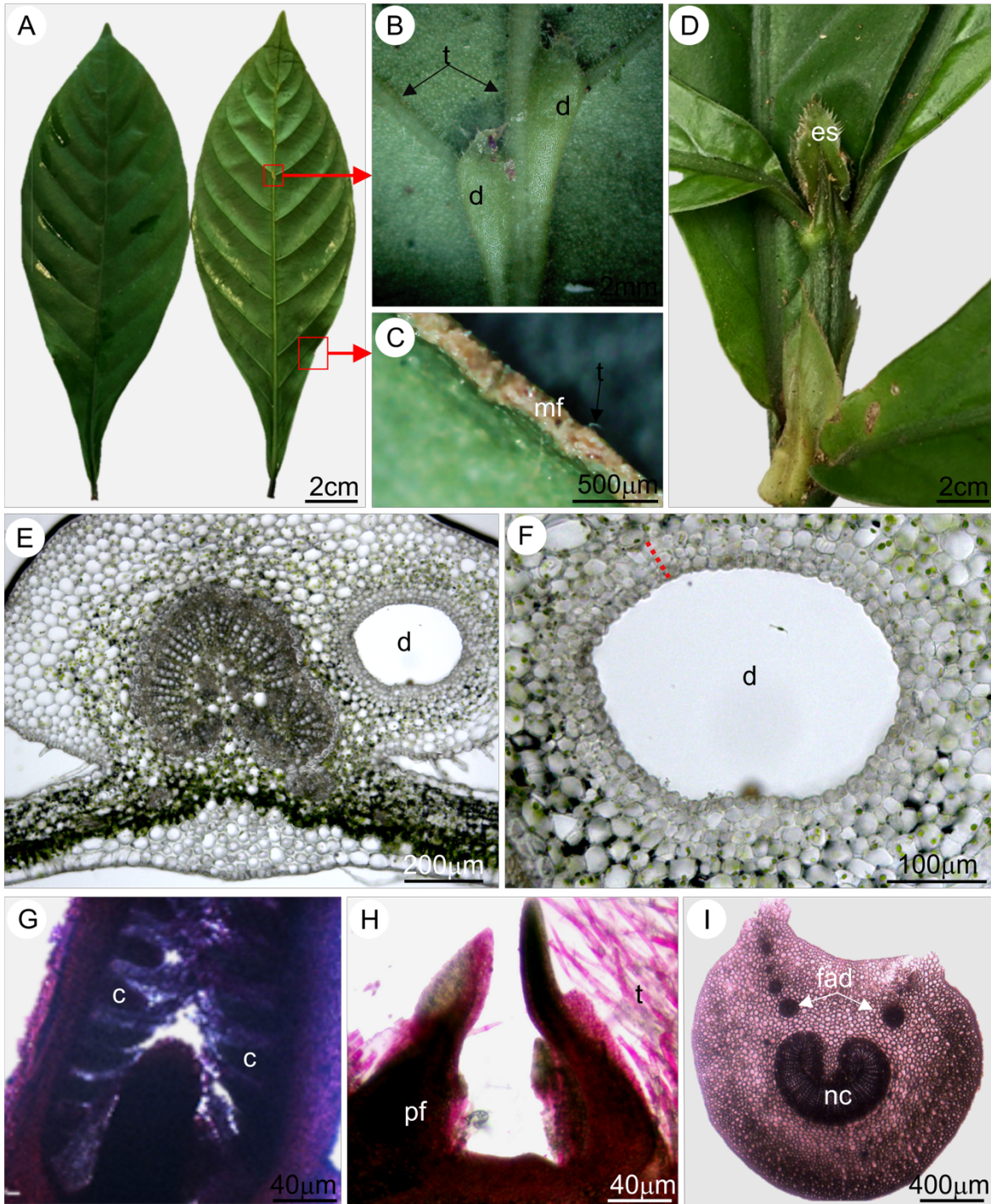


Figura 2. Morfologia externa e interna de folha de *Psychotria viridis* cultivadas em ecossistemas de CAMP e TF da Amazônia brasileira. A. Superfície abaxial e adaxial evidenciando o padrão de nervação penínervia e posicionamento das domácias; B. Domácia axilares com tricomas na ponta, e também tricomas nas nervuras; C. Margem foliar mostrando tricomas diminutos e composto mucilaginoso; D. Novo fitômero; E. Corte transversal (CT) de domácia; F. Detalhe para o número de camadas celulares da domácia; G. Corte longitudinal (CL) da estípula terminal mostrando coléteres dendróides; H. Primórdio foliar; I. CT do peciolo mostrando a nervura principal com feixe vascular de sistema aberto (em arco). Abreviações fad: c: coléter; d: domácia; es: estípula; feixes adicionais; mf: margem foliar; nc: nervura central; pf: primórdio foliar; t: tricoma; linha tracejada: camadas de células da domácia.

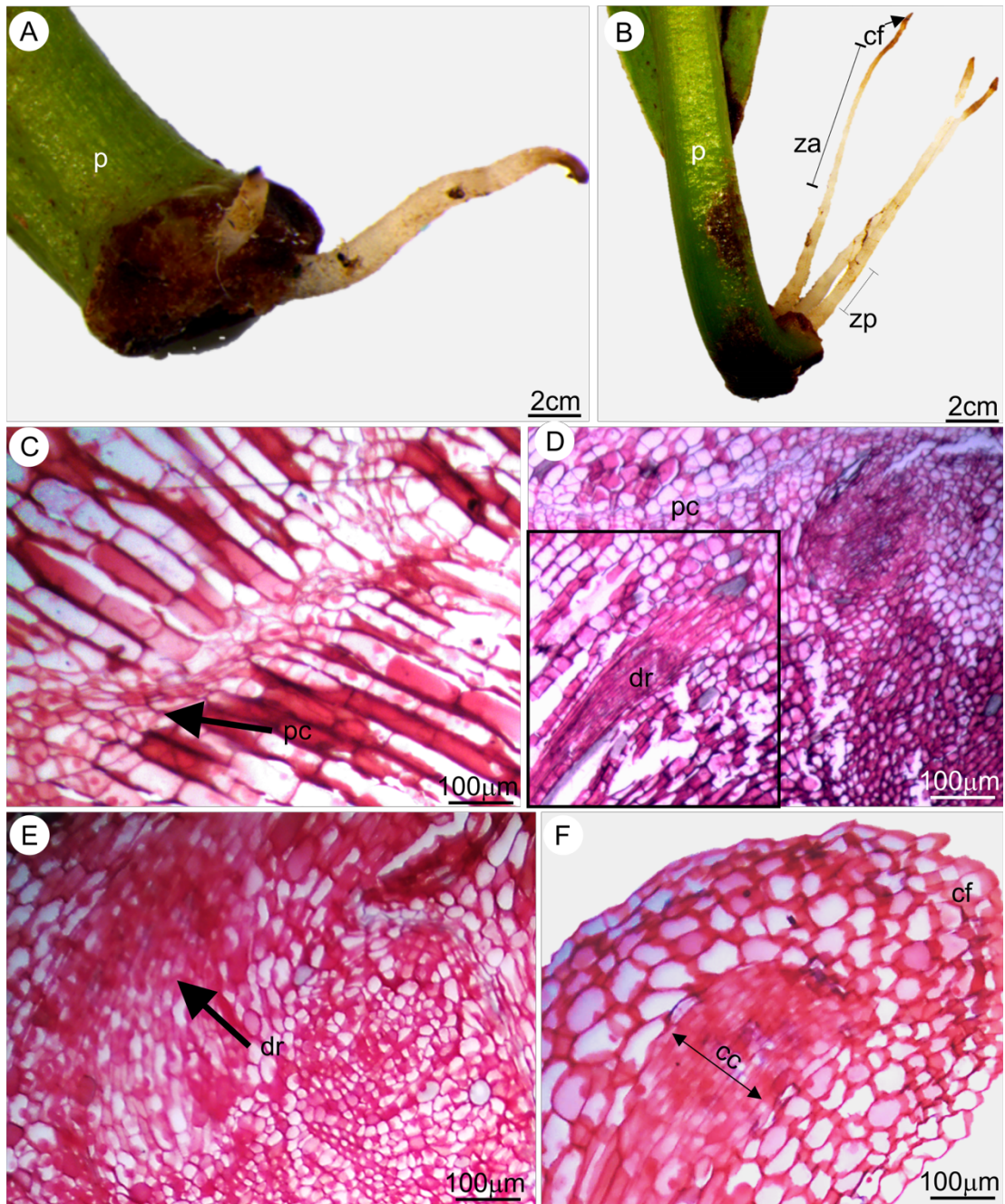


Figura 3. Formação de raiz adventícia em pecíolo de *Psychotria viridis*. A. Pecíolo com presença de raiz adventícia após 10 dias de imersão em água destilada; B. Pecíolo com presença de raiz adventícia completa após 16 dias de imersão em água destilada; C. Corte transversal (CT) do pecíolo mostrando atividade meristemática com divisão periclinal em células do parênquima cortical (seta); D - E. CT com detalhe do desenvolvimento da radícula; F. Corte longitudinal (CL) do desenvolvimento de raiz adventícia mostrando o cilindro central e região da coifa. Abreviações: cc: cilindro central; cf: coifa; dr: desenvolvimento da radícula; p: pecíolo; pc: parênquima cortical; za: zona de alongamento; zp: zona pilosa.

Na Figura 4 verifica-se que a superfície foliar em visão frontal apresenta células epidérmicas com padrão poligonal, parede anticlinal reta, com presença de cristais em todas as células, e estômatos do tipo paracítico (Fig. 4 A, B). Tricomas não glandulares unicelular e pluricelulares

estrelado foram encontrados na entrada das domácias, nas nervuras e na margem foliar (Fig. 4 C, E, F).

Cinco padrões de epicutícula foram observados em folhas de *P. viridis* de todas as plantas estudadas: canicular reto, papilar, canicular filamentososo, liso e em placas. O padrão canicular reto foi encontrado somente sobre as nervuras foliares (Fig. 4 D), enquanto o liso e em placas foram observados somente na superfície adaxial (Fig. 4 G), e os padrões papilar e canicular filamentososo estão presentes na superfície abaxial (Fig. 4 H-J). Epicutícula papilar e canicular filamentososa foram observadas tanto em folhas de CAMP quanto TF no período de inverno e verão. Entretanto, dois padrões em folhas do mesmo indivíduo foram observados somente no período de verão (Fig. 4 I). O padrão papilar foi encontrado na superfície abaxial de folhas tanto de TF quanto de CAMP. As folhas são hipoestomáticas em plantas de ambas as regiões, com ocorrência esporádica de folhas anfihipoestômáticas somente em plantas de CAMP. Os estômatos ocorrem no mesmo nível das outras células epidérmicas (Fig. 4 H-J). Ao realizar as análises da superfície foliar, notou-se a presença de fungos em ambas as superfícies foliares de todas as amostras analisadas (Fig 4 G-J).

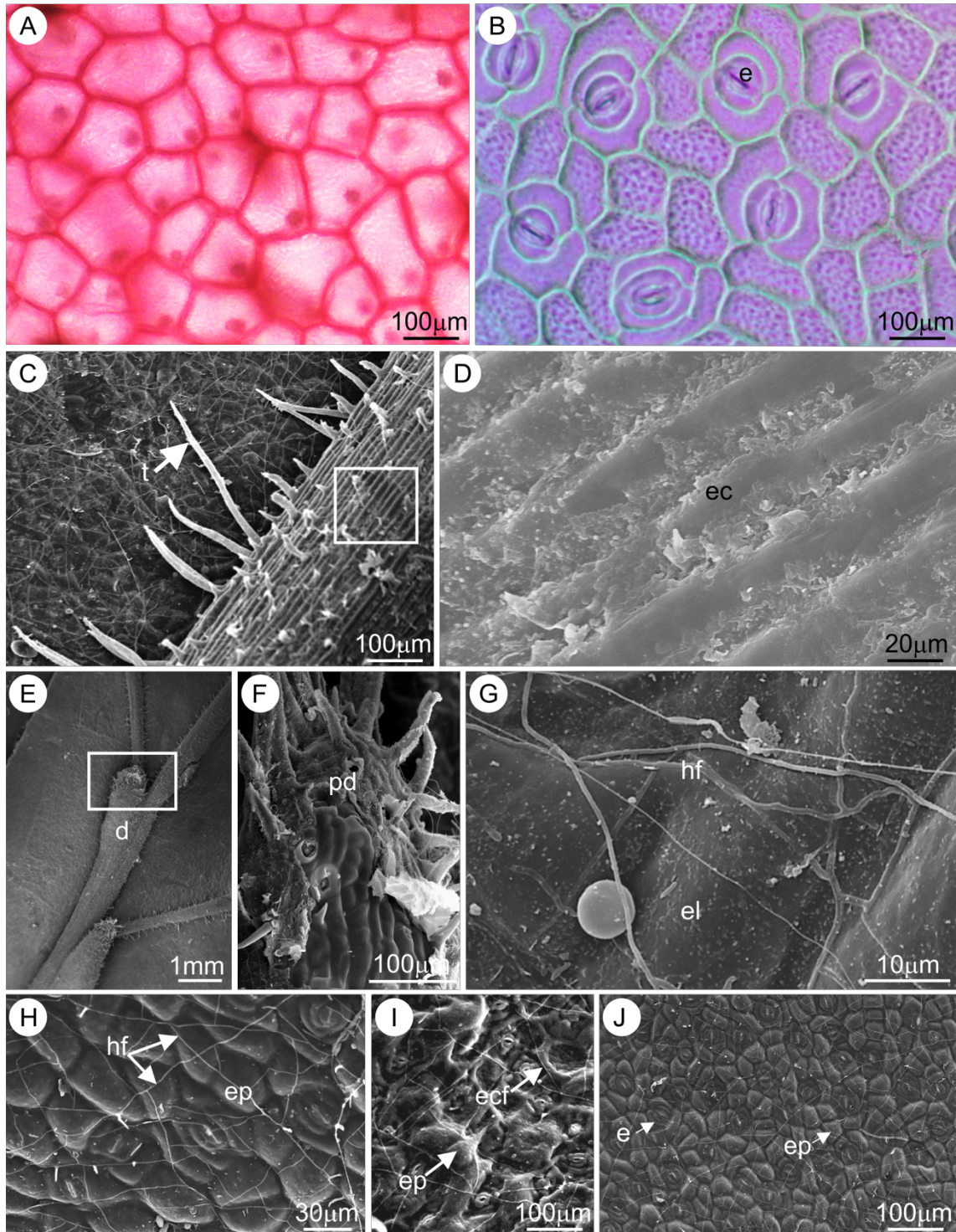


Figura 4. Fotomicrografias em MEV e microscópio de luz da superfície foliar de *Psychotria viridis* cultivadas em ecossistemas de TF e CAMP na Amazônia brasileira; A. Visão frontal da superfície adaxial mostrando o padrão poligonal das células epidérmicas; B. Visão frontal da superfície abaxial evidenciando estômatos paracítico; C. Nervura secundária exibindo tricomas não glandular na lateral da nervura foliar; D. Cera epicuticular canicular reto ; E. Detalhe da ponta da domácia com tufo de tricomas; F. ponta de domácia; G. Epicutícula da superfície adaxial de folhas de CAMP mostrando padrão em placas; (H. Superfície abaxial de folhas de plantas cultivadas em região de TF mostrando o padrão papilar de epicutícula; I. Região abaxial de folhas de *P. viridis* cultivada em região de CAMP no verão, evidenciando dois padrões de epicutícula na mesma folha. Notar o padrão canicular formando barreira de proteção ao estômato; J. Superfície abaxial de folhas de plantas cultivadas em região de CAMP no inverno mostrando o padrão papilar de epicutícula. Abreviações: d: domácia; e: estômato; ec: epicutícula canicular; ecf: epicutícula canicular filamentosos; hf: hifas de fungo; ep: epicutícula papilar; pd: ponta de domácia; el: epicutícula lisa; t: tricoma.

Plantas das duas regiões apresentaram folhas constituídas por epicutícula e cutícula em ambas faces foliares, epiderme unisseriada com parede celular sinuosa na maioria das amostras e parênquima dorsiventral (Fig. 5 A-D). A parede celular anticlinal da epiderme adaxial para as duas regiões apresentou sinuosidade em folhas de verão, enquanto na epiderme abaxial as células ordinárias apresentam maior largura que comprimento tanto no período de inverno quanto verão para todas as amostras. O mesofilo no período de inverno nas duas regiões apresenta células do paliçádico menores que o período de verão, irregulares e com amplo espaço intercelular. No período de verão ambas as regiões apresentam uma camada de células alongadas e justapostas no parênquima paliçádico, raramente duas somente em plantas de CAMP, foi observado também, presença de ráfides em todas as amostras (Fig. 5 A-D). Por outro lado, o parênquima lacunoso, no período de inverno, exibe cinco a sete camadas de células irregulares, largas com espaços intercelulares bem evidente. No período de verão, plantas de CAMP, algumas vezes, apresentaram até oito camadas celulares neste tecido. No período de inverno, em todas as amostras o parênquima lacunoso representou mais que 50% do mesofilo (Fig. 5 A e C), no verão apresentou menores espaços intercelulares, porém não foi observado diferença em espessura foliar em plantas de ambas as regiões (Fig. 5 B e D). Cristais foram encontrados sob a forma de drusas em todas as células epidérmicas (quase sempre um por célula) e agrupamento de ráfides em idioblastos no parênquima lacunoso, paliçádico e na nervura central.

O feixe vascular da nervura central, para as duas regiões no período de verão, apresenta sistema fechado com medula parenquimática (Fig. 5 E e H), porém no período de inverno apresenta sistema aberto, em forma de arco com terminações côncavas em direção ao interior do feixe, as terminações sofrem fragmentações que se juntam formando feixes acessórios (Fig. 5 F e I). Em ambas as regiões se observa a presença de fibras floemáticas tanto no período de inverno quanto no verão. Foram encontrados também cinco a sete camadas de colênquima anelar na porção adaxial, até dez camadas de parênquima na porção abaxial do feixe vascular central e dois a quatro pares de feixes adicionais (Fig. 5 I e J).

A área foliar não apresentou diferença significativa ao nível de 0,5% para as duas regiões. Porém, os parâmetros anatômicos foliares apresentaram maiores diferenças na espessura da epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e cutícula abaxial no período de verão (Tab. 1). Cutícula adaxial e epiderme abaxial não apresentaram diferenças significativas no mesmo período entre as regiões. No entanto, a cutícula adaxial variou dentro da população de CAMP entre as estações. Fato que merece destaque foi a maior espessura de parênquima paliçádico em folhas de TF tanto no período de inverno quanto verão, quando comparada com as folhas de CAMP (Tab. 1).

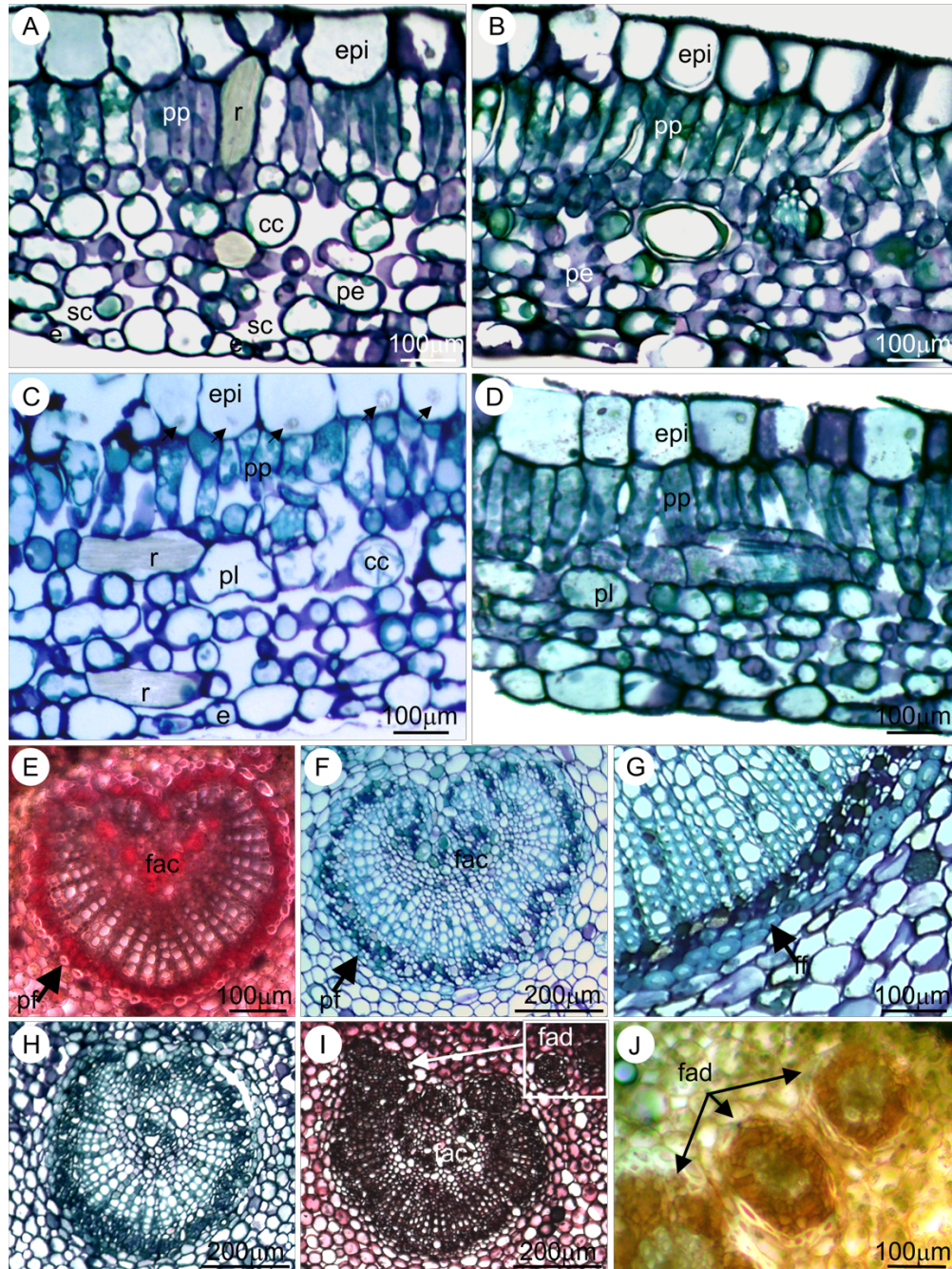


Figura 5. Corte transversal (CT) de folhas de *Psychotria viridis* cultivadas em ecossistemas de CAMP e TF da Amazônia. A. Folhas cultivadas no período de inverno em região de CAMP mostrando agrupamento de ráfides no parênquima paliçádico, lacunoso e drusas na epiderme e amplos espaços intercelulares; B. Folhas cultivadas no período de verão na região de CAMP com drusas nas células da epiderme e cavidade no parênquima lacunoso; C. Folhas cultivadas no período de inverno em região de TF exibindo células da epiderme com drusas (setas), células do paliçádico de tamanho irregular e amplos espaços intercelulares; D. Folhas cultivadas no período de verão na região de TF notar drusas em células epidérmicas; E. Folhas de verão de CAMP com feixe vascular em sistema fechado; F. Folhas de inverno de CAMP exibindo feixe vascular em arco com fragmentação da região final do arco, feixes acessórios e bainha floemática; G. Detalhes da fibra floemática mostrada em F; H. Padrão de nervura central de folhas de TF cultivadas no período de verão mostrando feixe vascular concêntrico; I. Folhas de inverno mostrando feixe vascular em arco com fragmentação e feixes adicionais destacados no quadrado; J. detalhes dos feixes adicionais evidenciados em I. Abreviações: cs: câmara subestomática; cc: célula coletora; e: estômato; epi: epiderme; fac: feixes acessórios; fad: feixes adicionais; ff: fibra floemática; pp: parênquima paliçádico; r: ráfide; pl: parênquima lacunoso.

A funcionalidade de estômatos maduros mostrou correlação positiva com o diâmetro polar e negativa com o diâmetro equatorial, este último respondeu em 34% e 29% da funcionalidade para plantas de CAMP e TF respectivamente (Fig. 6 A-D). Diferenças na densidade estomática entre CAMP e TF foram observadas e descritas na (Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros morfológicos de folhas de duas populações de *P. viridis* (média, desvio padrão e teste de Tukey).

Parâmetros morfológicos	Campinarana				Terra-firme			
	Verão		Inverno		Verão		Inverno	
Área foliar (cm ²)	51,68 ± 10,81	a	48,46 ± 11,13	a	50,67 ± 9,90	a	47,38 ± 10,30	a
Índice estomático (%)	20,09 ± 3,90	ab	18,86 ± 3,69	ab	17,98 ± 4,43	ab	15,48 ± 4,23	a
Densidade estomática (mm ²)	124,00 ± 31,85	ab	111,00 ± 28,45	b	107,00 ± 29,82	ab	104,00 ± 24,13	a
Maior abertura de poro (µm)	22,15 ± 6,83	a	23,45 ± 4,38	a	17,36 ± 5,23	ab	23,06 ± 4,44	ba
Espessura da cutícula adaxial (µm)	10,59 ± 3,26	a	7,64 ± 1,48	b	11,68 ± 2,80	a	10,36 ± 2,79	a
Espessura epiderme adaxial (µm)	63,14 ± 9,82	a	70,45 ± 13,75	b	68,50 ± 12,85	ab	70,56 ± 10,88	ab
Espessura do parênquima paliçádico (µm)	84,96 ± 12,80	a	89,80 ± 18,51	a	95,39 ± 24,97	ab	91,35 ± 15,53	a
Espessura do parênquima lacunoso (µm)	148,55 ± 29,59	ab	155,38 ± 25,00	b	137,18 ± 27,82	a	128,75 ± 23,31	ba
Espessura epiderme abaxial (µm)	30,382 ± 7,65	a	32,78 ± 9,03	a	31,17 ± 8,57	a	34,76 ± 7,83	a
Espessura da cutícula abaxial (µm)	7,69 ± 2,00	a	7,41 ± 4,43	a	8,67 ± 2,02	b	8,07 ± 2,81	a

* Letras diferentes na mesma linha, representam diferença significativa entre as populações ($p < 0,05$).

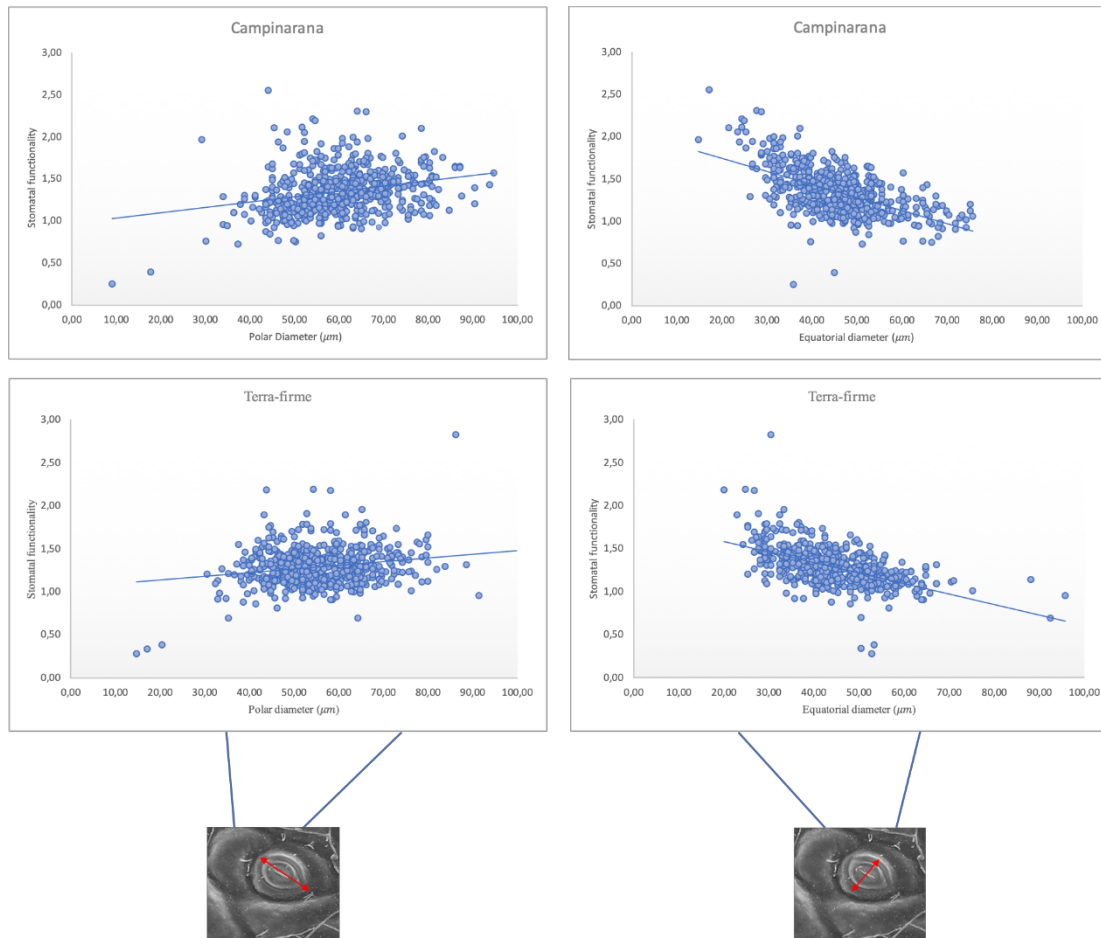


Figura 6. Funcionalidade de estômatos maduros de folhas de *P. viridis* dos ecossistemas de CAMP e TF da Amazônia brasileira.

Quanto a análise histoquímica, os alcaloides estão presentes na cutícula, no vacúolo e espaços intercelulares das células epidérmicas (Fig. 7 A), apresentando expressiva concentração em células coletoras e idioblastos dos parênquimas paliçádico e lacunoso. As células coletoras com alcaloides foram observadas sempre próximas de células contendo ráfides (Fig. 7 A-D). A maior concentração de alcaloides foi observada em células do parênquima paliçádico, enquanto no parênquima lacunoso e nervura central as amostras das duas regiões não apresentaram diferenças visíveis tanto no período de inverno quanto de verão (Fig. 7 E e F). Na nervura central, estes compostos secundários também estão presentes em idioblastos, cavidades, nos raios do xilema e células do floema (Fig. 7 E e F). Análises com PAS exibiu presença de polissacarídeos nas paredes de células da epiderme e parênquima paliçádico; compostos fenólicos em células do paliçádico e idioblastos do parênquima lacunoso e região da nervura central (Fig. 7 G e H).

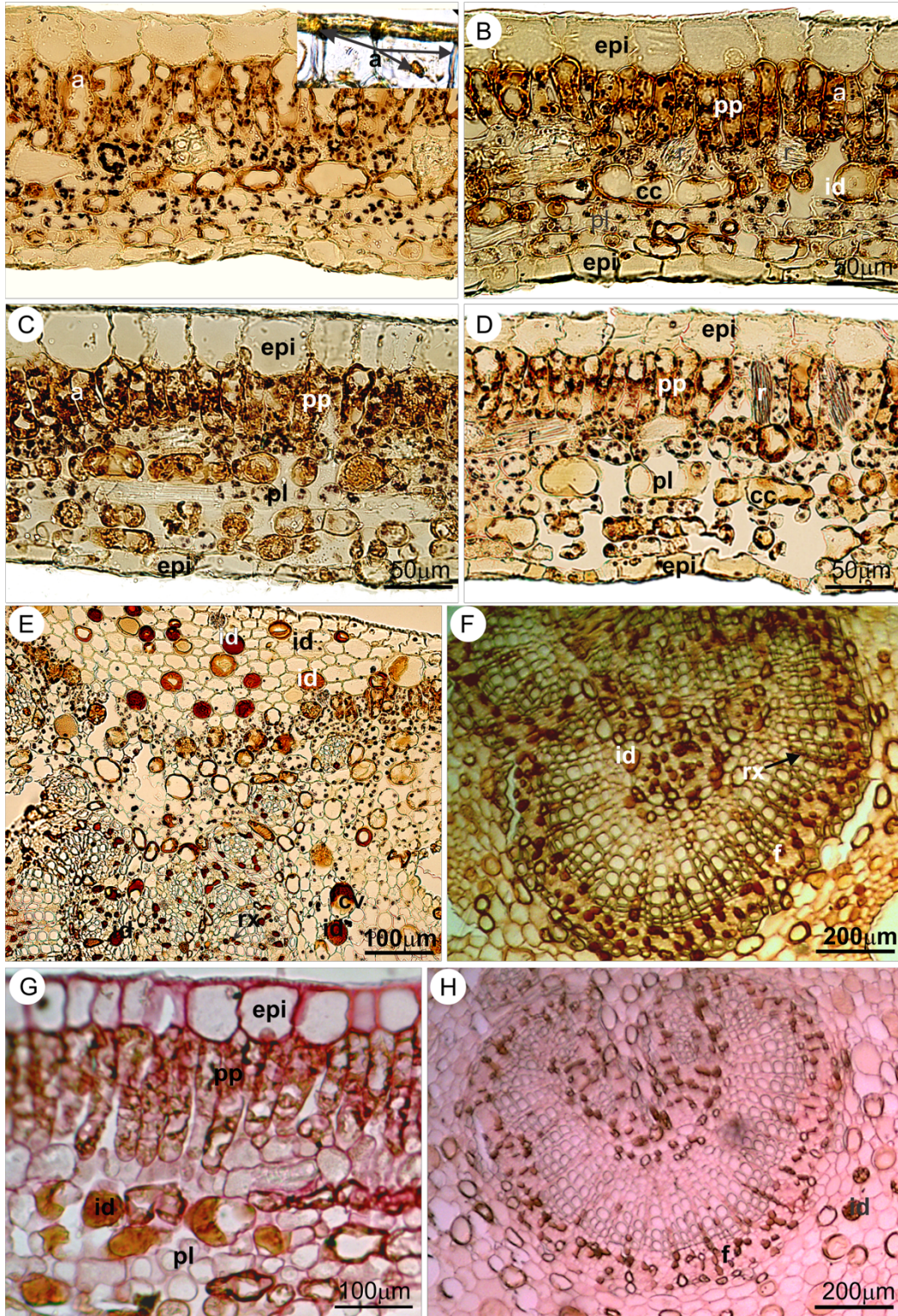


Figura 7. Corte transversal (CT) de folhas de *P. viridis* revelado com reagente de Dragendorff para alcaloides (coloração castanho), com PAS para polissacarídeos (coloração rosa) e compostos fenólicos (coloração laranja) presentes em vários tecidos. A. Folhas cultivadas no período de verão em CAMP com detalhe de células epidérmicas e cutícula contendo alcaloide; B. Folhas cultivadas no período de inverno em região de CAMP. Note a presença de células coletoras contendo alcaloides no parênquima lacunoso imediatamente abaixo de célula com ráfide; C e D. Folhas cultivadas nos períodos de verão (C) e inverno (D) na região de TF. Presença de alcaloide em todos os tecidos (A-F), ráfide em célula do paliçádico e célula coletora em célula do tecido lacunoso; (G e H) polissacarídeos principalmente em células da epiderme e compostos fenólicos em células coletoras e idioblastos. Abreviações: a: alcaloide; cc: células coletoras; epi: epiderme; f: floema; id: idioblasto; pp: parênquima paliçádico; r: ráfide; rx: raio do xilema; sp: parênquima lacunoso.

A análise fitoquímica por HPLC mostrou variação no teor de DMT em folhas de *P. viridis* entre os ecossistemas de TF e CAMP. No período de inverno folhas de TF apresentaram teor de DMT 35% mais elevado do que CAMP, enquanto no período de verão essa diferença foi reduzida para 17% (Tab. 2).

Tab. 2. Concentração de DMT encontrada em folhas de *P. viridis* em ecossistemas de CAMP e TF do bioma Amazônia. (média, desvio padrão e teste de Tukey).

Ecossistema	Média de DMT (mg.g ⁻¹)			
	Inverno		Verão	
Terra-firme	47,0 ± 0,9	a	33,2 ± 2,2	b
Campinarana	34,7 ± 2,2	b	28,4 ± 0,9	a

* Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre as populações ($p < 0,05$).

Em relação às características do solo nas áreas de coleta, entre os micronutrientes (Tab. 3), os teores de ferro (Fe) e manganês (Mn) apresentaram maiores variações entre as regiões de CAMP e TF, sendo também observadas variações sazonais inter-regionais. A região de TF apresentou variação sazonal acima de 50% no teor de Fe no período de inverno. O teor de Mn foi ligeiramente maior nas duas regiões no período de inverno.

Os valores de pH da água tiveram variações entre as regiões e foram maiores no período de inverno, bem como os teores de carbono (C), nitrogênio (N), potássio (K), magnésio (Mg) e matéria orgânica (MO). CAMP mostrou alto valor de fósforo (P) e cálcio (Ca) quando comparada com TF. O teor de alumínio (Al) foi maior para TF somente no período de inverno. Com relação à análise física do solo, CAMP apresentou maior teor de areia, caracterizando solo distrófico de textura arenosa, enquanto os maiores teores de silte e argila foram observados nos solos de TF, classificado como latossolo amarelo distrófico argiloso.

Tabela 2. Propriedades físicas e químicas do solo para ecossistema de Campinarana e Terra-firme da Amazônia brasileira nas áreas de coleta das duas populações de *P. viridis*.

		Parâmetros do solo														
Área		pH água	Fe (mg/kg)	Zn (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	N (g/Kg)	C (g/Kg)	M.O (g/Kg)	P (mg/Kg)	K (cmolc/Kg)	Ca (cmolc/Kg)	Mg (cmolc/Kg)	Al (cmolc/Kg)	Areia (g/Kg)	Silte (g/Kg)	Argila (g/Kg)
CAMP	Verão	3,85	179	0,53	12,34	0,78	8,32	14,34	3,93	0,07	0,54	0,22	0,9	739	98	163
	Inverno	4,92	162,86	0,52	14,9	1,05	11,78	20,3	3,91	0,12	0,82	0,37	0,9	642	130	228
T F	Verão	3,46	662,12*	0,55	2,01	1,93	24,02	41,41	0,98	0,07	0,09	0,17	0,95	51	329	620
	Inverno	3,97	243,79	0,7	2,88	2,13	31,04	53,52	0,94	0,08	0,22	0,23	2,43	60	372	569

3.4 Discussão

As características foliares de *P. viridis* avaliadas neste estudo evidenciaram que as respostas morfológicas, fisiológicas e fitoquímicas são mediadas pela relação com o ambiente de cada local de ocorrência da espécie, e são importantes para a produção de DMT e acúmulo de alcaloides totais na espécie. Estudos morfológicos tem mostrado que o tamanho da área foliar é influenciada pelo ambiente (Carlson, Adams, and Holsinger 2016; Mitchell et al. 2015) assim, a área foliar não diferir entre as regiões, frustrou as expectativas, uma vez que esperávamos menor área em plantas da região de CAMP por estarem presentes em solo mais pobre, com menor taxa pluviométrica anual e passarem por período de verão mais prolongado que plantas de TF. De acordo com McDonald et al. (2003) e Yates et al. (2010) em solos mais áridos, pobres em nutrientes e com menor taxa de chuvas, o esperado é que a área foliar decline. Considerando que as plantas das duas regiões recebem sombreamento natural similar, que as folhas se aclimatam e se adaptam às condições predominantes de luminosidade (Takala & Möttus, 2016), e em ambientes sombreado necessitam capturar a luz difusa (Pinheiro, Kolb, and Rossatto 2018) pode-se inferir, que a área foliar para as duas regiões foi modulada e regulada pelas condições de luz semelhantes nos dois ambiente, uma vez que a disponibilidade hídrica em região de CAMP é menor que em TF.

Em amostras foliares das duas regiões foram encontradas domácias axilares abrigando ácaros da família Tydeidae, gênero *Tydeus*, gentilmente identificados pelo acarologista Dr. Gilberto Moraes ESALQ/USP. A presença de ácaros micófagos e também de fungos em todas as folhas sugere uma relação simbiótica desses organismos com a espécie, uma vez que fungos são elicitores que formam simbiose estável e mutuamente benéfica a longo prazo com as plantas (Zhai et al. 2017), e podem causar interferências na produção de compostos secundários de defesa vegetal. Estes achados mostram a natureza mutualística desta relação (Carvalho et al. 2011) muito embora, em *P. viridis* essa relação careça de estudos mais aprofundados envolvendo outros organismos além dos fungos que ocorrem principalmente em grande concentração na superfície abaxial das folhas, indicando serem eles os principais elicitores para a produção de DMT na espécie. A presença de ácaros nas domácias de *P. viridis* não foi inteiramente surpresa dado que a presença desse microrganismo também já foi encontrada em folhas do cafeeiro por Matos et al. (2004).

O conjunto de coléteres dendróides com tricomas e secreção mucilaginosa se apresenta como importante estrutura de defesa que protege o desenvolvimento de novos fitômeros, Klein

et al. (2004) encontraram mucilagem em coléteres de *Simira glaziovii* (Rubiaceae) e associaram com mecanismo de defesa contra microrganismos. Em ambiente de TF com alta temperatura e CAMP com solos de baixa retenção hídrica, a mucilagem tem importância fundamental para a espécie, uma vez que lubrifica o primórdio foliar evitando a dessecação e protegendo os tecidos jovens contra a ação de microrganismos (Almeida, Antônio, and Paiva 2019; M. D. S. Silva et al. 2017).

As folhas apresentaram mucilagem na margem foliar tanto no período de inverno quanto de verão em plantas de CAMP, indicando um ajuste fisiológico para redução de perda de água. Mucilagem é uma substância de ampla distribuição entre os vegetais que fica viscosa em contato com água e contribui para a economia hídrica de plantas em ambientes xéricos (Silva and Potiguara 2009; Almeida, Antônio, and Paiva 2019) e tem valor taxonômico (Rocha, Pimentel, and Rodrigues Machado 2011).

Quanto a emissão de raízes adventícias no pecíolo, o tempo mais prolongado que folhas das plantas de CAMP levou para apresentar visível prolongamento radicular, pode ser reflexo tanto das condições hídricas quanto da fertilidade do solo de campinara, principalmente do teor de matéria orgânica que é fundamental para a ciclagem de nutrientes em solos amazônicos (Marques et al. 2010) que, possivelmente, influenciaram na nutrição foliar. As análises anatômicas revelaram que raiz adventícia peciolar em *P. viridis* tem origem a partir de divisões periclinais de células do parênquima cortical, e apresentam conexão com o sistema vascular do pecíolo, o que caracteriza uma raiz funcional que pode dar origem à planta autônoma (Almeida et al. 2012). Os resultados observados neste estudo sugerem que, com futuros estudos e otimização de parâmetros, a propagação por estaquia foliar pode ser um método de produção de mudas de alta qualidade que poderá contribuir para aumentar a produção fitoquímica em folhas de *P. viridis*.

Padrão hipoestômático encontrado nas folhas dos dois ecossistemas no período de inverno, tem sido relatado como uma característica comum em plantas de ambiente mesófito (Quinteiro et al. 2006; Bridson and Robbrecht 1990; Zini et al. 2016). Por outro lado, considerando que o padrão anfi-hipoestômático foi encontrado somente em folhas de plantas de CAMP no período de verão, e que *P. viridis* quando submetidas a estresse hídrico sazonal também apresenta estômatos anfi-hipoestomáticos (Miranda et al., 2020), essa variação estomática reflete a influência do ambiente nos ajustes foliares da espécie e indica adaptação da espécie à aridez (Carlson, Adams, and Holsinger 2016). Como respostas ecofisiológicas, o índice estomático diferiu entre os ambientes, mas não dentro do mesmo ambiente, folhas de CAMP exibiram

maior valor de densidade estomática e maior variação na densidade entre períodos. A diferenciação de células epidérmicas em um par de células guarda está intimamente ligada a sinais ambientais (Carlson, Adams, and Holsinger 2016) levando a alterações na densidade estomática (Pompelli et al. 2010; Hetherington and Woodward 2003), porém os benefícios dessa alteração para *P. viridis* ainda são desconhecidos.

A funcionalidade estomática mostrou correlação positiva com o diâmetro polar e negativa com o diâmetro equatorial para os dois ambientes e foi maior em plantas de ambiente de CAMP. Isto pode ter relação com a restrição que o diâmetro polar causa no aumento do comprimento do complexo estomático durante a abertura, causado por uma fixação mecânica das extremidades da célula-guarda (Carter et al. 2017) e, possivelmente pelo efeito restritivo que as células epidérmicas causam sobre o volume da célula-guarda e abertura estomática (Jezek et al. 2019). O controle da perda de água via estômato permite que a planta ocupe habitats com flutuação das condições ambientais (Hetherington and Woodward 2003) porém, a umidade relativa do ambiente é um parâmetro que afeta a funcionalidade estomática (Woltering and Paillart 2018) assim, plantas sob alta umidade relativa, como as plantas de TF, tem baixa demanda evaporativa o que leva a folha a produzir estômatos menos responsivos a estresse hídrico (Fanourakis, Heuvelink, and Carvalho 2013).

Os três padrões de epicutícula da superfície abaxial nas folhas, principalmente o canicular filamentososo no período de verão, formam barreiras ao redor dos estômatos e foram influenciadas pelo ambiente. Diversos autores tem mostrado que a forma da epicutícula está associada com a temperatura e nível de luz (Bieras and Sajo 2009; Metcalf and Chalk 1979; Vasconcelos et al. 2017). A cutícula de todas as plantas estudadas é espessa, característica bem descrita para o gênero *Psychotria* (Metcalf and Chalk 1979; Arruda et al. 2010; Quinteiro et al. 2006; Moraes et al. 2011; Bridson and Robbrecht 1990) e tem como principal função a proteção da folha contra o excesso de luminosidade. Miranda et al. (2020) encontraram variação na espessura da cutícula quando analisaram folhas de *P. viridis* de três ambientes diferentes no Sudeste brasileiro. Baseada na defesa que a epicutícula juntamente com a cutícula fornecem contra fungos, bactérias e patógenos (Kosma and Rowland 2016), a variação na forma da epicutícula e espessura da cutícula encontrada entre o período de inverno e verão em folhas de CAMP e entre regiões no período de inverno, revela uma estratégia de *P. viridis* em reduzir a transpiração foliar, evitar perda de água não estomática durante períodos de altas temperaturas e mediar interações com microrganismos, além de proteger a folha das intensas e prolongadas chuvas comuns na região amazônica (Arruda et al. 2010).

A epiderme adaxial exibiu células em camada unisseriada, parede anticlinal reta e drusas

para os dois ambientes, às vezes, apresentou epiderme bisseriada descontínua e parede anticlinal sinuosa na epiderme adaxial em folhas de CAMP. A sinuosidade de parede celular em Rubiaceae é relatada como característica de valor taxonômico por Metcalf & Chalk (1979), tendo função mecânica de prevenção do colapso parietal sob estresse hídrico (Haberlandt, 1928) pois aumenta o contato entre as células adjacentes (Martins, Bombo, and Soares 2013). Nas plantas estudadas, esta característica se assemelha mais com deformidade do que com sinuosidade da parede e, Feng et al. (2016) em estudo com estresse hídrico relatam que deformidade da parede celular surge como consequência do estresse hídrico. Assim, como essa característica foi encontrada somente no período de verão, não podemos afirmar que para *P. viridis* a sinuosidade de parede seja uma característica taxonômica. Mas, os dados nos permitem sugerir que esta alteração anatômica, em parte, pode ser explicada por algum evento epigênético. Assim, mais estudos são necessários para investigar se/como um evento epigênético, que tem impacto sobre a parede celular da espécie, é acionado por características do ambiente.

As células ordinárias da epiderme abaxial são mais largas que compridas e apresentam, visivelmente, maior quantidade de alcaloides que as células da epiderme adaxial. Vários estudos tem mostrado a influência das alterações da morfologia celular sobre respostas fisiológicas das células (Besson and Dumais 2011; Pompelli et al. 2010; Wilkins and Sabanci 1990). A quantidade de drusas nas células da epiderme acompanhou o teor de cálcio no solo. As plantas de TF em solo com baixo teor de cálcio, a presença de drusas foi comparativamente menor que CAMP onde foi encontrado maior teor de cálcio no solo. Isto corrobora revisão feita por Franceschi & Nakata (2005) mostrando que o cálcio do ambiente influencia a formação de cristais. Por outro lado, estudo de Bieras & Sajo (2009) encontrou maior quantidade de cristais nas plantas em solo com menor concentração de cálcio.

Nas folhas de plantas de TF, a cutícula, a epiderme e o parênquima paliçádico apresentaram maior espessura, devendo ser considerado que no paliçádico essas células têm espessura irregular com grandes espaços intercelulares; no parênquima lacunoso foram encontradas de cinco a seis camadas de células com espaços intercelulares evidentes e células largas. Para folhas de CAMP praticamente não se observa espaços intercelulares no paliçádico e o parênquima lacunoso apresentou entre seis e oito camadas com pouco espaço intercelular. Cavidade e células coletoras, acumulando alcaloides, foram encontradas fazendo a conexão do parênquima paliçádico com lacunoso, já descrita para outras espécies de Rubiaceae (Metcalf and Chalk 1979; Saibert, Romagnolo, and Albiero 2018; Vieira 1988; Gusmão et al. 1992).

Idioblastos contendo ráfides no parênquima paliçádico, lacunoso e nervura central, também apresentaram maior quantidade em folhas de CAMP. Ráfides foram encontradas para outras espécies de Rubiaceae e subfamília Rubioidae (Metcalf and Chalk 1979; Zini et al. 2016). Bioensaios realizados por Konno et al. (2014) com *Ricinus communis* mostraram que as ráfides atuam na defesa contra herbívoros e sua forma agulha rompe as barreiras da célula possibilitando a passagem de compostos bioativos de defesa.

A presença de feixes adicionais, arranjados imediatamente acima da porção lateral da nervura central do pecíolo, como os encontrados em nosso estudo, também foram descritos para diversas espécies de cerrado por Bieras & Sajo (2009) e para *P. viridis* de três biomas do Sudeste brasileiro por Miranda et al. (2020), esses dados apoiam determinar estas estruturas como característica estrutural anatômica de valor taxonômico para a espécie. Mesmo havendo pequenas variações em decorrência do ambiente, a nervura central é conspícua e mantém o mesmo padrão já descritas para o gênero (Metcalf and Chalk 1979; Moraes et al. 2011), para a espécie em floresta de Mata Atlântica (Quinteiro et al. 2006) e em diferentes ambientes (Miranda, et al. 2020). No entanto, a nervura central de folhas em ambiente de CAMP apresentou células com espessamento dos espaços intercelulares, formando um anel, limitando o feixe vascular que caracteriza uma endoderme (Pirolla-Souza et al. 2019), tipo de espessamento definido como uma característica de folhas de ambientes xéricos.

Quanto às análises histoquímicas, observou-se a presença de amido, compostos fenólicos, polissacarídeos e alcaloides em todas as plantas. Os alcaloides estão presentes em idioblastos e cavidades na nervura principal, em células do mesofilo, no poro estomático e cutícula. No período de verão foi notado que o acúmulo de alcaloide na cutícula se apresentou mais acentuado sobre os espaços intercelulares, como uma resposta que aumenta a defesa da planta às alterações no ambiente (Sabir et al. 2016).

Análises por HPLC-DAD mostraram que o teor de DMT em folhas de plantas cultivadas em ecossistema de TF foi 35% mais elevado quando comparado com o teor em folhas de plantas cultivadas em ecossistema de CAMP. As plantas regulam a bioatividade molecular em resposta às flutuações de luz, umidade e precipitação (Liebelt, Jordan, and Doherty 2019). Porém, a luz não foi determinante da redução do teor de alcaloides em plantas de CAMP, uma vez que em ambos os ambientes as plantas se encontravam sob sombreamento natural e a área foliar não diferiu entre os ambientes. Por outro lado, como as plantas fecham seus estômatos e reduzem a fotossíntese durante os períodos de escassez de água, pode-se esperar uma relação negativa entre a escassez de água e a síntese de metabólitos secundários (Ncube, Finnie, and Van Staden 2012), e como a biossíntese e acúmulo de alcaloides envolve um processo

regulatório rigoroso que inclui células, tecidos e controle ambiental específico (De Luca and St Pierre 2000), consideramos que a maior funcionalidade estomática favoreceu o teor de DMT em plantas do ecossistema de CAMP, pelo melhor controle da perda de água via estômato. Porém, menor taxa pluviométrica, menor capacidade hídrica do solo e maior período de verão afetaram o teor de DMT nas plantas desse ecossistema. Esses resultados destacam a importância de estudos da relação planta/ambiente com base em respostas morfológicas, anatômicas e fitoquímicas como ferramenta que pode ser útil para selecionar e padronizar cultivos de plantas medicinais de alto rendimento.

3.5 Conclusão

Neste estudo, *P. viridis* sob sombreamento natural não alterou a área foliar nos diferentes ambientes. A taxa pluviométrica anual e a capacidade hídrica do solo, que caracterizam a disponibilidade hídrica das áreas, são as variáveis ambientais que mais afetaram as variações em folhas de *P. viridis*. As plantas cultivadas em ecossistema de CAMP sob estresse hídrico apresentaram ajustes morfológicos, anatômicos e fitoquímicos mais expressivos que as plantas cultivadas em ecossistema de TF, refletindo as respostas da espécie às diferenças ambientais entre os dois ecossistemas.

Ajustes nas células do mesofilo, epiderme bisseriada com sinuosidade de parede e menor espaço intercelular, marcaram as alterações anatômicas nas plantas do ecossistema de CAMP em relação às plantas do ecossistema de TF. O acúmulo e armazenamento de DMT e outros alcaloides em folhas de *P. viridis*, foi expressivo em células da epiderme e células coletoras no mesofilo, além dos espaços intercelulares das células epidérmicas, onde a presença de alcaloide está relacionado à resposta de defesa da espécie. Consideramos também, que a espécie suporta uma relação simbiótica com fungos, mediada por ácaros micófagos, que também influencia na produção e acúmulo de DMT.

Como resposta fitoquímica, o teor de DMT em folhas de *P. viridis* sob estresse hídrico, foi favorecido por maior funcionalidade estomática, mas foi afetado pela disponibilidade hídrica do ambiente e pelas características do solo. Portanto, para cultivo da espécie, a disponibilidade hídrica é um parâmetro ambiental fundamental a ser considerado.

Muito embora nossos resultados apontem a disponibilidade hídrica do ambiente como fator fundamental para as diferenças em características morfológicas, anatômicas e para o teor de DMT nas plantas dos ecossistemas de TF e CAMP, estudos futuros com foco em eventos

epigenéticos, morfogênicos e ambientais específicos são importantes para elucidar as causas pontuais dessas variações.

REFERÊNCIAS

- Ab'Saber, Aziz N. 2002. “Bases Para o Estudo Dos Ecossistemas Da Amazônia Brasileira.” *Estudos Avançados* 16 (45): 7–30. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142002000200002>.
- AgriTempo. 2018. “Pesquisa de Dados Meteorológicos Para Presidente Figueiredo, AM.” 2018. <https://www.agritempo.gov.br/agritempo/jsp/PesquisaClima/index.jsp?siglaUF=AM>.
- Almeida, Andrea Lanna, Elder Antônio, and Sousa Paiva. 2019. “Colleters in *Mabea Fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): Anatomy and Biology of the Secretory Process.” *Flora* 258: 151439. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151439>.
- Almeida, Marcílio, Cristina Vieira Almeida. 2014. *Morfologia Da Raiz de Plantas Com Sementes*. Piracicaba, São Paulo: ESALQ/USP. <https://doi.org/10.11606/9788586481321>.
- Almeida, Marcilio, Cristina Vieira Almeida, Erika Mendes Graner, Gilvano Ebling Brondani, and Monita Fiori de Abreu-Tarazi. 2012. “Pre-Procambial Cells Are Niches for Pluripotent and Totipotent Stem-like Cells for Organogenesis and Somatic Embryogenesis in the Peach Palm: A Histological Study.” *Plant Cell Reports* 31 (8): 1495–1515. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1264-6>.
- Almeida, Marcílio de, and Cristina Vieira de Almeida. 2018. “Morfologia Da Folha de Plantas Com Sementes.”
- Alvares, Clayton Alcarde, José Luiz Stape, Paulo Cesar Sentelhas, José Leonardo de Moraes Gonçalves, and Gerd Sparovek. 2013. “Köppen’s Climate Classification Map for Brazil.” *Meteorologische Zeitschrift* 22 (6): 711–28. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- Arruda, Rosani do Carmo de Oliveira, Doria Maria Saiter Gomes, Aline Carvalho de Azevedo, Michelle Lima Magalhães, and Mario Gomes. 2010. “Leaf Anatomy and Micromorphology of Six *Posoqueria* Aublet Species (Rubiaceae).” *Rodriguésia* 61 (3): 505–18.
- Barbosa, Reinaldo Imbrozio, and Izildinha de Souza Miranda. 2004. “Fitofisionomia e Diversidade Vegetal Das Savanas de Roraima.” In *Savanas de Roraima - Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrosilvipastoris*, edited by Costa e Souza J. M. Barbosa R. I., Xaud H. A. M., 61–78. Manaus: FEMACT.

- Besson, Sébastien, and Jacques Dumais. 2011. "Universal Rule for the Symmetric Division of Plant Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (15): 6294–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011866108/-/DCSupplemental>.
- Bieras, Angela Cristina, and Maria das Graças Sajo. 2009. "Leaf Structure of the Cerrado (Brazilian Savanna) Woody Plants." *Trees*, no. 23: 451–71. <https://doi.org/10.1007/s00468-008-0295-7>.
- Blackledge, Robert D, and Charlotte M. Taylor. 2003. "Psychotria Viridis –A Botanical Source of Dimethyltryptamine (DMT)." *Microgram Journal* 1 (1–2): 18–22.
- Bridson, Diane M., and E. Robbrecht. 1990. "Tropical Woody Rubiaceae. Characteristic Features and Progressions. Contributions to a New Subfamilial Classification." *Kew Bulletin* 45 (3): 599. <https://doi.org/10.2307/4110534>.
- Callaway, J. C., D. J. McKenna, C. S. Grob, G. S. Brito, L. P. Raymon, R. E. Poland, E. N. Andrade, E. O. Andrade, and D. C. Mash. 1999a. "Pharmacokinetics of Hoasca Alkaloids in Healthy Humans." *Journal of Ethnopharmacology* 65 (3): 243–56. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00168-8).
- Callaway, J.C, D.J McKenna, C.S Grob, G.S Brito, L.P Raymon, R.E Poland, E.N Andrade, E.O Andrade, and D.C Mash. 1999b. "Pharmacokinetics of Hoasca Alkaloids in Healthy Humans." *Journal of Ethnopharmacology* 65 (3): 243–56. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00168-8).
- Callaway, J C, Glacus S Brito, and Edison S Neves. 2005. "Phytochemical Analyses of Banisteriopsis Caapi and Psychotria Viridis." *Journal of Psychoactive Drugs* 37 (2): 37–41.
- Carlson, Jane E., Christopher A. Adams, and Kent E. Holsinger. 2016. "Intraspecific Variation in Stomatal Traits, Leaf Traits and Physiology Reflects Adaptation along Aridity Gradients in a South African Shrub." *Annals of Botany* 117 (1): 195–207. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv146>.
- Carter, Ross, Hugh Woolfenden, Alice Baillie, Sam Amsbury, Sarah Carroll, Eleanor Healicon, Spyros Sovatzoglou, et al. 2017. "Stomatal Opening Involves Polar, Not Radial, Stiffening Of Guard Cells." *Current Biology* 27 (19): 2974-2983.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.006>.
- Carvalho, L. L., M. R Boeger, A. F Brito, and R. Goldenberg. 2011. "Morfologia Das Domácias Foliares de Miconia Sellowiana Naudin (Melastomataceae)." *Revista*

- Biotemas 25 (1): 2175–7925. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n1p1>.
- Cavalcante, André D, Gabriele A Cardoso, Fernando L P De Oliveira, Eduardo Bearzoti, Adriana A Okuma, Lucienir P Duarte, and Sidney A Vieira-filho. 2018. “Influence of Environmental Factors and Cultural Methods on the Content Of.” *Journal of the Brazilian Chemical Society* 00 (00): 1–11.
- Costa, Maria Carolina Meres, Mariana Cecchetto Figueiredo, and Silvia de O. Santos Cazenave. 2005. “Ayahuasca : Uma Abordagem Toxicológica Do Uso Ritualístico.” *Revista de Psiquiatria Clinica* 32 (19): 310–18.
- Cragg, Gordon M, and David J Newman. 2013. “Natural Products: A Continuing Source of Novel.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (6): 3670–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008.NATURAL>.
- Fanourakis, Dimitrios, Ep Heuvelink, and Susana M.P. Carvalho. 2013. “A Comprehensive Analysis of the Physiological and Anatomical Components Involved in Higher Water Loss Rates after Leaf Development at High Humidity.” *Journal of Plant Physiology* 170 (10): 890–98. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.013>.
- Feng, Wei, Heike Lindner, Neil E. Robbins, and José R. Dinneny. 2016. “Growing out of Stress: The Role of Cell- and Organ-Scale Growth Control in Plant Water-Stress Responses.” *Plant Cell* 28 (8): 1769–82. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00182>.
- Franceschi, Vincent R., and Paul A. Nakata. 2005. “Calcium Oxalate in Plants: Formation and Function.” *Annual Review of Plant Biology* 56 (1): 41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>.
- Gaujac, Alain. 2013. “Estudos Sobre o Psicoativo N , N -Dimetilriptamina (DMT) Em Mimosa Tenuiflora (Willd .) Poiret e Em Bebidas Consumidas Em Contexto Religioso.” Universidade Federal da Bahia.
- Gonçalves, E. G., and H. Lorenzi. 2007. *Morfologia Vegetal - Organografia e Dicionário Ilustrado de Morfologia Das Plantas Vasculares*. 1a. São Paulo.
- Grob, Charles S, Dennis J Mckenna, James C Callaway, Glacus S Brito, Edison S Neves, Guilherme Oberlaender, J Strassman, and Kyle B Boone. 1996. “Farmacologia Da Hoasca, Planta Alucinógena Usada Em Contexto Ritual No Brasil.” *The Journal of Nervous and Mental Disease* 184 (1): 86–94.
- Guerra, Angélica, and · Edna Scremin-Dias. 2018. “Leaf Traits, Sclerophylly and Growth Habits in Plant Species of a Semiarid Environment.” *Brazilian Journal of Botany* 41 (1): 131–44. <https://doi.org/10.1007/s40415-017-0416-x>.

- Gusmão, Elzeni Diladelfo, José Pereira Souza, Ivanádia Maria De Santana Silva, and Lázaro Benedito Silva. 1992. “Estudo Anatômico-Morfológico de Dicotiledôneas Das Dunas de Salvador-Bahia. *Borreia Cymosa* Cham. Et Schl. e *Chiococca Brachiata* R. Et P. (Rubiaceae).” *Acta Botanica Brasilica* 6 (1): 79–98.
- Hetherington, Alistair M, and F Ian Woodward. 2003. “The Role of Stomata in Sensing and Driving Environmental Change.” *Nature* 424: 901–8.
- Holopainen, Jarmo K., and Jonathan Gershenzon. 2010. “Multiple Stress Factors and the Emission of Plant VOCs.” *Trends in Plant Science* 15 (10): 1360–85.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.006>.
- Honda, Eliane Akiko, Natashi Aparecida Lima Pilon, and Giselda Durigan. 2019. “The Relationship between Plant Density and Survival to Water Stress in Seedlings of a Legume Tree.” *Acta Botanica Brasilica* 33 (3): 602–6. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0432>.
- Jezek, Mareike, Adrian Hills, Michael R. Blatt, and Virgilio L. Lew. 2019. “A Constraint–Relaxation–Recovery Mechanism for Stomatal Dynamics.” *Plant Cell and Environment* 42 (8): 2399–2410. <https://doi.org/10.1111/pce.13568>.
- Karnovsky, Morris John. 1965. “A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy.” Article in *The Journal of Cell Biology*.
- Klein, Denise Espellet, Valdirene Moreira Gomes, Sebastião José Silva-Neto, and Maura Da Cunha. 2004. “The Structure of Colleters in Several Species of *Simira* (Rubiaceae).” *Annals of Botany* 94: 733–40. <https://doi.org/10.1093/aob/mch198>.
- Konno, Kotaro, Takashi A. Inoue, and Masatoshi Nakamura. 2014. “Synergistic Defensive Function of Raphides and Protease through the Needle Effect.” *PLoS ONE* 9 (3): 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091341>.
- Kosma, Dylan K, and Owen Rowland. 2016. “Answering a Four Decade-Old Question on Epicuticular Wax Biosynthesis.” *Journal of Experimental Botany*, 67 (9): 2538–40. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw144>.
- Lanaro, Rafael, Débora Bressanim de Aquino Calemi, Loraine Rezende Togni, José Luiz Costa, Maurício Yonamine, Silvia de Oliveira Santos Cazenave, and Alessandra Linardi. 2015. “Ritualistic Use of Ayahuasca versus Street Use of Similar Substances Seized by the Police: A Key Factor Involved in the Potential for Intoxications and Overdose?” *Journal of Psychoactive Drugs* 47 (2): 132–39.

<https://doi.org/10.1080/02791072.2015.1013202>.

- Liebelt, Donna J, Juliette T Jordan, and Colleen J Doherty. 2019. "Only a Matter of Time: The Impact of Daily and Seasonal Rhythms on Phytochemicals." *Phytochemistry Reviews* 18: 1409–33. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09617-z>.
- Liu, Wei, Dongxue Yin, Na Li, Xiaogai Hou, Dongmei Wang, Dengwu Li, and Jianjun Liu. 2016. "Influence of Environmental Factors on the Active Substance Production and Antioxidant Activity in *Potentilla Fruticosa* L. and Its Quality Assessment." *Scientific Reports* 6 (June): 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep28591>.
- Luca, Vincenzo De, and Benoit St Pierre. 2000. "The Cell and Developmental Biology of Alkaloid Biosynthesis." *Trends in Plant Science* 5 (4): 168–73. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01575-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01575-2).
- Mabberley, D. J. 1997. *The Plant-Book : A Portable Dictionary of the Vascular Plants Utilizing Kubitzki's The Families and Genera of Vascular Plants (1990-), Cronquist's An Integrated System of Classification of Flowering Plants (1981), and Current Botanical Literature, Arrange.* 2nd ed. Kingdom; New York: Cambridge University Press.
- Magedans, Yve Verônica da Silva, Cristine Kelly Silva Rodrigues Corrêa, Cibele Tesser da Costa, Hélio Nitta Matsuura, and Arthur Germano Fett-Neto. 2019. "Sustainable Production of Bioactive Alkaloids in *Psychotria* L. of Southern Brazil: Propagation and Elicitation Strategies." *Acta Botanica Brasilica* 33 (4): 607–17. <https://doi.org/10.1590/0102-33062019abb0114>.
- Marques, Jean Dalmo de Oliveira, Wenceslau Geraldes Teixeira, Ana Maria Reis, Orlando Ferreira Cruz Junior, Salomao Marialva Batista, and Maria Amália Castelo Branco Afonso. 2010. "Atributos Químicos, Físico-Hídricos e Mineralogia Da Fração Argila Em Solos Do Baixo Amazonas: Serra de Parintins." *Acta Amazonica* 40 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1590/s0044-59672010000100001>.
- Martins, Aline R, Aline B Bombo, and Anielca N Soares. 2013. "Aerial Stem and Leaf Morphoanatomy of Some Species of *Smilax*." *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23 (4): 576–84. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000043>.
- Matos, Cláudia H C, Angelo Pallini, Fredson F Chaves, and Carla Galbiati. 2004. "Domácias Do Cafeeiro Beneficiam o Ácaro Predador *Iphiseiodes Zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae)?" *Neotropical Entomology* 33 (1): 57–063.
- McDonald, P. G., C. R. Fonseca, J. McC. Overton, and M. Westoby. 2003. "Leaf-Size Divergence along Rainfall and Soil-Nutrient Gradients: Is the Method of Size Reduction Common among Clades?" *Functional Ecology* 17 (1): 50–57.

- <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00698.x>.
- McKenna, Dennis J. 2004. "Clinical Investigations of the Therapeutic Potential of Ayahuasca: Rationale and Regulatory Challenges." *Pharmacology and Therapeutics* 102 (2): 111–29. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.03.002>.
- Metcalf, C. R., and L Chalk. 1979. *Anatomy of the Dicotyledons*. 2nd ed. New York.
- Miranda, Ordilena Ferreira, Saulo Eduardo Xavier Franco Souza, Rodrigo José Milan, Aline Borges Bueno, and Marcílio Almeida. 2020. "Influence of Environment on the Leaf Morpho-Anatomy and Histochemical of the Ayahuasca Leaf : Populations Cultivated in Extra-Amazonian Regions." *Acta Scientiarum Biological Sciences* 42: 1–12. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.50369>.
- Mitchell, Nora, Timothy E Moore, Hayley Kilroy Mollmann, Jane E Carlson, Kerri Mocko, Hugo Martinez-Cabrera, Christopher Adams, et al. 2015. "Functional Traits in Parallel Evolutionary Radiations and Trait-Environment Associations in the Cape Floristic Region of South Africa." *The American Naturalist* 185 (4): 525–37. <https://doi.org/10.5061/dryad.sc286>.
- Moraes, Tarsila Maria da Silva, Guilherme Rodrigues Rabelo, Camilla Ribeiro Alexandrino, Sebastião José da Silva Neto, and Maura Da Cunha. 2011. "Comparative Leaf Anatomy and Micromorphology of Psychotria Species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest." *Acta Botanica Brasilica* 25 (1): 178–90.
- Moreira, Leo Jackson da Silva. 2016. "Química, Física, Minerologia e Teores de Metais Pesados Em Solos Do Estado Do Amazonas." Universidade Federal de Viçosa.
- Ncube, B., J. F. Finnie, and J. Van Staden. 2012. "Quality from the Field: The Impact of Environmental Factors as Quality Determinants in Medicinal Plants." *South African Journal of Botany* 82 (September): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.009>.
- Pinheiro, Luiz Felipe Souza, Rosana Marta Kolb, and Davi Rodrigo Rossatto. 2018. "Leaf Anatomical Traits of Non-Arboreal Savanna Species along a Gradient of Tree Encroachment." *Acta Botanica Brasilica* 32 (1): 28–36. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0280>.
- Pires, A. P. S, C.D.R Oliveira, and M. Yonamine. 2010. "Ayahuasca : Uma Revisão Dos Aspectos Farmacológicos e Toxicológicos." *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 31 (1): 15–23.
- Pirolla-Souza, Andressa, Rosani C O Arruda, Marcelo R Pace, and Maria A Farinaccio. 2019. "Leaf Anatomical Characters of Rhabdadenia (Rhabdadenieae, Apocynaceae), Their

- Taxonomic Implications, and Notes on the Presence of Articulated Laticifers in the Genus.” *Plant Systematics and Evolution* 305: 797–810. <https://doi.org/10.1007/s00606-019-01608-z>.
- Pompelli, M. F, S.C.V. Martins, E.F. Celin, M.C. Ventrella, and F.M. DaMatta. 2010. “What Is the Influence of Ordinary Epidermal Cells and Stomata on the Leaf Plasticity of Coffee Plants Grown under Full-Sun and Shady Conditions ?” *Brazilian Journal of Biology* 70 (4): 1083–88.
- Quinteiro, Mmc, Dc Teixeira, Mg Moraes, and Jg Silva. 2006. “Anatomia Foliar de *Psychotria Viridis* Ruiz & Pav.(Rubiaceae).” *Revista Universidade Rural. Série Ciências Da Vida* 26 (2): 30–41.
- Reynolds., T. 1980. “The Botany and Chemistry of Hallucinogens.” In *Kew Bulletin*, edited by T. Reinald, 29:457-458. Royal Botanical Garden-Kew.
- Rocha, Joecildo Francisco, Rafael Ribeiro Pimentel, and Silvia Rodrigues Machado. 2011. “Estruturas Secretoras de Mucilagem Em *Hibiscus Pernambucoensis* Arruda (Malvaceae): Distribuição, Caracterização Morfoanatômica e Histoquímica.” *Acta Botanica Brasilica* 25 (4): 751–63.
- Rodrigues, Tarcísio Ewerton, Raimundo Cosme Oliveira Junior, Paulo Lacerda Santos, and Paulo Roberto Oliveira Silva. 2001. “Caracterização e Classificação Dos Solos Do Município de Presidente Figueiredo, Estado Do Amazonas.” *Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento*, 2001.
- Saibert, Polyanna Cristina Simão, Mariza Baron Romagnolo, and Adriana Lenita Meyer Albiero. 2018. “Comparação Morfoanatômica de Folhas de *Anesia Xanthorcapa* O. Berg E *Campomanesia Guaviroba* (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae) Como Contribuição a Farmacognosia.” *Visão Acadêmica* 19 (3): 301–16. <https://doi.org/10.15797/concom.2019..23.009>.
- Salisbury, E J. 1927. *On the Causes and Ecological Significance of Stomatal Frequency, with Special Reference to the Woodland Flora*. Edited by F.W.Oliver and F.R.S. *Plant Ecology*. I. Lodon: University of London, University College.
- Santos, Mônica Cardoso, Sandro Navickiene, and Alain Gaujac. 2017. “Determination of Tryptamines and β -Carbolines in Ayahuasca Beverage Consumed during Brazilian Religious Ceremonies.” *Journal of AOAC International* 100 (3): 820–24. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0337>.
- Santos, Rafael G., Flávia L. Osório, José Alexandre S. Crippa, and Jaime E. C. Hallak. 2016. “Antidepressive and Anxiolytic Effects of Ayahuasca: A Systematic Literature Review of

- Animal and Human Studies.” *Revista Brasileira de Psiquiatria* 38 (1): 65–72.
<https://doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1701>.
- Schlichting, Carl D. 1986. “The Evolution of Phenotypic Plasticity in Plants.” *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, no. 17: 667–93.
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.003315>.
- Segatto, Fernanda Bastos, Marlova Benedetti, Marcos Vicente Rampelotto, and Fernando Teixeira Nicoloso. 2004. “Técnica Para o Estudo Da Anatomia Da Epiderme Foliar de Batata 1.” *Ciência Rural* 34 (5): 1597–1601.
- Silva, José Augusto Coelho da, and Marlene Freitas da Silva. 2006. “Estudos Florísticos No Município de Presidente Figueiredo, Amazonas. Brasil-I. Famílias Annonaceae e Gnetaceae.” *Acta Amazonica* 36 (1): 53–58.
- Silva, Marinalva Dos Santos, Italo Antôni Cotta Coutinho, Maicon Nascimento Araújo, and Renata MariaStrozi Alves Meira. 2017. “Colleters in *Chamaecrista* (L.) Moench Sect. *Chamaecrista* and Sect. *Caliciopsis* (Leguminosae-Caesalpinioideae): Anatomy and Taxonomic Implications.” *Acta Botanica Brasilica* 31 (3): 382–91.
<https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0339>.
- Silva Neto, Eduardo Carvalho, Marcos Gervasio Pereira, Elizio Ferreira Frade Junior, Sandra Bezerra Silva, João Andrade De Carvalho Junior, and José Carlos Dos Santos. 2019. “Temporal Evaluation of Soil Chemical Attributes after Slash-and-Burn Agriculture in the Western Brazilian Amazon.” *Acta Scientiarum. Agronomy* 41.
<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v41i1.42609>.
- Silva, Rolf Junior Ferreira, and Raimunda Conceição de Vilhena Potiguara. 2009. “Substâncias Ergásticas Foliáres de Espécies Amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae): Caracterização Histoquímica e Ultra-Estrutural 1.” *Acta Amazonica* 39 (4): 793–98.
- Simioni, Priscila Fernanda, Pedro V. Eisenlohr, Marcos José Gomes Pessoa, and Ivone Vieira da Silva. 2017. “Elucidating Adaptive Strategies from Leaf Anatomy: Do Amazonian Savannas Present Xeromorphic Characteristics?” *Flora* 226 (January): 38–46.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.11.004>.
- Soares, Débora B S, Lucienir P Duarte, D Cavalcanti, Fernando C Silva, Ariadne D Braga, Miriam T P Lopes, Jacqueline A Takahashi, Sidney A Vieira-Filho, and Fernando César Silva. 2017. “*Psychotria* Viridis: Chemical Constituents from Leaves and Biological Properties.” *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 89 (2): 927–38.

<https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160411>.

- Takala, Tuure L.H., and Matti Möttöus. 2016. “Spatial Variation of Canopy PRI with Shadow Fraction Caused by Leaf-Level Irradiation Conditions.” *Remote Sensing of Environment* 182 (September): 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2016.04.028>.
- Taylor, C, M Gomes, and D Zappi. 2015. “Psychotria in Lista de Espécies Da Flora Do Brasil.” *Jardim Botânico Do Rio de Janeiro*. 2015.
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB24581>.
- Teixeira, Paulo Cesar, Guilherme Kangussú Donagemma, Ademir Fontana, and Wenceslau Geraldes Teixeira. 2017. *Manual de Métodos de Análise de Solo*. - Portal Embrapa. Edited by Jacqueline Silva Rezende Mattos. 3rd ed. Brasília, DF: EMBRAPA.
- Vasconcelos, Alex L., Andréa V. Santos, Rafael J.R. Padilha, Luiz C. Alves, and Karina P. Randau. 2017. “Anatomical Characterization of Ultra-Structures, Biominerals and Histolocalization of Metabolites in Leaves of *Genipa Americana*.” *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 27 (5): 541–48. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.002>.
- Vieira, Ricardo C. 1988. “Tocoyena (Vell.). Mart. (Rubiaceae). Anatomia Foliar.” *Rodriguésia* 64/66 (38/40): 33–39.
- Wang, Yan Hong, Volodymyr Samoylenko, Babu L. Tekwani, Ikhlas A. Khan, Loren S. Miller, Narayan D. Chaurasiya, Md Mostafizur Rahman, et al. 2010. “Composition, Standardization and Chemical Profiling of *Banisteriopsis Caapi*, a Plant for the Treatment of Neurodegenerative Disorders Relevant to Parkinson’s Disease.” *Journal of Ethnopharmacology* 128 (3): 662–71. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.02.013>.
- Weckmüller, Rômulo, and Raúl Sánchez Vicens. 2011. “Variabilidade Climática de Regiões Pluviometricamente Homogêneas Na Amazônia Ocidental Daris.” *Revista Brasileira de Geografia Física* 06: 1275–91.
- Wilkins, P. W., and C. O. Sabanci. 1990. “Genetic Variation in Leaf Epidermal Cell Size and Shape in *Lolium Perenne*.” *Euphytica* 47 (3): 233–39.
<https://doi.org/10.1007/BF00024246>.
- Woltering, Ernst J., and Maxence J.M. Paillart. 2018. “Effect of Cold Storage on Stomatal Functionality, Water Relations and Flower Performance in Cut Roses.” *Postharvest Biology and Technology* 136 (August 2017): 66–73.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.009>.
- Yates, Megan J, G Anthony Verboom, and Anthony G Rebelo. 2010. “Ecophysiological Significance of Leaf Size Variation in Proteaceae from the Cape Floristic.” *Functional Ecology* 24 (3): 485–92.

- Zarur, Jorge. 1943. "Um Comentário Sobre a Classificação de Koppen." *Revista Brasileira de Geografia* 2: 250–54.
- Zhai, Xin, Min Jia, Ling Chen, Cheng-jian Zheng, Khalid Rahman, and Ting Han. 2017. "The Regulatory Mechanism of Fungal Elicitor- Induced Secondary Metabolite Biosynthesis in Medical Plants." *Critical Reviews in Microbiology* 43 (2): 238–61. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1201041>.
- Zini, Annielly da Silva, Shirley Martins, Marlene Livia Toderke, and Livia Godinho Temponi. 2016. "Anatomia Foliar de Rubiaceae Ocorrentes Em Fragmento Florestal Urbano de Mata Atlântica, PR, Brasil." *Hoehnea* 43 (2): 173–82. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-59/2015>.

4. CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS ADAPTATIVAS E TEOR DE ALCALOIDES EM CAULE DE *BANISTERIOPSIS CAAPI* (SPRUCE EX GRISEB.) CV MORTON COMO RESPOSTA AO AMBIENTE

RESUMO

As plantas exibem diversas alterações como estratégia de adaptação as variações nas características do ambiente. Em nível global, *Banisteriopsis caapi*, amplamente conhecida como mariri, é a liana mais usada na preparação do chá psicotrópico Ayahuasca. Aqui trazemos uma abrangente descrição das características morfológicas, anatômicas, histoquímicas e fitoquímicas da espécie. As alterações anatômicas que ocorrem em resposta às mudanças no ambiente foram estudadas, e aparecem como suporte para entender os mecanismos de adaptação que podem ter efeito sobre o teor dos alcaloides harmina, harmalina e tetrahidroharmina na espécie. *B. caapi* apresenta um tipo de variante cambial com forma final rosetada, de valor taxonômico que é descrito e nomeado pela primeira vez neste estudo. Nos dois ecossistemas Campinarana (CAMP) e Terra-firme (TF) dimorfismo e deformidade dos elementos de vaso aparecem mais constantes no período de inverno. Entre CAMP e TF a diferença no diâmetro e número de elementos de vasos estão fortemente ligados às estratégias adaptativas da espécie para se ajustar ao déficit hídrico sazonal. Acúmulo de alcaloides foram encontrados em células do córtex, idioblastos e elementos de tubo clivado do floema e na medula, e também em elementos de vaso do xilema interno. As plantas do ecossistema de Campinarana exibiram teor de alcaloides mais elevado e revela uma relação positiva dos alcaloides harmala com a disponibilidade hídrica do ambiente. Os resultados sugerem que o teor dos alcaloides harmina, harmalina e tetrahidroharmina está direto e, positivamente relacionado com os ajustes anatômicos do xilema e com estresse hídrico sazonal de curto prazo experimentado pela espécie.

Palavras-chave: Ayahuasca; Alcaloides; Ecossistemas; Alterações anatômicas; Variante cambial.

ABSTRACT

Plants exhibit diverse alterations as adaptation strategies to changes in environmental characteristics. Globally, *Banisteriopsis caapi*, widely known as *mariri*, is the most commonly used liana in the preparation of the psychotropic tea Ayahuasca. Here we bring a comprehensive description of the species' morphological, anatomical, histochemical and phytochemical characteristics. The anatomical changes that occur in response to environmental changes have been studied and emerge as a support to understand the adaptation mechanisms that can have an effect on the content of the alkaloids harmina, harmalina and tetrahydroharmina in the species. *B. caapi* presents a type of cambium variant with a final rosette shape, which has taxonomic value, and described and named for the first time in this study. In both *Campinarana* (CAMP) and *Terra-firme* (TF) ecosystems dimorphism and deformity of the vessel elements appear more constant in the winter period. Between CAMP and TF the difference in the diameter and number of vessel elements are strongly linked to the species' adaptive strategies to adjust to the seasonal water deficit. Alkaloid accumulation was found in cortex cells, idioblast cells and sieve tube elements in the phloem and spinal cord, and in vessel elements of the internal xylem. Plants

from the *Campinarana* ecosystem exhibited a higher alkaloid content and a positive relationship between harmine alkaloids and water availability in the environment. Results suggest that the content of the alkaloids harmine, harmaline and tetrahydroharmine is direct and positively related to the anatomical adjustments of the xylem and to short-term seasonal water stress experienced by the species.

Keywords: Ayahuasca; alkaloids; ecosystems; anatomical alterations; exchange variant.

4.1 Introdução

Banisteriopsis caapi (Spruce ex Griseb) é uma liana gigante, nativa da Amazônia (Schultes 1970) que em habitat natural atinge o dossel das grandes árvores. Constitui uma das matérias-primas utilizadas para o preparo da Ayahuasca tradicional, um chá psicotrópico de uso ritualístico milenar pelos povos indígenas da Amazônia, preparado com caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis*.

Ayahuasca tem mostrado potencial medicinal para o controle de diversas doenças (Grob et al. 1996, Callaway et al. 1999, Santos et al. 2016, Morales-García et al. 2017, Inserra 2018, Palhano-Fontes et al. 2018). Os caules de *B. caapi* fornecem à Ayahuasca os alcaloides β -carbolínicos harmina (HRM) harmalina (HRL) e tetrahydroharmina (THH) (McKenna 2004). Esses alcaloides funcionam como inibidores de monoamina oxidase (IMAO) (Riba et al. 2012).

A variação na concentração dos alcaloides na Ayahuasca tem sido bem documentada (Callaway et al. 2005, Pires et al. 2018, Souza et al. 2019). Recentemente, Santos et al. (2020) quantificaram a concentração dos alcaloides em amostras de *B. caapi* de ambiente nativo e de cultivo, eles encontraram variação na concentração dos alcaloides HRM, HRL, THH da ordem de 78,9 a 170%. Estudos tem apontado diferentes causas para essas variações nas concentrações dos alcaloides na Ayahuasca (McKenna 2004, Kaasik and Kreegipuu 2020, Silveira et al. 2020). O local de origem das espécies usadas no chá pode ser uma das causas dessas variações, uma vez que as plantas utilizadas na preparação da Ayahuasca são cultivadas e/ou coletadas em distintas regiões com as mais diferentes características ambientais

Banisteriopsis é um gênero taxonomicamente complexo que possui um grande número de espécies (Rowe, 1982). No caso de *B. caapi*, do ponto de vista taxonômico a espécie é pouco estudada quando se compara com estudos dos efeitos de seus alcaloides e, vários “tipos” da espécie já foram encontrados sendo usados por consumidores tradicionais de ayahuasca (Langdon 1986). Estudos realizados por Santos et al. (2020) classificaram quatro “grupos”, identificados a partir de características morfológicas, que foram descritos pelos coletores e usuários de ayahuasca, como sendo a liana *B. caapi*. Porém, já é bem estabelecido que tanto as

características morfológicas de utilidade taxonômica (Moffat et al. 2015) quanto as características fitoquímicas das plantas são influenciadas pelo ambiente (Ncube et al. 2012, Liu et al. 2016). Alcaloides são produtos de um metabolismo secundário altamente ordenado (Osbourn et al. 2003) envolvendo características ambientais (Kong et al. 2016, Liebelt et al. 2019, Li et al. 2020), morfológicas e anatômicas.

Análises de características morfológicas (Araújo and Meira 2016) e anatômicas têm sido realizadas para auxiliar na determinação taxonômica de outros gêneros de Malpighiaceae (Pace et al. 2018). Mas, até onde podemos saber, nenhum estudo morfológico ou anatômico considerando a interferência do ambiente foi realizado para *B. caapi*. Assim, a complexidade anatômica e morfológica da espécie e sua relação com o ambiente, que envolve a produção e acúmulo dos alcaloides ativos, ainda são desconhecidas. No entanto, estudos com essa linha de abordagem podem registrar informações da influência do ambiente sobre as características morfológicas e anatômicas de *B. caapi* com impacto na concentração dos alcaloides β -carbolínicos da espécie e também, pode ser um caminho para explicar a alta variabilidade nas concentrações de HRM, HRL e THH amplamente encontradas em diversos estudos com Ayahuasca (Kaasik and Kreegipuu 2020, Silveira et al. 2020). Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar as diferenças morfológicas, anatômicas e histoquímicas em amostras de *B. caapi* coletados em dois ecossistemas com diferentes características ambientais na Amazônia e quantificar a concentração dos alcaloides nas plantas de cada ecossistema. Além disso foi descrito um tipo de variante cambial de padrão conspicuo que pode contribuir para a correta identificação da espécie.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Áreas de coletas

Dois ecossistemas da Floresta Amazônica Ocidental brasileira, localizados em Estados vizinhos que se encontram separados geograficamente pela linha do Equador, foram selecionadas para coleta do material vegetal deste estudo. Ecossistema 1. Área de Terra-firme (TF) no Estado do Amazonas (60° 01' 30" O e -02° 02' 04"), 122 m de altitude, temperatura anual entre de 32 °C e 22 °C, umidade relativa do ar em torno de 55% e 95% de mínima e máxima (Nava and Gomes 1998), período com maior taxa de chuvas de dezembro a maio e menor junho a

novembro (inverno e verão amazônico), precipitação pluviométrica anual de 2.585 mm (Agritempo 2018). Ecossistema 2. Área de Savana (IBGE, 2005; MAPSBIOMA, 2018) com características predominantes de floresta de Campinarana (CAMP) (Barbosa and Miranda 2004) no Estado de Roraima (00° 57' 02" e -59° 54' 41"), 255 m de altitude, maior concentração de chuva entre maio a setembro e menor de outubro a abril, temperatura anual com variações entre máxima de 32 °C e mínima de 21 °C, 72% de umidade relativa anual e precipitação pluviométrica anual de 1.847 (Agritempo 2018).

As duas áreas apresentam clima equatorial úmido *Af* segundo a classificação de Köppen (Zarur 1943), são marcadas por sazonalidade anual de chuvas (Alvares et al. 2013) sem alagação e não apresentam clara estabilização das estações do ano. A cobertura florestal é ombrófila densa (Ministério da Defesa 2004). Os dados climáticos e a capacidade hídrica do solo foram coletados diretamente de registros locais do INMET (Agritempo 2018).

4.2.2 Coleta e análises de solo

Com auxílio de um trado holandês amostras de solo de TF e CAMP foram coletadas para análises físico-químicas. Nas camadas de 0,00-0,20 e 0,20-0,50 cm do solo 15 subamostras foram coletadas e imediatamente homogeneizadas e, aproximadamente 0,5 dm³ do material foi transferido para sacos plásticos, identificados e encaminhados para análises no Laboratório de Solos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As análises foram realizadas com a fração de terra fina, seca ao ar livre. As partículas (silte, areia e argila) foram analisadas pelo método da pipeta; pH (H₂O) solo: solução 1:2,5; Fe, Zn, Mn, P, K usando o método de extração de Mehlich-1; N pela digestão úmida de Kjeldahl; o conteúdo de matéria orgânica do solo segundo o método Walkley-Black; Al, Mg e Ca usando como extrator KCl 1M (Teixeira et al., 2017).

4.2.3 Material botânico

Nas duas áreas, as amostras foram coletadas do ramo principal de *B. caapi* entre 7:00 – 10:00 horas da manhã no final das estações de inverno e verão que correspondem aos períodos de maior e menor intensidade de chuvas na Amazônia. Em cada população, 10 plantas por estação foram amostradas, totalizando 40 plantas para as duas populações. Ainda em campo as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965).

Toda a coleta do material vegetal obedeceu a um padrão de uniformidade em espessura, fitossanidade e fenofase. Exsiccatas foram preparadas, identificadas sob voucher e depositadas no Herbário INPA do Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia-INPA.

4.2.4 Análises morfológicas e histoquímicas

B. caapi é uma liana de caule composto e, considerando que a morfologia de sua variante cambial em várias características é semelhante à *B. nunminifera* descrita por Pace et al., (2018), definiu-se como câmbio regular o câmbio principal e câmbio variante cada região dissecada por tecido floemático. As recomendações do IAWA Committee (1989) foram utilizadas para descrições, contagens, medidas e terminologias.

As análises foram realizadas em campo e em laboratório. Regiões caulinares de internós com 1-1,5 cm de diâmetro foram coletas e imediatamente fixadas em solução de Karnovsky (1965) por uma semana para preservar os tecidos moles e evitar a perda do material. Posteriormente todas as amostras foram desidratadas usando uma série de álcool graduado (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% v / v) e incluídas em hidroxietil resina de metacrilato (Historesi, Leica, Heidelberg, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

Regiões caulinares de 5-7cm de diâmetro foram mantidas em álcool 70% e cortadas com auxílio de uma serra com fio de diamante para produção de secções transversais de 1mm. Enquanto secções transversais e longitudinais de 5-10 μm de espessura foram produzidas em micrótomo rotativo manual e micrótomo de deslize. Para as análises anatômicas, histoquímicas e medição de diâmetro de vasos (DV) as secções foram coradas com azul de toluidina, ácido periódico de Schiff e Naphtol blue black (FISHER, 1968), enquanto o reagente de Dragendorff foi usado para determinação de alcaloides. Em seguida as secções foram montadas entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan®). Todas as lâminas histológicas analisadas foram fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) e em estereomicroscópio Micronal®, as imagens capturadas na mesma escala com câmera Premiere® MA88-300.

A análise de diâmetro de vaso (DV) e a quantificação de vaso por milímetro quadrado (NV/mm²) foram realizadas em fotomicrografia com captura em objetiva de 10X. Os diâmetros dos vasos medidos na parte mais larga da área do lúmen, com base na suposição de que os vasos eram circulares. Para assegurar a aleatoriedade nas medições de DV utilizou-se uma grade so-

breposta às imagens, onde foram considerados nove pontos formados pela intersecção das linhas da grade. Enquanto para o NV/mm² foram considerados todos os vasos acima de 45µm da fotomicrografia.

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de caules foram seccionadas longitudinalmente e transversalmente, imediatamente fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY 1965) modificada com tampão fosfato pH 7,2), desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao método do ponto crítico de CO₂, montadas sobre suportes de alumínio (Stubbs) sobre fitas de carbono dupla face e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e as eletromicrografias feitas ao microscópio eletrônico de varredura modelo LEO VP 435, operado a 20 kV, com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

4.2.6 Análise fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Amostras de caules de *B. caapi* foram desfibrados e secos em estufa de circulação forçada a 45 °C com velocidade do ar de 1,0 m s⁻¹ até atingir peso constante. Após a secagem, as amostras foram moídas e do pó resultante, utilizou-se 35g de cada amostra para preparo dos extratos etanólicos em sistema soxhlet. A concentração do extrato foi realizada em rota- evaporador modelo FISATON até atingir aproximadamente 10%, seguido de congelamento em freezer -80 °C e posteriormente liofilizados a 4 ATM de pressão por cerca de 72 horas em modelo L101. O resíduo seco obtido foi protegido da luz e guardado em geladeira até o momento das análises fitoquímicas. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia Experimental (LAFTex) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP.

Os padrões harmina (HRM) e harmalina (HRL) foram obtidos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e tetrahydroarmina (THH) da Cayman Chemical. Para cada analito foi construída uma curva de calibração contendo cinco pontos variando de 100-1000 µg/mL, obtida através da regressão linear (a área sob a curva versus concentração) considerando R² ≥ 0,98.

A análise por CLAE-DAD foi realizada utilizando um sistema CLAE-DAD Prominence Shimadzu, segundo a metodologia descrita por Lanaro et al. (2015). Foi usada 1,0 mg do

material vegetal liofilizado diluído em metanol (mg/ml), o cromatograma foi extraído a 279 nm para quantificação de harmina, harmalina e tetrahydroharmina.

4.2.7 Análise Estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. Para DV, as análises foram compostas de três repetições (planta), sendo avaliadas cinco fotomicrografia por planta e medidos nove campos por fotomicrografia, constituindo 270 medições por área, totalizando 540 medições. A análise de NV/mm² foi realizada usando 60 fotomicrografias capturada em objetiva de 10X (0,35mm²) na qual foram considerados todos os vasos com diâmetro $\geq 45 \mu\text{m}$.

Cada parâmetro analisado para as populações foi submetido ao teste de Shapiro Wilk para confirmar a normalidade dos dados, análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para verificar potenciais diferenças entre as populações. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando o software PAST 3.24 (Hammer et al. 2001). Quando necessário, os dados foram *log* transformados.

4.3 Resultados e Discussão

Abordamos em conjunto as questões morfológicas, histoquímicas e fitoquímicas de *B. caapi*, a principal espécie de cipó usada para o preparo do chá Ayahuasca (Callaway et al. 2005; Halberstadt 2016; Silveira et al. 2020). Além de existir poucos estudos com morfologia de *Banisteriopsis*, a maioria deles se concentram em folhas (Araújo and Meira 2016, Nery et al. 2017, Araújo et al. 2020) e ainda, para caules de *B. caapi* os estudos geralmente tem focado na ação que seus alcaloides promovem ao chá Ayahuasca (Mckenna et al. 1984, Callaway et al. 1999, Brierley and Davidson 2013, Hamill et al. 2019). Assim, as descrições anatômicas, morfológicas e locais de acúmulo de alcaloides em caules de *B. caapi* estão sendo apresentados pela primeira vez e corroboram nossa hipótese que a concentração de alcaloides em *B. caapi* está relacionada com as alterações anatômicas de ajuste às características ambientais experimentadas pela espécie.

4.3.1 Características ambientais e adaptativas

Os ecossistemas de TF e CAMP da Amazônia brasileira são teoricamente bem definidos (Ab'Saber, 2002; Barbosa & Miranda, 2004; MAPSBIOMA, 2018). Porém as áreas deste estudo apresentam características ambientais transicionais que podem estar relacionadas tanto com a transição entre os hemisférios (Fig. 1 A) quanto com a florestas contínua de Terra-firme que aos poucos se mistura com floresta de Campinarana, configurando as áreas como uma região ecotônica (Risser 1995, Milan and Moro 2016) entre TF-CAMP. Porém, CAMP ainda atravessa período de estresse hídrico de curto prazo. As diferenças nas características ambientais que se destacaram foram: a taxa pluviométrica média anual e a disponibilidade hídrica do solo que nos períodos de verão apresenta queda de 31% para TF e 78% para CAMP (Fig. 1 B). Além disso, o teor de Nitrogênio (N), ferro (Fe), matéria orgânica (M.O) e carbono (C) foi mais elevado em ecossistema de TF (Tab. 1). Enquanto em ecossistema de Campinarana somente fósforo (P) e cálcio (Ca) foram os nutrientes que tiveram valor mais elevado que TF. Por outro lado, o teor de areia foi 14 vezes maior que em ecossistema de TF. Os solos com alto teor de areia, em geral, resultam em solos com menor superfície de contato, menor retenção de nutrientes e baixa capacidade de retenção hídrica (Yost et al. 2019).

Nossas observações evidenciaram que *B. caapi* se adapta bem tanto em ecossistema de Terra-firme quanto em Campinarana. O que pode ser explicado pelo balanço no teor de fósforo (Malizia et al. 2010) e matéria orgânica do solo que as lianas realizam, como estratégias de colonização (Collins et al. 2016, Sfair et al. 2016). Considerando que lianas podem buscar água em grande profundidade (De Deurwaerder et al. 2018), a adaptabilidade de *B. caapi* em CAMP pode está relacionado mais as características hídricas da espécie do que à capacidade hídrica do solo, uma vez que a capacidade de retenção de água do solo, mais do que a quantidade e a sazonalidade da chuva, é um importante preditor da abundância de lianas (Manzané-Pinzón et al. 2018), porém a capacidade de buscar água em grandes profundidades permite que a espécie sofra menos estresse hídrico durante as secas sazonais, como já descrito para outras espécies de lianas (Schnitzer 2005). Esta adaptabilidade em *B. caapi* é reforçada pelas alterações nas características anatômicas do sistema condutor, que aumenta a segurança e a eficiência do transporte de água (Rosell and Olson 2014, Ganthaler et al. 2019) isso, efetivamente, mostra que a espécie desse estudo responde fortemente à fatores ambientais isolados e em conjunto, como ocorre com outras espécies de lianas (Schnitzer and Bongers 2011).

Os resultados apontam para dinâmica de aporte de nutrientes distinta entre *B. caapi* de ecossistema de TF e CAMP. No entanto, além da capacidade hídrica do solo, não está claro os efeitos das propriedades do solo e do clima sobre seus processo ecológicos.

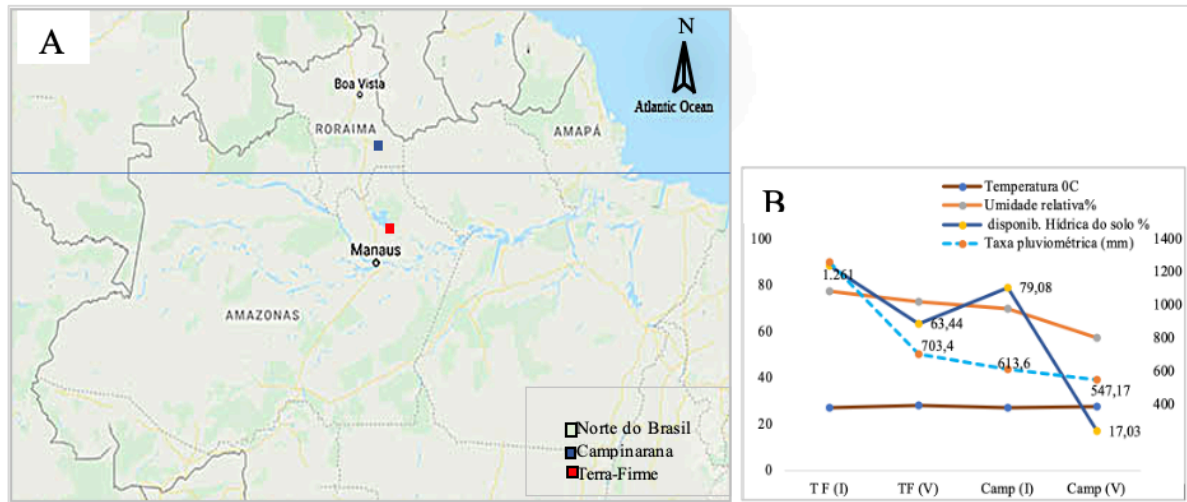


Figura 1. Área de estudo e dados climatológicos. A. Área de estudo no Norte do Estados do Amazonas (Terra-firme- TF) e Sul do Estado de Roraima (Campinarana-CAMP), Norte do Brasil; B. Gráfico climatológico da estação automática do INMET para o período entre maio de 2017 e maio 2019. Os pontos nas linhas representam a média para cada período em cada regiões. (V): verão; (I): inverno.

Tabela 1. Análises químicas e físicas do solo de ecossistemas de Terra-firme e Campinarana da Amazônia com ocorrência de *B. caapi* nativo.

Área/período		Parâmetros do Solo														
		Água	Fe	Zn	Mn	P	N	C	M.O	K	Ca	Mg	Al	Areia	Silte	Argila
		pH	mg/Kg			g/Kg			cmolc/Kg				g/Kg			
CAMP	Verão	3,85	179	0,53	12,34	3,93	0,78	8,32	14,34	0,07	0,54	0,22	0,9	739	98	163
	Inverno	4,92	162,86	0,52	14,9	3,91	1,05	11,78	20,3	0,12	0,82	0,37	0,9	642	130	228
TF	Verão	3,46	662,12	0,55	2,01	0,98	1,93	24,02	41,41	0,07	0,09	0,17	0,95	51	329	620
	Inverno	3,97	243,79	0,7	2,88	0,94	2,13	31,04	53,52	0,08	0,22	0,23	2,43	60	372	569

Cada dado amostrado é a média de três repetições para cada ecossistema e período do ano.

4.3.2 Morfologia e macroanatomia do caule

Nos dois ecossistemas *B. Caapi* se apresentou como uma liana terrícola, ocorrendo em touceiras com caule volúvel e destroso. Na touceira, o caule principal emite diversos brotos que apresentam as mesmas características morfológicas do caule principal. Durante o período de coletas para o estudo, acompanhamos mudas em estágio de crescimento auto suportante, seguido de associação a uma árvore hospedeira que guiou a escalada do caule até o dossel (Fig. 2 A -B), uma característica comum para diversas espécies de lianas (Isnard and Silk 2009, Crivellaro et al. 2012, Angyalossy et al. 2015), essa mudança de hábito é sustentada pelas propriedades mecânicas de sua madeira (Rajput et al. 2012). As folhas têm filotaxia opostas, venação broquidódroma, ápice acuminado e base obtusa (Fig 2. C). Quando a haste de *B. caapi* atinge o dossel da árvore hospedeira há um aumento na quantidade de folhas, um mecanismo que confere vantagem às lianas (Collins et al. 2016) pois favorece os processos fisiológicos de aquisição de recursos. A inflorescência se apresenta racemosa paniculada com flores e sépalas pentâmeras de cor rosa claro na fase jovem e branca na fase adulta, as pétalas são amarelas e pequenas em relação à corola (Fig 2. D) características que já foram descritas para outras espécies da família Malpighiaceae (Davis and Anderson 2010).

Em morfologia externa, um caule adulto de *B. caapi*, em primeira observação parece com um trançado de várias hastes (Fig. 2A), esta aparência é causada pela presença de câmbio variante e pela torção do caule durante a escalada na árvore hospedeira. O câmbio regular apresenta medula angular e xilema inicial lobado (Fig. 2E, F), resultando em atividade cambial diferencial que ocorre em quatro partes equidistantes do câmbio (Ragni and Greb 2018), características que precedem e potencializam o desenvolvimento de câmbio variante (Chery et al. 2020).

A presença de câmbio variante é inicialmente observada em *B. caapi* pela elevada diferença de tecido floemático/massa floemática em relação ao tecido xilemático, que indica a presença inicial de variação cambial (Fig. 2F). Essa atividade começa no início do crescimento em espessura do caule, com o câmbio aumentando a produção desigual de floema que emergem em quatro pontos, imediatamente ao xilema inicial, iniciando o processo de desenvolvimento do corpo primário lobulado, citado por Chery et al. (2020), que formará o câmbio variante.

O crescimento do câmbio variante de *B. caapi* exibe polaridade regular com produção de xilema para o interior e floema para o exterior. Cada câmbio variante é lobado e organizado em múltiplos de dois ou três lóbulos preenchidos com grande área de xilema secundário (Fig.

2 G), e se encaixa na premissa de câmbio múltiplo do tipo sucessivo (Angyalossy et al. 2015). Esse é um tipo de crescimento secundário considerado anômalo, porém comum em lianas (Angyalossy et al. 2015, Pace et al. 2018, Chery et al. 2020) e, já apresentado para outra espécie de *Banisteriopsis* em trabalho de Pace et al., (2018). Para espécies de lianas de florestas com alto índice de tempestades e fortes ventos, como a amazônica, este tipo de crescimento promove a importante vantagem mecânica de torcer sem quebrar (Rowe 2018, Groover 2020).

Cortes anatômicos em caules maduros mostram que o cilindro de cada câmbio variante é profundamente dissecado por cunhas de floema que se conectam ao câmbio regular próximo ao xilema interno (Fig. 2G), revelando uma quase-independência do câmbio variante, explicada detalhadamente em outras espécies no trabalho de Chery et al., (2020). Essa é uma estratégia mecânica que protege o caule, por exemplo, se um dos câmbios variantes sofrer rompimento ou injúria, o restante do caule continuará funcional, também contribui na reparação de lesões do caule (Dobbins and Fisher 1986) e segundo Pace et al. (2011) tem floema mais eficiente na condução dos fotoassimilados que o câmbio regular. Ainda há poucos estudos que descrevem a variação cambial de caule para o gênero *Banisteriopsis* (Davis and Anderson 2010, Pace et al. 2018) e nenhuma contempla *B. caapi*, que possui uma variação cambial conspícua.

O câmbio de *B. caapi*, apresenta anatomia em plano transversal marcante, indicando a cooptação de um mecanismo ancestral (Chery et al. 2020, Groover 2020). Na fase inicial o câmbio apresenta anatomia regular, na fase juvenil passa para lobado e em seguida para uma estrutura em camadas, que seria uma variação do câmbio sucessivo apresentado por Angyalossy et al. (2015). Porém, à medida que o caule aumenta em diâmetro, as camadas de crescimento e a torção do câmbio regular + câmbio variante fazem com que, a estrutura do caule adquira anatomia “similar à uma rosa surgindo no mesmo eixo. Esse tipo de formação de câmbio não é comum e ainda não foi descrito. Portanto, nomeamos a sua variante cambial de **câmbio sucessivo rosetado**, para indicar o formato de “rosa” dentro do caule em sua forma final (Fig. 2 G), e também porque o formato de “rosa” no interior do caule é utilizado como subsídio para identificação de *B. caapi* como “Ayahuasca verdadeira” pelas comunidades da Amazônia que fazem uso tradicional desta espécie. Dessa forma, a estrutura final do caule, câmbio regular + câmbio variante, pode ser usada como característica para identificação de *Banisteriopsis caapi*, como sugerido por Pace et al. (2018) para *B. nummifera*.

Este estudo está baseado em análises de caules com câmbio variante já formado. Porém, para uma compreensão mais abrangente das etapas geradoras desta variante cambial consideramos importante estudo mais profundo de ontogênia do câmbio.

4.3.3 Morfologia do ritidoma, floema condutor e não condutor

O ritidoma ou casca externa apresenta cor marrom escura e tem suas camadas eliminadas à medida que o caule amadurece e aumenta em diâmetro. Além disso, rompimentos sequenciais causados pelas torções desprendem as lenticelas ao longo da vida do caule, (Fig. 3A). O ritidoma é espesso e produzido por múltiplas peridermes, sendo possível observar até três peridermes sequenciais na casca externa de *B. caapi*. A periderme mais externa é de cor marrom escuro e as subsequentes marrom avermelhado, quando corado com lugol, indicando presença de alcaloides (Fig. 3 A,) que funcionam como substâncias de defesa do córtex e do floema não funcional (Evert 2013).

O felogênio produz felema não-estratificado e feloderme fina com até três camadas de células que podem se confundir com as células do córtex por sua aparência e conteúdo. Felema e feloderme possuem células retangulares tangencialmente alongadas que acompanham o crescimento cilíndrico do caule e contendo compostos fenólicos (Fig. 3 A, B). Felogênio e compostos fenólicos juntos servem como proteção ao ataque de patógenos e perda de água (Ragni and Greb 2018). O córtex imediatamente interno à periderme exibe células parenquimáticas bastante dilatadas com espaços intercelulares reduzidos, características associadas ao crescimento em diâmetro do caule de lianas (Angyalossy et al. 2016).

Com relação ao floema condutor e não-condutor ou casca interna, o floema não-condutor ocupa uma área maior que o floema condutor, apresentando o mesmo padrão tanto para plantas de CAMP quanto TF, este mesmo padrão foi observado tanto em plantas coletadas no período de verão quanto no de inverno (Fig.3 C, D). O início do floema não-condutor é marcado pela dilatação do parênquima radial e axial, obliteração dos tubos clivados, abundância de drusas e presença da primeira faixa de fibras subsequente ao floema condutor. (Fig. 3 E), características também apresentadas por *B. numminifera* (Pace et al. 2018).

Muito embora sejam necessários estudos mais criteriosos do fenômeno, observamos que o floema condutor perde sua função a partir da primeira faixa de fibras, permitindo inferir que seu período funcional é de apenas uma estação, uma característica que está relacionada à torção do caule, e que não difere entre as plantas coletadas em CAMP e TF. Largas faixas de fibras com paredes espessas ocorrem paralelas e tangenciais contínuas e descontínuas contendo tubos crivados, e tornam-se cada vez mais descontínuas chegando a formar “ilhas” no córtex.

Amostras coradas com reagente de Schiff revelam que a parede secundária das fibras é rica em celulose (Fig. 4 A), indicando a presença de fibras gelatinosas (Evert, 2013).

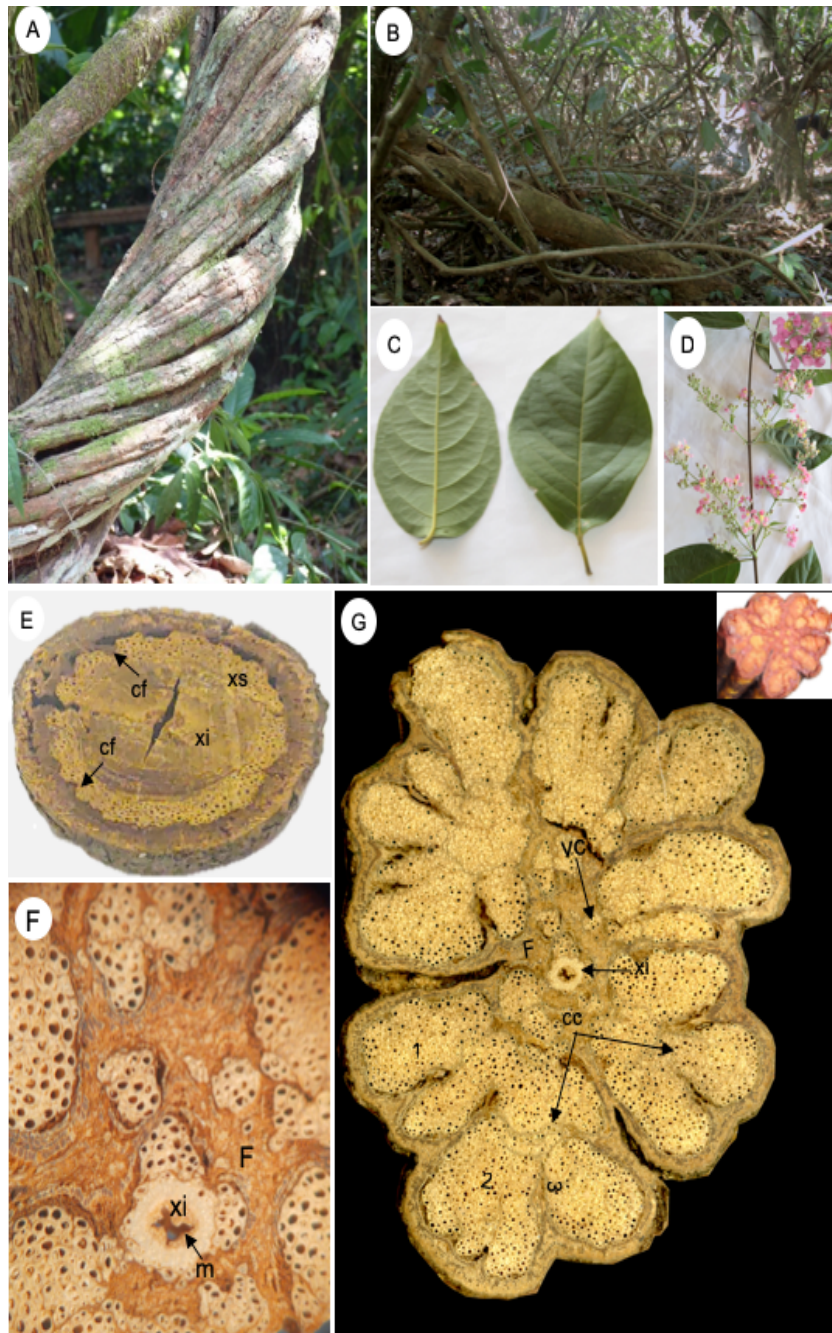


Figura 2. Morfologia externa e interna de *Banisteriopsis caapi*. A. caule em floresta nativa de Terra-firme; B. Touceira de *B. caapi* em floresta nativa de Campinarana; C. Folhas mostrando venação broquidódroma; D. inflorescência racemosa em panículas, note flores amarelas inseridas dentro das sépalas; E. Corte transversal do caule exibindo início da formação de Cunhas de floema e xilema interno e xilema secundário externo; F. Medula em forma angular, xilema inicial lobado e alta quantidade de floema no início da formação do câmbio variante; G. Caule exibindo variação cambial ocorrendo próximo da medula imediatamente ao xilema interno, lobo formado por 2 a 3 lóbulos, detalhe da forma rosetada do caule; camada de crescimento visíveis. Abreviações: cc: camada de crescimento; cf: cunha de floema; F: floema; m: medula; vc: variação cambial; xi: xilema interno; xs: xilema externo. Diâmetro dos caules: F= 1,3 cm; G= 6,5 cm.

O floema condutor apresenta canais secretores ramificados (Fig 4. A e B), idioblastos contendo compostos fenólicos, cristais prismáticos e drusas que aparecem isoladas ou agregadas formando grandes grupos (Fig. 4 C), também presentes em células do parênquima axial. Agrupamentos de drusas foram mais abundantes em plantas de ecossistema de campinarana. Além

do suporte mecânico já relata por Esaú (2013), alta concentração de drusas está associada à capacidade de refletância da planta, e pode contribuir na adaptação de *B. caapi* em ecossistema de Campinarana, um ambiente com florestas mais abertas e maior incidência direta de luz que em ecossistema de Terra-firme.

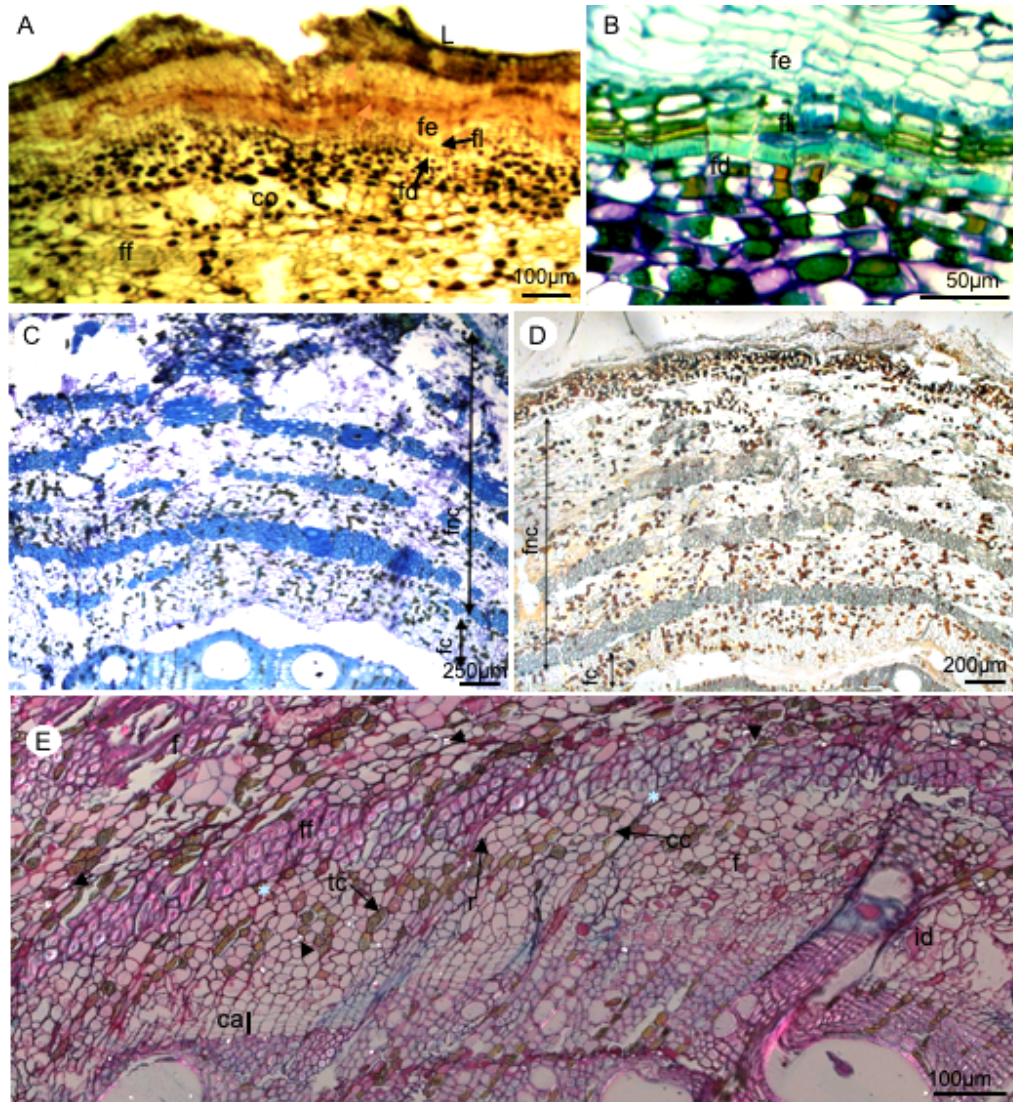


Figura 3. Corte transversal (CT) de casca de *Banisteriopsis caapi*. A. Casca externa formada por lenticelas, múltiplas peridermes e córtex; B. Periderme exibindo feloderme com três camadas de células; C. CT de plantas de CAMP coletadas no verão exibindo floema condutor e não-condutor; D. CT de plantas de TF coletadas no verão exibindo floema condutor e não-condutor; E. CT do floema evidenciando tubo crivado com células companheiras, faixa de fibras, dilatação de raios, obliteração de elementos de tubo crivados e células parenquimáticas (*asterisco); câmbio, idioblastos e abundante presença de cristais (ponta de seta). Abreviações: ca: câmbio; co: córtex; cc: células companheiras; fc: floema condutor; fd: feloderme; fe: felema; ff: fibras do floema; fl: felogênio; fnc: floema não-condutor; tc: tubo crivado.

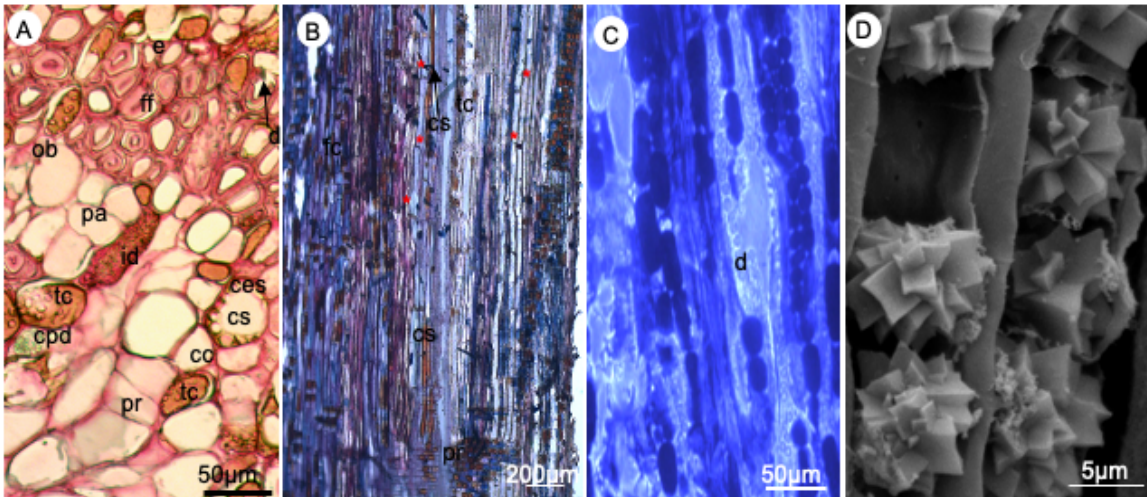


Figura 4. Caule de *Banisteriopsis caapi*. A. Seção transversal do floema condutor evidenciando célula obliterada, célula parenquimática, célula parenquimática com cristal, tubo clavado, canal secretor, idioblasto e fibras; B. Corte longitudinal radial do floema condutor evidenciando as fibras septadas (*asteriscos), tubos contendo compostos fenólicos, parênquima radia e canal secretor; C. Corte longitudinal radial do floema não-condutor onde exibe por microscopia de luz polarizada alta densidade de cristais; D. Série de drusas em idioblastos do parênquima axial do floema não-condutor. Abreviações: cc: célula companheira; cs: canal secretor; cse: célula secretora; cp: célula parenquimática; cpd: célula parenquimática com drusa; d: drusa; ob: célula obliterada; pa: parênquima axial; pr: parênquima radial; tc: tubo clavado.

4.3.4 Xilema

Como características do xilema secundário comum tanto em ecossistema de Campinarana quanto de Terra-firme, *B. caapi* apresenta dimorfismo dos elementos de vasos, com elementos de vasos excepcionalmente largos co-ocorrendo com elementos de vasos estreitos e abundância de parênquima radial e axial (Fig. 5 A-D). Dimorfismo de elementos de vaso é uma estratégia que combina segurança e eficiência hidráulica (Carlquist 1985). Abundância de parênquima é descrito como características que acompanham as espécies de lianas neotropicais e pode funcionar para o armazenamento de água e carboidratos (Spicer and Groover 2010, Rajput et al. 2012). Além disso, vasos largos em lianas apresentam maior eficiência hidráulica com maior condutividade específica (Ganthaler et al. 2019).

O parênquima radial é multiseriado com células procumbentes, os são raios unisseriados, as fibras septadas, e os anéis de crescimento anuais são margeados por parênquima. O xilema inicial é marcado por maior densidade que o xilema externo e apresenta vasos estreitos solitários ou em cadeia radial acompanhando o raio, uma característica da fase auto suportante do caule (Angyalossy et al. 2015). Quando vistos em corte transversal, os vasos apresentam deformidades sugerindo dilatação durante a torção do caule (Fig 5 E).

Os elementos de vasos apresentaram maior deformidade no período de inverno (Fig. 6 A e B) em plantas de Terra-firme, o que está relacionado ao maior crescimento em diâmetro

do caule das plantas deste ecossistema que são favorecidas por maior período chuvoso do que as plantas do ecossistema de Campinarana.

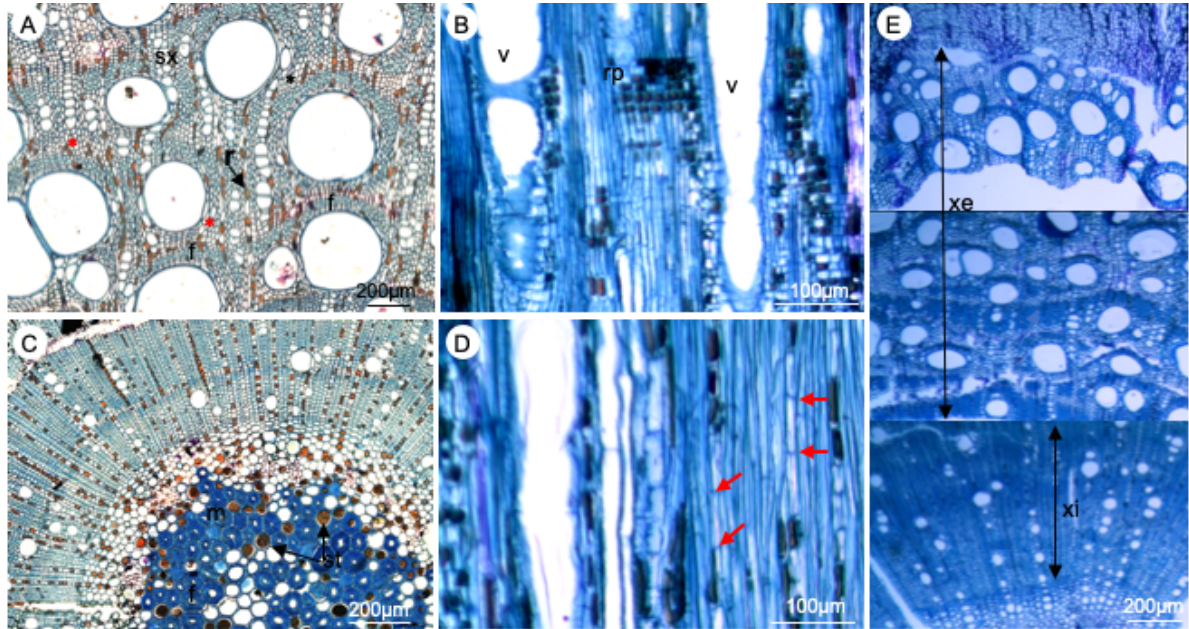


Figura 5. Seções anatômicas de *Banisteriopsis caapi*. A. Seção transversal mostrando o xilema secundário com células do parênquima (*asteriscos), raios do xilema (seta) e fibras do xilema; B. Seção longitudinal radial mostrando o parênquima radial com células procumbentes e os elementos de vaso; C. Seção transversal mostrando a estrutura da medula, tubo clivado, fibras com paredes espessas e células parenquimáticas; D. Seção longitudinal tangencial mostrando parênquima radial, vaso e as fibras septadas (seta); E. Seção transversal do xilema interno e xilema externo. Note a presença de dimorfismo de vaso e diferença entre xilema interno e externo. Abreviações: f: fibra; r: raio; rp: parênquima radial; st: elemento de tubo clivado; sx: xilema secundário; v: vaso; m: medula, xi: xilema interno; xe: xilema externo.

As amostras coletadas em ecossistema de TF apresentaram elevada média de diâmetro de vaso e de número de vaso/mm² consistentes, e sem diferença significativa entre os períodos de verão e inverno (fig. 6 A e B). Essa resposta pode estar associada às características ambientais de TF que mantém baixa alteração entre os dois períodos sazonais, como por exemplo a capacidade hídrica do solo e a umidade relativa do ar têm valores relativamente próximos nos dois períodos. Elementos de vasos largos estão associados ao transporte com maior condutividade, menor atrito e maiores volumes de água (Pace et al. 2011) porém, com maior vulnerabilidade do sistema condutor.

A média do diâmetro de vaso e número de vaso/mm² para amostras coletadas em CAMP foi significativamente maior no período de inverno e não diferiu significativamente das amostras de TF. Entretanto, no período de verão CAMP apresentou menor número de elementos de vasos/mm² e menor diâmetro de elementos de vasos (Fig. 6B), indicando um ajuste para aumentar a segurança hidráulica do xilema, pois vasos estreitos e traqueídes formam resistência a embolia (Pockman and Sperry 2000, Ganthaler et al. 2019). Estas respostas encontradas nos

caules de *B. caapi*, neste ecossistema, podem sugerir uma adaptação anatômica em consequência da alteração da disponibilidade hídrica no ambiente entre os períodos de inverno e verão, gerando um melhor sistema de condução de água (Angyalossy et al. 2012), que para *B. caapi* pode representar uma estratégia de uso eficiente de água e nutrientes, para suportar períodos de estresse hídrico, ligada à uma pré-adaptação que permite que a espécie possa se sair bem após uma mudança ambiental por meio de respostas no desenvolvimento do caule (Rowe, 2018).

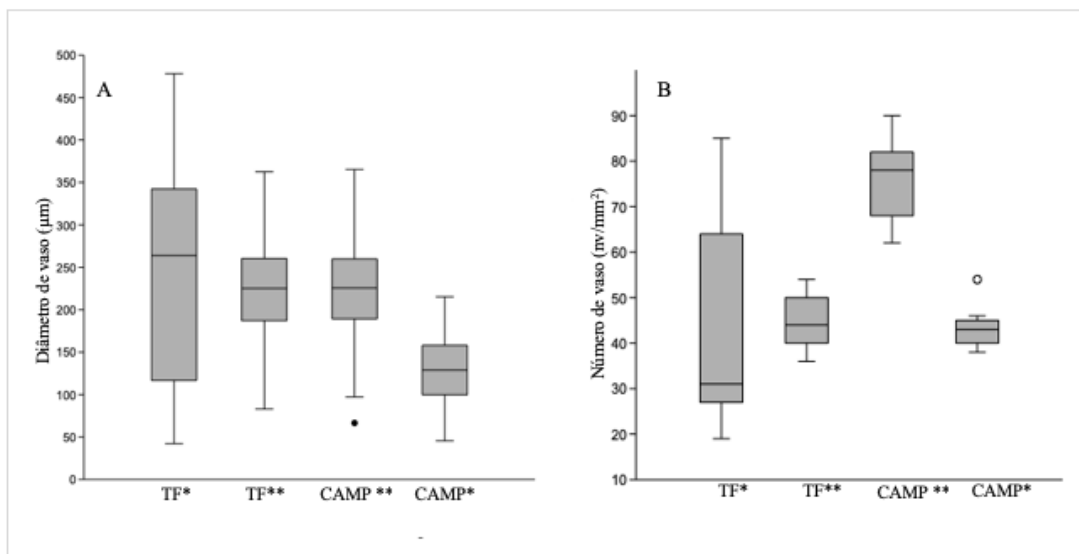


Figura 6. Diâmetro (μm) e número de vaso (nv/mm^2) em caules de *B. caapi*. A. Diâmetro de vasos em plantas coletadas em ecossistema de Terra-firme (TF) e Campinarana (CAMP) no período de verão (*) e período de inverno (**); B. Diâmetro de elementos de vaso em plantas coletadas em ecossistema de TF e CAMP no período de verão e período de inverno. Barras horizontais são as medianas, caixas representam 50% dos dados (50º quantil), linhas são 95º quantil e pontos são “outliers”. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey

4.3.5 Local de acúmulo de alcaloides

Nenhum estudo mostrando a localização de alcaloides em *B. caapi* foi encontrado, sendo revelada pela primeira vez neste estudo. Os resultados qualitativos dos testes histoquímicos nos permitiram reconhecer o local de acúmulo dos alcaloides com facilidade, que foram encontrados em todo o corpo caulinar. A presença dos alcaloides no ritidoma, na camada mais externa da periderme e em abundantes idioblastos no córtex (Fig. 7 A) está relacionada à proteção contra patógenos e herbívoros do caule, uma vez que estes compostos são associados à defesa da planta (Wink 1987), devido ao rompimento constante da periderme causado pelo crescimento em diâmetro e pela torção do caule.

No floema não condutor é marcante a presença de alcaloide nos elementos de tubo crivado, porém a cor marrom mais clara que outros locais de acúmulo pode sugerir perda do

conteúdo de alcaloides por rompimento da parede celular (Fig. 7B). Por outro lado, no floema condutor, quando revelado com Dragendorff, a presença de alcaloide evidencia cor marrom intenso nos elementos de tubo crivado, em canal secretor, nas fibras e esclereides (Fig. 7 C, D). Síntese e acúmulo de alcaloides em elementos de tubo crivado foram relatados para papoula do opio (Bird et al. 2003), porém podem ser transportados para outros tecidos da planta, frequentemente, envolvendo a ação de transportadores localizados nas membranas (Yazaki 2006).

No xilema externo (Fig. E e F) os alcaloides estão presentes nos raios, células parenquimáticas e na parede de alguns elementos de vaso. Alcaloides em elementos de vaso podem ter sido sintetizados pela raiz e transportados via xilema e traqueídes associados a laticíferos (De Luca and St Pierre 2000). Já no xilema interno, acúmulo de alcaloides foi detectado no interior de elementos de vasos largos e estreitos, no raio, traqueídes e em célula do parênquima (Fig. 7 G e H). Uma possibilidade para a presença de alcaloides nos elementos de vasos, é que eles sejam absorvidos do solo e translocados pelo xilema (Nowak and Selmar 2016). Além disso, alcaloides no xilema interno sugerem aumento de proteção contra predadores durante a fase auto suportante do caule. Já na medula (Fig. I) destaca-se a presença de alcaloides em elementos de tubo crivado, fibras e idioblasto.

Nossos resultados revelam que todo os tecidos do caule de *B. caapi* possui local de acúmulo de alcaloide. Isto é claramente explicado, uma vez que a maioria dos alcaloides são capazes de se difundir facilmente através das biomembranas (Nowak and Selmar 2016), assim a presença de alcaloide em todo o corpo caular, torna mais rápido o recrutamento deste composto durante as fases de crescimento da espécie. Aqui descrevemos os locais de acúmulo dos alcaloides em *B. caapi* baseados em análises histoquímicas. Porém, estudos fitoquímicos em tecidos específicos poderão detalhar os processos subjacente de alocação e acúmulo de alcaloides para espécie.

4.3.6 Quantificação de HRM, HRL e THH

Com relação à quantificação dos alcaloides, considerável variação foi encontrada nos valores médios nas amostras entre os dois ecossistemas. Harmalina e tetrahydroharmina exibiram maior concentração nas plantas coletadas no período de inverno, porém com diferença significativa entre as duas áreas. Isto pode está relacionado ao teor de fósforo (Malizia et al. 2010) e às adaptações anatômicas durante o período de inverno. Teor baixo de harmalina em *B. caapi* pode não ter relação com harmina e terahidroharmina (Callaway et al. 2005). Como a

concentração média desses alcaloides foi superior tanto no período de inverno quanto verão em Campinarana, além do balanço nutricional, associamos o sucesso fitoquímico das plantas desse ecossistema à variedade de adaptações anatômicas do sistema condutor e às características áridas deste ecossistema, uma vez que aridez tende a aumentar a concentração de alcaloides (Robertson et al. 2018).

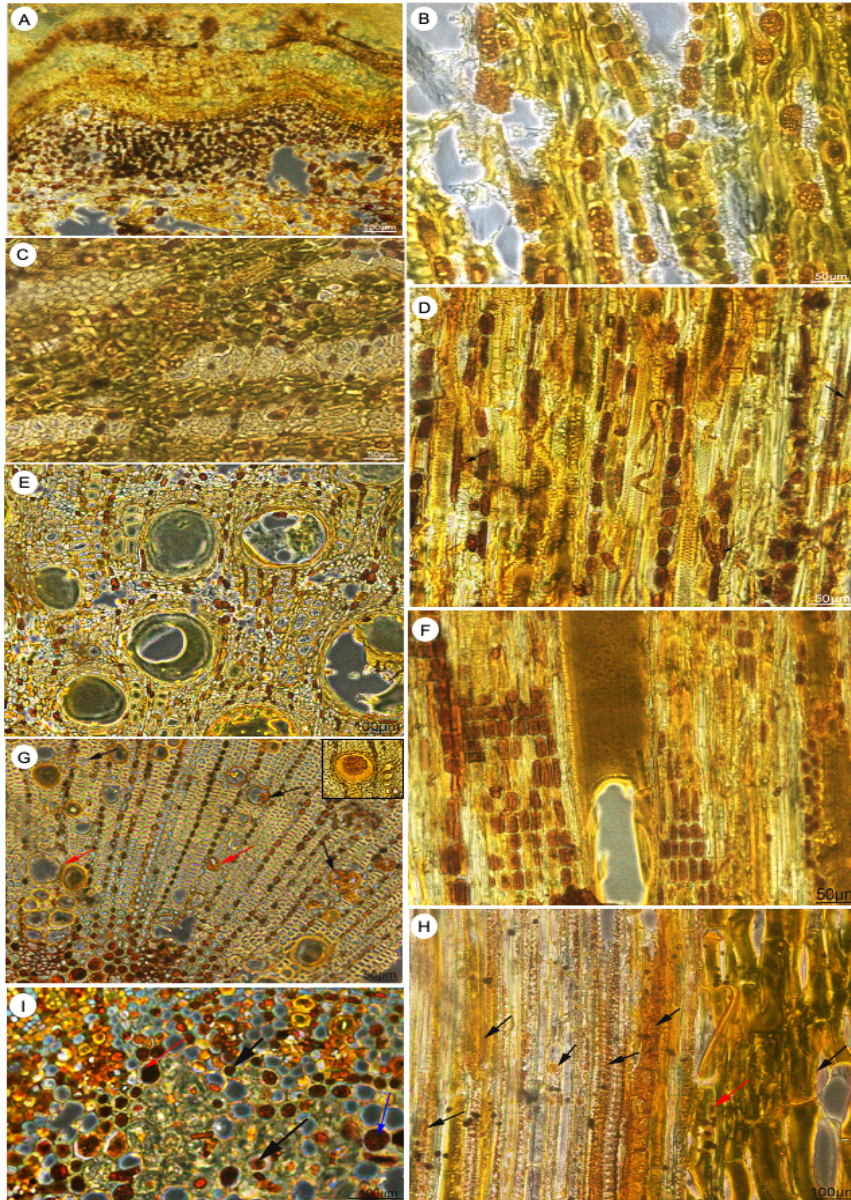


Figura 7. Localização histoquímica de alcaloides em caules de *Banisteriopsis caapi* revelado com reagente de Dragendorff. A. Região do ritidoma e córtex com abundante presença de alcaloide; B. corte longitudinal do floema não condutor; C. corte transversal do floema condutor mostrando a faixa de fibras, presença de alcaloide em esclereídes e elementos de tubo crivado; D. longitudinal do floema condutor; E. corte transversal do xilema externo, observar a presença de alcaloide em células do parênquima, no raio e elemento de vaso; F. corte longitudinal radial do xilema secundário (externo) mostrando acúmulo de alcaloides em células do raio e parênquima radial e axial e também nas fibras; G. corte transversal do xilema interno observar a presença de alcaloides em células do raio, elementos de vaso e traqueídes, em detalhe presença de alcaloide em elemento de vaso; H. Corte longitudinal radial do xilema interno com acúmulo de alcaloides em traqueídes, elementos de vaso e células do parênquima; I. corte transversal da região da medula mostrando a presença de alcaloides em idioblastos (seta vermelha), elemento de tubo crivado (seta azul) e fibras (seta preta). Observar a abundância de idioblastos contendo alcaloides.

Por outro lado, a concentração média de harmina não mostrou diferença nas plantas coletadas nos dois ecossistemas tanto no período de verão quanto inverno (Fig. 8 A-C). Uma explicação para isto é que, maior concentração de nitrogênio no solo do ecossistema de Terra-firme pode ter favorecido a concentração média desse alcaloide encontrada em plantas de TF, considerando que a maioria dos alcaloides funcionam como reservatórios de nitrogênio (Ali et al. 2019). Porém amostras de *B. caapi* que foram coletadas por Spruce em 1852 e analisadas em 1969, harmina (4 mg/g) foi exclusivamente o único alcaloide encontrado (Schultes et al. 1969) o que demonstra a estabilidade desse alcaloide.

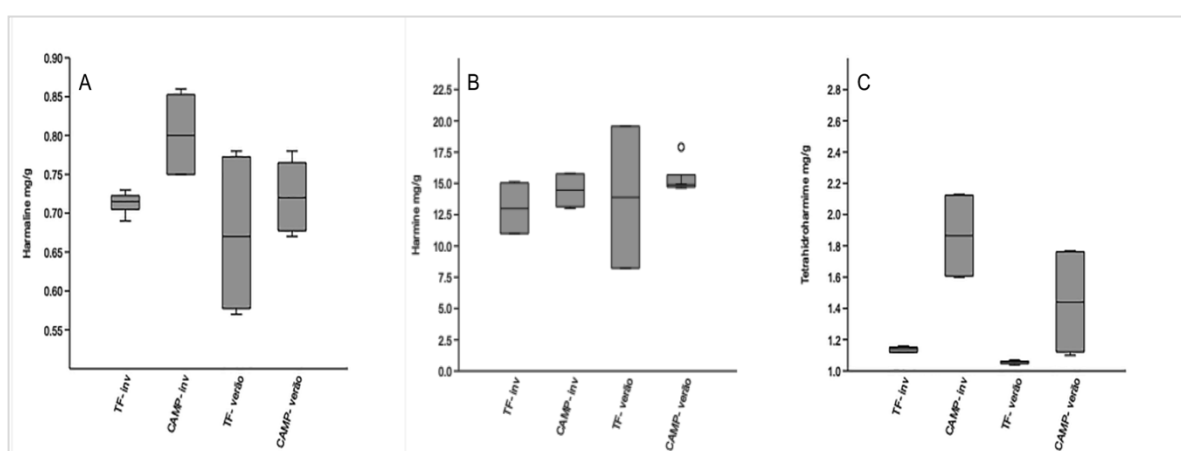


Figura 8. Concentração de alcaloides em caules de *Banisteriopsis Caapi* coletados em ecossistema de Terra-firme (TF) e Campinarana (CAMP) no período de inverno e verão. A. concentração de harmalina; B. concentração de harmina; C. concentração de tetrahydroharmane.

4.4 Conclusão

Nosso estudo mostra com dados ambientais, anatômicos, morfológicos e fitoquímicos as principais causas das variações nas concentrações de alcaloides encontradas em caules de *B. caapi*. A espécie se adapta bem tanto em ecossistema de Campinarana quanto de Terra-firme.

O tipo de variante cambial tem valor taxonômico, e é descrito aqui pela primeira vez como *câmbio sucessivo rosetado*. Futuros estudos ontogenéticos são necessários para determinar a origem de formação desta variante cambial.

As características anatômicas do sistema condutor se adaptam em resposta às alterações na disponibilidade hídrica sazonal do ambiente e na capacidade hídrica do solo. O crescimento em espessura do caule aumenta a deformidade dos elementos de vasos, principalmente, no período de inverno. Diâmetro e quantidade dos elementos de vasos em *B. caapi* são alteradas como estratégia de aliar segurança e eficiência hidráulica.

Todos os tecidos do caule de *B. caapi* tem locais de acúmulo de alcaloides, e também os elementos de vasos do xilema interno. A variação na concentração de harmina, harmalina e tetrahydroharmina em *B. caapi* está ligada às características hídricas do ambiente, ao balanço nutricional do solo e às adaptações anatômicas do sistema condutor do caule. Em ecossistema de CAMP que passa por períodos de estresse hídrico sazonal a concentração dos alcaloides é mais elevada.

REFERÊNCIAS

- Ab'Saber, A.N. 2002. Bases para o estudo dos ecossistemas da Amazônia brasileira. *Estudos Avançados* 16: 7–30.
- Agritempo. 2018. *Pesquisa de dados meteorológicos para Presidente Figueiredo, AM*. (<https://www.agritempo.gov.br/agritempo/jsp/PesquisaClima/index.jsp?siglaUF=AM>). Accessed on 14 Oct. 2018.
- Ali, A.H.; Abdelrahman, M.; El-Sayed, M.A. 2019. Alkaloid Role in Plant Defense Response to Growth and Stress. In: Jogaiah, S.; Abdelrahman, M. (Eds.), *Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress*, Springer International Publishing, Cham, p.145–158.
- Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.L. de M.; Sparovek, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22: 711–728.
- Angyalossy, V.; Pace, M.R.; Lima, A.C. 2015. Liana Anatomy , Physiology and Biomechanics. In: Schnitzer, S.A.; Bongers, F.; Burnham, R.J.; E., P.F. (Eds.), *Ecology Of Lianas*, 1st ed. JohnWiley & Sons, Ltd, São Paulo, p.253–287.
- Angyalossy, V.; Angeles, G.; Pace, M.R.; Lima, A.C.; Dias-Leme, C.L.; Lohmann, L.G.; et al. 2012. An overview of the anatomy, development and evolution of the vascular system of lianas. *Plant Ecology & Diversity* 5: 167–182.
- Angyalossy, V.; Pace, M.R.; Evert, R.F.; Marcati, C.R.; Oskolski, A.A.; Terrazas, T.; et al. 2016. IAWA List of Microscopic Bark Features. *IAWA Journal* 37: 517–615.
- Araújo, J.S.; Meira, R.M.S.A. 2016. Comparative anatomy of calyx and foliar glands of *Banisteriopsis C. B. Rob.* (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* - 30: 112–123.
- Araújo, J.S.; Almeida, R.F. De; Meira, R.M.S.A. 2020. Taxonomic relevance of leaf anatomy in *Banisteriopsis C.B. Rob.* (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 34: 214–228.
- Barbosa, R.I.; Miranda, I. de S. 2004. Fitofisionomia e diversidade vegetal das savanas de Roraima. In: Barbosa R. I., Xaud H. A. M., C. e S.J.M. (Ed.), *Savanas de Roraima - Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrosilvipastoris*, FEMACT, Manaus,

p.61–78.

- Bird, D.A.; Franceschi, V.R.; Facchini, P.J. 2003. A Tale of Three Cell Types: Alkaloid Biosynthesis Is Localized to Sieve Elements in Opium Poppy. *The Plant Cell* 15: 2626–2635.
- Brierley, D.I.; Davidson, C. 2013. Harmine augments electrically evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens shell. *Journal of Psychopharmacology* 27: 98–108.
- Callaway, J.C. 2005. Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. *Journal of Psychoactive Drugs* 37: 151–155.
- Callaway, J.C.; Brito, G.S.; Neves, E.S. 2005. Phytochemical Analyses of *Banisteriopsis Caapi* and *Psychotria Viridis*. *Journal of Psychoactive Drugs* 37: 37–41.
- Callaway, J.C.; McKenna, D.J.; Grob, C.S.; Brito, G.S.; Raymon, L.P.; Poland, R.E.; et al. 1999. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 243–256.
- Carlquist, S. 1985. Observations on Functional Wood Histology of Vines and Lianas. *Aliso* 11: 139–157.
- Chery, J.G.; Pace, M.R.; Acevedo-rodrigues, P.; Specht, C.D.; Rothfels, C.J. 2020. Modifications during Early Plant Development Promote the Evolution of Nature ' s Most Complex Woods. *Current Biology* 30: 237–244.
- Collins, C.G.; Wright, S.J.; Wurzburger, N. 2016. Root and leaf traits reflect distinct resource acquisition strategies in tropical lianas and trees. *Oecologia* 180: 1037–1047.
- Crivellaro, A.; McCulloh, K.; Jones, F.A.; Lachenbruch, B. 2012. Anatomy and mechanical and hydraulic needs of woody climbers contrasted with subshrubs on the island of cyprus. *IAWA Journal* 33: 355–373.
- Davis, C.C.; Anderson, W.R. 2010. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. *American Journal of Botany* 97: 2031–2048.
- De Deurwaerder, H.; Hervé-Fernández, P.; Stahl, C.; Burban, B.; Petronelli, P.; Hoffman, B.; et al. 2018. Liana and tree below-ground water competition-evidence for water resource partitioning during the dry season. *Tree Physiology* 38: 1071–1083.
- Dobbins, D.R.; Fisher, J.B. 1986. Wound Responses in Girdled Stems of Lianas. *Botanical Gazette* 147: 278–289.
- Evert, R.F. 2013. *Anatomia das Plantas de Esaú, meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura função e desenvolvimento*. In: Evert, R.F. (Ed.) 3rd ed. Blucher,

São Paulo, 726p.

- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribbed epon section for light microscopy. *Histochemie* 16: 92–96.
- Ganthaler, A.; Marx, K.; Beikircher, B.; Mayr, S. 2019. Are hydraulic patterns of lianas different from trees? New insights from *Hedera helix*. *Journal of Experimental Botany* 70: 2811–2822.
- Grob, C.S.; McKenna, D.J.; Callaway, J.C.; Brito, G.S.; Neves, E.S.; Oberlaender, G.; et al. 1996. farmacologia da Hoasca, planta alucinógena usada em Contexto ritual no Brasil. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 184: 86–94.
- Groover, A. 2020. Woody Plant Evolution: Exceptional Lianas Reveal Rules of Woody Growth. *Current Biology* 30: R76–R78.
- Halberstadt, A.L. 2016. Behavioral and pharmacokinetic interactions between monoamine oxidase inhibitors and the hallucinogen 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 143: 1–10.
- Hamill, J.; Hallak, J.; Dursun, S.M.; Baker, G. 2019. Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. *Current Neuropharmacology* 17: 108–128.
- Inserra, A. 2018. Hypothesis: The psychedelic Ayahuasca Heals traumatic memories via a sigma 1 receptor-mediated Epigenetic-Mnemonic process. *Frontiers in Pharmacology* 9: 1–13.
- Isnard, S.; Silk, W.K. 2009. Moving with climbing plants from Charles Darwin's time into the 21st century. *American Journal of Botany* 96: 1205–1221.
- Kaasik, H.; Kreegipuu, K. 2020. Ayahuasca Users in Estonia: Ceremonial Practices, Subjective Long-Term Effects, Mental Health, and Quality of Life. *Journal of Psychoactive Drugs* 00: 1–9.
- Karnovsky, M.J. 1965. *A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy*. .
- Kong, D.X.; Li, Y.Q.; Wang, M.L.; Bai, M.; Zou, R.; Tang, H.; et al. 2016. Effects of light intensity on leaf photosynthetic characteristics, chloroplast structure, and alkaloid content of *Mahonia bodinieri* (Gagnep.) Laferr. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 1–15.
- Langdon, E.J. 1986. Las clasificaciones del yagé dentro del grupo Siona: etnobotánica, etnoquímica e historia. *América Indígena*.
- Li, Y.; Kong, D.; Fu, Y.; Sussman, M.R.; Wu, H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology*

- and Biochemistry* 148: 80–89.
- Liebelt, D.J.; Jordan, J.T.; Doherty, C.J. 2019. Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews* 18: 1409–1433.
- De Luca, V.; St Pierre, B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 5: 168–173.
- Malizia, A.; Grau, H.R.; Lichstein, J.W. 2010. Soil phosphorus and disturbance influence liana communities in a subtropical montane forest. *Journal of Vegetation Science* 21: 551–560.
- Manzané-Pinzón, E.; Goldstein, G.; Schnitzer, S.A. 2018. Does soil moisture availability explain liana seedling distribution across a tropical rainfall gradient? *Biotropica* 50: 215–224.
- Mckenna, D.J. 2004. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca : rationale and regulatory challenges. *Pharmacology & Therapeutics* 102: 111–129.
- McKenna, D.J. 2004. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics* 102: 111–129.
- McKenna, D.J.; Towers, G.H.N.; Abbott, F. 1984. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and β -carboline constituents of Ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology* 10: 195–223.
- Milan, E.; Moro, R.S. 2016. O conceito biogeográfico de ecótono El concepto biogeográfico de ecótono The Ecotone Biogeographic Concept. *Terra Plural* 10: 74–88.
- Ministério da Defesa. 2004. *Plano de Desenvolvimento Local Integrado e Sustentável*. Boa Vista, 94p.
- Moffat, C.E.; Ensing, D.J.; Gaskin, J.F.; De Clerck-Floate, R.A.; Pither, J. 2015. Morphology delimits more species than molecular genetic clusters of invasive *Pilosella*. *American Journal of Botany* 102: 1145–1159.
- Morales-García, J.A.; De La Fuente Revenga, M.; Alonso-Gil, S.; Isabel Rodríguez-Franco, M.; Feilding, A.; Perez-Castillo, A.; et al. 2017. The alkaloids of *Banisteriopsis caapi*, the plant source of the Amazonian hallucinogen Ayahuasca, stimulate adult neurogenesis in vitro. *Scientific Reports* 7.
- Nava, D.B.; Gomes, R.F. 1998. *Situação Fundiária do Município de Presidente Figueiredo - Amazonas*. Manaus, 16p.
- Nery, L.A.; Faria Vieira, M.; Contin Ventrella, M. 2017. Leaf glands of *Banisteriopsis muricata* (Malpighiaceae): distribution, secretion composition, anatomy and relationship

- to visitors. *Acta Botanica Brasilica* 31: 459–467.
- Nowak, M.; Selmar, D. 2016. Cellular distribution of alkaloids and their translocation via phloem and xylem : the importance of compartment pH. 18: 879–882.
- Osbourn, A.E.; Qi, X.; Townsend, B.; Qin, B. 2003. Dissecting plant secondary metabolism - constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* 159: 101–108.
- Pace, M.R.; Lohmann, L.G.; Angyalossy, V. 2011. Evolution of disparity between the regular and variant phloem in Bignoniaceae (Bignoniaceae); Evolution of disparity between the regular and variant phloem in Bignoniaceae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 98: 602–618.
- Pace, M.R.; Acevedo-Rodríguez, P.; Amorim, A.M.; Angyalossy, V. 2018a. Ontogeny, structure and occurrence of interxylary cambia in Malpighiaceae. *Flora* 241: 46–60.
- Pace, M.R.; Acevedo-Rodríguez, P.; Amorim, A.M.; Angyalossy, V. 2018b. Ontogeny, structure and occurrence of interxylary cambia in Malpighiaceae. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 241: 46–60.
- Palhano-Fontes, F.; Barreto, D.; Onias, H.; Andrade, K.C.; Novaes, M.M.; Pessoa, J.A.; et al. 2018. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. 49: 655–663.
- Pires, J.M.; Mendes, F.R.; Pires, A.P.S.; Yonamine, M.; Amaral, J.L.G. do; Carlini, E.A.; et al. 2018. Pre-clinical interaction of ayahuasca, a brew used in spiritual movements, with morphine and propofol. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 54: e17174.
- Pockman, W.T.; Sperry, J.S. 2000. Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran Desert vegetation. *American Journal of Botany* 87: 1287–1299.
- Ragni, L.; Greb, T. 2018. Secondary growth as a determinant of plant shape and form. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 79: 58–67.
- Rajput, K.S.; Fiamengui, M.B.; Marcatti, C.R. 2012. Stem anatomy and development of successive cambia in the neotropical liana *Securidaca rivinifolia* (Polygalaceae). *IAWA Journal* 33: 391–402.
- Riba, J.; McIlhenny, E.H.; Valle, M.; Bouso, J.C.; Barker, S.A. 2012. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. *Drug Testing and Analysis* 4: 610–616.
- Risser, P.G. 1995. The Status of the Science Examining Ecotones between more homogeneous vegetation associations. *BioScience* 45: 318–325.
- Robertson, L.P.; Hall, C.R.; Forster, P.I.; Carroll, A.R. 2018. Alkaloid diversity in the leaves of Australian *Flindersia* (Rutaceae) species driven by adaptation to aridity.

Phytochemistry 152: 71–81.

- Rosell, J.A.; Olson, M.E. 2014. Do lianas really have wide vessels? Vessel diameter-stem length scaling in non-self-supporting plants. *Journal of PPEES Sources* 16: 288–295.
- Rowe, N. 2018. Lianas. *Current Biology* 28: 249–252.
- Santos, B.W.L.; Oliveira, R.C. de; Sonsin-Oliveira, J.; Fagg, C.W.; Barbosa, J.B.F.; Caldas, E.D. 2020. Biodiversity of β -Carboline Profile of *Banisteriopsis caapi* and Ayahuasca, a Plant and a Brew with Neuropharmacological Potential. *Plants* 9: 870.
- Santos, R.G.; Osório, F.L.; Crippa, J.A.S.; Hallak, J.E.C. 2016. Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 38: 65–72.
- Schnitzer, S.A. 2005. A mechanistic explanation for global patterns of liana abundance and distribution. *American Naturalist* 166: 262–276.
- Schnitzer, S.A.; Bongers, F. 2011. Increasing liana abundance and biomass in tropical forests: emerging patterns and putative mechanisms. *Ecology Letters* 14: 397–406.
- Schultes, R.E.; Holmstedt, B.; Lindgren, J.-E. 1969. Harvard University Herbaria. *Harvard Papers in Botany* 22: 121–132.
- Schultz, R.E. 1980. The botany and chemistry of hallucinogens. *Kew Bulletin* 29: 457–458.
- Sfair, J.C.; Rochelle, A.L.C.; Rezende, A.A.; Van Melis, J.; Burnham, R.J.; Weiser, V. de L.; et al. 2016. Liana avoidance strategies in trees: Combined attributes increase efficiency. *Tropical Ecology*.
- Silveira, G. de O.; Santos, R.G. dos; Rebello, L.F.; Rossi, G.N.; Hallak, J.E.C.; Yonamine, M. 2020. Stability evaluation of DMT and Harmala alkaloids in ayahuasca tea samples. *Molecules* 25: 5–7.
- Souza, R.C.Z.; Zandonadi, F.S.; Freitas, D.P.; Tófoli, L.F.F.; Sussulini, A. 2019. Validation of an analytical method for the determination of the main ayahuasca active compounds and application to real ayahuasca samples from Brazil. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1124: 197–203.
- Spicer, R.; Groover, A. 2010. Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytologist* 186: 577–592.
- Teixeira, P.C.; Donagemma, G.K.; Fontana, A.; Teixeira, W.G. 2017. *Manual de métodos de análise de solo*. - Portal Embrapa. In: Jacqueline Silva Rezende Mattos (Ed.) 3rd ed. EMBRAPA, Brasília, DF, 50p.

- Wink, M. 1987. Physiology of the Accumulation of Secondary Metabolites with Reference to Alkaloids. In: Constabel, F.; Vasil, I.K. (Eds.), *Cell Culture in Phytochemistry*, Vol. 4, 1st ed.p.17–34.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3–19.
- Yazaki, K. 2006. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters* 580: 1183–1191.
- Yost, J.L.; Huang, J.; Hartemink, A.E. 2019. Spatial-temporal analysis of soil water storage and deep drainage under irrigated potatoes in the Central Sands of Wisconsin, USA. *Agricultural Water Management* 217: 226–235.
- Zarur, J. 1943. Um comentário sobre a classificação de Koppen. *Revista brasileira de geografia* 2: 250–254.

5. AVALIAÇÃO DO AMBIENTE DE ORIGEM E CONDIÇÃO DE SECAGEM DAS PLANTAS NA CONCENTRAÇÃO DOS ALCALOIDES E POTENCIAL CITOTÓXICO DO CHÁ AYAHUASCA SOBRE CÉLULAS DE QUERATINÓCITOS HUMANOS

RESUMO

Banisteriopsis caapi e *Psychotria viridis* são as plantas usadas na Ayahuasca, um chá psicoativo de uso medicinal e espiritual indígena, considerado sagrado para além das comunidades tradicionais da Amazônia. Atualmente, o chá e suas plantas têm uso religioso e terapêutico crescente em diversos países da Europa, Oceania e América do Norte. Diversas publicações mostram efeitos neuropsicológicos e psicoterapêuticos associados aos seus alcaloides bioativos. Uma ampla variação na concentração dos alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) harmalina (HRL), harmina (HRM) e tetrahydroharmina (THH) em chá Ayahuasca tem sido reportada mundialmente. Este estudo foi realizado para verificar a variabilidade da concentração dos alcaloides presentes na Ayahuasca, preparado com insumos *in natura* provenientes de ambientes distintos e submetidas a secagem em diferentes temperaturas na etapa pós-colheita. Outrossim, o chá Ayahuasca liofilizado, foi avaliado para sua atividade citotóxica sobre células de queratinócitos (HaCaT) humanos. Caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis* foram coletados em dois ecossistemas distintos sendo cada coleta dividida em dois grupos. A interferência do ambiente sobre os insumos vegetais foi avaliada em amostras do chá Ayahuasca preparado com plantas frescas. O parâmetro de temperatura de secagem das espécies estudadas foi avaliado pelo preparo do chá Ayahuasca com plantas que foram submetidas a temperaturas de 40, 43, 45, 50, 60 °C e ao sol. O protocolo de preparo do chá Ayahuasca foi por decocção, conforme preparado no ritual de uso religioso. O teor dos alcaloides bioativos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-vis com arranjo de diodo (CLAE-DAD), a citotoxicidade *in vitro* da Ayahuasca foi avaliada em células HaCaT (queratinócitos humanos) utilizando o ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB), e como controle positivo o agente antineoplásico cloridrato de doxorrubicina. As diferentes características do ambiente de Campinarana (CAMP) e Terra-firme (TF) e as diferenças sazonais entre as duas áreas bem como o processo e temperatura de secagem das plantas demonstrou interferir nas concentrações de DMT, HRL, HRM e THH das amostras avaliadas. As variações nas concentrações dos alcaloides, sofrem influências do ambiente de origem das plantas usadas na preparação do chá Ayahuasca. O processo de secagem tem interferência sobre o teor dos alcaloides DMT, HRL, HRM e THH detectado em chá Ayahuasca. Com base na atividade antiproliferativa os alcaloides presentes na Ayahuasca, preparados com plantas desidratadas ou *in natura* nas amostras estudadas, não demonstrou efeito citotóxico *in vitro* em queratinócitos humanos relacionados a DMT, HRL, HRM e THH presentes na Ayahuasca. Estudos futuros usando modelo animal poderão dar uma visão mais ampla desses resultados *in vivo*.

Keywords: Ayahuasca, Alcaloides, Etnomedicina, Secagem de *Psychotria* e *Banisteriopsis*.

ABSTRACT

Banisteriopsis caapi and *Psychotria viridis* are the plants used in Ayahuasca, a psychoactive tea of medicinal and spiritual indigenous use, considered sacred beyond the traditional communities of the Amazon. Currently, the tea and its plants have a growing religious and therapeutic use in several countries in Europe, Oceania and North America. Several publications showed neuropsychological and psychotherapeutic effects associated with their bioactive alkaloids. A wide variation in the concentration of *NN* alkaloids -dimethyltryptamine (DMT), Harmaline (HRL), Harmine (HRM) and Tetrahydroharmine (THH) in Ayahuasca tea has been reported worldwide. This study was carried out to verify the variability of the alkaloid's concentrations present in the Ayahuasca beverage, prepared with fresh ingredients from different environments and dried at different temperatures in the post-harvest stage. Furthermore, lyophilized Ayahuasca tea was evaluated for its cytotoxic activity on keratinocyte cells (HaCAT). Stems of *B. caapi* and leaves of *P. viridis* were collected in two different ecosystems, each collection being divided into two groups. The environment interference on plant inputs was evaluated in samples of Ayahuasca tea prepared with fresh plants. The drying temperature parameter of the studied species was evaluated by preparing Ayahuasca tea with plants that were subjected to temperatures of 40, 43, 45, 50, 60 °C and in the sun. The protocol for preparing Ayahuasca tea was by decoction, as prepared in the ritual of religious use. The concentration of bioactive compounds was determined by high performance liquid chromatography with a UV-vis detector with diode array (HPLC-DAD). The *in vitro* cytotoxicity of Ayahuasca tea was evaluated in HaCaT cells (human keratinocytes) using the colorimetric assay of sulforodamine B (SRB) using the antineoplastic agent doxorubicin hydrochloride as a positive control. The different characteristics of the Campinarana (CAMP) and Terra-firme (TF) environment and the seasonal differences between the two areas, as well as the drying process and temperature of the plants, have been shown to interfere with the DMT, HRL, HRM and THH concentrations of the evaluated samples. The variations in the alkaloid concentrations are influenced by the environment of origin of the plants used in the preparation of Ayahuasca tea. The drying process interferes with the content of DMT, HRL, HRM and THH alkaloids detected in Ayahuasca tea. Based on the antiproliferative activity, the alkaloids present in Ayahuasca, prepared with dehydrated or in natura plants in the studied samples, did not demonstrate an *in vitro* cytotoxic effect in human keratinocytes related to DMT, HRL, HRM and THH present in Ayahuasca. Future studies using an animal model can give a broader view of these results *in vivo*.

Keywords: Ayahuasca, Alkaloids, Ethnomedicine, Drying of *Psychotria*, *Banisteriopsis*.

5.1 Introdução

O chá ayahuasca é um decocto presente na etnomedicina e nos rituais indígenas dos povos da Amazônia desde época pré-colombiana (Miller et al., 2019), se destacando por seu potencial psicoativo desencadeado pelo sinergismo dos alcaloides *NN*-dimetiltryptamina (DMT) presentes nas folhas de *Psychotria viridis* e o grupo de compostos β -carbolínicos har-

maina (HRM) harmalina (HLM) e tetrahydroharmina (THH) encontrados no caule de *Banisteriopsis caapi* (Fig. 1). A atividade sinérgica destes compostos confere os efeitos psicotrópicos e enteogênicos (Tupper, 2008) considerados pelos consumidores do chá como um resultado de expansão da consciência.

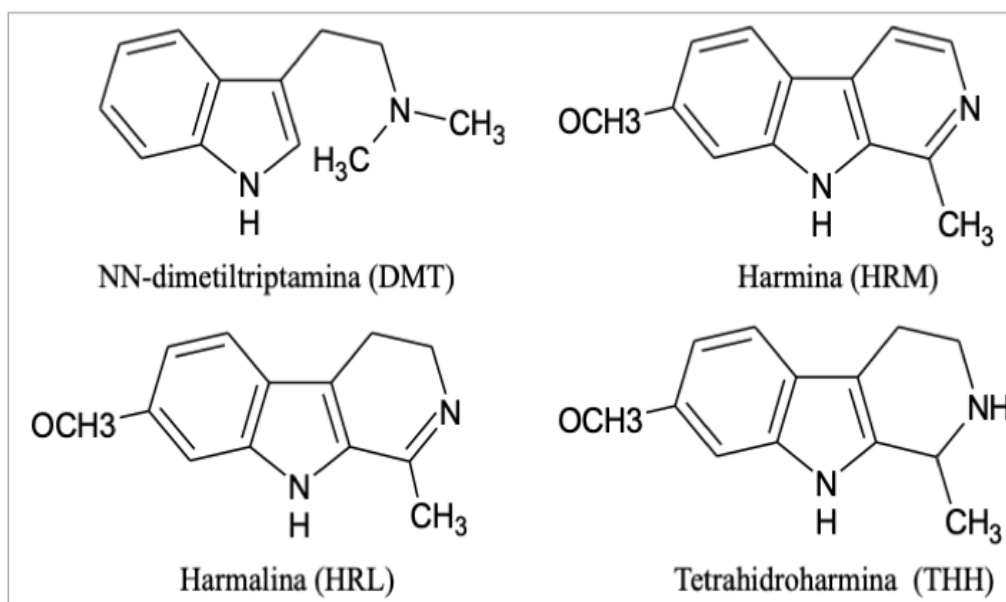


Figura 1. Estruturas químicas dos alcaloides no chá Ayahuasca. NN-dimetiltriptamina (DMT), β -carbolínico harmaina (HRM) harmalina (HLM) e tetrahydroharmina (THH).

A incorporação desta bebida para propósitos de cura e sustentação religiosa, em sociedade urbana contemporânea, surgiu de populações indígenas (Grob et al., 1996) e caboclas de florestas tropicais. Estudos dos compostos bioativos do chá Ayahuasca (Callaway et al., 1999; Pires et al., 2009; Santos et al., 2017; Souza et al., 2019) e das plantas que o compõem (Cavalcante et al., 2018; Miranda et al., 2020; Soares et al., 2017) foram impulsionados pelo aumento do uso religioso e terapêutico da Ayahuasca nos Estados Unidos e diversos países da Europa e também, pela tendência mundial para pesquisa de terapias psicodélicas. Ficou evidente, que o efeito enteogênico da Ayahuasca tem relação direta com a atividade do DMT, que por via oral é inativado devido a degradação pela monoamina oxidase visceral (MAO). Esse efeito é revertido pela ação das β -carbolinas que são inibidores reversíveis altamente ativos da MAO podendo proteger o DMT da desaminação pela MAO viabilizando seu uso oral (McKenna, 2004).

Em amostras de Ayahuasca consumido em países da Europa foram encontradas variações na concentração dos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH, em alguns casos foi encontrado

até produto sintético (Kaasik and Kreegipuu, 2020). É sabido que a Ayahuasca consumido nesses países, geralmente, são produzidos em países amazônicos e transportados para os locais de consumo. Silveira et al. (2020) quantificaram os alcaloides em amostras de Ayahuasca armazenadas sete dias em alta temperatura, imitando o transporte de correio, e não encontraram diminuição significativa para DMT, mas importantes variações ocorreram com os alcaloides β -carbolínicos, constatando para THH uma diminuição de até 67,9 %. Outros estudos também encontraram variações na concentração destes alcaloides em amostras de Ayahuasca da mesma origem (Pires et al., 2009). Em amostras de Ayahuasca preparadas conforme a tradição que preconiza a decocção de folhas de *P. viridis* juntamente com o caule de *B. caapi*, a variação encontrada atingiu ordem de grandeza de até 10 vezes (Souza et al., 2019).

Os dados mostrados nos estudos acima descritos e a rápida expansão de uso deste chá revelam que duas abordagens relevantes com respeito ao uso da Ayahuasca necessitam ser avaliadas. A primeira abordagem refere-se as causas da variação dos teores dos alcaloides no chá encontrado mundialmente e a segunda, refere-se a estratégias para assegurar que a Ayahuasca consumido em países fora das regiões amazônicas contenham somente as plantas preconizadas na preparação da Ayahuasca, de modo que o uso deste chá seja seguro para seus usuários. Outros autores já descreveram a grande variabilidade da *B. caapi*, com ao menos 30 variedades distintas descritas e catalogadas, que estão diretamente relacionadas, com os diferentes teores dos alcaloides encontrados nas preparações da Ayahuasca, além dos diferentes proporção das plantas usadas pelos diferentes grupos (Santos et.al., 2020; McKenna, 2004).

Quanto a origem, a relação planta-ambiente interfere no processo do metabolismo secundário, atuando como força motriz para a biossíntese de compostos fitoquímicos em plantas (Ncube et al., 2012; Osbourn et al., 2003) essa abordagem foi relatada por Miranda et al. (2020) para *P. viridis*, a espécie que contribui com o DMT, porém nesse estudo os autores não relataram o teor desse alcaloide no chá. Outro fator que tem influência no metabolismo secundário das plantas é a diversidade genética dentro da espécie, bem descrita para as espécies utilizadas na beberagem de Ayahuasca e outras espécies medicinais (Santos et. al., 2020; Figueira et.al., 2010). Para garantir a segurança de uso da Ayahuasca em países fora da área geográfica de ocorrência natural das plantas (Europa e América do Norte), uma estratégia seria disponibilizar os insumos para o preparo *in loco* da Ayahuasca nesses destinos. Para atingir um produto de qualidade que proporcione o efeito esperado uma alternativa é o fornecimento o insumo vegetal desidratado e estabilizado. O processo de secagem proporciona um produto estável de fácil transporte, em volume reduzido comparado a planta *in natura*, além d ficar disponível durante o ano todo (Orphanides et al., 2016). Apesar de ser considerada um dos processos mais usual e

fundamental de preservação de plantas medicinais, a secagem pode favorecer a perda exacerbada de compostos bioativos dependendo da temperatura aplicada (Chua et al., 2019).

A interferência tanto do ambiente quanto da secagem na concentração dos compostos bioativos de plantas medicinais está bem documentada (Liebelt et al., 2019; Ng et al., 2020). Para as espécies *B. caapi* e *P. viridis*, apesar do aumento do consumo da Ayahuasca em diversos países extra-amazônicos, bem como, seu descrito potencial farmacológico e terapêutico, ainda faltam dados consolidados estabelecendo a contribuição do efeito do local de coleta do insumo na variação do teor dos alcaloides no chá, como também, até o momento faltam estudos sobre a temperatura de secagem mais consolidados das plantas que são utilizadas na bebida da Ayahuasca.

Com intuito de padronizar parâmetros dos insumos utilizados no preparo do chá de Ayahuasca, este trabalho avaliou a concentração dos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH (Fig 1) de plantas coletadas em dois ecossistemas distintos da Amazônia aliado a avaliação da influência que as temperaturas de secagem de *B. caapi* e *P. viridis* tem sobre o conteúdo destes alcaloides no produto final. Outrossim, foi testado a citotoxicidade, em células de queratinócitos, do chá de Ayahuasca preparado tanto com plantas in natura como aquelas submetidas a secagem.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Áreas de coletas e material vegetal

As coletas de *B. caapi* nativo e de *P. viridis* cultivada foram realizadas em duas áreas de ecossistemas distintos, distantes entre si aproximadamente 360 Km, sendo área de Campinarana (CAMP), localizada ao Sul do Estado de Roraima (00° 57' 03" N e 59° 54' 39" O) e área de Terra-firme (TF) localizada ao Norte do Estado do Amazonas (02° 02' 04" S; 60° 01' O). Apresentando clima classificado como equatorial úmido *Af* segundo Koppen (Zarur, 1943), ambas áreas não apresentam clara estabilização das estações do ano e o clima é marcado por sazonalidade anual de chuvas (Alvares et al., 2013). Cada ecossistema deste estudo foi caracterizado de acordo com dados descrito na literatura (Ab'Saber, 2002; Barbosa and Miranda, 2004; Miranda et al., 2020) e por observações *in loco*.

Para todas as análises, o material vegetal foi coletado de indivíduos escolhidos aleatoriamente dentro de cada área, sendo cinco indivíduos de *B. caapi* nativos e 20 de *P. viridis*

cultivados em plantio agroflorestal. As coletas foram realizadas entre 6h e 10h da manhã nos meses de agosto/2016, janeiro/2017, novembro/2017 e fevereiro/2019.

Os nomes das espécies foram verificados no <http://www.theplantlist.org> e o material identificado sob Voucher INPA N° 282931, 282932, 282933, 282934, 282935 estando as exsiccatas depositadas no Herbário INPA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

5.2.2 Pré-processamento das plantas e preparo de Ayahuasca

Após cada coleta, as amostras de folhas e os caules de *B. caapi* foram lavadas em água corrente sendo os caules pré-processados, por batção com porrete de madeira para separação das fibras (Fig. 2 A-D). No pré-processamento do material vegetal coletado em janeiro/2016, agosto/2016 e uma coleta de novembro/2017 as folhas e caules foram pesados separadamente e as amostra de cada espécie divididas em dois lotes de pesos iguais (Fig. 1 B). O primeiro lote foi usado para preparo de Ayahuasca com plantas *in natura*, enquanto o segundo lote, o material foi submetido a secagem a temperaturas de 60 °C, 50 °C e 40 °C sendo as amostras de chá resultantes, analisadas para determinação do teor dos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH.

As demais coletas realizadas em novembro/2017 e fevereiro/2019 foram submetidas ao mesmo pré-processamento descrito para as três primeiras coletas e dividido em lotes de igual massa. Os caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis* pré-preparados foram submetidos a três condições de secagem diferentes [(a) caules a 45 °C e folhas 40 °C, (b) caules e folhas ao sol e (c) caules a 45 °C e folhas a 43 °C]. Após secagem, cada lote de material foi utilizado para preparo de Ayahuasca, sendo as amostras de chá resultantes, analisadas para determinação do teor dos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH.

Para todas as secagens foi utilizada estufa de circulação forçada com renovação de ar com temperatura controlada (TE-394/3 Tecnal). Para secagem ao sol, foi utilizado um mecanismo com badeiras de tela (Fig. 3 A e B). A secagem foi monitorada por pesagens amostrais, em balança de precisão com intervalos iniciais de 12 h, reduzidos para 6 h quando o material atingiu 50% do peso inicial, sendo mantido esse intervalo até peso constante. Após a secagem completa, os materiais foram acondicionados em sacos plásticos, protegidos da luz e armazenados em caixa organizadora até o momento do preparo do chá Ayahuasca.

O máximo teor de umidade das plantas foi medido com base no trabalho de Silveira et al. (2013). Amostras de caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis* foram submersos em água para saturação até atingir peso constante, considerando-se este o peso fresco máximo (PF). Para

determinar o peso seco (PS), as amostras foram secas em estufa de circulação forçada com renovação de ar (TE-394/3 Tecnal) à 90 °C para caules e 70 °C para folhas. Realizadas pesagens a cada 24, sendo considerado peso seco quando a diferença entre duas pesagens consecutivas, foi inferior a 1%. O teor de umidade máximo (TU) foi calculado como $TU (\%) = (PF - PS) / PF \times 100$.



Figura 2. Pré-processamento de *P. viridis* e *B. caapi*. A. Folhas de *P. viridis* após lavagem em água corrente; B. caules de *B. caapi* após lavagem em água corrente para separação das fibras; C. caules de *B. caapi* após desfibragem; D. Pesagem dos caules de *B. caapi* para secagem.



Figura 3. Mecanismo utilizado para desidratação ao sol de *B. caapi* e *P. viridis*. A. Caules de *B. caapi*; B. Caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis*.

A Ayahuasca, tanto usando plantas *in natura* quanto plantas desidratadas, foi preparado seguindo o ritual de preparo adotado pelo Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CBUDV) com proporções definidas entre as quantidades de folhas de *P. viridis* e caule de *B. caapi*, volume de água, pressão do fogo e tempo de cozimento, mantendo-se constante em todas as preparações para análises (Fig. 4). O rendimento médio foi de 5-7 L de chá para cada lote de material vegetal. Após a preparação a Ayahuasca foi armazenado em recipiente PET ainda quente (em torno de 60 °C) e sem ar para minimizar o processo de fermentação, deixado para esfriar em temperatura ambiente e posteriormente mantido em geladeira à 5 °C.



Figura 4. Processo de decocção da Ayahuasca preparado com caule de *B. caapi* e folhas de *P. viridis* (proporção aproximada de 10/1) em água seguindo o ritual de uso religioso da UDV.

5.2.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

5.2.3.1 Preparo das amostras

As amostras líquidas de Ayahuasca foram concentradas sob vácuo (FISATON®), até atingir um volume de cerca de 10% do volume inicial. A seguir, foram acondicionados em frascos apropriados, congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizadas a 4 atm de pressão durante 72 horas até a obtenção do resíduo seco (liofilizado). O liofilizado resultante foi armazenado protegido da luz em geladeira a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alíquotas ($10 \pm 1\text{ mg}$) de cada amostra de Ayahuasca foram pesadas, transferidas para um balão volumétrico (10 mL) e dissolvidas em metanol grau HPLC sob agitação vigorosa (vórtice) seguida de ultrassom (10 min) ajustando o volume final para 10 mL (solução estoque 1 mg/mL). No momento da análise, uma alíquota (200 μL) de cada solução estoque foi misturada com metanol grau HPLC (800 μL) em um tubo cônico de polipropileno de 2 mL sob agitação em vórtex (1.400 rpm, 10 min) e centrifugada (12.000 rpm, 5 min). Uma alíquota (200 μL) de cada sobrenadante foi coletada, transferida para um frasco de vidro de amostrador automático contendo 800 μL de metanol e homogeneizada por vórtex para posterior análise.

5.2.3.2 Preparo das Soluções padrão

Os padrões de harmina (HRM) e harmalina (HRL) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha) e tetrahydroharmina (THH) da Cayman Chemical® e o N,N-dimetiltriptamina (DMT) foi sintetizado por um procedimento (Giumanini et al., 1389; Pires et al., 2009b), baseado no método de dimetilação de triptamina. Para cada analito foi construída uma curva de calibração contendo cinco pontos variando de 100-1000 µg/mL, obtida através da regressão linear (a área sob a curva versus concentração) considerando $R^2 \geq 0,98$.

5.2.3.3 Condições de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV-vis com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

O método utilizado foi descrito por Lanaro et al. (2015). O experimento realizado usando um Sistema de CLAE Proeminence (Shimadzu®, Kyoto, Japan). Foi utilizada uma coluna Atlantis T3 (150 x 3.0mm, 3µm) equipado com uma coluna de proteção Atlantis T3 (30 x10 mm, 5 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) mantida à 35 °C. A fase móvel foi formada por solução de ácido fosfórico em água ultrapura (10 mmol/L, pH ajustado para 3,0 com trietilamina, A) e acetonitrila grau HPLC (B). A eluição por gradiente, com taxa de vazão de 1 mL/min, foi iniciada com 40% A e 60% B mantidas por 1 min e, em seguida, uma mudança gradual para 5% A e 95% B nos próximos 13 min sendo esta proporção final mantida por 5 min. A coluna foi reequilibrada para 60% de B ao longo de 0,5 min e mantida nessa concentração por 3 min (tempo total de gradiente = 21 min). A temperatura do auto-amostrador foi controlada e o volume de injeção foi de 10 µL. O detector de arranjo de diodos foi mantido a 35 °C e ajustado para adquirir espectros de 195 a 600 nm. Para quantificação, os cromatogramas foram registrados a 279 nm (DMT), 291 nm (tetra-hidroharmina), 320 nm (harmina) e 375 nm (harmalina).

5.2.4 Avaliação da citotoxicidade in vitro

5.2.4.1 Linhagem Celular

Para avaliação da atividade antiproliferativa, que determina a citotoxicidade, foi empregada uma linhagem não tumoral humana (HaCaT, queratinócitos imortalizados) que foi fornecida pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP / Unicamp. A linhagem celular foi cultivada em frascos T75 (Corning) em meio completo (RPMI-1640, suplementado com soro

fetal bovino a 5% e penicilina/estreptomicina a 1%) em estufa a 37 °C com atmosfera úmida suplementada com 5% de CO₂. Estas condições foram utilizadas tanto para a manutenção das células quanto para os experimentos. As células foram utilizadas entre as passagens 5 e 12.

5.2.4.2 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada pelo teste desenvolvido pelo NCI/EUA (Monks et al., 1991). Primeiro, as células HaCaT foram colocadas em placas de 96 poços (4 x 10⁴ células/mL, 100 µL/poço) e incubadas por 24 h. Em seguida, uma alíquota (5 mg) de cada amostra de chá Ayahuasca liofilizado foi diluída em DMSO (100 mg/ml) seguida de diluição em série em meio completo (0,15; 1,5, 15 e 150 µg/mL, concentração final) e aplicadas sobre as células (100 µL/compartimento) em triplicata (placas T1). O agente antineoplásico cloridrato de doxorrubicina foi utilizado como controle positivo (0,015, 0,15, 1,5 e 15 µg/mL, 100 µL / compartimentos, em triplicata). No momento da adição das amostras, uma placa denominada T0, contendo células HaCaT, foi submetida à fixação com ácido tricloroacético (TCA 50%, 50 µL/compartimento). Após 48 h de incubação, as células das placas T1 foram fixadas com TCA 50%. Todas as células fixadas (T0 e T1) foram coradas com corante proteico sulforrodamina B (0,4% em ácido acético 1%) e a leitura espectrofotométrica a 540 nm foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplacas (Molecular Devices[®], modelo VersaMax). Usando os valores de absorvância, o crescimento celular (%), em cada concentração de amostra, foi calculado considerando-se como 100% do crescimento celular a diferença entre as absorvâncias de células não tratadas após 48 h de incubação (T1) e no momento de adição da amostra (T0). A curva de crescimento celular em função da concentração da amostra foi plotada e a concentração efetiva GI50 (concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular) foi calculada por regressão sigmoideal usando o software Origin 8.0[®] (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA). As análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia Experimental (LAFTEX) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP.

5.3 Resultados e discussão

Este trabalho permitiu verificar a influência do ambiente e do processo de secagem dos caules de *Banisteriopsis caapi* e das folhas de *Psychotria viridis* na concentração de quatro alcaloides presentes no chá Ayahuasca, preparado conforme ritual tradicional. Considerando-

se o grande interesse na utilização do chá Ayahuasca para o uso religioso e tratamento de diversas enfermidades neurológicas e psiquiátricas (Antonio Estrella-Parra et al., 2019; Brecksema et al., 2020; Guimarães dos Santos and Eduardo Cecilio Hallak, 2019; Hamill et al., 2019; Miranda et al., 2020; Orsolini et al., 2020; Romeo et al., 2020) estudos sobre essas variáveis dão contribuições importantes para estabelecer os parâmetros necessários para assegurar reprodutibilidade dos efeitos psicotrópicos e farmacológicos esperados.

Neste estudo, foram avaliadas espécies vegetais coletadas em duas localidades da região Norte do Brasil. Uma localidade está ao Norte do Estado do Amazonas no ecossistema de Terra-Firme (TF) e outra ao Sul do Estado de Roraima no ecossistema de Campinarana (CAMP). A região de TF exhibe taxa pluviométrica anual média de 2.585 mm e capacidade de retenção hídrica do solo maior que o ecossistema de CAMP que tem taxa pluviométrica anual média de 1.847 mm, aproximadamente 30% menor que TF (Agritempo 2018). CAMP ainda tem período de verão mais prolongado (Miranda et al., 2020; Moreira, 2016), solo pobre em minerais e alta lixiviação causada pela intensidade de chuvas (Rodrigues et al., 2001; Silveira et al., 2013). Esses fatores juntos fazem com que as plantas do ecossistema de CAMP atravessem um período de estresse hídrico o que não ocorre com as plantas de TF. Os dois ecossistemas deste estudo estão localizados geograficamente em lados opostos da linha do Equador, da mesma forma os períodos de verão (período menos chuvoso) e inverno (período mais chuvoso) se invertem nas duas áreas. Novembro é o único mês em que o período de verão ocorre simultaneamente nos dois ecossistemas, porém em estágios opostos da estação, uma iniciando o período enquanto a outra finalizando o ciclo da estação.

A relação planta-ambiente interfere na qualidade dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas (Osborn et al., 2003) e tem sido alvo de estudo para diversas espécies ao longo dos tempos (Cavalcante et al., 2018; Liu et al., 2016; Nava and Gomes, 1998; Ncube et al., 2012). Além das características do ambiente (origem geográfica da planta) e período de coleta das plantas usadas na preparação do chá, a diversidade genética da espécie, os processos pós-colheita do material vegetal, como secagem, assim como as condições de preparo do chá Ayahuasca também influenciam o teor final das substâncias enteogênicas do chá.

A quantidade e a proporção de plantas usadas na preparação do chá Ayahuasca são parâmetros que influenciam diretamente no teor dos alcaloides detectados do chá (McKenna, 2004). Por outro lado, entre os alcaloides extraídos no processo de decocção de Ayahuasca os compostos HRL e HRM são facilmente degradados em THH por ação da temperatura do processo (Callaway, 2005). Buscando minimizar variabilidade nos resultados e respeitando o método de preparação ritualística utilizada pela UDV, buscou-se uniformizar todas as preparações

chá Ayahuasca deste estudo quanto: a proporção das plantas, o volume inicial de água, a intensidade de fogo e o rendimento final.

Ainda, todas as amostras de chá Ayahuasca foram armazenadas em geladeira antes do processo de liofilização. Estudos de estabilidade de amostras, quantificadas por cromatografia líquida acoplada a detector de massas (LC-ESI-MS/MS), dos alcaloides encontrados no chá Ayahuasca demonstraram que DMT e HRM foram estáveis num período de 12 meses quando armazenados em condição refrigerada. Enquanto HRL demonstrou ser facilmente degradada, como também THH cujo teor decaiu significativamente num intervalo de quatro meses, com perfis distintos entre as amostras avaliadas (Silveira et al. 2020).

Considerando a uniformidade estabelecida para as amostras, os resultados produzidos em nosso trabalho refletem de maneira representativa a influência do local e época de coleta bem como o efeito do processo de secagem na concentração de alcaloides no chá Ayahuasca.

O efeito psicotrópico do chá Ayahuasca depende da atividade sinérgica dos alcaloides harmina (HRM), harmalina (HRL), tetrahydroharmina (THH) e *N,N*-dimetiltryptamina (DMT) (Estrella-Parra et al, 2019). Por isso, avaliamos a variação dos teores brutos e relativos desses quatro alcaloides no chá Ayahuasca preparado com plantas das áreas de coleta de Campinarana e Terra-firme.

Considerando-se as amostras de Ayahuasca preparadas com plantas *in natura* coletadas no inverno (Tabela 1, amostras A3 e A4), a concentração dos alcaloides DMT, HRL e THH foi 54,22; 50,09 e 42,09% respectivamente maior quando as plantas foram coletadas no ecossistema de TF comparado ao ecossistema CAMP enquanto a concentração de HRM não apresentou diferença entre as coletas. Já quando a coleta foi realizada durante o verão (Tabela 1, amostras A2 e A13), observou-se um aumento na concentração de DMT 44,34% diminuição nas concentrações de HRL e HRM 46,83 e 48,04% respectivamente com manutenção da concentração de THH quando se compara a área de coleta TF com CAMP. Ainda, quando se compararam dois anos diferentes de coleta na mesma estação do ano (verão) (Tabela 1, amostras A13 e A5 para CAMP e A2 e A7 para TF), as amostras A13 e A5 demonstraram aumento de 49,6% no teor de DMT e 5,6% para THH com uma diminuição dos teores de HRL de 19,68% e para HRM de 20,58%. Enquanto para as amostras A2 e A7 ocorreu uma diminuição no teor de DMT de 24% e 11,84 para THH com concomitante aumento de 35,47% para HRL e 14,93% para HRM evidenciando como as variações climáticas da disponibilidade de água no solo de um ano para outro influência diretamente nos teores dos alcaloides analisados (Tab. 2). A queda significativa na disponibilidade de água no solo (DAS) de janeiro a novembro no ecossistema

de CAMP refletiram nas amostras numa queda de 24% do DMT e 14,93% de HRM, enquanto que para as amostras de TF, onde a variação da disponibilidade de água no solo foi positiva observou-se um incremento de 49,6% para DMT e 5,6% para THH.

Tabela 1. Concentração de alcaloides (mg/L) e Efeito citostático (GI₅₀, µg/ml) observados para Ayahuasca preparado com plantas *in natura* e após secagem.

Época	Coleta		Amostra	Secagem		Alcaloides (mg/L)						Razões				GI ₅₀
	Local	Estação		Não	Sim	DMT	HRL	HRM	THH	DMT/HRL	DMT/HRM	DMT/THH	THH/HRL	THH/HRM	HRM/HRL	
Ago/16	TF	V	A2	x		73,74	27,72	161,34	263,94	2,66	0,46	0,28	9,52	1,64	5,82	80,5 ± 5,1
			A14		60/60	37,3	15,7	181,9	79,4	2,38	0,21	0,47	5,06	0,44	11,59	n.t.
	Camp	I	A3	x		40,74	31,8	250,8	242,94	1,28	0,16	0,17	7,64	0,97	7,89	>150
			A12		60/60	31,62	14,52	110,76	100,62	2,18	0,29	0,31	6,93	0,91	7,63	>150
Jan/16	TF	I	A4	x		88,86	63,72	256,5	419,58	1,39	0,35	0,21	6,58	1,64	4,03	141,6 ± 13,9
			A10		50/50	39,72	30,66	198,0	230,88	1,3	0,2	0,17	7,53	1,17	6,46	150
	Camp	V	A13	x		41,04	52,14	310,56	274,2	0,79	0,13	0,15	5,26	0,88	5,96	n.t.
			A6		50/50	40,44	23,34	129,48	134,52	1,73	0,31	0,3	5,76	1,04	5,55	150
Nov/17	TF	V	A7	x		55,98	42,96	189,66	232,68	1,3	0,3	0,24	5,42	1,23	4,41	34,5 ± 7,3
			A8		40/40	65,1	51,54	240,12	256,32	1,26	0,27	0,25	4,97	1,07	4,66	n.t.
			A18		50/50	33,36	4,5	116,28	29,76	7,41	0,29	1,12	6,61	0,26	25,84	n.t.
	Camp	V	A11		40/45	52,0	33,4	238,8	206,6	1,56	0,22	0,25	6,19	0,87	7,15	n.t.
			A16		sol	37,08	5,46	140,58	40,5	6,79	0,26	0,92	7,42	0,29	25,75	119,5 ± 0,5
			A5	x		81,42	41,88	246,3	290,58	1,94	0,33	0,28	6,94	1,18	5,88	>150
			A9		40/40	62,94	11,28	173,76	97,08	5,58	0,36	0,65	8,61	0,56	15,40	>150
Fev/19	Camp	V	A17		50/50	55,5	19,2	149,28	96,54	2,89	0,37	0,57	5,03	0,65	7,78	>150
			A15		sol	72,18	29,52	232,8	103,5	2,45	0,31	0,7	3,51	0,44	7,89	65,7 ± 25,0
Fev/19	Camp	V	A19		43/45	108,36	39,78	165,3	127,8	2,72	0,66	0,85	3,21	0,77	4,16	111,9 ± 0,3
			A20		43/45	98,94	29,76	119,1	111,42	3,32	0,83	0,89	3,74	0,94	4,00	35*

Camp = Campinarana; TF= Terra-firme; E= estação do ano: V = Verão, I = Inverno; Amostras: Ayahuasca preparado com plantas *in natura* (A2-TF, A3-CAMP; A4-TF, A-13-CAMP; A 7-TF e A-5 CAMP); Secagem: 60/60, 50/50, 40/40, 40/45, 43/45 = temperaturas (°C) de secagem das folhas de *P. viridis* e dos caules de *B. caapi*, respectivamente; sol = folhas de *P. viridis* e dos caules de *B. caapi* secas ao sol conforme Figura 3; Razões: concentração do alcaloide *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) em função da concentração de Harmalina (HML), Harmina (HRM), tetrahydroarmina (THH); concentração de THH em função da concentração de HRL, HRM e concentração de HRM em função de HRL determinadas por HPLC-DAD; GI₅₀ (µg/ml) = concentração de chá liofilizado necessário para inibir em 50% a proliferação das células da linhagem HaCaT; *valor aproximado em função dos valores experimentais; n.t. = não testado.

Tabela 2. Variações climáticas ocorridas entre o verão de 2016 e 2017 nos ecossistemas CAMP e TF

Ecossistema	Coleta	T (°C)	Pluv (mm)	U.R %	DAS
TF	ago/16	28,07	4,72	72,92	62,94
TF	nov/17	28,50	3,92	73,27	82,84
CAMP	jan/16	28,41	0,99	63,08	52,40
CAMP	nov/17	30,56	0,17	57,10	6,57

TF:Terra-firme; CAMP: Campinarana; T: temperatura; pluv: pluviosidade; U.R: umidade relativa e DAS: disponibilidade de água no solo. Os valores são dados da média mensal.

Análises realizadas por Callaway (2005) em amostras de Ayahuasca obtidas durante cinco anos de várias fontes religiosas revelaram ampla variação no perfil dos alcaloides. Enquanto Lanaro et al. (2015) em amostras obtidas de uma única fonte, porém de estações distintas (inverno, verão, outono e primavera também encontraram variações acentuadas nas concentrações dos alcaloides. Ambos autores basearam seus resultados nas diferentes formas de preparação, na fonte da planta e pela quantidade/proporção das plantas usada na preparação da Ayahuasca.

As variações encontradas em nosso estudo são menores do que as encontradas por Callaway e Lanaro (Tab 3). Considerando que utilizamos amostras padronizadas desde o local de coleta das plantas até a preparação do chá Ayahuasca e momento das análises de uma única fonte religiosa, a variação encontrada nos teores dos alcaloides neste estudo tem relação direta com a época de coleta, com as características do ambiente de coleta das plantas. Portanto, padronizar as proporções das plantas utilizadas na preparação da Ayahuasca, na tentativa de evitar concentrações elevadas dos princípios enteogênicos no chá preparado com plantas *in*, deverão ser considerados necessariamente o local e época da colheita (Liebelt et al., 2019).

As concentrações de HRM, HRL e THH detectadas, mostram que a conversão de HRM em HRL e desta para THH durante a decocção das plantas sugerida por Callaway (2005) se ocorreu em nossas amostras foi em menor escala, considerando a concentração de HRM e HRL quantificadas no chá. Isto reforça a importância de equilibrar a proporção/quantidade das plantas utilizada na preparação da Ayahuasca para evitar exacerbadas variações nas concentrações dos alcaloides no chá.

Em termos de razão proporcional relativa dos alcaloides no chá Ayahuasca preparado com plantas *in natura* no inverno (Tab. 1 amostras A3 e A4), a razão DMT/HRL DMT/HRM e DMT/THH foi maior quando as plantas foram coletadas em ecossistema de TF sendo 1,39; 0,35 e 0,21 respectivamente. Da mesma forma no período de verão (Tab. 1 amostras A2 e A13)

maior razão também foi encontrada para amostras do ecossistema de TF, sendo 2,66 para DMT/HRL; 0,46 para DT/HRM e 0,28 para DMT/THH quando comparadas com as amostras preparadas com plantas coletadas em ecossistema de CAMP. A razão de THH/HRM foi de 1,64 e 0,88 em ecossistema de TF e CAMP respectivamente.

Tabela 3. Comparação da concentração dos alcaloides da Ayahuasca com preparação com e sem padronização de diferentes fontes. Quantificados por HPLC.

Autor	Padrão	Origem (n)	Amostras (n)	DMT (mg/L)	HRL (mg/L)	HRM (mg/L)	THH (mg/L)
Callaway (2005)	Não	4	20	160-5840	100-900	450-6250	450-5260
Lanaro et. al (2018)	Não	1	9	402-2070	28-181	295-2894	850-2053
Este estudo	Sim	1	20	41-108	28-64	161-311	239-420

A relação encontrada para THH/HRM nos períodos de verão e inverno (Tab.1 amostras A2 e A13; A3 e A4) foi maior e constante para chá com plantas coletadas no ecossistema de TF tanto no período de inverno quanto verão (1,64) está razão é o dobro da razão encontrada por Callaway, (2005) em estudo com amostras de Ayahuasca da UDV. Porém, até onde sabemos, ainda não foi estudada qual é a melhor razão entre estes dois alcaloides considerando os efeitos enteogênicos para uso religioso e, também o resultado no tratamento de dependência química.

Este é o primeiro relato de estudo que descreve parâmetros para padronização da forma de preparação e das proporções das plantas (*P. viridis/B. caapi*) a serem utilizadas na preparação do chá Ayahuasca, que é uma variável fundamental para comparar o efeito de amostras provenientes de regiões diversas. A quantificação dos alcaloides em amostras de Ayahuasca usado em ritual religioso, gerará informações mais precisas do real potencial psicotrópico desta bebida. Outrossim, considerando que compostos ativos de plantas também estão relacionados com variabilidade genética (Figueira et al., 2010; Gupta et al., 2017), estudos futuros com foco na variabilidade genética desta espécie sobre os alcaloides formados irão permitir uma melhor compreensão do efeito destes componentes.

Até a presente data, a preparação da Ayahuasca tem-se utilizado plantas frescas. Com o aumento da popularização do efeito enteogênico e benefícios farmacológicos que o chá dessas plantas propiciam, os processos de secagem desses insumos devem ser considerados, pois podem contribuir para qualidade do chá Ayahuasca utilizado tanto em rituais religiosos fora das

áreas de ocorrência das espécies, quanto para utilização da bebida com fins terapêuticos (McKenna, 2004; Palhano-Fontes et al., 2018; Santos et al., 2017; Silveira et al., 2020).

Diante do exposto, neste trabalho analisamos o efeito do processo de secagem das plantas sobre o teor dos alcaloides encontrados no chá Ayahuasca preparado com as espécies *B. caapi* e *P. viridis*, desidratadas sob a mesma temperatura 40, 50, 60° C e ao sol (Fig. 5). Para o chá Ayahuasca com plantas desidratadas à 60° C (Tab. 1 amostras A14 e A12) quando comparada com sua amostra com plantas *in natura* correspondente (Tab 1 amostras A2 e A3) de ecossistema de TF e CAMP respectivamente, a quantificação por HPLC dos teores de alcaloides para amostras do ecossistema de TF demonstraram diminuição de 49, 43, 12 e 69,9% para DMT, HRL, HRN e THH respectivamente. Enquanto em amostras com plantas do ecossistema de CAMP a diminuição foi de 22,4, 54,7, 56 e 59,3% para DMT, HRL, HRM e THH respectivamente. Quando as amostras de Ayahuasca de CAMP e TF foram preparadas com plantas desidratadas à 50° C (Tab. 1 amostras A10 e A6) comparadas com suas correspondentes *in natura* (Tab.1 amostras A4 e A13) e amostras de chá com plantas de TF as concentrações encontradas foram de 55,4; 51,8; 22,8 e 45,3 (mg/L) para DMT, HRL, HRM e THH respectivamente. Com relação às amostras com plantas do ecossistema de CAMP a perda na concentração dos alcaloides foi de 1,5; 55,2; 58,3 e 50,9 (mg/L) para DMT, HRL, HRM e THH sequencialmente. Esses resultados podem estar relacionados à instabilidade térmica de compostos termo lábeis no chá Ayahuasca podendo ocasionar reações adversas durante o processo de secagem (Orphanides et al., 2016; Cernîșev, 2010).

Por outro lado, na análise de amostras de chá Ayahuasca com plantas usando temperatura de secagem à 40° C (Tab. 1 amostras A8 e A9) quando comparadas com sua amostra correspondente (Tab. 1 A7 e A5) foi encontrado aumento nas concentrações dos alcaloides para Ayahuasca com plantas coletadas em ecossistema de TF +16,29; +19,97; +26,62 e +10,16% para DMT, HRL, HRM e THH. Já para coleta de CAMP observou-se redução na concentração de 22,70; 73,07; 29,45 e 66,59% para DMT, HRL, HRM e THH.

As temperaturas de secagem 60 e 50° C resultaram em depleção dos compostos ativos na Ayahuasca e alta variação de depleção para o mesmo composto, especialmente observados em DMT, HRL e THH mostrando a sensibilidade destes compostos à estas temperaturas, sendo portanto inadequadas para a secagem das plantas da Ayahuasca, uma vez que sensibilidade térmica e suscetibilidade a degradação afeta a estabilidade do composto (Chua et al., 2019). Independentemente da origem, todas as amostras de folhas de *P. viridis* ficaram escurecidas e os caules de *B. caapi* tornaram-se quebradiços sob secagem a 50 e 60° C. (Orphanides et al.,

2016). Alta temperatura leva a reações químicas irreversíveis e adversas que causam a degradação da qualidade do produto (Cernîșev, 2010). Já a secagem a 40° C mostrou resultados totalmente inesperado com redução e aumento dos alcaloides quando comparada com sua amostra correspondente, que pode ter sido influenciado pelas características morfológicas das plantas que segundo Chua et al. (2019) também influência na qualidade final da secagem. Enquanto as amostras que tiveram processo de secagem direta ao sol apresentaram instabilidade na concentração de DMT e nos compostos β -carbolínicos. Além disso, a secagem ao sol, pode favorecer à contaminação pela exposição do material ao ambiente podendo as bebidas preparadas com esses insumos levar a efeitos adversos (Alibas et al., 2020).

Considerando as características próprias de cada espécie que compõe o chá Ayahuasca com hábitos diferentes e, que diferentes órgãos de cada uma delas é usado na preparação do chá, e tomando por base as concentrações encontradas em Ayahuasca preparado com plantas secas a 40 e 50° C, foram avaliadas amostras de Ayahuasca preparado com plantas secas sob diferentes temperaturas para cada espécie, porém estabelecidas em: (a) caules a 45° C e folhas 40° C e (b) caules a 45° C e folhas a 43° C (Fig. 5).

Considerando-se a concentração dos alcaloides HRL, HRM, THH nas amostras de Ayahuasca com caules desidratados a 40/45 e 43/45° C (Tab1. Amostras A11, A18 e A19), tanto amostras do ecossistema de CAMP quanto de TF nos períodos de inverno e verão apresentaram razão THH/HRM menor, porém próximo de 1:1 sendo constante em todas as amostras. Já para a concentração de DMT nestas mesmas amostras onde as folhas utilizaram temperatura de secagem de 40 e 43° C (Tb.1 amostra A11, A18, A19), as folhas desidratadas a 40°C tiveram uma baixa variação no teor de DMT porém, também baixo teor deste alcaloide (52,0 mg/L) quando comparados com as amostras A19 e A20 preparado com folhas desidratadas à 43° C que exibiram maior concentração de DMT (108, 36 e 98,94 mg/L) em ecossistema de TF e CAMP respectivamente. Este resultado indica que o DMT pode ser sensível a temperaturas acima de 43°C, como ocorre com o alcaloide trigonelina durante o processo de torra do café (Marcucci et al., 2013).

Razão entre THH/HRM de 1:1 e 1:5 respectivamente foram encontradas em trabalhos de Callaway (2005) e Callaway et al. (2005), este autor indicou que poderia haver uma rota de redução de HRM à HRL e desta à THH, porém estes estudos não contemplam a interferência da secagem das planta nem a estabilidade da razão entre os alcaloides.

A secagem das plantas pode ser uma resposta para atender à crescente demanda por Ayahuasca. Considerando a ação sinérgica das moléculas no chá, tanto a manutenção quantitativa de DMT quanto a razão entre os compostos β -carbólicos parecem ser fundamentais para a ação psicotrópica da Ayahuasca, a maior concentração de DMT e maior estabilidade entre a razão THH/HRM encontrada em Ayahuasca com plantas sob secagem a 43 e 45° C para folhas *P. viridis* e caules de *B. caapi*, respectivamente, indicam que estas temperaturas podem ser consideradas na secagem das plantas para preparação de Ayahuasca tradicional.

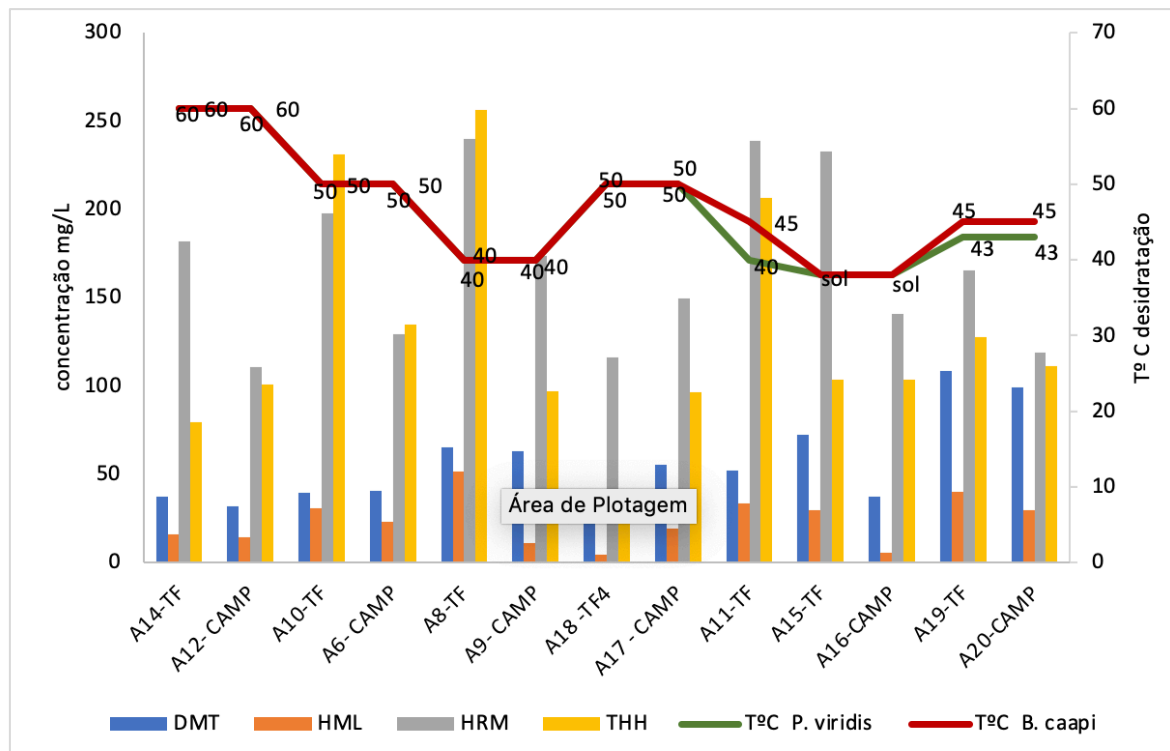


Figura 5. Gráfico mostrando a interferência da temperatura de secagem na concentração (mg/L) de DMT, HRL, HRM e THH em amostras de Ayahuasca preparado com caules de *B. caapi* e folhas de *P. viridis* após secagem.

Finalmente, avaliamos a influência da variação na composição química do chá Ayahuasca sobre a atividade antiproliferativa *in vitro* (Tabela 1, Figura 6). A avaliação *in vitro* apresenta como vantagens o cultivo das células em um ambiente propício e controlado, a facilidade e a rapidez de sua execução e relativo baixo custo (Mori and Hara, 2013). No entanto, é uma avaliação alvo-dirigida. Ou seja, no modelo escolhido neste estudo (queratinócitos humanos imortalizados, HaCaT), a avaliação *in vitro* ajudará a evidenciar possíveis efeitos do chá Ayahuasca sobre a proliferação de tecidos normais tais como pele, mucosas e medula óssea (Muller and Milton, 2012). Desta forma, a avaliação de toxicidade *in vitro*, considerando-se a atividade antiproliferativa como parâmetro, pode ajudar no refinamento da triagem de amostras

para testes *in vivo* e possibilitar uma triagem mais dirigida das amostras a serem avaliadas (Lilienblum et al., 2008).

A avaliação de atividade antiproliferativa após 48 h de exposição (Fig. 6) seguiu o protocolo desenvolvido pelo National Institute of Cancer – USA (Monks et al., 1991). Neste modelo, a atividade citostática pode ser expressa como a concentração de amostra necessária para inibir em 50% a proliferação celular (GI_{50}) (Shoemaker, 2006). Ainda, valores de GI_{50} maiores que 30 $\mu\text{g/ml}$ são considerados como representativos de amostras que não afetam significativamente a proliferação celular (Fouche et al., 2008). Analisando os resultados apresentados na Tabela 1 com base nesses critérios, das amostras analisadas 90% exibiu GI_{50} acima de 150 $\mu\text{g/ml}$, isto é, não demonstraram citotoxicidade sobre a proliferação de células humanas normais (HaCaT) (Fig. 6). Apenas as amostras A7 proveniente da amostra de chá preparado com plantas frescas coletadas em Terra-Firme, durante o verão e A20 proveniente de chá preparado com plantas secas a (folhas) 43 °C e (caule)/45 °C coletadas em Campinarana, durante o verão) mostrou atividade levemente citotóxica quando testada em queratinócitos humanos imortalizados ($GI_{50} \approx 30 \mu\text{g/ml}$, HaCaT) (Fig. 6).

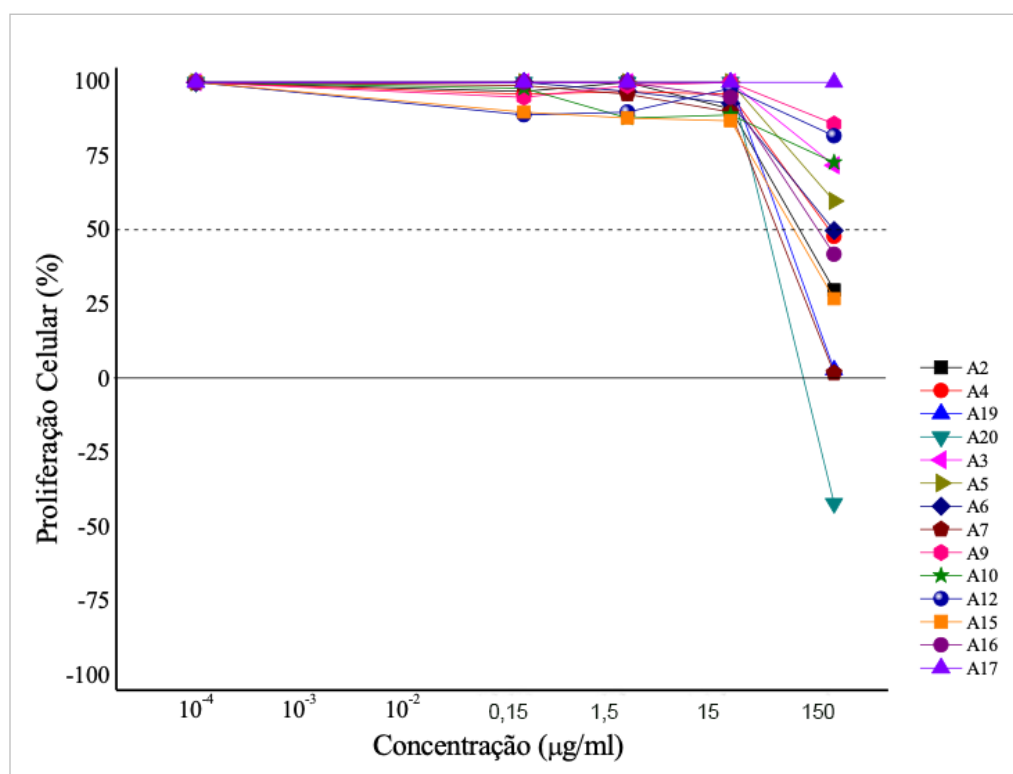


Figura 6. Proliferação de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) após 48 h de exposição a diferentes amostras de chá Ayahuasca (vide Tabela 1 para condições de coleta e secagem de cada amostra).

Comparando-se esses resultados de atividade antiproliferativa com os teores de DMT, HRL, HRM e THH, bem como com as proporções relativas entre eles (Tabela 1), não há correlação evidente entre as variações observadas para esses compostos e o efeito leve citostático em observado em $GI_{50} \approx 30 \mu\text{g/ml}$ para as amostras A7 e A20. Portanto, uma avaliação mais aprofundada do perfil químico dessas amostras em comparação as que não apresentaram nenhum efeito citotóxico, se faz necessário, para identificar os possíveis componentes envolvidos nesse leve efeito.

Uma revisão sistemática de estudos com humanos mostrou que o uso agudo, subagudo e de longo prazo de Ayahuasca parece ter baixa toxicidade (Dos Santos et al., 2016). Enquanto, avaliações de parâmetros bioquímicos relacionados ao dano hepático no soro em 22 voluntários que consumiram ayahuasca duas vezes ao mês ou mais por pelo menos um ano indicaram que o consumo crônico de ayahuasca em um contexto religioso aparentemente não afeta a função hepática (Mello et al., 2019). Ainda, tanto o DMT quanto HRM demonstraram efeito citoprotetor *in vitro* em diferentes linhagens celulares de neurônios humanos submetidos a hipóxia (Szabo et al., 2016) ou por exposição a 6-hydroxydopamine (Katchborian-Neto et al., 2020). Outrossim, harmina demonstrou atividade antiproliferativa em concentrações em torno de $50 \mu\text{M}$ em linhagens tumorais de mama (Ding et al., 2019), enquanto derivados de harmina apresentam atividade antiproliferativa promissora ($< 10 \mu\text{M}$) em diferentes linhagens tumorais humanas (Jadala et al., 2019; Sayed et al., 2020). O procedimento de secagem estabelecido neste estudo mostrou-se seguro para caules de *B. caapi* e folhas *P. viridis*. portanto, um procedimento que pode ser considerado como pré-processamento das plantas para o preparo de Ayahuasca tradicional. Ayahuasca preparado dentro dessas condições apresentou relativa segurança relacionada à proliferação celular de queratinócitos humanos (HaCaT). Nossos resultados, estabelecem e demonstram não apenas que a secagem de *B. caapi* e *P. viridis* é um método de pré-processamento para as plantas, que assegura sua qualidade fitoquímica da Ayahuasca, mas também mostrou que com relação ao DMT, HRM, HML e THH de Ayahuasca preparado com plantas desidratadas, dentro do método desenvolvido aqui, não apresenta citotoxicidade para queratinócitos humanos.

5.4 Conclusão

A variabilidade dos teores dos alcaloides presentes no chá Ayahuasca tem relação com o local e a época de coleta das espécies. A pluviosidade e a capacidade hídrica do solo, demonstraram estar diretamente relacionados com os teores dos alcaloides DMT, HRL, HRM e THH

em Ayahuasca. O período de inverno, com maior taxa pluviométrica, aumenta a concentração dos alcaloides em Ayahuasca preparado com plantas coletadas em ecossistema de terra-firme. No entanto, as plantas do ecossistema de Campinarana são mais adaptadas à estresse hídrico e a Ayahuasca apresenta menor variação sazonal na concentração dos alcaloides quando preparado com plantas deste ecossistema.

Foi demonstrado que a temperatura de secagem tem interferência sobre a qualidade dos componentes detectados nas plantas que entram no preparo da Ayahuasca. Portanto, os parâmetros de secagem das espécies *B. caapi* e *P. viridis* deverão ser padronizados baseado nas características morfológicas de cada espécie. Neste estudo as condições mais adequadas, para as amostras avaliadas, foram alcançadas em estufa de circulação forçada com renovação de ar, com temperaturas de 43° C para folhas, que manteve constante e maior o teor de DMT, e 45° C para caules que também manteve a proporção quantitativa mais constante entre as β -carbolinas tanto em Ayahuasca preparado com plantas de ecossistema Campinarana quanto de Terra-firme.

Com relação a avaliação de citotoxicidade *in vitro*, o resultado indica que as variações nas concentrações dos alcaloides na Ayahuasca preparados com plantas desidratadas ou *in natura* nas amostras estudadas, não demonstrou efeito citotóxico *in vitro* em queratinócitos humanos relacionados a DMT, HRL, HRM e THH presentes na Ayahuasca. Este é o primeiro estudo que aborda a citotoxicidade de Ayahuasca preparado com plantas desidratadas, e os resultados mostrados, foram analisados em célula específica, estudo futuro usando modelo animal poderá dar uma visão mais ampla desses resultados *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- Ab'Saber, A.N., 2002. Bases para o estudo dos ecossistemas da Amazônia brasileira. Estudos Avançados 16, 7–30. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142002000200002>
- Agritempo, 2018. Pesquisa de dados meteorológicos para Presidente Figueiredo, AM <https://www.agritempo.gov.br/agritempo/jsp/PesquisaClima/UF=AM> (accessed 10.14.18).
- Alibas, I., Zia, M.P., Yilmaz, A., Asik, B.B., 2020. Drying kinetics and quality characteristics of green apple peel (*Mallus communis* L. var. “Granny Smith”) used in herbal tea production. Journal of Food Processing and Preservation 44, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14332>
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L. de M., Sparovek, G., 2013.

- Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22, 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Antonio Estrella-Parra, E., Almanza-Pérez, J.C., Francisco, ·, Alarcón-Aguilar, J., Estrella-Parra, E.A., 2019. Ayahuasca: Uses, Phytochemical and Biological Activities. *Natural Products and Bioprospecting* 9, 251–265. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0210-5>
- Barbosa, R.I., Miranda, I. de S., 2004. Fitofisionomia e diversidade vegetal das savanas de Roraima, in: Barbosa R. I., Xaud H. A. M., C. e S.J.M. (Ed.), *Savanas de Roraima - Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrosilvipastoris*. FEMACT, Manaus, pp. 61–78.
- Breeksema, J.J., Niemeijer, A.R., Erwin Krediet, ·, Vermetten, E., Schoevers, R.A., NI, J.B., 2020. Psychedelic Treatments for Psychiatric Disorders: A Systematic Review and Thematic Synthesis of Patient Experiences in Qualitative Studies. *CNS Drugs* 34. <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00748-y>
- Callaway, J.C., 2005. Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. *Journal of Psychoactive Drugs* 37, 151–155. <https://doi.org/10.1080/02791072.2005.10399796>
- Callaway, J.C., Brito, G.S., Neves, E.S., 2005. Phytochemical Analyses of *Banisteriopsis Caapi* and *Psychotria Viridis*. *Journal of Psychoactive Drugs* 37, 37–41.
- Callaway, J.C., McKenna, D.J., Grob, C.S., Brito, G.S., Raymon, L.P., Poland, R.E., Andrade, E.N., Andrade, E.O., Mash, D.C., 1999. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 243–256. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00168-8)
- Cavalcante, A.D., Cardoso, G.A., Oliveira, F.L.P. De, Bearzoti, E., Okuma, A.A., Duarte, L.P., Vieira-filho, S.A., 2018. Influence of Environmental Factors and Cultural Methods on the Content of *N,N*-Dimethyltryptamine in *Psychotria viridis* (Rubiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 00, 1–11.
- Cernișev, S., 2010. Effects of conventional and multistage drying processing on non-enzymatic browning in tomato. *Journal of Food Engineering* 96, 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.002>
- Chua, L.Y.W., Chong, C.H., Chua, B.L., Figiel, A., 2019. Influence of Drying Methods on the Antibacterial, Antioxidant and Essential Oil Volatile Composition of Herbs: a Review. *Food and Bioprocess Technology* (2019) 12, 450–476. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2227-x>
- Colaço, C.S., Alves, S.S., Nolli, L.M., Pinheiro, W.O., Oliveira, D.G.R. de, Santos, B.W.L., Pic-Taylor, A., Mortari, M.R., Caldas, E.D., 2020. Toxicity of ayahuasca after 28 days

- daily exposure and effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in brain of Wistar rats. *Metabolic Brain Disease* (2020) 35, 739–751.
<https://doi.org/10.1007/s11011-020-00547-w>
- Ding, Y., He, J., Huang, J., Yu, T., Shi, X., Zhang, T., Yan, G., Chen, S., Peng, C., 2019. Harmine induces anticancer activity in breast cancer cells via targeting TAZ. *International Journal of Oncology* 54, 1995–2004. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4777>
- Dos Santos, R.G., Balthazar, F.M., Bouso, J.C., Hallak, J.E., 2016. The current state of research on ayahuasca: A systematic review of human studies assessing psychiatric symptoms, neuropsychological functioning, and neuroimaging. *Journal of Psychopharmacology* 30, 1230–1247. <https://doi.org/10.1177/0269881116652578>
- Figueira, G.M., Ramelo, P.R., Ogasawara, D.C., Montanari, I., Zucchi, M.I., Cavallari, M.M., Foglio, M.A., 2010. A set of microsatellite markers for *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae), a medicinal liana from the Neotropics. *American Journal of Botany* 97, 63–64.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1000145>
- Fouche, G., Cragg, G.M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V.J., Senabe, J., 2008. In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.005>
- Giumanini, G.A., Chiavari, G., Musiani, M.M., Rossi, P., 1389. N-Permethylation of primary and secondary aromatic-amines. *Synthesis-Stuttgart* 9, 743–6.
- Grob, C.S., Mckenna, D.J., Callaway, J.C., Brito, G.S., Neves, E.S., Oberlaender, G., Strassman, J., Boone, K.B., 1996. farmacologia da Hoasca, planta alucinógena usada em Contexto ritual no Brasil. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 184, 86–94.
- Gupta, A.K., Mishra, R., Singh, A.K., Srivastava, A., Lal, R.K., 2017. Genetic variability and correlations of essential oil yield with agro-economic traits in *Mentha* species and identification of promising cultivars. *Industrial Crops and Products* 95, 726–732.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.041>
- Hamill, J., Hallak, J., Dursun, S.M., Baker, G., 2019. Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. *Current Neuropharmacology* 17, 108–128.
<https://doi.org/10.2174/1570159X16666180125095902>
- Jadala, C., Sathish, M., Reddy, T.S., Reddy, V.G., Tokala, R., Bhargava, S.K., Shankaraiah, N., Nagesh, N., Kamal, A., 2019. Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of β -carboline-combretastatin carboxamides as apoptosis inducing agents: DNA intercalation

and topoisomerase-II inhibition. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 27, 3285–3298.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.06.007>

Kaasik, H., Kreegipuu, K., 2020. Ayahuasca Users in Estonia: Ceremonial Practices, Subjective Long-Term Effects, Mental Health, and Quality of Life. *Journal of Psychoactive Drugs* 00, 1–9. <https://doi.org/10.1080/02791072.2020.1748773>

Lanaro, R., Calemi, D.B. de A., Togni, L.R., Costa, J.L., Yonamine, M., Cazenave, S. de O.S., Linardi, A., 2015. Ritualistic Use of Ayahuasca versus Street Use of Similar Substances Seized by the Police: A Key Factor Involved in the Potential for Intoxications and Overdose? *Journal of Psychoactive Drugs* 47, 132–139.
<https://doi.org/10.1080/02791072.2015.1013202>

Liebelt, D.J., Jordan, J.T., Doherty, C.J., 2019. Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews* 18, 1409–1433.
<https://doi.org/10.1007/s11101-019-09617-z>

Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.G., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H., Wollin, K.M., 2008. Alternative methods to safety studies in experimental animals: Role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Archives of Toxicology*.
<https://doi.org/10.1007/s00204-008-0279-9>

Liu, W., Yin, D., Li, N., Hou, X., Wang, D., Li, D., Liu, J., 2016. Influence of environmental factors on the active substance production and antioxidant activity in *Potentilla fruticosa* L. and its quality assessment. *Scientific Reports* 6, 1–18.
<https://doi.org/10.1038/srep28591>

Marcucci, C.T., De Toledo Benassi, M., Almeida, M.B., Nixdorf, S.L., 2013. Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros, *Quim. Nova*.

McKenna, D.J., 2004. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics* 102, 111–129.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.03.002>

Mello, S.M., Soubhia, P.C., Silveira, G., Corrêa-Neto, N.F., Lanaro, R., Costa, J.L., Linardi, A., 2019. Effect of Ritualistic Consumption of Ayahuasca on Hepatic Function in Chronic Users. *Journal of Psychoactive Drugs* 51, 3–11.
<https://doi.org/10.1080/02791072.2018.1557355>

Miller, M.J., Albarracin-Jordan, J., Moore, C., Capriles, J.M., 2019. Chemical evidence for

- the use of multiple psychotropic plants in a 1,000-year-old ritual bundle from South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 11207–11212.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1902174116>
- Miranda, O.F., Souza, S.E.X.F., Milan, R.J., Bueno, A.B., Almeida, M., 2020. Influence of environment on the leaf morpho-anatomy and histochemical of the ayahuasca leaf: Populations cultivated in extra-Amazonian regions. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 42, 1–12. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v42i1.50369>
- Monks, A., Scudiero, P., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83, 757–766.
- Moreira, L.J. da S., 2016. Química, física, minerologia e teores de metais pesados em solos do Estado do Amazonas. Universidade Federal de Viçosa.
- Mori, H., Hara, M., 2013. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 116, 647–652.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.028>
- Muller, P.Y., Milton, M.N., 2012. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Reviews* 11, 751–761.
<https://doi.org/10.1038/nrd3801>
- Nava, D.B., Gomes, R.F., 1998. Situação Fundiária do Município de Presidente Figueiredo - Amazonas. Manaus.
- Ncube, B., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2012. Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany* 82, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.009>
- Ng, Z.X., Yong, P.H., Lim, S.Y., 2020. Customized drying treatments increased the extraction of phytochemicals and antioxidant activity from economically viable medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 155. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112815>
- Orphanides, A., Goulas, V., Gekas, V., 2016. Drying Technologies: Vehicle to High-Quality Herbs. *Food Engineering Reviews* 8, 164–180. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9128-9>
- Orsolini, L., Chiappini, S., Papanti, D., Latini, R., Volpe, U., Fornaro, M., Tomasetti, C., Vellante, F., De Berardis, D., 2020. How does ayahuasca work from a psychiatric

- perspective? Pros and cons of the entheogenic therapy. *Human Psychopharmacology* 35. <https://doi.org/10.1002/hup.2728>
- Osbourn, A.E., Qi, X., Townsend, B., Qin, B., 2003. Dissecting plant secondary metabolism - Constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* 159, 101–108. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00759.x>
- Palhano-Fontes, F., Barreto, D., Onias, H., Andrade, K.C., Novaes, M.M., Pessoa, J.A., Mota-Rolim, S.A., Osório, F.L., Sanches, R., Dos Santos, R.G., Tófoli, L.F., De Oliveira Silveira, G., Yonamine, M., Riba, J., Santos, F.R., Silva-Junior, A.A., Alchieri, J.C., Galvão-Coelho, N.L., Lobão-Soares, B., Hallak, J.E.C., Arcoverde, E., Maia-De-Oliveira, J.P., Araújo, D.B., 2018. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial 49, 655–663. <https://doi.org/10.1017/S0033291718001356>
- Pic-Taylor, A., da Motta, L.G., de Moraes, J.A., Junior, W.M., Santos, A. de F.A., Campos, L.A., Mortari, M.R., von Zuben, M.V., Caldas, E.D., 2015. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behavioural Processes* 118, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.05.004>
- Pires, A.P.S., Dizioli, C., Oliveira, R. De, Moura, S., Dörr, F.A., Silva, W.A.E., Yonamine, M., 2009a. Gas Chromatographic Analysis of Dimethyltryptamine and β -Carboline Alkaloids in Ayahuasca, an Amazonian Psychoactive Plant Beverage. *Phytochemical Analysis* 20, 149–153. <https://doi.org/10.1002/pca.1110>
- Pires, A.P.S., Oliveira, C.D.R. de, Moura, S., Dörr, F.A., Silva, W.A.E., Yonamine, M., 2009b. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in Ayahuasca, an amazonian psychoactive plant beverage. *Phytochemical Analysis* 20, 149–153. <https://doi.org/10.1002/pca.1110>
- Rodrigues, T.E., Oliveira Junior, R.C., Santos, P.L., Silva, P.R.O., 2001. Caracterização e classificação dos solos do município de Presidente Figueiredo, Estado do Amazonas. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento* 50.
- Romeo, B., Karila, L., Martelli, C., Benyamina, A., 2020. Efficacy of psychedelic treatments on depressive symptoms: A meta-analysis. *Journal of Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/0269881120919957>
- Santos, R.G. dos, Hallak, J.E.C., 2020. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. *Epilepsy & Behavior journal*. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.04.053>

- Santos, M.C., Navickiene, S., Gaujac, A., 2017. Determination of tryptamines and β -carbolines in Ayahuasca beverage consumed during Brazilian religious ceremonies. *Journal of AOAC International* 100, 820–824. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0337>
- Sayed, A.R., Gomha, S.M., Taher, E.A., Muhammad, Z.A., El-Seedi, H.R., Gaber, H.M., Ahmed, M.M., 2020. One-Pot Synthesis of Novel Thiazoles as Potential Anti-Cancer Agents. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S221263>
- Shoemaker, R.H., 2006. Timeline | Major events in the development, implementation and use of the NCI60 cell lines.
- Silveira, C.E.S., Palhares, D., Pereira, L.A.R., Pereira, K.B.D., Silva, F.A.B., 2013. Strategies of plant establishment of two Cerrado species: *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae) and *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC (Myrtaceae). *Plant Species Biology* 28, 130–137. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2012.00366.x>
- Silveira, G. de O., Santos, R.G. dos, Rebello, L.F., Rossi, G.N., Hallak, J.E.C., Yonamine, M., 2020. Stability evaluation of DMT and Harmala alkaloids in ayahuasca tea samples. *Molecules* 25, 5–7. <https://doi.org/10.3390/molecules25092072>
- Silveira, L.H.C., Rezende, A.V., Vale, A.T. do, 2013. Teor de umidade e densidade básica da madeira de nove espécies comerciais amazônicas. *Acta Amazonica* 43, 179–184.
- Soares, D.B.S., Duarte, L.P., Cavalcanti, D., Silva, Fernando C, Braga, A.D., Lopes, M.T.P., Takahashi, J.A., Vieira-Filho, S.A., Silva, Fernando César, 2017. *Psychotria viridis*: Chemical constituents from leaves and biological properties. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89, 927–938. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160411>
- Souza, R.C.Z., Zandonadi, F.S., Freitas, D.P., Tófoli, L.F.F., Sussulini, A., 2019. Validation of an analytical method for the determination of the main ayahuasca active compounds and application to real ayahuasca samples from Brazil. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1124, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.014>
- Szabo, A., Kovacs, A., Riba, J., Djurovic, S., Rajnavolgyi, E., Frecska, E., 2016. The Endogenous Hallucinogen and Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Displays Potent Protective Effects against Hypoxia via Sigma-1 Receptor Activation in Human Primary iPSC-Derived Cortical Neurons and Microglia-Like Immune Cells. *Frontiers in Neuroscience* 10, 423. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00423>

Tupper, K.W., 2008. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? *International Journal of Drug Policy* 19, 297–303.
<https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2006.11.001>

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho, além de revelar as principais causas da variação do teor de DMT, HRM, HRL e THH no chá Ayahuasca consumido em nível mundial, também traz importantes contribuições da relação planta-ambiente de *B. caapi* e *P. viridis*, que podem contribuir para padronizar cultivos de alto rendimento fitoquímico. Do ponto de vista anatômico e morfológico, pela primeira vez são descritas alterações que interferem no teor de alcaloides nas plantas e, indica a disponibilidade hídrica como principal condutor dessas alterações. Além disso, foi descrito e nomeado o tipo de variante cambial de *B. caapi*, dando contribuição à sua correta identificação taxonômica. Outrossim, os parâmetros de secagem dos caules de *B. caapi* (45 °C) e folhas de *P. viridis* (43 °C) foram estabelecidos. Ainda, as análises antiproliferativa mostraram que a Ayahuasca dentro das concentrações deste estudo, que são as mesmas usadas em ritual religioso na UDV, não apresenta citotoxicidade relacionada aos alcaloides DMT, HRM, HRL e THH.