



## Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação

F.L.P. Nogueira<sup>1,2</sup>, S.B.O. Fernandes<sup>2</sup>, G.M. Reis<sup>3</sup>, M.E. Matheus<sup>3</sup>, P.D. Fernandes<sup>3</sup>,  
C.L.S. Lage<sup>1</sup>, F.S. Menezes<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

<sup>2</sup>Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

<sup>3</sup>Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**RESUMO:** *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) é uma erva que ocorre em todas as regiões do Brasil. No presente trabalho, foram avaliadas as atividades analgésica, através do teste da placa quente, da retirada de cauda e da formalina, e antiedematogênica, através do teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton, dos extratos etanólicos obtidos das partes aéreas de *Polygala paniculata* selvagem e cultivadas por micropropagação. A aplicação oral do extrato etanólico de *Polygala paniculata* apresentou atividade analgésica, em ratos, tanto em testes de dor induzida por agentes térmicos (testes da placa quente e de retirada da cauda) quanto por agentes químicos (teste da formalina), de modo que os melhores resultados foram obtidos na dose de 400 mg/kg. Também foi observada redução na formação de edema de orelha induzida pela aplicação de óleo de cróton. Os efeitos provocados pelos extratos obtidos a partir das plantas cultivadas *in vitro* foram menos pronunciados que aqueles produzidos pelos extratos das plantas selvagens, embora ambos tenham sido significativos. Estes resultados sugerem que o extrato etanólico de *Polygala paniculata* possui atividades analgésica e antiedematogênica.

**Unitermos:** *Polygala paniculata*, Polygalaceae, micropropagação, atividade analgésica, atividade antiedematogênica.

**ABSTRACT:** "Analgesic and antiedematogenic activities of wild and micropropagated *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae)". The ethanolic extracts of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae), which is a herbaceous plant widely distributed all over Brazil, were tested for their analgesic effects using hot plate, tail flick and formalin test models, and for their antiedematogenic effects using croton oil induced ear oedema. The ethanolic extracts obtained from wild and micropropagated plants produced analgesic effects against thermal and chemical induced pain. The highest results were observed at the dose of 400 mg/kg. The inhibition of ear oedema in mice was also observed after treatment with ethanolic extract of *Polygala paniculata*. The effects produced by micropropagated plants were lower than wild plants, whereas both had produced significant effects. These results suggest that the ethanolic extracts from wild and micropropagated *Polygala paniculata* possess analgesic and antiedematogenic effects.

**Keywords:** *Polygala paniculata*, Polygalaceae, micropropagation, analgesic activity, antiedematogenic activity.

### INTRODUÇÃO

*Polygala paniculata* L. (Polygalaceae), conhecida popularmente como barba-de-são-pedro, vassourinha-branca, entre outros, ocorre em todas as regiões do Brasil, em altitudes que variam desde o nível do mar até 2300m. Essa espécie apresenta caule ereto e ramificado, filotaxia alterna, flores alvas ou roxas reunidas em panículas terminais e raiz axial ramificada, odorífera e de coloração alvo-amarelada (Marques, 1979). Estudos prévios com esta espécie utilizando cromatografia com

fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) revelaram que o odor característico das raízes dessa espécie é devido a presença abundante de salicilato de metila (Nogueira, 2004).

Diversas espécies do gênero *Polygala* são utilizadas tradicionalmente em diversas regiões do mundo, como por exemplo, *P. tenuifolia* usada como expectorante, sedativa e antipsicótica (Chung; Kim; Kim, 2002) e *P. senega* var. *latifolia* empregada contra gripes e para neutralizar o veneno de cobras (Estrada et al., 2000). Além disso, testes farmacológicos demonstraram que *P.*

*cyparissias* apresenta forte ação antinociceptiva (Campos et al., 1997) e *P. myrtifolia* apresenta expressivas atividades antimicrobiana, contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Lall, 1999; Meyer, 1999), e antifúngica, contra *Candida albicans* (Motsei et al., 2003).

Técnicas de cultivo *in vitro* de plantas medicinais, como a micropropagação, além de permitir a seleção e multiplicação de “genótipos elite” (Arikat et al., 2004; Garcia-Granados et al., 1994; Thiem, 2003; Socorro, Tárrega; Rivas, 1998), visam evitar a coleta massiva de espécies ameaçadas de extinção e o aumento da produção de metabólitos por estas plantas, devido ao rápido crescimento da cultura *in vitro* e da ausência de fatores como clima, doenças e sazonalidade, que, freqüentemente, interferem negativamente nessa produção (Pierik, 1987).

Embora a utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico esteja bastante difundida no Brasil e no mundo, são necessários estudos para comprovar certas atividades preconizadas para determinados vegetais. Além disso, para se obter êxito na busca por novos fármacos com atividade biológica, deve-se buscar maior integração entre as informações obtidas em comunidades

tradicionais e aquelas obtidas através de pesquisas laboratoriais (Elisabetsky; Wannmacher, 1993).

Em diversas regiões do Brasil, *Polygala paniculata* é utilizada popularmente para o tratamento de traumatismos e luxações, pois atuam ativando a circulação sanguínea no local afetado (Lorenzi; Matos, 2002). Desta planta foram isolados anteriormente alguns derivados cumarínicos (Pizzolatti et al., 2002). Devido a isso, esse trabalho tem por objetivo, verificar as atividades analgésica e antiedematogênica dos extratos etanólicos obtidos a partir de plantas selvagens e de plantas cultivadas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

O material vegetal selvagem foi coletado na cidade do Rio de Janeiro e identificado pela Dra. Maria do Carmo M. Marques. Uma excisada do material foi preparada e enviada para o herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), onde foi registrada sob o número

**Tabela 1.** Efeito da administração oral do extrato etanólico de *Polygala paniculata* no tempo de resposta dos animais no modelo da placa quente.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Potencial analgésico (%) dos extratos etanólicos de <i>Polygala paniculata</i> calculados através do teste da placa quente			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Pp-C	100	27,17*	36,74**	53,21**	24,98*
Pp-C	200	31,46**	47,17**	58,90**	26,15*
Pp-C	400	45,41**	53,44**	67,38**	20,59
Pp-iV	100	1,81	22,80*	45,77**	0,67
Pp-iV	200	7,32	33,98**	57,04**	12,19
Pp-iV	400	16,28	44,50**	68,77**	10,13
Fentanil	0,3	96,68**	89,07**	49,79**	19,50*

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01. Os valores foram comparados com o controle negativo (DMSO) e analisados através do teste de Dunnet.

**Tabela 2.** Efeito da administração oral do extrato etanólico de *Polygala paniculata* no tempo de resposta dos animais no modelo da retirada de cauda.

Tratamento	Dose mg/kg	Potencial analgésico (%) dos extratos etanólicos de <i>Polygala paniculata</i> calculados através do teste da retirada de cauda					
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Pp-C	100	11,16**	15,23**	42,95**	47,16**	43,24**	0,72
Pp-C	200	9,69**	25,29**	45,68**	55,51**	47,20**	- 0,62
Pp-C	400	0,47	5,04	56,57**	74,38**	85,62**	5,18
Pp-iV	100	4,64	8,58	37,55**	31,64**	33,61**	4,36
Pp-iV	200	2,20	5,86**	39,17**	45,03**	47,20**	4,69
Pp-iV	400	3,55	12,97**	45,60**	59,56**	71,41**	4,58
Fentanil	0,3	63,00**	100,00**	96,47**	78,53**	22,87**	0,66

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01. Os valores foram comparados com o controle negativo (DMSO) e analisados através do teste de Dunnet.

347.639.

Para a obtenção de exemplares de *Polygala paniculata* cultivados *in vitro*, 300 sementes foram semeadas em meio de composição salina básica desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) acrescido de 4,1 µM de ácido nicotínico, 0,6 µM de mioinositol, 2,4 µM de piridoxina, 1,5 µM de tiamina, 30,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 8,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Após a germinação das sementes, as plântulas foram cultivadas em meio de cultura semelhante ao descrito anteriormente. Os meios de cultura utilizados tiveram pH ajustado para 5,8 antes de serem esterilizados em autoclave à 121 °C (1,1 Kg/cm<sup>2</sup>), por 15 minutos.

### Preparação dos extratos

As partes aéreas das plantas coletadas em seu ambiente natural e daquelas obtidas por micropropagação foram submetidas a processos de secagem à temperatura ambiente. Posteriormente, esses materiais foram extraídos por maceração estática à temperatura ambiente, com etanol 96° GL. O extrato etanólico total foi concentrado sob pressão reduzida rendendo um total de, aproximadamente, 8 g de extrato para as partes aéreas das plantas de campo (Pp-C) e 5g de extrato para as partes aéreas das plantas *in vitro* (Pp- iV).

### Animais

Para os testes de atividade analgésica e antiedematogênica foram utilizados camundongos Swiss 44, fêmeas e que não estavam em período estral, verificado através da análise do esfregaço vaginal. Os animais foram criados em fotoperíodo de 12/12 horas com livre acesso a ração e água, sendo que, 12 horas antes de cada experimento, os animais eram deixados em jejum, tendo livre acesso à água. Cada grupo experimental foi constituído de 5 animais. Utilizou-se como grupo controle, animais que receberam somente o veículo utilizados na solubilização dos extratos.

### Teste da placa quente

Nesse teste, foi considerado como latência de resposta, o tempo que os animais permaneciam sobre uma chapa metálica aquecida (55±0,5 °C) até reagirem ao estímulo térmico, caracterizado pelo comportamento de levantar ou lambear as patas (Tita et al., 2001). As aferições foram realizadas 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de 100, 200 e 400 mg/kg de extrato, por via oral. Os resultados foram expressos como valor de potencial analgésico (PA) (Kuraishi et al., 1983), obtido através da fórmula:

$$PA = \frac{\text{valor medido} - \text{valor basal}}{\text{tempo de corte} - \text{valor basal}} \times 100 ;$$

onde o valor basal foi obtido através da média de duas aferições realizadas com cada animal antes dos

tratamentos. O tempo de corte foi fixado em 30 s, a fim de evitar danos aos animais. Como controle positivo utilizou-se fentanil (0,3 mg/kg). Para avaliar uma possível participação do sistema opióide na atividade analgésica dos extratos, dois grupos de 5 animais foram tratados com naloxona antes da administração, por via oral, de 200 e 400 mg/kg de extrato.

### Teste da retirada da cauda

Para determinar o efeito dos extratos na resposta de retirada de cauda dos animais, foi utilizada a metodologia descrita por Alviano et al. (2004). Os animais foram colocados no interior de um pequeno cilindro, deixando apenas sua cauda livre. Após a administração do extrato, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, via oral, 2/3 da cauda do animal foi imersa em banho-maria (50±1 °C), sendo registrado o tempo que o animal permanecia com a cauda dentro do banho, determinando-se assim o tempo de latência (em segundos). Foram feitas marcações nos tempos de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos após a administração dos extratos.

Os resultados foram expressos como valor de potencial analgésico (PA) (Kuraishi et al., 1983), obtido através da fórmula:

$$PA = \frac{\text{valor medido} - \text{valor basal}}{\text{tempo de corte} - \text{valor basal}} \times 100 ;$$

onde o valor basal foi obtido através da média de duas aferições realizadas com cada animal antes dos tratamentos. O tempo de corte foi fixado em 10 s, a fim de evitar danos aos animais. Como controle positivo utilizou-se fentanil (0,3 mg/kg).

### Teste da formalina

Esse teste foi realizado seguindo o procedimento descrito por Bispo et al. (2001), com pequenas modificações. Os animais foram tratados com os extratos (100, 200 e 400 mg/kg) 1 hora antes da administração de 0,05 mL de formalina (0,2%), via injeção subplantar, em uma das patas traseiras do animal. Foi considerado como indicativo de dor, lambidas realizadas pelo animal na pata que sofreu a injeção. Registrou-se o número de lambidas no intervalo 0-5 min após a injeção (fase 1 – dor neurogênica) e no intervalo 15-30 min (fase 2 – dor inflamatória). Foram utilizados como controles positivos a indometacina (10,0 mg/kg) e o fentanil (0,3 mg/kg). A porcentagem de atividade analgésica (Asongalen et al., 2004) foi calculada através da fórmula:

$$PA = \frac{\text{valor basal} - \text{valor medido}}{\text{valor basal}} \times 100 ;$$

### Teste do edema de orelha

A atividade antiedematogênica dos extratos foi avaliada através da capacidade de inibir a formação do edema na orelha dos animais testados, após aplicação

**Tabela 3.** Efeito do extrato etanólico de *Polygala paniculata* no modelo de dor provocada pela formalina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Porcentagem de redução no número de lambidas na pata no modelo de dor induzida pela formalina	
		Fase 1 (0 – 5 min)	Fase 2 (20 – 25 min)
Pp-C	100	18,04*	22,20**
Pp-C	200	22,68**	26,55**
Pp-C	400	48,43**	36,93**
Pp-iV	100	16,32*	16,07*
Pp-iV	200	21,57**	21,49**
Pp-iV	400	29,11**	30,11**
Fentanil	0,3	62,48**	38,77**
Indometacina	10,0	14,32*	47,35**

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . Os valores foram comparados com o controle negativo (DMSO) e analisados através do teste de Dunnet.

**Tabela 4.** Efeito do extrato etanólico de *Polygala paniculata* na redução de edema em orelha de rato.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Porcentagem de redução do edema de orelha provocado pela aplicação de óleo de cróton
Pp-C	100	34,27**
Pp-C	200	39,88**
Pp-C	400	40,96**
Pp-iV	100	15,26*
Pp-iV	200	19,63*
Pp-iV	400	36,14**
dexametasona	0,5	89,16**
Indometacina	10,0	53,89**

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . Os valores foram comparados com o controle negativo (DMSO) e analisados através do teste de Dunnet.

tópica do óleo de cróton 1 hora após a administração dos extratos (100, 200 e 400 mg/kg), os animais receberam 10  $\mu$ L de uma solução de óleo de cróton (2,5%, v/v em acetona) sobre a superfície interna da orelha de uma das orelhas, enquanto a mesma região da outra orelha foi tratada com o mesmo volume de acetona. Após 4 horas da aplicação do agente flogístico, os animais foram sacrificados e discos de 6 mm de diâmetro foram removidos de cada orelha e pesados. A atividade antiedematogênica foi expressa como a média das diferenças de peso entre as orelhas dos animais, sendo que, quanto menor a diferença de peso, maior o potencial de inibição (Schiantarelli et al., 2004). Como controles positivos foram utilizados a indometacina (10,0 mg/kg) e a dexametasona (10 mg/kg).

#### Análise estatística

Nos testes analgésico e antiedematogênico, os resultados foram analisados através de análise de variância de uma via (ANOVA) e do teste de Dunnet. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade analgésica dos extratos nos modelos de dor provocada por estímulo térmico mostrou-se dependente da dose. No modelo da placa quente, os extratos foram capazes de ampliar significativamente o tempo que os animais permaneciam sobre a placa aquecida, com efeito mais pronunciado aos 90 minutos, atingindo valor máximo de 67,38% para o extrato das plantas selvagens, e de 68,77% para o extrato obtido das plantas cultivadas *in vitro*, ambos na dose de 400 mg/kg (Tabela 1).

O pré-tratamento dos animais com naloxona foi capaz de reverter o efeito analgésico provocado pelos extratos em 70%, sugerindo a participação de receptores opióides no mecanismo de antinocicepção apresentado por *P. paniculata*, ao contrário do observado para outra espécie deste gênero, *P. cyparissias*, que produz atividade analgésica por outro mecanismo que não esse (Campos et al., 1997). Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar de forma mais precisa possível mecanismo pelo qual esses extratos atuam.

No modelo da retirada da cauda, os extratos apresentaram efeito significativo na produção de resposta

analgésica ( $P < 0,05$ ), em todas as concentrações testadas, quando comparados com o DMSO, usado como controle negativo (Tabela 2). O efeito máximo foi observado na dose de 400 mg/kg, com 85,62% de atividade analgésica para o extrato obtido a partir das plantas selvagens, e de 71,41% para as plantas oriundas do cultivo *in vitro*.

A atividade analgésica dos extratos também foi avaliada pelo método da dor induzida pela formalina. Neste teste, o extrato etanólico de *Polygala paniculata* foi capaz de inibir a dor durante as duas fases do processo algésico, agindo de modo dependente da concentração de extrato aplicada (Tabela 3). Durante o desenvolvimento da dor neurogênica (fase 1), o maior percentual de atividade analgésica observado foi de 48,42% para o extrato das plantas de campo e de 29,11% para o extrato das plantas *in vitro*, ambos na dose de 400 mg/kg.

Durante o desenvolvimento da fase inflamatória (fase 2), o extrato obtido a partir das plantas de campo reduziu a dor em 36,93%, enquanto o extrato obtido a partir das plantas *in vitro* reduziu em 30,11%, ambos na concentração de 400 mg/kg (Tabela 4). Esta inibição do processo algésico durante a fase inflamatória do teste da formalina sugere a existência de substâncias no extrato capazes de atuar diretamente sobre as terminações nervosas periféricas, caracteristicamente pela inibição de ciclooxigenases (Bispo et al., 2001; Asongalem, et al., 2004).

Através do teste de indução de edema de orelha, pode-se verificar que os extratos de *Polygala paniculata* possuem atividade antiedematogênica, sendo significativamente superior ao controle em todas as concentrações testadas ( $P < 0,05$ ), embora o efeito mais pronunciado tenha sido observado na concentração de 400 mg/kg, tanto para o extrato das plantas de campo (40,96%), quanto para o extrato das plantas *in vitro* (36,14%) (Tabela 5).

O desenvolvimento de plantas medicinais *in vitro*, seja por micropropagação ou por qualquer outra técnica, tem recebido bastante atenção nos últimos anos, devido, principalmente, ao risco de extinção de muitas plantas medicinais e a destruição de importantes ecossistemas (Rout et al., 2000). Algumas plantas quando cultivadas *in vitro*, exibem pouquíssimas diferenças com respeito à composição química, quando comparadas às plantas de campo, embora a produção total de metabólitos, em geral, seja maior nestas do que naquelas (Socorro; Tárrega; Rivas, 1998). Para reverter essa diferença, eliciadores têm sido usados em culturas *in vitro* de plantas medicinais para aumentar a produção de determinados metabólitos, como demonstrado por Namdeo et al. (2002) que conseguiram aumentar a produção de ajmalicina por células de *Catharanthus roseus*, cultivando-as com fragmentos de parede celular de diferentes tipos de fungos.

Nesse trabalho, foi observado que os extratos obtidos a partir das plantas *in vitro* se mostraram menos eficazes do que aqueles obtidos a partir das plantas coletadas em campo, embora ambos tenham apresentado

atividades analgésica e antiedematogênica significativas. Essa diferença pode ser consequência das condições ambientais a que essas plantas estão sujeitas durante o seu crescimento e desenvolvimento (Pierik, 1987).

A análise farmacológica de *Polygala paniculata* através de ensaios para atividades analgésica e antiedematogênica demonstrou que esta espécie possui ambas as atividades. Estes resultados estão de acordo com a utilização popular desta espécie, que é recomendada para o tratamento de traumatismos, luxações e, também, para a neutralização de venenos de cobras, uma vez que nesses casos ocorre o desenvolvimento de processos algésicos e inflamatórios que precisam ser eliminados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro - PBV/UFRJ.

## REFERÊNCIAS

- Alviano DS, Rodrigues KF, Leitão SG, Rodrigues ML, Matheus ME, Fernandes PD, Antonioli AR, Alviano CS. 2004. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 92: 269-273.
- Arikat NA, Jawad FM, Karam NS, Shibli RA. 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Sci Horti* 100: 193-202.
- Asongalem EA, Foyet HS, Ngogang J, Folefoc GN, Dimo T, Kamtchouing P. 2004. Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. *J Ethnopharmacol* 91: 301-308.
- Bispo MD, Mourão RHV, Franzotti EM, Bomfim KBR, Arrigoni-Blank M de F, Moreno MPN, Marchioro M, Antonioli AR. 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 76: 81-86.
- Campos ROP, Santos ARS, Vaz ZR, Pinheiro TR, Pizzolatti MG, Cechinel Filho V, Monache FD, Yunes RA, Calixto JB. 1997. Antinociceptive properties of hidroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Life Sci* 61: 1619-1630.
- Chung IW, Kim SR, Kim EG. 2002 Dopamine-2 and serotonin-2 receptor binding in antipsychotic medicines from natural products. *Journal of Korean Neuropsychiatric Association* 31: 856-857 apud *Pharmacol., Biochem. Behav* 71: 191-195.
- Elisabetsky E, Wannmacher L. 1993. The status of ethnopharmacology in Brazil. *J Ethnopharmacol* 38: 137-143.
- Estrada A, Katselis GS, Laarveld B, Barl B. 2000. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol*

*Microbiol Infect Dis* 23: 27-43.

- Garcia-Granados A, Martinez A, Onorato ME, Parra A, Recondo MB, Rivas F, Arrebola ML, Socorro O. 1994. Products with biological activity obtained from in vitro micropropagated *Sideritis foetens*. *Phytochemistry* 35: 645-650.
- Kuraishi Y, Harada Y, Aratani S, Satoh M, Takagi H. 1983. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal analgesic tests. *Brain Res* 273: 245-252.
- Lall N, Meyer JJM. 1999. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol* 66: 347-354
- Lorenzi H, Matos FJA. 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.
- Marques MCM. 1979. Revisão das espécies do gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) do Estado do Rio de Janeiro. *Rodriguesia* 31: 69-339.
- Motsei ML, Lindsey KL, van Staden J, Jäger AG. 2003. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol* 86: 235-241.
- Murashige T, Skoog FA. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Namdeo A, Patil S, Fulzele DP. 2002. Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Prog* 18: 159-162.
- Nogueira FLP. 2004. *Estudo biotecnológico e farmacológico de Polygala paniculata L.* Rio de Janeiro, 86p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Pierik RLM. 1987. *In vitro culture of high plants*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.
- Pizzolatti MG, Cristiano R, Monache FD, Branco A. 2002. Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae). *Rev Bras Farmacogn* 12: 21-26.
- Rout GR, Samarantay S, Das P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv* 18: 91-120.
- Schiantarelli P, Cadel S, Acerbia D, Pavesi L. 1982. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzneim-Forsch Drug Res* 32: 230-235.
- Socorro O, Tárrega I, Rivas F. 1998. Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum bastetanum*. *Phytochemistry* 48: 1347-1349.
- Thiem B. 2003. In vitro propagation of isoflavone-producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Sci* 165: 1123-1128.
- Tita B, Abdel-Haq H, Vitalone A, Mazzanti G, Saso L. 2001. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Il Farmaco* 56: 341-343.