

**Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências Humanas e Naturais
Departamento de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**

TARSILA DAYSY URSULA HERMOGENES GOMES

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *Pilea microphylla* (L.) Liebm.
(Urticaceae): ASPECTOS TÓXICO, MUTAGÊNICO, ANTIMUTAGÊNICO E
ANTIOXIDANTE**

**Vitória
2009**

Tarsila Daysy Ursula Hermogenes Gomes

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *Pilea microphylla* (L.) Liebm.
(Urticaceae): ASPECTOS TÓXICO, MUTAGÊNICO, ANTIMUTAGÊNICO E
ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Biologia Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal com ênfase em Fisiologia Vegetal.

Orientação: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Co-orientação: Prof^a Dr^a Marcieni Ataíde de Andrade

Vitória

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

G633p Gomes, Tarsila Daysy Ursula Hermogenes, 1982-
Prospecção fitoquímica e avaliação dos efeitos biológicos
do extrato etanólico das partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.)
Liebm. (Urticaceae) : aspectos tóxico, mutagênico,
antimutagênico e antioxidante / Tarsila Daysy Ursula
Hermogenes Gomes. – 2009.
70 f. : il.

Orientadora: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

Co-Orientadora: Marcieni Ataíde de Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. *Pilea microphylla*. 2. Compostos fenólicos. 3.
Antioxidantes. 4. Toxicidade aguda. 5. Mutagenicidade. I.
Batitucci, Maria do Carmo Pimentel. II. Andrade, Marcieni
Ataíde de. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

Tarsila Daysy Ursula Hermogenes Gomes

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *Pilea microphylla* (L.) Liebm.
(Urticaceae): ASPECTOS TÓXICO, MUTAGÊNICO, ANTIMUTAGÊNICO E
ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Biologia Vegetal do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) com ênfase em Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2009:

Profª Drª Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Orientadora

Profª Drª Marcieni Ataíde de Andrade
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientadora

Profª Drª Diolina Moura Silva
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Examinador Interno

Profª Drª Lusânia Maria Greggi Antunes
USP – Ribeirão Preto
Examinador Externo

Aos meus pais, Marilza e Severino

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor incondicional, compreensão, apoio e educação.

À chefe Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pela orientação, compreensão, apoio nos momentos difíceis quase intermináveis, companheira de muitas risadas, festas e outros encontros e principalmente pela confiança na minha capacidade e descoberta do meu potencial.

À Prof^a. Dr^a. Marcieni Ataíde Andrade, pela orientação, confiança compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas de mestrado, companheiros de muitos momentos difíceis e divertidos.

Aos colegas de laboratório.

Ao Guilherme Batitucci, pela permissão em coletar no horto.

À Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Gregg Antunes, pela participação na banca.

À Prof^a. Dr^a. Diolina Moura Silva, pela participação na banca.

“Eu faço da dificuldade a minha motivação
A volta por cima vem na continuação”

Charlie Brown Jr.

Resumo Geral

Pilea microphylla (L.) Liebm. (Urticaceae), popularmente conhecida por brilhantina no Brasil, é usada como antipirética, purificadora de vesícula e ventre, antidiarréica, antiasmática e para dores abdominais. Apesar desse uso medicinal, não há informações sobre sua biologia e eficácia terapêutica. Assim, o objetivo desse trabalho é realizar a caracterização fitoquímica, quantificando a composição fenólica total e capacidade antioxidante total, e avaliar possíveis efeitos de toxicidade aguda pela DL₅₀ (Dose Letal Média), mutagênico e antimutagênico pelo teste de micronúcleos em medula óssea e sangue periférico de camundongos. As partes aéreas secas foram submetidas à maceração em álcool etílico absoluto, obtendo-se o extrato bruto etanólico (EBE). A prospecção fitoquímica qualitativa indicou presença de açúcares redutores, fenóis, taninos, depsídeos/depsidonas, cumarinas, esteróides e triterpenos. A concentração de compostos fenólicos foi 9,75 equivalentes de ácido tânico e 17,5 equivalentes de ácido gálico (por leitura em espectrofotômetro), resultado inferior aos encontrados por outros autores com outras espécies vegetais. A atividade antioxidante indicou valores semelhantes ou mesmo maiores que os encontrados para o ácido ascórbico e rutina e para outras espécies vegetais. O teste de toxicidade aguda não indicou DL₅₀, demonstrando baixa toxicidade do extrato, como obtido por outro estudo com essa espécie. Apesar disso, o teste de mutagenicidade do EBE nas doses 250 mg/Kg e 500 mg/Kg em medula óssea e sangue periférico de camundongos indicou aumento não significativo na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (EPCMNs) e normocromáticos (ENCMNs) em medula e sangue periférico, respectivamente, independente da concentração. O potencial antimutagênico foi avaliado na dose 250 mg/Kg em pré-tratamento, pós-tratamento e tratamento simultâneo. Somente o pós-tratamento apresentou redução, porém não significativa, na frequência de EPCMNs em relação ao controle positivo. Em sangue periférico, também verificou-se que o pós-tratamento apresentou menores valores de ENCMNs. Os resultados obtidos sugerem que o uso indiscriminado e prolongado (subcrônico/crônico) de preparações de *Pilea microphylla* pode ser prejudicial à saúde, devido à formação de micronúcleos, mas fornecem informações para outros estudos que visem à confirmação da antimutagenicidade, à elucidação dos mecanismos de mutagenicidade e à composição fitoquímica, como importantes fontes de compostos bioativos para a indústria farmacêutica para utilização de maneira isolada ou em associações com tratamentos convencionais em diversas patologias como, por exemplo, o câncer ou verminoses.

Palavras-chave: *Pilea microphylla*, compostos fenólicos, antioxidante, toxicidade aguda, mutagenicidade, antimutagenicidade.

Abstract

Pilea microphylla (L.) Liebm. (Urticaceae), popularly known as brilhantina in Brazil, is used as antipyretic, purifying the bladder, anti-diarrhea, anti-asthma and used for abdominal pain. Despite this medical use, there is no information about its biology and therapeutic efficacy. The objective of this work is to characterize the phytochemical, quantifying the total phenolic composition and total antioxidant capacity, and assess possible effects of the acute toxicity by LD₅₀ (Median Lethal Dose), mutagenic and antimutagenic by micronucleus test in bone marrow and peripheral blood of mice. The dried aerial parts were subjected to maceration in absolute alcohol, resulting the crude ethanolic extract (CEE). The qualitative phytochemical prospection indicated the presence of reducing sugars, phenols and tannins, depsides and depsidons, coumarins, steroids and triterpenes. The concentration of phenolic compounds was 9.75 tannic acid equivalents and gallic acid equivalents 17.5 (reading in spectrophotometer), lower than the result found by other authors with other plant species. The antioxidant activity showed values similar or even higher than those found for other plant species. The test indicated no acute toxicity LD₅₀, as obtained by another study. Nevertheless, the test for mutagenicity of CEE in doses 250 mg/Kg and 500 mg/Kg in bone marrow and peripheral blood of mice showed no significant increase in the frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes (MNPCEs) and normochromatic (MNNCEs) in marrow and peripheral blood, respectively, independent of concentration. The antimutagenic potential was evaluated in dose 250 mg/Kg in pre-treatment, post-treatment and simultaneous treatment. Only the post-treatment showed a decrease not significant in the frequency of MNPCEs on the positive control. In peripheral blood, it was found that post-treatment had lower values of MNNCEs. The results suggest that the indiscriminate and prolonged use (subchronic/chronic) preparations of *Pilea microphylla* may be harmful to health, due to the formation of micronuclei, but provide information for other studies to confirm the antimutagenic effect, to elucidate the mechanisms of mutagenicity and phytochemical composition, as important sources of bioactive compounds for the pharmaceutical industry for use in an isolated manner or in association with conventional treatments in various diseases such as cancer.

Key words: *Pilea microphylla*, phenolic compounds, antioxidant, acute toxicity, mutagenicity, antimutagenicity.

1 Introdução Geral	8
1.1 Formação de Micronúcleos e Desenvolvimento de Cânceres.....	10
1.2 <i>Pilea microphylla</i> (L.) Liebm.....	13
2 Objetivo Geral	16
2.1 Objetivos Específicos	16
3 Artigo 1 * : Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de <i>Pilea microphylla</i> (L.) Liemb. (Urticaceae), quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante total por método espectrofotométrico	17
4 Artigo 2*: Avaliação dos potenciais efeitos tóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato etanólico de <i>Pilea microphylla</i> (L.) Liemb. (Urticaceae) em camundongos	38
5 Conclusões Gerais	58
6 Referências	59
APÊNDICE A- Pacientes atendidos das cidades Vila Velha e Serra no mês de Janeiro de 2008 por um laboratório de análises clínicas	63
APÊNDICE B- Espécies da família Urticaceae usadas como medicinais	64
Referências.....	66
APÊNDICE C- Figura Metabolismo Vegetal	70

* Formatação segundo normas da ABNT 2000 (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

1 Introdução Geral

Atualmente, a medicina popular utiliza as plantas medicinais sob diversas formas de preparo, não havendo o conhecimento dos seus princípios ativos oriundos do metabolismo secundário (FERRO, 2006), das suas possíveis ações e interações e até mesmo de qual parte da planta é possuidora de maior concentração das substâncias bioativas, como é mostrado em estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos (Di STASI et al., 2002; FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004; SOUZA et al., 2004; AZEVEDO; SILVA, 2006; RODRIGUES; GUEDES, 2006). Algumas plantas citadas nesses estudos já possuem trabalhos que buscam elucidar a composição fitoquímica, entretanto, ainda é comum o uso popular de espécies com poucos e insuficientes dados farmacológicos disponíveis, com nenhuma evidência clínica controlada que garanta o uso terapêutico em humanos.

O mercado para terapias à base de plantas medicinais mostra-se em crescente expansão, movimentando em torno de U\$ 500 milhões de dólares no Brasil, o que corresponde a uma pequena parcela dos estimados U\$ 22 bilhões de dólares do mercado mundial (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Cerca de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal, com 121 substâncias ativas utilizadas na terapêutica. Entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal, e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos sintéticos, obtidos a partir de precursores naturais (RATES, 2001).

Dentro desta perspectiva, esperar-se-ia que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando que é o país de maior biodiversidade vegetal, onde há 55.000 espécies de plantas descritas ou 22% do total mundial (ELISABETSKY; COSTA-CAMPOS, 1996), mas apenas 8% da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA; NODARI, 2004). Além disso, as inovações e pesquisa nesse setor têm sido de baixa ou média intensidade, sendo que os fitoterápicos mais vendidos no mercado brasileiro são produzidos a partir de espécies estrangeiras (FUNARI; FERRO, 2005). Do mesmo modo, levando-se em consideração o custo do investimento, e o retorno econômico de um produto farmacêutico, a indústria

farmacêutica mundial prioriza os investimentos em doenças como AIDS, mal de Alzheimer, câncer, depressão, diabetes, doenças cardíacas, derrame e osteoporose, principalmente (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Essa situação faz das doenças chamadas “negligenciadas” e típicas de países em desenvolvimento, como tuberculose, malária, mal de chagas e verminoses, pouco interessantes à indústria farmacêutica, pois embora estes países reúnam 80% da população mundial, correspondem a apenas 20% das vendas globais de remédios (FUNARI; FERRO, 2005). A incidência dessas doenças negligenciadas na população pode ser constatada no número de atendimentos realizados no mês de janeiro de 2008 por um laboratório que atende a duas grandes cidades do Estado do Espírito Santo, Vila Velha e Serra, em que cerca de 30% das pessoas atendidas apresentaram algum tipo de infecção causada por parasitas diversos (APÊNDICE A). Essas infecções comuns nos sistemas respiratório, gastrointestinal e geniturinário correspondem a maioria das citações para o uso de plantas medicinais em estudos de etnobotânica realizados por Di Stasi (2002) e Pinto et al. (2006) em regiões de Mata Atlântica. Ainda segundo Funari e Ferro (2005), a própria OMS reconhece no conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade um importante instrumento no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o combate de doenças que assolam as populações dos países em desenvolvimento, uma vez que cálculos realizados em 1997 mostram que um terço da população mundial ainda carece de acesso a medicamentos essenciais, associado às pobres práticas de tratamento e inadequadas medidas de controle (AKHTAR et al., 2000).

Farnsworth (1997, apud REZENDE; RIBEIRO, 2005) cita a importância desse conhecimento tradicional para conduzir pesquisas, pois relata que mais de 80% dos fármacos comercializados atualmente com algum princípio ativo derivado de plantas, tem correlação positiva entre a sua aplicação na medicina tradicional e a sua indicação terapêutica pelos médicos. De modo complementar, Elisabetsky e Souza (2004) expõem que a chance de se encontrar um composto ativo numa planta rastreada a partir de uma informação etnobotânica é mais de mil vezes maior do que as chances das técnicas de rastreamento randômicas convencionais. Isso torna os países detentores de grande biodiversidade, como o Brasil, potenciais geradores de substâncias bioativas para o mercado farmacêutico.

Por isso, estudos realizados para caracterização dos componentes químicos dos produtos vegetais podem identificar prováveis causadores da toxicidade ou terapêuticos, destinados ao controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos produtos fitoterápicos (SARTI, 2006). Um estudo toxicológico preliminar são os que visam verificar a citotoxicidade e a mutagenicidade de diversas substâncias, através de bioensaios que utilizam, por exemplo, roedores e permitem o monitoramento da bioatividade de extratos e frações quanto a sua possível potencialidade tóxica. Dentre os testes de avaliação de mutagenicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em medula óssea e em sangue periférico de roedores *in vivo* é amplamente recomendado para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial, sendo útil como um estudo toxicológico preliminar (KRISHNA; HAYASHI, 2000; RIBEIRO, 2003). Além desses estudos mutagênicos, avaliações de compostos antimutagênicos podem fornecer informações para redução do risco de cânceres em humanos (DEARFIELD et al., 2002; ANDRADE et al., 2008).

1.1 Formação de Micronúcleos em Roedores e Desenvolvimento de Cânceres

No processo de eritropoiese na medula óssea, a célula jovem conhecida por eritroblasto passa pelas fases normais do ciclo celular e as células-filhas derivadas chamam-se eritrócito policromático (EPC). Nesse estágio, essas células apenas sofrem um processo de maturação quando expulsam o núcleo principal e a quantidade de RNA que possuem confere a elas uma coloração azulada quando corada com Giemsa ou Leishmann (Figura 1). Com o tempo, o EPC perde o RNA e inicia o acúmulo de hemoglobina, tornando-se um eritrócito normocromático (ENC) (Figura 1), menor e de coloração rosada/alaranjada, sendo posteriormente removido para o sangue periférico, onde também podem ser detectados os eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMNs) (Figura 2) (KRISHNA; HAYASHI, 2000; RIBEIRO, 2003). Assim, os danos citogenéticos acumulados podem ser avaliados porque os eritrócitos micronucleados produzidos na medula em 6-8 horas após tratamento com substâncias químicas são transferidos para o sangue periférico em 18-22 horas (ASANAMI et al., 1995; ABRAMSSON-ZETTERBERG et al., 1996).



Figura 1: Fotomicrografia mostrando eritrócitos corados com Leishman em medula óssea de roedores: **A**, eritrócito policromático (EPC); **B**, eritrócito normocromático (ENC); **C**, eritrócito policromático micronucleado (EPCMN). Aumento original: 1000x.



Figura 2: Fotomicrografia mostrando eritrócito normocromático micronucleado (ENCMN) corado com Leishman no sangue periférico de roedores. Aumento original: 1000x.

Os micronúcleos podem ser induzidos pela exposição a agentes mutagênicos ambientais (naturais ou antrópicos), desenvolvidos durante processos infecciosos (verminoses), mas também como ocorrência sem uma causa definida. São formados por fragmentos de cromossomos, produzidos ou por quebras cromossômicas desencadeadas por mutações não corrigidas pelos mecanismos de reparo ou por cromossomos inteiros que sofreram um retardo durante a migração na anáfase da divisão celular devido à interferência na formação do fuso mitótico (FAGUNDES et al., 2005). As alterações que promovem quebras recebem o nome de clastogênese e causam danos estruturais aos cromossomos, porém não visualizados pelo teste de micronúcleo, e as mudanças que promovem a perda de cromossomos (confirmados pela presença de centrômeros) desencadeiam danos numéricos e são chamadas de aneugênese. Essas anomalias (fragmentos ou cromossomos inteiros) não são incorporadas ao núcleo da célula-filha dos eritrócitos após a divisão e não são

expelidas da célula durante o processo de extrusão do núcleo, permanecendo visíveis no EPC como micronúcleos (Figura 1) (KRISHNA; HAYASHI, 2000; RIBEIRO, 2003; GUZMAN et al., 2008).

A maior frequência com que ocorrem esses micronúcleos torna-se, portanto, um indicativo da toxicidade causada por agentes mutagênicos em protocolos que utilizam roedores como sistema-teste, e pode ser similar a efeitos cromossômicos em humanos por induzirem as mesmas alterações fisiológicas na absorção, distribuição, metabolismo e excreção (GUZMÁN et al., 2008). Mesmo não sendo possível verificar quais são os tipos de mutação existentes, outros tipos de aberrações cromossômicas e os mecanismos que causam a clastogenicidade e/ou aneugenicidade, essas alterações podem desencadear mais mutações e falhas no mecanismo de reparo devido à divisão anterior ao reparo, sendo que os danos fixados no DNA e irreversíveis acumulam-se e podem originar um processo tumoral, cujos mecanismos ainda não são definidos (SARASIN, 2003; FAGUNDES et al., 2005).

A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese, havendo alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como em humanos (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Dessa forma, os mecanismos envolvidos no processo de tumorigênese têm fortalecido a importância dos testes de mutagenicidade, principalmente pelo fato do câncer ser a terceira e segunda causa de óbitos no mundo e no Brasil, respectivamente, segundo a OMS (ALMEIDA et al., 2005). Durante o desenvolvimento de cânceres hereditários ou não, as mutações têm que ocorrer em genes que estimulem (proto-oncogenes) e/ou inibam (genes supressores de tumor) a proliferação celular, levando assim ao ganho ou perda de função desses genes e tornam a célula afetada susceptível a desenvolver mais alterações (PINTO; FELZENSZWALB, 2003). Como as mutações irreversíveis acumulam-se, ocorre uma proliferação celular anormal e em curto período de tempo devido à alteração da comunicação celular e expressão gênica (ALMEIDA et al., 2005; BARILE, 2007).

Para impedir o aumento nas divisões e as mutações geradas, são utilizadas drogas antineoplásicas ou antitumorais, sendo os mais estudados e utilizados os agentes alquilantes. Esses agentes são capazes de formar ligações interfilamentares com o DNA e necessitam ser metabolizados pelas fosfamidases (enzima hepática citocromo P450), para que seus metabólitos possam exercer o efeito alquilante celular e impeça a síntese de macromoléculas. Um exemplo de agente alquilante é a ciclofosfamida, usada para casos de carcinomas de mama, de endométrio, de cólon, de testículo, sarcomas, linfomas e neuroblastomas (ALMEIDA et al., 2005). Além de ser um agente alquilante, a ciclofosfamida ao ser metabolizada no fígado também origina espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais ânion superóxido (O_2^-), hidroxil (OH^\cdot) e peroxil (ROO^\cdot), oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), compostos altamente reativos que buscam estabilizar sua estrutura química, causando danos às estruturas celulares e envelhecimento do organismo (WILHEM FILHO et al., 2001).

Apesar dos benefícios dessa droga, seu uso também pode estar associado ao início de cânceres secundários, devido ao seu potencial genotóxico e as principais formas de toxicidade são cistites e úlceras gastrointestinais (ANDERSON et al., 1995; CONKLIN, 2000). Além disso, sabe-se que a mutagenicidade é também desencadeada pela indução de danos na molécula de DNA, pela inibição da DNA-topoisomerase II (topo II), quebras simples e duplas, e indução da apoptose (PENAULT-LLORCA et al., 2003, apud BUENO, 2006; NATARAJAN; PALITTI, 2008). Portanto, a busca por compostos bioativos derivados de plantas pode ser justificada para redução da toxicidade e aumento do benefício clínico dos pacientes (SANTOS; ELISABETSKY, 1999). Alguns compostos sintéticos puros e naturais estão em vários estágios de triagem clínica em humanos como agentes quimioprotetores (MITSCHER et al., 1996)

1.2 *Pilea microphylla* (L.) Liebm.

A família Urticaceae é composta por plantas herbáceas, arbustivas ou arbóreas, classificadas em 45 gêneros e 1000 espécies distribuídas na região intertropical, em função dos ambientes úmidos e sombreados necessários ao seu desenvolvimento. Apesar da presença de tricomas às vezes urticantes, responsáveis pela conhecida

denominação dessa família, na grande maioria dos gêneros não há esses pêlos. Essa família possui espécies usadas como medicinais (APÊNDICE B), como por exemplo, a *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Figura 3): uma planta herbácea, muito ramificada, com talos eretos ou rasteiros, com 5 a 45 cm de altura, as folhas diminutas e suculentas possuem dimensões que variam 0,1 a 0,6 cm de comprimento e conferem uma ramagem densa e carnosa (STEINMANN, 2005).

A *Pilea microphylla*, popularmente conhecida por brilhantina, é citada para dores de cabeça (CHIFUNDERA, 2001; PINTO et al., 2006), como antipirética (BEYRA et al., 2004), usada em casos de diarreia e asma (MITCHELL; AHMAD, 2006) e com atividade positiva contra *Staphylococcus aureus* (FACEY et al., 1999), purificadora de vesícula (LANS, 2006), para inflamação e como purificadora de ventre em casos de problemas reprodutivos (LANS, 2007) e dores de barriga (RODRIGUES; GUEDES, 2006). Entretanto, devido à ausência de dados fitoquímicos e farmacológicos, esta planta foi classificada por Lans (2006; 2007) como menor nível de validação para o uso popular, o que reforça a necessidade de estudos.

Em estudo farmacológico desenvolvido por Prabhakar et al. (2007), ratos que foram submetidos à radiação e tratados com compostos oxidantes receberam, posteriormente, extrato etanólico de *P. microphylla*, objetivando avaliar o seu potencial efeito radioprotetor e antioxidante. Os resultados indicaram 80% de proteção contra a radiação e redução da depleção das enzimas envolvidas na atividade antioxidante, mas não mostra como ocorreu o efeito protetor do extrato etanólico frente ao processo de mutação.

Assim, a ausência de informações sobre efeitos e composição fitoquímica de *P. microphylla* sugere a realização de experimentos para assegurar se o extrato orgânico obtido dessa planta pode causar mutagenicidade, se pode ter efeito antimutagênico relacionado ou não à possível capacidade antioxidante. Essas respostas podem estar relacionadas aos grupos de constituintes químicos que estão presentes no extrato orgânico, principalmente os compostos fenólicos quantificados, buscando-se em literatura se possuem alguma ação terapêutica anteriormente comprovada em outras espécies ou se são responsáveis pelos efeitos mutagênicos, antimutagênicos e antioxidantes.

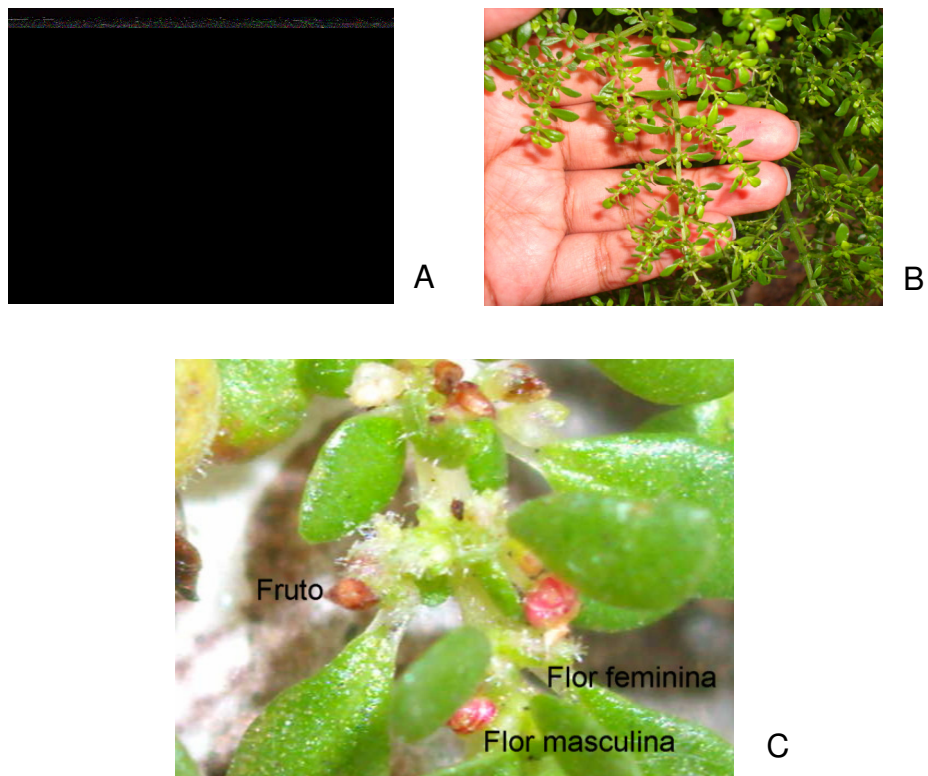


Figura 3: *Pilea microphylla* (L.) Lieb. A: aspecto geral; B: detalhe da disposição das folhas no ramo; C: detalhes da floração. Fotos pessoais.

2 Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxico, mutagênico e antimutagênico, por meio da análise de micronúcleos em células de medula óssea e sangue periférico de roedores, caracterizar a composição fitoquímica do extrato bruto etanólico de *Pilea microphylla* (L.) Liebm., quantificar os compostos fenólicos e verificar a atividade antioxidante total do extrato bruto orgânico.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica das partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm., utilizando extrato bruto orgânico etanólico;
- Quantificar a composição fenólica presente no extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm., utilizando o método de Folin-Ciocalteu;
- Estabelecer a dose letal 50% (DL₅₀) do extrato etanólico das partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm., por meio do teste de toxicidade aguda em roedores;
- Avaliar a potencial atividade mutagênica do extrato bruto orgânico etanólico das partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm., em diferentes concentrações por meio do teste de micronúcleo em medula óssea e sangue periférico de camundongos;
- Avaliar a potencial atividade antimutagênica de diferentes concentrações de extrato bruto orgânico etanólico das partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm., em bioensaio com camundongos (medula óssea e sangue periférico);
- Avaliar a potencial atividade antioxidante de diferentes concentrações do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm., por meio do teste com fosfomolibdênio em espectrofotômetro e correlacionar com a quantidade da composição fenólica;
- Relacionar os compostos químicos, derivados do metabolismo secundário, encontrados na *Pilea microphylla* (L.) Liebm., com as diferentes atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidante e a ação terapêutica apresentadas pelo extrato com dados de literatura.

3 Artigo 1 *

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE *Pilea microphylla* (L.) Liebm., QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

GOMES, T. D. U. H.^{a*}; ANDRADE, M. A.^b; BATITUCCI, M. C. P.^a

^a Laboratório de Genética Vegetal e Produtos Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, n 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil

^b Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, n 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil

* autor para correspondência: tarsilagomes@yahoo.com.br

Resumo

Os metabólitos secundários são importantes fontes de compostos bioativos para a indústria farmacêutica, dentre eles os compostos fenólicos. *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Urticaceae), popularmente conhecida por brilhantina, é uma planta medicinal, usada como antipirética, purificadora de vesícula e ventre, antidiarréica, antiasmática e para dores de barriga, sem comprovação de seus efeitos farmacológicos e composição fitoquímica. Devido à ausência de informações sobre a composição fitoquímica dessa planta e a importância das propriedades dos compostos fenólicos, o objetivo desse trabalho é realizar a caracterização fitoquímica, quantificar o conteúdo de compostos fenólicos e mensurar a atividade antioxidante total. O resultado da prospecção fitoquímica obtido do extrato bruto etanólico das partes aéreas indicou a presença de açúcares redutores, fenóis, taninos, depsídeos/depsidonas, cumarinas, esteróides e triterpenos. Para a quantificação de compostos fenólicos em unidades de ácido tânico e gálico, foi utilizado o reativo Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio 7,5%, com posterior leitura em espectrofotômetro. Determinou-se que a concentração de compostos fenólicos foi 9,75 equivalentes de ácido tânico e 17,5 equivalentes de ácido gálico. Embora esse resultado seja inferior aos encontrados por outros autores com outras espécies vegetais, não é uma estimativa do conteúdo absoluto de compostos fenólicos, devido a possível variação sazonal na produção e os efeitos podem relacionar-se mais ao tipo de composto presente que a concentração fenólica total. A atividade antioxidante mensurada indicou valores semelhantes ou mesmo superiores aos encontrados para outras espécies vegetais. Esses resultados corroboram com outros estudos que demonstram a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos e a composição fitoquímica pode ser a responsável pela utilização empírica dessa planta por parte da população, para casos de dores de barriga, problemas respiratórios, problemas femininos e ações como antimicrobiana e antipirética.

* Formatação segundo normas da ABNT 2000 (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Palavras-chave: *Pilea microphylla*, composição fitoquímica, quantificação, compostos fenólicos, atividade antioxidante

Abstract

The secondary metabolites are important sources of bioactive compounds for the pharmaceutical industry, including the phenolic compounds. *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Urticaceae), popularly known as brilhantina in Brazil, is used as antipyretic, purifying the bladder, anti-diarrhea, anti-asthma and used for abdominal pain, with no evidence of its pharmacological effects and phytochemical composition. Due to the lack of information on the phytochemical composition of plants and the importance of the properties of phenolic compounds, the aim of this work is to characterize the phytochemical, quantifying the content of phenolic compounds and measuring the total antioxidant activity. The result of phytochemical prospecting obtained from a crude ethanol extract of aerial parts showed the presence of reducing sugars, phenols and tannins, depsides and depsidons, coumarins, steroids and triterpenes. For the quantification of phenolic compounds in units of tannic and gallic acids, we used the Folin-Ciocalteu reagent and sodium carbonate 7.5%, with reading in spectrophotometer. It was determined that the concentration of phenolic compounds was 9.75 tannic acid equivalents and 17.5 gallic acid equivalents, lower than the result found by other authors with other plant species. The antioxidant activity showed values similar or even higher than those found for other plant species. These results corroborate with other studies showing the antioxidant capacity of phenolic compounds and the phytochemical composition may be responsible for the empirical use of this plant by the population, for cases of gripes, respiratory problems, female problems and as antimicrobial and antipyretic actions.

Key words: *Pilea microphylla*, phytochemical composition, quantify, phenolic compounds, antioxidant activity

3.1 Introdução

A fisiologia vegetal pode ser dividida, de acordo com os processos metabólicos responsáveis pela manutenção das plantas, em metabolismo primário, que compreende os processos essenciais ao crescimento e desenvolvimento, como a fotossíntese e a respiração, e metabolismo secundário, cujos produtos garantem vantagens para sobrevivência e perpetuação das espécies nos ecossistemas, possuindo restrita distribuição no reino vegetal. Entretanto, não são processos independentes, uma vez que a origem de todo metabolismo secundário é

proveniente da glicose obtida do primário, sendo derivados ácido chiquímico e acetil-CoA que são os precursores de diversas estruturas de metabólitos secundários (SANTOS, 2004). Estas substâncias são classificadas em alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, fenóis, taninos, cumarinas, catequinas, ligninas e quinonas (Figura 1- ANEXO A).

Apesar da dificuldade em justificar a presença desses compostos na bioquímica dos vegetais, acredita-se que os metabólitos secundários sejam produzidos para o sistema de defesa, por exemplo, contra herbívoros e microrganismos (GURIB-FAKIM, 2006), a proteção contra raios ultravioleta, o estabelecimento em ambientes extremos, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e a participação em processos alelopáticos (LAMBERS et al., 1998; TAIZ; ZEIGER, 2002; HARBORNNE, 1997; SANTOS, 2004). Devido às funções relacionadas à interação entre organismos e resistência para ambientes difíceis, muitos metabólitos secundários biologicamente ativos são de importância comercial (PIETERS; VLIETINCK, 2005).

Nas áreas farmacêutica e médica, muitos tiveram seus efeitos biológicos amplamente estudados, sendo isolados e com importância na terapia médica convencional, como os alcalóides atropina (isolado da *Atropa bella-donna*) usado na oftalmologia e cardiologia, taxol (isolado da *Taxus brevifolia*) usado como anticancerígeno, quinina (isolado da *Cinchona officinalis*) usado no tratamento da malária, dentre outros metabólitos (LAMBERS et al., 1998). Calixto (2000) estima que aproximadamente 25% de toda a medicina moderna deriva direta ou indiretamente de plantas superiores, resultando em 50 mil metabólitos secundários isolados das angiospermas, embora muitos não possuam avaliação com relação ao seu potencial farmacológico (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Somente 5% das mais de 250 mil espécies têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor foi avaliada sob aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Além das funções citadas, os metabólitos secundários também apresentam propriedades antioxidantes, principalmente os compostos fenólicos, classificados por Harborne (1998) e Gurib-Fakim (2006) em taninos, cumarinas, quinonas, flavonóides, ligninas, depsídeos e depsidonas, terpenóides e esteróides, ainda que

Carvalho et al. (2004) não incluem os últimos como compostos fenólicos. Essa propriedade deve-se a sua estrutura química que lhes confere maior eficiência antioxidante *in vitro* que as vitaminas E e C (RICE-EVANS et al., 1997), isto é, são capazes de oxidar as espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas naturalmente durante a cadeia respiratória. Essas espécies são os radicais ânion superóxido (O_2^-), hidroxil (OH^-) e peroxil (ROO^-), oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), compostos altamente reativos que buscam estabilizar sua estrutura química, causando danos às estruturas celulares e envelhecimento do organismo (WILHEM FILHO et al., 2001).

Além de serem produtos do metabolismo do oxigênio, as EROs também podem ser produzidas durante o desenvolvimento de algumas doenças, dentre as quais câncer, diabetes, AIDS, cardiopatias e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (LEE et al., 2003; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; RAO et al., 2007) ou podem ser oriundas de fontes exógenas como a fumaça do tabaco, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Nos vegetais e também nos animais, o acúmulo de EROs faz com que essas moléculas atuem como mensageiros secundários para transdução de sinais, modulando expressão gênica, síntese protéica, inativação enzimática, peroxidação lipídica e degradação de ácidos nucleicos, o que contribui para a morte celular como parte da resposta de defesa ou atue diretamente sobre os patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2002; HONG-BO et al., 2008).

Dentre os vegetais que são usados para fins medicinais, sem que tenham sido realizados estudos sobre seus componentes, tem-se a *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Urticaceae), popularmente conhecida por brilhantina. Essa espécie é usada como antipirética (BEYRA et al., 2004), purificadora de vesícula e ventre e inflamação (LANS, 2006; 2007), diarreia e asma (MITCHELL; AHMAD, 2006), para dores de barriga (RODRIGUES; GUEDES, 2006) e de cabeça (CHIFUNDERA, 2001; PINTO et al., 2006) e apresentou atividade positiva contra *Staphylococcus aureus* (FACEY et al., 1999). Lans (2006; 2007) e Rodrigues e Guedes (2006) afirmam que não há informações sobre a composição fitoquímica dessa planta e devido a isso e importância das propriedades dos compostos fenólicos, o objetivo desse trabalho é

realizar a caracterização fitoquímica e avaliar a atividade antioxidante total, quantificando o conteúdo de compostos fenólicos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta do Material Botânico

Partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm. foram coletadas no Horto Florestal Arthur Dias Martins, da Prefeitura Municipal de Vitória, ES, Brasil. Exsicata do material foi confeccionada e encontra-se sob registro 15399 no herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, Brasil.

3.2.2 Preparo do Extrato Bruto Etanólico (EBE)

As partes aéreas foram submetidas à secagem em estufa artesanal, e após completamente secas, foram pulverizadas, utilizando-se um moedor elétrico. O material vegetal pulverizado foi submetido a uma extração por maceração em um período de 8 dias, com álcool etílico PA (quantidade necessária para cobrir todo o material vegetal), e após eliminação do solvente através de evaporador rotativo, obteve-se o extrato bruto etanólico (EBE). A determinação da massa seca foi obtida pelo aquecimento do extrato (100 mg) em placa aquecedora, buscando-se evaporar o restante da água presente no material vegetal fresco e do solvente utilizado, seguido por pesagens sucessivas do material aquecido até que o valor observado não se alterasse por três vezes consecutivas. A partir desse procedimento, obteve-se que em 100 mg de extrato fresco, foram encontrados 36,8 mg de massa seca. A concentração de extrato utilizada neste estudo foi baseada nessa massa seca obtida.

3.2.3 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada buscando-se verificar alteração de coloração ou formação de precipitado como resposta de resultado positivo. Para isso, utilizaram-se alíquotas do EBE para detecção dos seguintes grupos dos metabólitos secundários dos vegetais: saponina espumídica, açúcares redutores,

polissacarídeos, proteínas/aminoácidos, fenóis/taninos, flavonóides, alcalóides, depsídeos/depsidonas, cumarinas, e triterpenos/esteróides (BARBOSA, 2001).

3.2.3.1 Saponina Espumídica

Uma alíquota do EBE foi solubilizada em 5 mL de água destilada. Em seguida, diluiu-se para 15 mL e agitou-se vigorosamente durante 2 minutos em tubo fechado.

3.2.3.2 Açúcares Redutores

Solubilizou-se uma alíquota do EBE em 5 mL de água destilada e filtrou-se. Adicionaram-se 2 mL do reativo de FEHLING A e 2 mL do reativo de FEHLING B. Aqueceu-se em banho-maria em ebulição durante 5 minutos.

3.2.3.3 Polissacarídeos

Solubilizou-se uma alíquota do EBE em 5 mL de água destilada, filtrou-se e adicionaram-se 2 gotas de lugol.

3.2.3.4 Proteínas e Aminoácidos

Solubilizou-se uma alíquota do EBE em 3 mL de água destilada, filtrou-se e adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de Nihidrina a 1%, sendo aquecido até a ebulição.

3.2.3.5 Fenóis e Taninos

Solubilizou-se uma alíquota de EBE em 5 mL de água destilada, filtrou-se e adicionaram-se 2 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%.

3.2.3.6 Flavonóides- Reação de Shinoda

Solubilizou-se uma alíquota do EBE, em 10 mL de metanol, filtrou-se e adicionaram-se 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio.

3.2.3.7 Alcalóides

Solubilizou-se uma alíquota do extrato seco em 5mL de solução de HCl a 5%, filtrou-se, separando-se 4 porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionaram-se gotas dos reativos de Bouchardat, Dragendorff, Mayer e Bertrand.

3.2.3.8 Depsídeos e Depsidonas

Solubilizou-se uma alíquota do extrato seco em 5 mL de éter etílico, filtrou-se e evaporou-se todo o éter em banho-maria. Juntaram-se ao resíduo 3 mL de metanol, agitou-se e adicionaram-se 3 gotas de solução de FeCl_3 a 1%.

3.2.3.9 Derivados de Cumarina

Solubilizou-se uma alíquota do extrato seco em 5 mL de éter etílico, concentrando-se em banho-maria até 0,5 mL. Em papel filtro, foram colocadas gotas da solução etérea, a qual se aplicou uma gota de solução de NaOH 1N para análise sob luz ultravioleta.

3.2.3.10 Esteróides e Triterpenóides- Reação de Liebermann-Burchard

Solubilizou-se uma alíquota do extrato seco em 10 mL de clorofórmio. Filtrou-se sobre carvão ativado e transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético, agitou-se suavemente e, em seguida, adicionaram-se 3 gotas de H_2SO_4 concentrado, sendo novamente agitado.

3.2.4 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais por Método Espectrofotométrico

Determinou-se a concentração de compostos fenólicos totais das partes aéreas de *Pilea microphylla* de acordo com a metodologia utilizada por Dores (2007), em equivalentes de ácidos tânico e gálico (mg de ácido/g de EBE), com algumas modificações.

Para estabelecer as curvas padrão de compostos fenólicos, foram usados os ácidos tânico e gálico como substâncias padrão. Pesaram-se 10 mg dos ácidos e diluí-se em 100 mL de metanol, obtendo-se uma solução de concentração 0,1 mg/mL (ou 100 µg/mL) para cada ácido. Dessas soluções, retiraram-se alíquotas de 25 µL a 300 µL, as quais foram adicionados 1175 µL a 900 µL do reativo Folin-Ciocalteu (1:10) e 800 µL de carbonato de sódio 7,5% (p/v). Homogenizou-se, permanecendo em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro em 760 nm. O resultado foi expresso, portanto, em equivalentes de ácidos (mg de ácido tânico/g do EBE e mg de ácido gálico/g de EBE).

Após estabelecer que em 100 mg de massa fresca do EBE continha 36,8 mg de massa seca, foi preparada uma solução metanólica de 200 µg/mL do EBE. Retiraram-se 200 µL desse extrato metanólico, aos quais foram adicionados 1000 µL do reativo Folin-Ciocalteu e 800 µL de carbonato de sódio 7,5% (p/v). Homogenizou-se, permanecendo em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro em 760 nm.

3.2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante Total por Método Espectrofotométrico

Determinou-se a atividade antioxidante das partes aéreas de *Pilea microphylla* de acordo com a metodologia utilizada por Negri (2007) e Prieto et al. (1999), com algumas modificações.

Da amostra do EBE na concentração 200 µg/mL solubilizado em água foi retirada uma alíquota de 300 µL, a qual foram acrescentados 3000 µL do reativo fosfomolibdênico (molibdato de amônio 4 mM, fosfato sódico tribásico 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). O branco era constituído de 300 µL água e 3000 µL do reativo. Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Resfriado e realizado a leitura em espectrofotômetro UV a 695 nm, zerando o aparelho com água. As substâncias referências foram ácido ascórbico (AA) e rutina a 200 µg/mL.

Por esse método, os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR% (ácido ascórbico) e AAR% (rutina)) e os cálculos estabelecidos através das seguintes equações (BALESTRIN, 2006; NEGRI, 2007):

$$\text{AAR \% (ácido ascórbico)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{ácido ascórbico}} - \text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100$$

$$\text{AAR \% (rutina)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{rutina}} - \text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100$$

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Prospecção Fitoquímica

A pesquisa fitoquímica visa conhecer os constituintes químicos presentes em vegetais. Assim, quando não existem dados sobre uma espécie de interesse, sugere-se que uma análise fitoquímica preliminar possa indicar os grupos de metabólitos presentes (FALKENBERG et al., 2004). O resultado da prospecção fitoquímica do EBE das partes aéreas da brilhantina (Tabela 1) indicou a presença de açúcares redutores, fenóis, taninos, depsídeos/depsidonas, cumarinas, esteróides e triterpenos. Exceto esteróides/triterpenos, os grupos de metabólitos presentes no EBE da brilhantina são classificados como compostos fenólicos (Figura 1- ANEXO A), de acordo com Carvalho et al. (2004).

Tabela 1: Resultado da prospecção fitoquímica do EBE de *Pilea microphylla* (L.) Liebm.

Grupos Avaliados	Resultado Positivo	Resultado Observado
Saponina espumídica	Camada de espuma por mais de ½ hora.	Negativo
Açúcares redutores	Formação de precipitado vermelho.	Positivo
Polissacarídeos	Aparecimento de coloração azul.	Negativo
Proteínas/aminoácidos	Aparecimento de coloração violeta persistente.	Negativo
Fenóis/taninos	Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado.	Positivo
Flavonóides	Surgimento de uma coloração rósea.	Negativo
Alcalóides	Formação de precipitado.	Negativo
Depsídeos/depsidonas	Aparecimento de coloração verde, azul ou cinza.	Positivo
Cumarinas	Fluorescência azul na parte exposta da mancha.	Positivo
Esteróides/triterpenos	Desenvolvimento de cores, que vão do azul ao verde persistente.	Positivo

A maioria dos compostos fenólicos são geralmente tóxicos à vida. A fitotoxicidade não ocorre nas plantas devido à conjugação com açúcares, sulfatos, ou ambos e há o armazenamento sob formas solúveis em vacúolos (HARBORNNE, 1997). Ecologicamente, os compostos fenólicos são produzidos para defesa contra herbivoria, atração para polinizadores, interação hormonal, fitoalexinas de defesa, interação alelopática, dentre outros (HARBORNNE, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2002). Para esses tipos de ações protetoras, muitos compostos fenólicos podem apresentar efeito mutagênico por atuarem como “venenos” da DNA-topoisomerase, enzima que realiza quebras no DNA para distorcer a cadeia importante para os processos de replicação, transcrição, recombinação, segregação e condensação do DNA, reparando possíveis mutações, sendo que tal efeito interfere no processo de religação da dupla cadeia e induz estresse oxidativo (FERGUSON, 2001). Esse efeito pode ser maléfico em casos de uso indiscriminado dessas substâncias, entretanto, a inibição da DNA-topoisomerase pode também atuar impedindo a proliferação descontrolada de células tumorais (NEUKAM et al., 2008). Outros

compostos, ao contrário, apresentam atividade antioxidante por seqüestrarem as EROs e que pode ser a responsável por atuarem indiretamente como agentes anticâncer (FERGUSON, 2001; SALEEM et al., 2002; SINGH et al., 2007).

Dentre os fenólicos encontrados no EBE da *Pilea microphylla*, os taninos apresentam propriedade adstringente devido à formação de um complexo insolúvel com proteínas, tornando as plantas que os possuem, como a goiaba (*Psidium guajava* (L.)), impalatáveis para potenciais herbívoros (HARBORNNE, 1997). Farmacologicamente, esses compostos apresentam atividades anticâncer, anti-HIV, anti-HSV 1 (JASSIM; NAJI, 2003; GURIB-FAKIM, 2006; NEUKAM et al., 2008), antiulcerogênica e antioxidantes (CARVALHO, 2006) e não foram responsáveis em promover alterações cromossômicas em células de medula óssea de ratos Wistar tratados com infusão de goiaba (TEIXEIRA et al., 2003). Apesar disso, não se pode afirmar a total ausência da toxicidade desse composto, tendo em vista que Labieniec e Gabryelac (2003) citam que taninos podem promover o crescimento de células tumorais. Ou seja, existem casos em que danos ao DNA induzidos por EROs são inibidos por baixas concentrações de compostos fenólicos, enquanto altas concentrações dos mesmos podem causar danos ao DNA (JOHNSON; LOO, 2000). Outras propriedades dos taninos são antidiarréica, antireumática, antihemorrágico, hipotensora arterial, antibactericida, antifúngica, moluscida, tratamento de queimaduras, feridas, problemas renais e estomacais (SANTOS; MELLO, 2004).

Os depsídeos e as depsidonas são substâncias fenólicas, obtidos a partir de acetil-CoA (HARBORNNE, 1998). Essa via é responsável por produzir o ácido hidroxibenzóico, que ao formar ésteres de duas ou mais subunidades, origina os depsídeos, sendo estes os precursores para a formação de depsidonas (CARRAZONI, 2003). São substâncias comuns em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville) (MACEDO et al., 2007) e *Cladonia sprucey*, um líquen (CARRAZONI, 2003). Terapeuticamente, esses grupos têm sido reconhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes, antivirais, antitumorais, analgésicas e antipiréticas (MACEDO et al., 2007).

As cumarinas são produzidas nos vegetais em resposta a estresses bióticos e abióticos, como deficiência nutricional e ataques de insetos ou inoculação de fungos

(KUSTER; ROCHA, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Essas substâncias também estão presentes no guaco (*Mikania laevigata*) e foram as responsáveis por reduzir os efeitos sobre a secreção gástrica, diminuição do trânsito intestinal de forma semelhante à atropina, o que confirma a atividade sobre o sistema nervoso parassimpático (CARVALHO, 2006). Esse autor cita que essa inibição do parassimpático pode também justificar o uso do guaco nos distúrbios respiratórios, por diminuição da secreção e relaxamento bronquial, o que se correlaciona às propriedades atribuídas à brilhantina e também a outras espécies da família Urticaceae, como *Urtica dioica* e *Parietaria diffusa* (MANGANELLI et al., 2005), por exemplo. As cumarinas estão presentes em várias famílias de plantas e, entre diversos efeitos, possuem também ações antiespasmódicas e vasodilatadoras (KUSTER; ROCHA, 2004) e são capazes de atuar em DNA, bloquear a síntese de RNA do vírus de HIV (JASSIM, NAJI, 2003).

Os triterpenos são constituídos por 6 unidades de isopreno e são a maioria dos tipos de terpenóides produzidos pelas plantas. Apresentam várias atividades ecológicas incluindo toxicidade a mamíferos (cardenólídeos), moluscida, sabor amargo (curcubitacinas, quassinóides) e interferência hormonal em insetos (fitoecdisonas) (HARBORNNE, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2002). Outros tipos de terpenóides produzidos pelas plantas apresentam funções ligadas ao crescimento e desenvolvimento, isto é, metabolismo primário, como o fitohormônio giberilina (diterpeno), os carotenóides (tetraterpenos) que são pigmentos acessórios da fotossíntese, conferem fotoproteção ao aparato fotossintético e são precursores do fitohormônio ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2002). Farmacologicamente, essas substâncias são responsáveis por inibir a síntese de DNA viral por meio de mecanismos envolvendo membranas, o que os torna potenciais fontes de remédios anti-HSV e anti-HIV (JASSIM; NAJI, 2003).

Os esteróides são derivados de triterpenos e compõem membranas celulares, sendo estabilizados pela interação com fosfolipídeos (TAIZ; ZEIGER, 2002). Na área terapêutica, as substâncias esteroidais possuem relação com os hormônios sexuais, compondo pílulas anticoncepcionais, o que pode ser a razão da utilização de folhas de *Cleome nutidosperma* por mães para o balanço hormonal (EDEOGA et al., 2005) e *Pipturus argenteus* para induzir a esterilidade (BOURDY; WALTER, 1992), ambas

da família Urticaceae, assim como a *Pilea microphylla* para problemas reprodutivos femininos (LANS, 2007).

3.3.2 Quantificação de Compostos Fenólicos

Por causa da presença de diversos compostos fenólicos no EBE detectados por algumas reações qualitativas específicas, foi realizada a quantificação total desses constituintes por método espectrofotométrico. Esse método consiste na mudança de coloração da amostra quando se adicionam o reativo Folin-Ciocalteu e o carbonato de sódio. Em presença de compostos fenólicos, esse reativo muda sua coloração de amarela para azul, em função da redução do complexo tungstânico/molibdênico por compostos fenólicos, sendo a intensidade da coloração azul proporcional aos compostos fenólicos da amostra, independente das estruturas destes (BORA et al., 2005; SOUSA et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008).

Utilizando-se a equação da curva padrão de ácido tânico obtido pela média das absorvâncias ($y=0,2195x + 0,2087$, $R^2=0,9846$), determinou-se que a concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido tânico foi 9,75 (mg de ácido tânico/g de EBE). Pela curva padrão de ácido gálico ($y=0,1673x + 0,0483$, $R^2=0,9861$), obteve-se a concentração 17,5 equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de EBE). Comparando-se os dois tipos de ácidos, verifica-se que o teste utilizando ácido gálico é mais sensível que o ácido tânico, pelo fato de mensurar uma maior quantidade de compostos fenólicos que o outro ácido e pode, portanto, ser uma estimativa mais demonstrativa.

Para ambos equivalentes, as concentrações obtidas do EBE são inferiores as encontradas por outros autores com outras espécies de plantas medicinais, independente do tipo de substância usada como padrão (KUMAZAWA et al., 2002; PAREJO et al., 2003; MILIAUSKAS et al., 2004; ANDRADE et al., 2007; PAIXÃO et al., 2007; SOUSA et al., 2007) ou mesmo ao encontrado por Dôres (2007) com flores, frutos e folhas de vários cultivares de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) e preparações homeopáticas com ácido tânico. Todavia, não é possível afirmar que a *Pilea microphylla* contenha poucos compostos fenólicos, uma vez que pode ocorrer uma variação sazonal no conteúdo, de acordo com a época do ano ou das

condições de cultivo, semelhante ao que aconteceu com os taninos presentes em cascas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Cov. e *S. polyphyllum* (Mart.)) analisado por Santos et al. (2006). Além disso, é difícil estimar o seu valor quantitativo nos tecidos das plantas de modo absoluto, haja vista a grande diversidade de processos metabólicos na formação de substâncias fenólicas (DÔRES, 2007). Ainda assim, a possibilidade de encontrar efeitos farmacológicos provenientes dos compostos fenólicos não pode ser descartada, já que esses efeitos relacionam-se mais ao tipo de composto presente que a concentração fenólica total.

3.3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante Total por Método Espectrofotométrico

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante, baseado ou nos princípios da reação de transferência de átomo hidrogênio (próton e elétron) e na transferência de elétron ou na atividade antioxidante da planta/substância em relação à redução de um radical, como o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (HUANG et al., 2005). Um exemplo para o primeiro caso é o método de complexação pelo fosfomolibdênio que é uma maneira simples para avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas e suas frações. Este método, descrito por Prieto et al. (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente. Esse complexo possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (BALESTRIN, 2006), sendo mais intensa quando maior for a atividade antioxidante da amostra (BORA et al., 2005).

Pela fórmula relativa à rutina (AAR_{rutina}), obteve-se uma atividade antioxidante 383,42% do EBE na concentração 200 µg/mL. Balestrin (2006) também obteve elevada atividade antioxidante da fração clorofórmio de *Dorstenia multiformis* na concentração 200 µg/mL (AAR_{rutina} 106,90%), sendo o extrato bruto obtido dessa espécie indicou 65,30% AAR_{rutina} . Considerando-se o ácido ascórbico como atividade antioxidante de 100% e utilizando-se a fórmula relativa a ele ($AAR_{ácido\ ascórbico}$), obteve-se uma atividade antioxidante do EBE da brilhantina de 78,60%, valor

superior ao obtido por Balestrin (2006), que foi 21,21% para o extrato bruto e 34,39% para a fração clorofórmio. Essa espécie pertencente à família Moraceae é classificada por Cronquist (1988) no mesmo ramo evolutivo que a família Urticaceae, o que pode explicar o resultado da atividade antioxidante apresentado por essas duas espécies.

Ajustando-se os valores obtidos à metodologia utilizada por Bora et al. (2005), obtém-se que o EBE da brilhantina apresentou atividade antioxidante de 79,09%, superior ao que seria obtido para o padrão rutina (22,34%). Esse resultado é superior aos valores obtidos para o extrato bruto e as frações avaliadas (hexano, diclorometano e acetato de etila) de *Dicksonia sellowiana*. Negri (2007) também utilizou o método com fosfomolibdênio para verificar a atividade antioxidante de folhas de *Maytenus ilicifolia* submetidas a diferentes temperaturas de secagem. Essa autora obteve valores que variaram de 28,93 a 36,99% e 24,93% para folhas submetidas a diferentes temperaturas e rutina, respectivamente.

Os resultados apresentados no presente estudo corroboram aos resultados obtidos por Prabhakar et al. (2007) que utilizaram a *Pilea microphylla* para avaliar os efeitos antioxidantes e radioprotetores do extrato etanólico. Nesse estudo, também foi realizado a avaliação da atividade antioxidante total com complexo fosfomolibdênico, além das reações com os radicais DPPH e ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Como conclusão, esses autores obtiveram que o extrato apresentou habilidade de seqüestrar radicais livres gerados por radiações, garantindo 80% de proteção, além de reduzir a depleção de enzimas envolvidas no mecanismo de radioproteção.

A presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante pode neutralizar os efeitos das EROs produzidas pelo estresse oxidativo durante tratamentos quimioterápicos, uma vez que nessa condição há depleção dos antioxidantes celulares. Com isso, podem aumentar a eficiência da quimioterapia pela redução da citotoxicidade, atuando não somente com suas propriedades antioxidantes, como também pela inibição da DNA-topoisomerase ou tirosina sintase (CONKLIN, 2000).

Apesar da atividade antioxidante ser obtida pela comparação entre uma substância isolada (ácido ascórbico e rutina) e um extrato composto por diversos tipos de substâncias (o que potencializa a atividade antioxidante), não se pode descartar a capacidade antioxidante apresentado por essa planta. Esse resultado a torna objeto de estudo para investigações acerca da sua composição e conseqüente atividade antioxidante utilizando outros tipos de testes e frações, principalmente pelo fato de amostra em 200 µg/mL indicar uma baixa concentração de compostos fenólicos totais.

3.4 Conclusões

A caracterização fitoquímica de *Pilea microphylla* indicou a presença de depsídeos/depsídonas, fenóis/taninos, cumarinas e esteróides/triterpenos, cujas propriedades já estudadas em outras espécies corroboram com a utilização empírica dessa planta por parte da população. Em situações como dores de barriga, possivelmente causados por alguns nematóides ou microrganismos, pode haver atuação de compostos com atividade antimicrobiana, como os taninos, assim como a ação antipirética pode ser pela presença, entre outros, de depsídeos e depsídonas. Além disso, a presença de cumarinas pode ser a responsável também pela utilização de preparados caseiros da brilhantina para problemas respiratórios, devido a sua atuação no Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático, ou mesmo a presença de esteróides ser relacionada à utilização em casos de problemas femininos citados para esta planta ou outras da família Urticaceae. A baixa concentração de compostos fenólicos não pode inviabilizar o uso dessa planta como fonte de substâncias antioxidantes, tendo em vista a possibilidade de encontrar efeitos farmacológicos relacionados ao tipo de compostos presentes e a presença de outros metabólitos com ações já estudadas. Além disso, sugere modificações no meio de cultivo, visando aumentar a produção de tais substâncias, e a realização de mais estudos sobre os compostos fenólicos presentes na *Pilea microphylla*, substâncias estas que podem ser, pelo menos em parte, responsáveis pela atividade antioxidante, o que faz do extrato uma possibilidade de aplicação na terapêutica e de separação de potenciais ativos.

3.5 Referências

- ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 17, n 2, p 231-235, 2007.
- BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae**. 2006. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006
- BARBOSA, W. L. R. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2001.
- BEYRA, A. B., LÉON, M. C., IGLESIAS, E., FERRÁNDIZ, D., HERRERA, R., VOLPATO, G., GODÍNEZ, D., GUIMARAIS, M., ÁLVARES, R. Estudos etnobotânicos sobre plantas medicinales em la provincia de Camagüey (Cuba). **Anales Del Jardim Botánico de Madrid**, v 61, n 2, p185-204, 2004.
- BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSONIACEAE. **Visão Acadêmica**, v 6, n 2, p 6-16, 2005.
- BOURDY, G.; WALTER, A. Maternity and medicinal plants in Vanuatu I. The cycle of reproduction. **Journal of Ethnopharmacology**, v 37p 179-196, 1992
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v 33, p179-189, 2000.
- CARRAZONI, E. D. Estudo químico de líquens VIII: isolamento dos constituintes da *Cladonia sprucey*. **Revista Química e Tecnologia**, n 1, p 32- 34, 2003.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 519-536.
- CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, v 7, p 1-18, 2006
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v 21, n 1, p 99-105, 1998.

CHIFUNDERA, K. Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. **Fitoterapia**, v 72, p 351-368, 2001.

CONKLIN, K. A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutrition and Cancer**, v 37, n 1, p 1-18, 2000.

CRONQUIST, A. **The evaluation and classification of flowering plants**. 2. ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v 5, n 1, p 33-40, 2004.

DÔRES, R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica de fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)** 2007. 396 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

EDEOGA, H.O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B.O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v 4, n 7, p 685-688, 2005.

FACEY, P. C.; PASCOE, K. O; PORTER, R. B.; JONES, A. D. Investigation of Plants used in Jamaican Folk Medicine for Anti-bacterial Activity. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v 51, p 1555-1560, 1999.

FALKENBERG, M. B. ; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 229-246.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v 475, p 89–111, 2001.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v 27, p 1-93, 2006.

HARBORNNE, J. B. Plant secondary metabolism. In: CRAWLEY, M. J. **Plant Ecology**. 2 ed. Malden: Blackwell, 1997, p 132- 155.

_____. **Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1998.

HONG-BO, S.; LI-YE, C.; MING-AN, S.; JALEEL, C. A.; HONG-MEI, M. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. **C. R. Biologies**, v 331, p 433–441, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 53, p 1841–1856, 2005

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v 95, p 412–427, 2003.

JOHNSON, M. K.; LOO, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research**, v 459, p 211–218, 2000.

KUMAZAWA, S.; TANIGUCHI, M.; SUZUKI, Y.; SHIMURA, M.; KWON, M.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 50, p 3733–3737, 2002

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 537- 556.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. **Mutation Research**, v 539, p 127–135, 2003.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F., S.; PONS, T., L. **Plant Physiological Ecology**. New York: Springer, 1998.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 2, n 45, p 1-12. 2006.

_____. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 3, n 13, p 1-11, 2007.

LEE, S. E.; HWANG, H. J.; HA, J. S.; JEONG, H. S.; KIM, J. H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences**, v 73, p 167–179, 2003.

MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. Triagem Fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, v 5, n 2, p 1166-1168, 2007.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v 613, p1–19, 2008.

MANGANELLI, R. E. U.; ZACCARO, L.; TOMEI, P. E. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v 98, p 323–327, 2005.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v 85, p 231–237, 2004.

MITCHELL, S. A.; AHMAD, M. H. A review of medicinal plant research at the University of West Indies, Jamaica, 1948-2001. **West Indian Medicinal Journal**, v 55, n 4, p 243-269, 2006.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v 24, n 1, p 105-111, 2001.

NEGRI, M. L. S. **Secagem das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos.** 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NEUKAM, K.; PASTOR, N.; CORTÉS, F. Tea flavanols inhibit cell growth and DNA topoisomerase II activity and induce endoreduplication in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v 654, p 8–12, 2008.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. **Food Chemistry**, v 105, p 204–214, 2007.

PAREJO, I., VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v 73, p 1667–1681, 2003.

PIETERS, L., VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v 100, p 57–60, 2005.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v 20, n 4, p 751-762, 2006.

PRABHAKAR, K.R.; VEERAPUR, V.P.; BANSAL, P.; PARIHAR, V. K.; KANDADI, M. R.; KUMAR, P. B.; PRIYADARSINI, K.I.; UNNIKRISHNAN, M.K. Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of *Pilea microphylla* (L.) ethanolic extract. **Chemico-Biological Interactions**, v 165 p 22–32, 2007.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v 269, p 337–341, 1999.

RAO, Y. K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v 45, p 1770–1776, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v 2, n 4, p 152-159, 1997.

RODRIGUES, A.C.C., GUEDES, M.L.S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 8, n 2, p 1-7, 2006.

SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HÄRKÖNEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v 81, p 327-336, 2002.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 403-434.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C.P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 615-656.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; BATISTA, F.; SANTOS, L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 16, n 4, p 552-556, 2006.

SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. **Food and Chemical Toxicology**, v 45, p 1216–1223, 2007.

SOUSA, C.M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v 30, n 2, p 351-355, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. L. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v 26, n 4, p 551-555, 2003.

WILHEM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais: sob a óptica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p 317- 334.

4 Artigo 2*

AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS EFEITOS TÓXICO, MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Urticaceae) EM CAMUNDONGOS

GOMES, T. D. U. H.^{a*}; ANDRADE, M. A.^b; BATITUCCI, M. C. P.^a

^a Laboratório de Genética Vegetal e Produtos Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, n 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil

^b Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, n 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil

* autor para correspondência: tarsilagomes@yahoo.com.br

Resumo

Pilea microphylla (L.) Liebm. (Urticaceae), popularmente conhecida como brilhantina é uma planta medicinal nativa de regiões tropicais úmidas, empregada na medicina popular como antipirética, purificadora de ventre e vesícula, em casos de diarreia, asma, inflamação e dores abdominais. Entretanto, devido à ausência de dados sobre essa planta, objetivou-se avaliar o seu possível efeito tóxico usando extrato bruto etanólico da parte aérea, determinando a toxicidade aguda, por meio da dose letal média (DL₅₀), a mutagenicidade e a antimutagenicidade (pré-tratamento, pós-tratamento e tratamento simultâneo), pelo teste do micronúcleo nos sistemas medula óssea e sangue periférico de camundongos. Os resultados indicaram a ausência de toxicidade aguda entre as doses avaliadas, mas houve uma tendência de efeito mutagênico sem diferenças entre as doses, quando comparado aos controles em ambos os sistemas avaliados. Para antimutagenicidade, obteve-se um aumento na frequência de micronúcleos em medula nos grupos pré-tratamento e tratamento simultâneo, indicando a ausência do efeito antimutagênico do EBE da brilhantina nas condições testadas. Somente o pós-tratamento apresentou redução significativa na frequência de micronúcleos em relação ao controle positivo. A redução da frequência de micronúcleos em sangue periférico de ambos os testes pode ser relacionada a uma tendência do extrato em causar citotoxicidade em uso crônico, atribuído aos constituintes da planta ou à interação dos mesmos. Tais resultados sugerem a necessidade de realização de outros ensaios, para esclarecer quais e como estão envolvidos os constituintes da planta na produção dos danos ao DNA.

Palavras-chave: *Pilea microphylla*, DL₅₀, mutagenicidade, camundongos, micronúcleo

* Formatação segundo normas da ABNT 2000 (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Abstract

Pilea microphylla (L.) Liebm. (Urticaceae), popularly known as brilhantina is a medicinal plant native to humid tropical regions, used in folk medicine as antipyretic, purifying the womb and bladder in cases of diarrhea, asthma, inflammation and abdominal pain. However, due to lack of data on this plant, aimed to assess its possible toxic effect using a crude ethanol extract of the aerial part, determining the toxicity through median lethal dose (LD₅₀), mutagenicity and antimutagenicity (pre – treatment, post-treatment and simultaneous treatment) by the micronucleus test in cells of bone marrow and peripheral blood of mice. The results indicated the absence of acute toxicity, but there was mutagenic effect with no differences between doses, when compared to controls. For antimutagenicity, there was an increase in the frequency of EPCMNs in bone marrow in the pre-treatment and simultaneous treatment groups, indicating the absence of the antimutagenic effect of the CEE in tested conditions. Just the post-treatment showed significant reduction in the frequency of MNPCEs on CP. The reduction in micronucleus frequency in peripheral blood for both experiments may be related to a tendency of the extract in causing cytotoxicity in chronic use and should be attributed to the constituents of the plant or the interaction of the same. These results suggest the necessity to do other tests and to clarify what constituents are involved and how the one may cause damage to.

Key words: *Pilea microphylla*, LD₅₀, mutagenicity, mice, micronuclei

4.1 Introdução

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Assim, como há um crescimento da procura por medicamentos naturais, acredita-se na crença popular de ausência de efeitos colaterais ou tóxicos, negligenciando ou mesmo ignorando tais efeitos (STOPPER et al., 2005; FERRO, 2006; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Devido a isso, a população somente tem condições de reconhecer sintomas e sinais agudos muito evidentes de toxicidade, como alergias, convulsões e diarreia. Situações mais sutis, como toxicidade tardia, dificilmente são detectadas ou identificadas como efeitos colaterais causados pelo uso prolongado de plantas medicinais, o que algumas vezes não é informado aos profissionais de saúde. Mesmo no caso de serem detectadas, não existem programas de vigilância bem estabelecidos na maioria dos países não desenvolvidos, como o Brasil (RATES, 2001; VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Outra vertente da utilização de plantas como opção de tratamento é a busca por substâncias que atuem como agentes antimutagênicos, tendo em vista o crescimento de casos de câncer na população mundial como resposta à poluição, ao consumo de tabaco, às exposições a outros tipos de substâncias xenobióticas (externas ao organismo e capazes de provocar danos ao material genético) ou mesmo mutações que desencadeiem doenças degenerativas, problemas cardíacos e envelhecimento (CASTRO et al., 2004). Somando-se a isso, o uso de quimioterápicos sintéticos causa muitos efeitos colaterais, o que os torna mais perigosos que as doenças que objetivam curar (SANNOMIYA et al., 2007), e justifica a pesquisa por compostos bioativos derivados de plantas capazes de reduzir a toxicidade de drogas sintéticas e aumentar do benefício clínico dos pacientes (SANTOS; ELISABETSKY, 1999). Diversos estudos foram conduzidos com extratos de plantas em modelos *in vivo* e *in vitro* visando reduzir efeitos mutagênicos induzidos por substâncias citotóxicas utilizadas na quimioterapia, tais como a ciclofosfamida (MELO et al., 2001; PEREZ-CARREÓN et al., 2002; ANDRADE et al., 2008; SILVA et al., 2008).

O teste de mutagenicidade em camundongos pode ser realizado utilizando a medula óssea e o sangue periférico, correspondendo a uns dos melhores testes citogenéticos *in vivo* da genética toxicológica (FENECH, 2000). Embora o teste de micronúcleos em medula e sangue periférico seja definido como mutagenicidade, não é possível saber quais são os tipos de mutações decorrentes e quais os genes afetados, uma vez que ao administrar potenciais substâncias tóxicas, avaliam-se os danos nos cromossomos, causados por agentes aneugênicos ou clastogênicos, isto é, que induzem segregação anormal ou quebram cromossomos, respectivamente (ALMEIDA NETO et al., 2005). Apesar dessa deficiência do teste, as mutações que causam quebras no DNA podem ser prejudiciais aos organismos, uma vez que essas alterações genéticas são precursoras para doenças degenerativas, problemas cardíacos, envelhecimento e carcinogênese (FENECH, 2000; CASTRO et al., 2004; CARIÑO-CORTES et al., 2007). Pelo mesmo teste de micronúcleos, é possível avaliar compostos com potencial antimutagênico, pela prevenção ou correção dos danos ao material genético, o que pode fornecer informações para redução do risco de cânceres em humanos (DEARFIELD et al., 2002; ANDRADE et al., 2008).

A *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Urticaceae), popularmente conhecida por brilhantina no Brasil, é citada para dores de cabeça (CHIFUNDERA, 2001; PINTO et al., 2006), como antipirética (BEYRA et al., 2004), usada em casos de diarreia e asma (MITCHELL; AHMAD, 2006) e com atividade positiva contra *Staphylococcus aureus* (FACEY et al., 1999), purificadora de vesícula (LANS, 2006), para inflamação e como purificadora de ventre em casos de problemas reprodutivos (LANS, 2007), dores de barriga (RODRIGUES; GUEDES, 2006) e, entretanto, devido à ausência de dados fitoquímicos e farmacológicos, Lans (2006; 2007) e Rodrigues e Guedes (2006) reforçam a necessidade de estudos. Devido a essa ausência de informações sobre *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Urticaceae), o objetivo desse trabalho é avaliar os possíveis efeitos de toxicidade aguda, mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato bruto etanólico dessa planta por meio do teste de micronúcleo em camundongos.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta do Material Botânico

Partes aéreas de *Pilea microphylla* (L.) Liebm. foram coletadas no Horto Florestal Arthur Dias Martins, da Prefeitura Municipal de Vitória, ES, Brasil. Exsicata do material foi confeccionada e encontra-se sob registro 15399 no herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, Brasil.

4.2.2 Preparo do Extrato Bruto Etanólico (EBE)

As partes aéreas foram submetidas à secagem em artesanal, e após completamente secas, foram pulverizadas, utilizando-se um moedor elétrico. O material vegetal pulverizado foi submetido a uma extração por maceração em um período de 8 dias, com álcool etílico (quantidade necessária para cobrir todo o material vegetal), e após eliminação do solvente através de evaporador rotativo, obteve-se o extrato bruto etanólico (EBE). A determinação da massa seca foi obtida pelo aquecimento do extrato (100 mg) buscando-se evaporar o restante da água presente no material vegetal fresco e do solvente utilizado, seguido por pesagens sucessivas do material

aquecido até que o valor observado não se alterasse por três vezes consecutivas. A partir desse procedimento, obteve-se que em 100 mg de extrato fresco, foram encontrados 36,8 mg de massa seca. As doses de extrato utilizadas neste estudo foram baseadas na massa seca obtida, solubilizando-o em água destilada e Cremophor (em quantidade necessária para total solubilização).

4.2.3 Animais

Foram usados camundongos Swiss (25-45g), obtidos no Biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES. Os animais foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 h. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética da UFES.

4.2.4 Estabelecimento da Dose Letal Média (DL₅₀): Teste de Toxicidade Aguda

Para estabelecimento da dose letal média (DL₅₀) foram usados camundongos divididos em grupos experimentais (n=10) e tratados com o EBE, em diferentes doses (1 000 mg/Kg, 500 mg/Kg, 250 mg/Kg, 100 mg/Kg, 50 mg/Kg), por via intraperitoneal (*v.i.*), em delineamento inteiramente casualizado. Os volumes administrados das doses e da solução salina foram proporcionais à massa corpórea de cada animal. Os animais permaneceram nas gaiolas por período de 24 horas, para contagem do número de óbitos. Pela relação entre o número de óbitos e as doses, determina-se a dose letal média pela qual serão estabelecidas as doses 50% da DL₅₀ e 25% da DL₅₀ para serem avaliadas no teste de micronúcleos.

4.2.5 Delineamento Experimental da Avaliação de Mutagenicidade e Antimutagenicidade por meio do Teste do Micronúcleo em Camundongos

Para cada grupo experimental de ambos protocolos foram utilizados seis camundongos Swiss, aos quais foram administrados volumes proporcionais à massa corpórea de cada animal. Como controles, foi utilizada solução salina 0,9% como negativo (CN- gavage) e ciclofosfamida como positivo (CP- 50 mg/Kg em dose única

v.i.). Devido a ausência de valor para a DL_{50} no intervalo de doses avaliadas do EBE, estabeleceram-se as doses 250 e 500 mg/Kg para o experimento de mutagenicidade, sendo que os animais de cada grupo foram tratados durante cinco dias consecutivos a cada 24 horas por gavagem. Para avaliação da antimutagenicidade e devido à ausência de diferenças entre as doses avaliadas no teste de mutagenicidade, foi utilizada a dose 250 mg/Kg do EBE, sendo que os grupos experimentais consistiram em pré-tratamento (EBE administrado do primeiro ao 15º dia, a cada 24 horas, e ciclofosfamida 50 mg/Kg *v.i.* ao 16º dia), pós-tratamento (dose única de ciclofosfamida 50 mg/Kg *v.i.* no primeiro dia e EBE administrado do segundo ao 16º dia a cada 24 horas) e tratamento simultâneo (ciclofosfamida 50 mg/Kg e EBE administrados *v.i.* em seqüência). Em todos os grupos após 24 horas da última administração, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, coletando-se uma gota de sangue da extremidade da cauda para a análise do sangue periférico e a coleta de amostras da medula óssea dos fêmures foi realizada consecutivamente, injetando-se soro fetal bovino e centrifugando-se por 10 minutos, a 1000 rpm. Pelo método de esfregaço, foram confeccionadas 2 lâminas para cada animal, fixadas em álcool metílico por 10 minutos e coradas com Leishman.

4.2.6 Teste do Micronúcleo em Camundongos

O teste de micronúcleos em medula óssea e sangue periférico foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Krishna e Hayashi (2000). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, sendo que nas lâminas do sistema medula, são contados cerca de 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal, considerando-se os eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN). A análise de citotoxicidade é determinada pela relação entre EPC e eritrócitos normocromáticos (ENC) pela razão $EPC/EPC+ENC$ em 200 células contadas. Nas lâminas de sangue periférico, são contados 2000 ENC, considerando-se os eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMN).

4.2.7 Análise Estatística

A análise estatística empregada foi o teste não paramétrico X^2 , com significância de 1%.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Toxicidade Aguda (DL₅₀)

A toxicidade de substâncias ou derivados de plantas representa um dos principais problemas na produção de fármacos, sendo necessária essa avaliação nos experimentos pré-clínicos. Um exemplo dessa avaliação é o teste de DL₅₀, ou seja, dose letal média responsável por levar a óbito 50% dos animais, sendo usado tradicionalmente como um dos parâmetros para avaliação da toxicidade aguda (SOUSA et al., 2005). Esse tipo de teste além de avaliar a toxicidade de um potencial agente tóxico em 24 horas, também fornece dados para a seleção dos níveis de dose em estudos mais prolongados, porém não oferece informações mais detalhadas, como os mecanismos de efeitos e seleção de órgãos-alvo, sendo limitado pela rota e duração da exposição (BARILE, 2007). O resultado da DL₅₀ sugere baixa toxicidade aguda do extrato da brilhantina, uma vez que não houve mortes de animais, no intervalo de doses testadas (50-1000 mg/Kg), assim como o ocorrido com folha-da-fortuna (*Bryophillum calycinum* Salisb.) (SOUSA et al., 2005). O resultado da baixa toxicidade do EBE de *P. microphylla* corrobora ao encontrado por Prabhakar et al. (2007) que obtiveram a toxicidade aguda na dose 1661,6 mg/Kg. Devido a ausência de valores para a DL₅₀, no intervalo de doses avaliadas, e conseqüente determinação dos valores para 50% da DL₅₀ e 25 % da DL₅₀, estabeleceram-se as doses 250 e 500 mg/Kg para o experimento de mutagenicidade e 500 mg/Kg para a avaliação da antimutagenicidade utilizando micronúcleos em camundongos.

4.3.2 Avaliação da Mutagenicidade e Antimutagenicidade pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos

O teste do micronúcleo é amplamente utilizado e confiável para detecção de possíveis agentes mutagênicos presentes em produtos químicos, farmacêuticos e fitoterápicos, empregado por agências internacionais para registro de controle de qualidade (ASANAMI et al., 1995; KRISHNA; HAYASHI, 2000; SILVA et al., 2008). Em especial, o teste *in vivo* usando medula óssea ou sangue periférico de roedores é capaz de verificar o potencial de compostos que aumentam a formação de micronúcleos como consequência dos distúrbios nas condições fisiológicas e por isso também são capazes de induzir as mesmas mudanças em humanos, o que não seria possível em testes *in vitro* (GUZMÁN et al., 2008). Além de verificar a mutagenicidade, o teste de micronúcleos em roedores também pode indicar o potencial antimutagênico de diversas substâncias, naturais ou não, pela redução na formação dessas estruturas.

4.3.2.1 Avaliação da Mutagenicidade

O EBE da brilhantina foi responsável por aumentar, ainda que não tenha ocorrido diferença significativa pelo X^2 em relação ao CN, a incidência de micronúcleos no sistema medula óssea nos animais tratados durante os cinco dias do experimento (Tabela 1). Esse aumento na formação de micronúcleos ocorreu devido a maior taxa de divisão celular e redução no tempo de reparo de danos espontâneos no DNA, interrupção na formação do fuso durante a rápida divisão celular e erros no processo de extrusão do núcleo ou diferenciação dos eritrócitos causados pelo extrato e pela ciclofosfamida, como sugere Guzmán et al. (2008).

Tabela 1: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em medula óssea de camundongos tratados com extrato bruto etanólico de *Pilea microphylla* (EBE) e respectivos controles na avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade.

Tratamentos	N° de EPCs analisados	EPCMNs		EPC/EPC+ENC
		n°	%	
CN	11110	13	0,11	0,62
CP	12070	59	0,49	0,87
EBE 250 mg/Kg ^a	11240	41	0,36	0,64
EBE 500 mg/Kg ^a	11420	44	0,38	0,66
Pré-Tratamento	9990	132	1,32**	0,59
Pós-Tratamento	9530	15	0,16	0,51
Tratamento Simultâneo	10650	144	1,35**	0,46

CN: controle negativo (solução salina 0,9%)

CP: controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/Kg *v.i.*).

^a tratamento durante cinco dias

Pré-tratamento: EBE 250 mg/Kg (15 dias de tratamento) + CP 50 mg/Kg

Pós-tratamento: CP 50 mg/Kg + EBE 250 mg/Kg (15 dias de tratamento)

Tratamento Simultâneo: CP 50 mg/Kg + EBE 250 mg/Kg em um dia de tratamento

Duzentos eritrócitos foram analisados por animal para obter citotoxicidade (EPC/EPC+ENC)

^b um animal morreu

** P < 0,01 ao controle negativo

A relação EPC/ENC indicativa de citotoxicidade é obtida pela razão entre EPC/EPC+ENC contados em 200 células (RIBEIRO, 2003). Pelo fato de os EPCs serem os precursores dos ENCs durante a maturação, em situações normais, considera-se que as quantidades de EPCs e ENCs sejam semelhantes e que maiores valores para essa relação indiquem ausência de citotoxicidade, isto é, o processo de maturação não é afetado pelos agentes tóxicos. Diferentemente, menores valores indicam que menos EPCs tornam-se ENCs e isso pode ser desencadeado ou pelo fato de não serem produzidos mais EPCs ou porque estes entram em apoptose antes da maturação, indicando a citotoxicidade em ambas situações (RIBEIRO, 2003).

Os resultados obtidos com o EBE da brilhantina (Tabela 1) para a relação entre EPC e ENC não mostram diferenças significativas entre tratamentos e controles. Essa situação evidencia a ausência de citotoxicidade do extrato em medula, demonstrando que não houve interferências na maturação dos eritrócitos, ainda que os constituintes sejam responsáveis por promover a clastogênese e/ou aneugênese nos cromossomos observada pela frequência de micronúcleos. Pereira et al. (2008)

também não observaram efeito citotóxico pela relação EPC e ENC em camundongos tratados com extrato de *Baccharis dracunculifolia*.

Outro dado importante obtido relaciona-se ao fato de não haver diferenças significativas entre as doses testadas (Tabela 1). Essa situação pode ser causada pela saturação dos receptores de membrana, levando a célula a não mais responder ao aumento da concentração do extrato (MOREIRA et al., 2004) e/ou pela constituição do extrato, independente da concentração dos metabólitos presentes. Apesar de não haver diferença significativa em relação ao CN, o sutil efeito mutagênico observado deve-se a interação entre as substâncias (efeito sinérgico) e estas com o organismo-teste, evidenciando uma atuação do metabolismo do organismo com os agentes xenobióticos (exógenos), assim como detectado por Santos et al. (2006) com extrato metanólico de *Strychnos pseudoquina*. Essa condição confirma a importância de estudos em roedores *in vivo* devido aos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, garantindo validação para que os resultados possam ser aplicados aos humanos, o que não seriam detectados em experimentos *in vitro* (GUZMÁN et al., 2008).

No sistema em sangue periférico também foram observados micronúcleos, indicando clastogenicidade e/ou aneugenicidade sem diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 2). Acredita-se que essa redução pode ser uma resposta da apoptose para eliminar células danificadas, sendo que o sinal de alguma forma foi desencadeado pelo micronúcleo ou o seu conteúdo (fragmento ou cromossomo inteiro detectado pela ausência ou presença de centrômero). Decordier et al. (2008) citam que não há confirmação para esse tipo de evento, principalmente porque a remoção de eritrócitos micronucleados pelo baço de roedores é mais eficiente em ratos que em camundongos (ASANAMI et al., 1995).

Tabela 2: Frequência de eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMNs) em sangue periférico de camundongos tratados com extrato bruto etanólico de *Pilea microphylla* (EBE) e respectivos controles para avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade.

Tratamentos	N° de ENCs analisados	ENCMNs	
		n°	%
CN	12000	0	0
CP	12000	36	0,30
EBE 250 mg/Kg ^a	12000	9	0,08
EBE 500 mg/Kg ^a	12000	8	0,07
Pré-Tratamento	12000	49	0,41
Pós-Tratamento	12000	16	0,13
Tratamento Simultâneo	12000	79	0,66

CN: controle negativo (solução salina 0,9%)

CP: controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/Kg *v.i.*).

^a tratamento durante cinco dias

Pré-tratamento: EBE 250 mg/Kg (15 dias de tratamento) + CP 50 mg/Kg

Pós-tratamento: CP 50 mg/Kg + EBE 250 mg/Kg (15 dias de tratamento)

Tratamento Simultâneo: CP 50 mg/Kg + EBE 250 mg/Kg em um dia de tratamento

4.3.2.2 Avaliação da Antimutagenicidade

O EBE da brilhantina foi responsável por aumentar a frequência de EPCMNs em medula nos grupos pré-tratamento e tratamento simultâneo quando comparado ao controle negativo (Tabela 1). Esse resultado era esperado, uma vez que o extrato demonstrou-se com capacidade mutagênica, cujo efeito pode ter sido potencializado ou adicionado ao efeito mutagênico da ciclofosfamida, indicando a ausência do efeito antimutagênico do EBE da brilhantina nas condições testadas, assim como encontrado por Andrade et al. (2008) com extrato aquoso da raiz de *Cochlospermum regium* em tratamento simultâneo com camundongos.

Todavia, somente o pós-tratamento com o EBE reduziu a frequência de EPCMNs induzidos pela ciclofosfamida na medula a valores muito próximos do controle negativo (Tabela 1) e não causou acentuados efeitos danosos ao DNA como nos outros tratamentos. A antimutagenicidade também foi obtida por Edenharder et al. (2003) quando trataram camundongos com diversas frutas, vegetais e flavonóides em 24, 48 e 72h após administração de benzo[*a*]pireno (BaP). Essa redução obtida pode ter ocorrido pela supressão da indução de micronúcleos devido à neutralização do efeito mutagênico prolongado causado pelos metabólitos da ciclofosfamida e que em parte relaciona-se à composição fitoquímica. Experimento anterior realizado por

nosso grupo de pesquisa com esse extrato indicou presença de açúcares redutores, fenóis, taninos, depsídeos/depsidonas, cumarinas, esteróides e triterpenos.

Os resultados da relação EPC e ENC nos tratamentos realizados (Tabela 1) indicam que não houve citotoxicidade e diferenças significativas entre os sexos, independentes dos tratamentos e controles, ou seja, não houve atraso na progressão do ciclo celular mesmo em presença do extrato e da ciclofosfamida. Resultado semelhante foi encontrado por Furtado et al. (2008) quando administrou ácido rosmarínico a camundongos em associação com outro tipo de droga antitumoral, a doxurrubicina.

Observando-se os dados referentes ao sistema sangue periférico (Tabela 2), verifica-se que o pós-tratamento apresentou menores valores de ENCMNs quando comparado aos outros tratamentos avaliados, mesmo sem diferenças significativas, mantendo a tendência obtida no sistema medula que indicou redução na frequência de micronúcleos para o pós-tratamento.

Os resultados obtidos pela administração do extrato ocorreram em função da sua composição fitoquímica. Uma dessas substâncias detectadas são os compostos fenólicos, cujo efeito antioxidante torna-os interessante à indústria farmacêutica e já foi relatado em outros estudos (RICE-EVANS et al., 1997; CONKLIN, 2000; SALEEM et al., 2002; SINGH et al., 2007). Ferguson (2001) cita que nem todos os polifenóis, por exemplo, possuem efeitos benéficos, sendo que alguns apresentam interferência em vias bioquímicas, incluindo atividade enzimática da DNA-topoisomerase e transdução de sinais. Por exemplo, os taninos que são compostos fenólicos quando em altas concentrações podem causar danos ao DNA (JOHNSON; LOO, 2000). Outro exemplo são os esteróides que podem ser um dos responsáveis para a tendência a mutagenicidade observada. Isso é explicado pelo fato do uso de esteróides (como são classificados os hormônios sexuais animais) exógenos estar associado ao desenvolvimento de muitos tipos de câncer em humanos e induzir vários tipos de tumores em roedores (DHILLON; DHILLON, 1995).

Em testes *in vivo* realizados por Dhillon e Dhillon (1995), as altas doses de esteróides ocasionaram significativamente maiores frequências de EPCMNs,

principalmente porque esses tipos de hormônios são capazes de induzir aneuploidia e representam importante ação na transformação celular e desenvolvimento de câncer e na morte celular, como obtido por Kayani e Parry (2008). De maneira semelhante, Quick et al. (2008) sugerem que esteróides exógenos são capazes de causar câncer de mama por aneuploidia e isso também pode se relacionar à proliferação celular e desenvolvimento de câncer de mama induzido por essas substâncias em estudo realizado por Vicelli (2005) em ratas.

A presença de agentes aneuplóides causa uma possível interrupção na formação do fuso, que apesar de não provocarem danos no DNA, são capazes de afetar o equilíbrio genético pela perda ou ganho de cromossomos devido à alteração na dinâmica da polimerização de microtúbulos. Essa situação causa também citotoxicidade, já que essas estruturas estão envolvidas em funções celulares que requerem movimento e isso explica o uso de muitos agentes aneuplóides no tratamento de câncer, pelo bloqueio da divisão celular e morte das células tumorais (VALLARIÑO-KELLY; MORÁLES-RAMIRÉZ, 2001; DECORDERIE et al., 2008).

Comparando-se os valores obtidos pelos sistemas medula óssea e sangue periférico para ambos os protocolos (Tabela 1 e 2), observa-se que a análise do sangue periférico detectou micronúcleos, porém em menor quantidade quando comparado ao obtido em medula. Uma explicação para essa redução pode ser atribuída a um possível efeito citotóxico desencadeado pelo micronúcleo, diferente do obtido pela relação entre EPC e ENC em medula que não indicou interferência na maturação dessas células. Assim, a relação EPC e ENC obtida na medula pode somente avaliar a citotoxicidade relacionada ao processo de maturação dessas células, porém os resultados obtidos em sangue periférico sugerem possível citotoxicidade quando é observada a frequência de micronúcleos reduzida, provavelmente causada por apoptose induzida por essas estruturas.

O emprego da *Pilea microphylla* para dores de barriga (RODRIGUES; GUEDES, 2006) pode ser, dentre outros fatores, à provável propriedade anti-helmíntica. Por sua capacidade de induzir a formação de micronúcleos, é possível que os compostos clastogênicos e aneugênicos presentes no extrato dessa planta sejam responsáveis em promover desorganização celular e bloquear a divisão celular de

organismos parasitários. Poça et al. (2008) citam que infecções por helmintos também estão ligados ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres. Decordier et al. (2008) citam que compostos clastogênicos e principalmente aneugênicos devem ser aplicados em concentrações elevadas para efetiva ação contra organismos nocivos, mas em baixas concentrações em quimioterapia. Dessa forma, a mutagenicidade do extrato nas condições testadas e o uso popular da *P. microphylla* sugerem propriedade vermífuga em potencial e confirma a necessidade de mais estudos sobre essa planta ainda pouco utilizada como medicinal.

O período de 24 horas entre a aplicação da ciclofosfamida e o início do tratamento com o EBE (pós-tratamento) foi determinante para que os produtos do metabolismo dessa droga e os radicais livres gerados nesse processo promovessem alguns danos no DNA, observada pela frequência de EPCMNs obtida, ainda que em baixa quantidade. Da mesma forma, o período subsequente de tratamento com o EBE foi importante para a correção desses danos e/ou demonstrou que o extrato não os causou. Como não é possível afirmar se os eritrócitos micronucleados obtidos no pós-tratamento foram resultados ou da ciclofosfamida ou do extrato, o período do pós-tratamento poderia ser somente de 24 horas e a coleta de amostras poderia ser realizada em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com o EBE, visando explicar que a administração do extrato por longo período não é a determinante para a formação de micronúcleos.

4.4 Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho não indicaram um efeito tóxico agudo (24 horas), entretanto sugerem que o uso indiscriminado e prolongado (subcrônico/crônico) de preparações de *Pilea microphylla* pode ser prejudicial à saúde, devido à possível formação de micronúcleos diretamente causados por mutações no DNA ou indiretamente, devido à inibição da polimerização dos microtúbulos, ocasionando provável citotoxicidade. Essa situação mutagênica pode ser, pelo menos em parte, a responsável pela utilização popular dessa planta no tratamento de dores de barriga, provavelmente causadas por infecções por parasitas. Além disso, a menor quantidade de micronúcleos induzidos pela ciclofosfamida em pós-tratamento nas condições testadas pode ter sido causada

pela atividade antioxidante dos compostos presentes no extrato ou à apoptose. Fornecem informações também para outros estudos que visem à elucidação dos mecanismos de mutagenicidade e a composição fitoquímica, importantes para obtenção de novos fármacos e para serem utilizados em terapias com fitoterápicos, em diversas patologias como, por exemplo, o câncer e o tratamento de verminoses. Além disso, há necessidade de realização de outros ensaios, para esclarecer quais e como estão envolvidos os constituintes da planta na produção dos danos ao DNA ou mesmo se são capazes de reduzirem a formação de micronúcleos.

4.5 Referências

- ALMEIDA NETO, J. X.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; SILVA, J. C. S.; DANTAS, J. P. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *in vivo*. **Revista Brasileira de Biologia e Ciências da Terra**, v 5, n 2, 2005.
- ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v 68, n 1, p 155-159, 2008.
- ASANAMI, S.; SHIMONO, K.; SAWAMOTO, O.; KURISU, K.; UEJIMA, M. The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. **Mutation Research**, v 347, p 73-78, 1995.
- BARILE, F. A. **Principles of toxicology testing**. New York: CRC Press, 2007.
- BEYRA, A. B., LÉON, M. C., IGLESIAS, E., FERRÁNDIZ, D., HERRERA, R., VOLPATO, G., GODÍNEZ, D., GUIMARAIS, M., ÁLVARES, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales em la provincia de Camagüey (Cuba). **Anales Del Jardim Botánico de Madrid**, v 61, n 2, p185-204, 2004.
- CARIÑO-CORTÉS, R.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; TORRES-VALENCIA, J. M.; GONZÁLEZ-AVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. **Toxicology in Vitro**, v 21, p 691–697, 2007.
- CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 6, n 3, p 15-19, 2004.
- CHIFUNDERA, K. Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. **Fitoterapia**, v 72, p 351-368, 2001.
- CONKLIN, K. A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutrition and Cancer**, v 37, n 1, p 1-18, 2000.
- DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v 521, p 121–135, 2002.
- DECORDIER, I.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis. **Mutation Research**, v 651, p 30–39, 2008.

DHILLON, V. S.; DHILLON, I. K. Genotoxicity evaluation of estradiol. **Mutation Research**, v 345, p 87-95, 1995.

EDENHARDER, R.; KRIEG, H.; KÖTTGEN, V.; PLATT, K. L. Inhibition of clastogenicity of benzo[*a*]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice *in vivo* by fruits, vegetables, and flavonoids. **Mutation Research**, v 537, p 169–181, 2003.

FACEY, P. C.; PASCOE, K. O; PORTER, R. B.; JONES, A. D. Investigation of Plants used in Jamaican Folk Medicine for Anti-bacterial Activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v 51, p 1555-1560, 1999.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v 455, p 81–95, 2000.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v 475, p 89–111, 2001.

FERRO, D. Efeitos colaterais dos fitoterápicos. In: _____. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006, p 187-206.

FURTADO, M. A.; ALMEIDA, L. C. F.; FURTADO, R. A.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutation Research**, 2008.

GUZMÁN, A.; GARCÍA, C.; MARÍNA, A. P.; TORTAJADA, A.; RUIZ, M. T.; HENESTROSA, A. R. F.; MARCOS, R. Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis. **Mutation Research**, v 656, p 8–13, 2008.

JOHNSON, M. K.; LOO, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research**, v 459, p 211–218, 2000

KAYANI, M. A.; PARRY, J. M. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the *in vitro* cytokinesis blocked micronucleus assay. **Mutation Research**, v 651, p 40–45, 2008.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v 455, p 155–166, 2000.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 2, n 45, p 1-12, 2006.

_____. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 3, n 13, p1-11, 2007.

MELO, S. F.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F.; SILVA, C. R.; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J.A.C.; ARAÚJO, A. C.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts

against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v 496, p 33–38, 2001.

MITCHELL, S. A., AHMAD, M. H. A review of medicinal plant research at the University of West Indies, Jamaica, 1948-2001. **West Indian Medicinal Journal**, v 55, n 4, p 243-269. 2006.

MOREIRA, L. M.A.; ARAÚJO, L. M. P; CORDEIRO, A. P. B.; GUSMÃO, F. A. F. Teste de linfócitos humanos no reconhecimento do efeito clastogênico e citotóxico da 5-fluorouracil. **Revista de Ciências Médicas e Biologia**, v 3, n 1, p 5-12, 2004.

PEREIRA, A. D.; ANDRADE, S. F.; SWERTS, M. S. O.; MAISTRO, E. D. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v 46, p 2580–2584, 2008.

PEREZ-CARREÓN, J.I.; CRUZ-JIMENEZ, G; LICEA-VEGA, J.A.; ARCE POPOCA, E.; FATTEL FAZENDA, S.; VILLA-TREVINO, S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. **Toxicology in Vitro**, v 16, p 253–258, 2002.

POÇA, K. S.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; SANTOS, M. J. S.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Malaria infection modulates effects of genotoxic chemicals in the mouse bone-marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v 649, p 28–33, 2008.

PRABHAKAR, K. R.; VEERAPUR, V. P.; BANSAL, P.; PARIHAR, V. P.; KANDADI, M. R.; KUMAR, P. B.; PRIYADARSINI, K. I.; UNNIKRIISHNAN, M. K. Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of *Pilea microphylla* (L.) ethanolic extract. **Chemico-Biological Interactions**, v 165, p 22-32, 2007.

QUICK, E.L.; PARRY, E. M.; PARRY, J.M. Do oestrogens induce chromosome specific aneuploidy in vitro, similar to the pattern of aneuploidy seen in breast cancer? **Mutation Research**, v 651, p 46–55, 2008.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem do ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 11, n 2, p 57-69, 2001.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p 173-200.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v 2, n 4, p 152-159, 1997.

RODRIGUES, A.C.C., GUEDES, M.L.S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 8, n 2, p 1-7, 2006.

- SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HÄRKÖNEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v 81, p 327-336, 2002.
- SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R.P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SANTOS, F. V.; SERPELONI, J. M.; CÓLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v 112, p 319–326, 2007.
- SANTOS, F.V.; COLUS, I.M.S.; SILVA, M.A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v 44, p 1585–1589, 2006.
- SANTOS, M. A. C.; ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na seleção de espécies de plantas medicinais para triagem de atividade antitumoral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 2, n 1, p 7-17, 1999.
- SILVA, R. M. J.; SOUSA, N. C.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Antigenotoxic effects of *Mandevilla velutina* (Gentianales, Apocynaceae) crude extract on cyclophosphamide-induced micronuclei in Swiss mice and urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v 31, n 3, p 751-758, 2008.
- SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. **Food and Chemical Toxicology**, v 45, p 1216–1223, 2007.
- SOUSA, P.J.C.; ROCHA, J.C.S.; PESSOA, A.M.; ALVES, L.A.D.; CARVALHO, J.C.T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 15, n 1, p 60-64, 2005.
- STOPPER, H.; HEMPEL, K.; REINERS, C.; VERSHENYA, S.; LORENZ, R.; VUKICEVIC, V.; HEIDLAND, A.; GRAWE, J. Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring **Toxicology Letters**, v 156, p 351–360, 2005.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v 42, n 2, 2006.
- VALLARINO-KELLY, T.; MORALES-RAMÍREZ, P. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast in vivo. **Mutation Research**, v 495, p 51–59, 2001.
- VEIGA JUNIOR, F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v 28, n 3, p 519-528, 2005.

VICELLI, J. T. **Estudo histológico de mamas de ratas castradas submetidas à terapêutica com estrogênio, progestogênio e tibolona.** 2005. 64f. Tese de Doutorado (Doutorado em Tocoginecologia) - Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

5 Conclusões Gerais

A prospecção fitoquímica qualitativa do EBE da *Pilea microphylla* indicou presença de açúcares redutores, fenóis, taninos, depsídeos/depsidonas, cumarinas, esteróides e triterpenos, demonstrando que a composição fitoquímica pode ser a responsável pela utilização empírica da *P. microphylla* por parte da população, para casos de dores de barriga, problemas respiratórios, problemas femininos e ações como antimicrobiana e antipirética. Apesar da concentração de compostos fenólicos encontrada ter sido inferior a obtida por outros autores com outras espécies vegetais, não se pode estimar o conteúdo absoluto desse grupo de substâncias, devido a possível variação sazonal na produção e os efeitos farmacológicos podem relacionar-se mais ao tipo de composto presente que a concentração fenólica total. Apesar desse reduzido valor, a atividade antioxidante mensurada indicou valores semelhantes ou mesmo maiores que os encontrados para as substâncias padrão e outras espécies vegetais. Mesmo com a baixa toxicidade do extrato, houve tendência a mutagenicidade e citotoxicidade, sugerindo que o uso indiscriminado e prolongado (subcrônico/crônico) de preparações de *P. microphylla* pode ser prejudicial à saúde, devido a mutações e interferência na produção de proteínas envolvidas na manutenção celular, causados por constituintes da planta ou efeito sinérgico dos mesmos. Além disso, o efeito antimutagênico ainda precisa confirmado para saber quais compostos podem atuar no processo de mutagênese e/ou antimutagênese. Portanto, os resultados obtidos fornecem informações para outros estudos que visem à elucidação dos mecanismos de mutagenicidade/antimutagenicidade e a composição fitoquímica, surgindo como importantes fontes de compostos bioativos para a indústria farmacêutica na utilização de maneira isolada de derivados ou em associações com tratamentos convencionais em diversas patologias como, por exemplo, verminoses.

6 Referências

- ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ZETTERBERG, G.; GRAWÉ, J. The time-course of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. **Mutation Research**, v 350, p 349-358, 1996.
- AKHTAR, M.S.; IQBAL, Z.; KHAN, M.N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**, v 38, p 99-107, 2000.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v 28, n 1, p 118-129, 2005.
- ANDERSON, D.; BISHOP, J. B.; GARNER, R. C.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SELBY, P. B. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutation Research**, v 330, p 115-181, 1995.
- ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v 68, n 1, p 155-159, 2008.
- ASANAMI, S.; SHIMONO, K.; SAWAMOTO, O.; KURISU, K.; UEJIMA, M. The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. **Mutation Research**, v 347, p 73-78, 1995.
- AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v 20, n 1, p 185-194. 2006.
- BARILE, F. A. **Principles of toxicology testing**. New York: CRC Press, 2007.
- BEYRA, A. B.; LÉON, M. C.; IGLESIAS, E.; FERRÁNDIZ, D.; HERRERA, R.; VOLPATO, G.; GODÍNEZ, D.; GUIMARAIS, M.; ÁLVARES, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales em la provincia de Camagüey (Cuba). **Anales Del Jardim Botánico de Madrid**, v 61, n 2, p185-204, 2004.
- BUENO, R. B. L. **Efeitos da aspirina sobre aberrações cromossômicas induzidas pelo antitumoral doxorubicina em linfócitos humanos**. 2006. 86f. Monografia (Graduação em Biomedicina), Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2006.
- CHIFUNDERA, K. Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. **Fitoterapia**, v 72, p 351-368, 2001.

CONKLIN, K. A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutrition and Cancer**, v 37, n 1, p 1-18, 2000.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v 521, p 121–135, 2002.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIENA, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v 73, p 69-91, 2002.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v 51, p 111-120, 1996.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 107-122.

FACEY, P. C.; PASCOE, K. O; PORTER, R. B.; JONES, A. D. Investigation of Plants used in Jamaican Folk Medicine for Anti-bacterial Activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v 51, p 1555-1560,1999.

FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v 2, n 1, p 24-29, 2005.

FERRO, D. Os princípios ativos fitoterápicos: aspectos clínicos. In: _____. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006, p 114-130.

FONSECA-KRUEL, V. S. ; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v 18, n 1, p 177-190, 2004.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 15, n 2, 2005.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 13-28.

GUZMÁN, A.; GARCÍA, C.; MARÍNA, A. P.; TORTAJADA, A.; RUIZ, M. T.; HENESTROSA, A. R. F.; MARCOS, R. Formation of micronucleated erythrocytes in mouse bone-marrow under conditions of hypothermia is not associated with stimulation of erythropoiesis. **Mutation Research**, v 656, p 8–13, 2008.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v 455, p 155–166, 2000.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 2, n 45, p 1-12, 2006.

_____. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 3, n 13, p 1-11, 2007.

MITCHELL, S. A.; AHMAD, M. H. A review of medicinal plant research at the University of West Indies, Jamaica, 1948-2001. **West Indian Medicinal Journal**, v 55, n 4, p 243-269, 2006.

MITSCHER, L. A.; TELIKEPALLI, H.; MCGHEE, E.; SHANKEL, D. M. Natural antimutagenic agents. **Mutation Research**, v 350, p 143-152, 1996.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v 24, n 1, p 105-111, 2001.

NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. DNA repair and chromosomal alterations. **Mutation Research**, v 657, p 3–7, 2008.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v 20, n 4, p 751-762, 2006.

PINTO, L. F. R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p 29-48.

PRABHAKAR, K. R.; VEERAPUR, V. P.; BANSAL, P.; PARIHAR, V. P.; KANDADI, M. R.; KUMAR, P. B.; PRIYADARSINI, K. I.; UNNIKRISHNAN, M. K. Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of *Pilea microphylla* (L.) ethanolic extract. **Chemico-Biological Interactions**, v 165, p 22-32, 2007.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem do ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 11, n 2, p 57-69, 2001.

REZENDE, E. A.; RIBEIRO, M. T. F. Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria ou bioprospecção? **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v 7, n 3, p 37-44, 2005.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p 173-200.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. D. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p 21-27.

RODRIGUES, A.C.C.; GUEDES, M.L.S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 8, n 2, p 1-7, 2006.

SANTOS, M. A. C.; ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na seleção de espécies de plantas medicinais para triagem de atividade antitumoral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 2, n 1, p 7-17, 1999.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v 544, p 99–106, 2003.

SARTI, S. J. Fitoterápicos e fitoterapia. In: FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 9-34.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v12, n 1, p 35-40, 2002.

SOUZA, G. C.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v 90, p 135–143, 2004.

STEINMANN, V. W. **Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes**. Imprenta Tavera Hermanos, fascículo 134, 2005.

WILHEM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais: sob a óptica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p 317- 334.

APÊNDICE A

Pacientes atendidos das cidades Vila Velha e Serra no mês de Janeiro de 2008 por um laboratório particular de análises clínicas

10.055 pessoas atendidas:

- 7322 (72,82%) não apresentaram resultados positivos para infecções causadas por parasitas e/ou bactérias;
- 2733 (27,18%) apresentaram resultados positivos para infecções causadas por parasitas e/ou bactérias.

2733 casos positivos:

- 1669 (61,07%) apresentaram infecções por parasitas;
- 1064 (38,93%) apresentaram infecções por bactérias.

1669 casos positivos para parasitas:

- 642 (38,46 %) causados por *Endolimax* sp;
- 458 (27,44%) causados por *Giardia* sp;
- 311 (18,63%) causados por *Ascaris* sp;
- 70 (4,19%) causados por *Strongyloides* sp;

1064 casos positivos para bactérias:

- 941 (88,44%) causados por *Escherichia coli*;
- 27 (2,54%) causados por *Streptococcus* sp;
- 27 (2,54%) causados por *Enterobacter* sp;
- 20 (1,88%) causados por *Klebsiella* sp.

APÊNDICE B
Espécies da família Urticaceae usadas como medicinais

ESPÉCIES	UTILIZAÇÃO POPULAR/ ESTUDOS	REFERÊNCIAS
<i>Boehmeria nivea</i>	antireumática, lepra, doenças da pele, infecções oculares, rinites, diarreia, vermífuga	CHIFUNDERA, 2001
<i>Dendrocide sinuate</i>	estimulante capilar	ACHARYA; ROKAYA, 2005
<i>Elatostema beccarii</i>	aumentar a fertilidade	BOURDY; WALTER, 1992
<i>Fluerya aestruans</i>	úlceras pépticas	NOUMIU; DIBAKTO, 2000
<i>Ficus racemosa</i>	hipoglicemiante	WADOOD et al., 2005
<i>Ficus religiosa</i>	tóxica para <i>Ascaridia galli</i>	AKTHAR et al., 2000
<i>Holoptelea integrifolia</i>	doenças de pele, obesidade, câncer, cicatrizante, antimicrobiana (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. circulences</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomices cerevisiae</i> , <i>Aspegillus niger</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella aeruginosa</i> , <i>Candida tropicana</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i>)	REDDY et al., 2008
<i>Laportea alatipes</i>	antireumática, abscessos	CHIFUNDERA, 2001
<i>Morus alba</i>	anti-helmíntica, purgativa	AKTHAR et al., 2000
<i>Myrianthus arboreus</i>	anticancerígena	GRAHAM et al., 2000
<i>Nothocnide repanda</i>	abortiva	BOURDY; WALTER, 1992
<i>Obetia pinnatifida</i>	desordem mental	CHIFUNDERA, 2001
<i>Parietaria debilis</i>	problemas respiratórios, infecções urinárias, diarreia	RUFFA et al., 2004
<i>Parietaria diffusa</i>	antiviral (<i>Herpes zoster</i> , <i>Herpes labialis</i>), citotóxica para vírus da imunodeficiência de felinos, antisséptica, purificadora do sangue, inflamações de pele, diurética, inflamações de garganta picadas de insetos	MANGANELLI et al., 2005; PIERONI, 2000
<i>Pilea microphylla</i>	antimicrobiana (<i>Staphylococcus aureus</i>), antipirética, usada em casos de diarreia e asma, dores de cabeça e de barriga, purificadora de vesícula, para inflamação e como purificadora de ventre em casos de problemas reprodutivos	CHIFUNDERA, 2001; PINTO et al., 2006; BEYRA et al., 2004; MITCHELL; AHMAD, 2006; LANS, 2006; LANS 2007; RODRIGUES; GUEDES, 2006
<i>Pipturus albidicus</i>	expectorante, purificadora do sangue, laxante, antiviral (<i>Herpes simplex-1</i>), antimicrobiano (<i>Microsporium canis</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichosphyton rubrum</i> , <i>Streptococcus pyogens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)	LOCHER et al., 1995
<i>Pipturus argenteus</i>	mordidas de cobras, feridas inflamadas, furúnculos, dor de dente, asma, tosse, tuberculose, inflamação de garganta, dores de estômago, disenteria, febre malárica, dores de cabeça, abortiva, vermífuga	BOURDY; WALTER, 1992; NICK et al., 1995

<i>Polsozia mixta</i>	queimaduras, doenças venéreas, cicatrizante, antimicrobiana (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>)	RABE; VAN STADEN, 1997
<i>Procris pedunculata</i>	aumentar a fertilidade	BOURDY; WALTER, 1992
<i>Urera baccifera</i>	dores de cabeça/corpo	MILLIKEN; ALBERT, 1996; VISBISKI et al., 2003
<i>Urera cameroonensis</i>	mordidas de cobras, antihelmíntica	CHIFUNDERA, 2001
<i>Urtica dioica</i>	dor muscular, antihiperglicêmica, antiviral (<i>Herpes zoster</i> , <i>H. labialis</i>), vasodilatadora associada ao tratamento de câncer, antiinflamatória, aumento do número de linfócitos, dor de dente, purificadora do intestino, artrites, fluxo menstrual intenso, fratura óssea, antireumática, hemorróidas, hipertireoidismo, bronquite, caspa, calvície, coceira,	AFIFI-ABU; IRMAILEH, 2000; BLANCO et al., 1999; BNOUHAM et al., 2003; KANTER et al., 2005; LÓPEZ-AROCHE, 2008; MANGANELLI et al., 2005;
<i>Urtica dioica</i>	hepatoproteção, antioxidante (redução da proliferação lipídica), expectorante, purgativa, inibe a proliferação celular no cancer de próstata, aumento da lactação, icterícia, hipotensiva, depurativa do sangue, antihemorrágica, anti-agregante de plaquetas, anti-septico bucal, diurética, hemostática, vermífuga, tratamento de eczema,	MAVI et al., 2004; MEKHFI et al., 2004; ÖZEN; KROKMAZ, 2003; SCHÖTTNER et al., 1997; SCHRETHA; DILLION, 2003; TAHRI et al., 2000; TESTAI et al., 2002; TUNON et al., 1995; VASQUEZ, 1997; WAZIR et al., 2004; ZIYYAT et al., 1997.
<i>Urtica fissa</i>	redução da hiperplasia de próstata	ZHANG et al., 2007
<i>Urtica pilulifera</i>	hipoglicemiante	KAVALI et a., 2003
<i>Urtica urens</i>	enfermidades do aparelho geniturinário, constipação, desordens no estômago, diurética, hemostática	JAMIR et al., 1999

Referências

- ACHARYA, K. P.; ROKAYA, M. B. Ethnobotanical survey of medicinal plants traded in the streets of Kathmandu Valley **Scientific World**, v 3, n 3, 2005.
- AFIFI, F.U.; ABU-IRMAILEH, B. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on less commonly used medicinal herbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v 72, p 101–110, 2000.
- AKHTAR, M.S.; IQBAL, Z.; KHAN, M.N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**, v 38, p 99-107, 2000.
- BEYRA, A. B., LÉON, M. C., IGLESIAS, E., FERRÁNDIZ, D., HERRERA, R., VOLPATO, G., GODÍNEZ, D., GUIMARAIS, M., ÁLVARES, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales em la provincia de Camagüey (Cuba). **Anales Del Jardim Botánico de Madrid**, v 61, n 2, p185-204, 2004.
- BLANCO, E.; MACÍA, M.J.; MORALES, R. Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia, northwest Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, v 65, p 113–124, 1999.
- BNOUHAM, M.; MERHFOUR, F. Z.; ZIYYAT, A.; MEKHFI, H.; AZIZ, M.; LEGSSYER, A. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. **Fitoterapia**, v 74, p 677–681, 2003.
- BOURDY, G.; WALTER, A. Maternity and medicinal plants in Vanuatu I. The cycle of reproduction. **Journal of Ethnopharmacology**, v 37p 179-196, 1992
- CHIFUNDERA, K. Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. **Fitoterapia**, v 72, p 351-368, 2001.
- GRAHAM, J.G.; QUINN, M.L.; FABRICANT, D.S.; Farnsworth, N.R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v 73, p 347–377, 2000.
- JAMIR, T.T.; SHARMA, H.K.; DOLUIU, A.K. Folklore medicinal plants of Nagaland, India. **Fitoterapia**, v 70, p 395- 401, 1999.
- KANTER, M.; COSKUN, O.; BUDANCAMANA, M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. **World Journal of Gastroenterology**, v 11, n 42, p 6684-668, 2005.
- KAVALALI, G.; TUNCEL, H.; GÖKSEL, S.; HATEMI, H.H. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v 84, p 241- 245, 2003.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 2, n 45, p 1-12, 2006.

_____. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v 3, n 13, p 1-11, 2007.

LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v 49, p 23-32, 1995.

LÓPEZ-AROCHE, U.; SALINAS-SÁNCHEZ, D. O.; MENDOZA DE GIVES, P.; LÓPEZ-ARELLANO, M. E.; LIÉBANO-HERNÁNDEZ, E.; VALLADARES-CISNEROS, G.; ARIAS-ATAIDE, D. M.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. In vitro nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, Mexico against *Haemonchus contortus* infective larvae. **Journal of Helminthology**, v 82, p 25–31, 2008.

MANGANELLI, R. E. U.; ZACCARO, L.; TOMEI, P. E. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v 98, p 323–327, 2005.

MAVI, A.; TERZI, Z.; ZGEN, U. O.; YILDIRIM, A.; COSKUN, M. Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v 27, n 5, p 702-705, 2004.

MEKHFIA, H.; EL HAOUARI, M.; LEGSSYER, A.; BNOUHAMA, M.; AZIZ, M.; ATMANI, F.; REMMAL, A.; ZIYYAT, A. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v 94, p 317–322, 2004.

MILLIKEN, W; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the yanomami indians of Brazil. **Economy Botany**, v 50, n 1, p 10-25, 1996.

MITCHELL, S. A., AHMAD, M. H. A review of medicinal plant research at the University of West Indies, Jamaica, 1948-2001. **West Indian Medicinal Journal**, v 55, n 4, p 243-269, 2006.

NICK, A.; RALI, T.; STICHER, O. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. **Journal of Ethnopharmacology**, v 49, p 147-156, 1995.

NOUMIU, E.; DIBAKTO, T.W. Medicinal plants used for peptic ulcer in the Bangangte region, western Cameroon. **Fitoterapia**, v 71, p 406- 412, 2000.

ÖZEN, T.; KORKMAZ, H. Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate

dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. **Phytomedicine**, v 10, p 405–415, 2003

PIERONI, A. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v 70, p 235–273, 2000.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v 20, n 4, p 751-762, 2006.

RABE, T.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v 56, p 81-87, 1997.

REDDY, B. S.; REDDY, R. K. K.; NAIDU, V. G. M.; MADHUSUDHANA, K.; AGWANE, S. B.; RAMAKRISHNA, S.; DIWAN, P. V. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound-healing potentials of *Holoptelea integrifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v 115, p 249–256, 2008.

RODRIGUES, A.C.C.; GUEDES, M.L.S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 8, n 2, p 1-7, 2006.

RUFFA, M. J.; WAGNER, M. L.; SURIANO, M.; VICENTE, C.; NADINIC, J.; PAMPURO, S.; SALOMÓN, H.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v 15, p 153–159, 2004.

SCHOTTNER, M.; REINER, J.; TAYMAN, F. S. K. (+)-neo-olivil from roots of *Urtica dioica*. **Phytochemistry**, v 46, n 6, p 1107-1109, 1997.

SHRESTHA, P. M.; DHILLION, S. S. Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v 86, p 81–96, 2003.

TAHRI, A.; YAMANI, S.; LEGSSYER, A.; AZIZ, M.; MEKHFI, H.; BNOUHAM, M.; ZIYYAT, A. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v 73, p 95–100, 2000.

TESTAI, L.; CHERICONI, S.; CALDERONE, V.; NENCIONI, G.; NIERI, P.; MORELLI, I.; MARTINOTTI, E. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v 81, p 105-109, 2002.

TUNÓN, H.; OLAVSDOTTER, C.; BOHLIN, L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v 48, p 61-76, 1995.

VÁZQUEZ, F. M.; SUAREZ, M. A.; PÉREZ, A. Medicinal plants used in the Barros Area, Badajoz Province (Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, v 55, p 81-85, 1997.

VISBISKI, V. N.; WEIRICH NETO, P. H.; SANTOS, A. L. Uso popular das plantas medicinais no assentamento Guanabara, Imbau-PR. **Publicação da UEPG/ Ciências Exatas/Terra**, v 9, n 1, p 13-20, 2003.

WADOOD, N.; NISAR, M.; RASHID, A.; WADOOD, A.; GUL-NAWAB; KHAN, A. Effect of a compound recipe (medicinal plants) on serum insulin levels of alloxan induced diabetic rabbits. **Journal of Ayub Medical Coll Abbottabad**, v 19, n 1, 2007.

WAZIR, S. M.; DASTI, A. A.; SHAH, J. Common medicinal plants of Chapursan Valley, Gojal II, Gilgit-Pakistan. **Journal of Research (Science)**, v 15, n 1, p 41-43, 2004

ZHANG, Q.; LI, L.; LIU, L.; LI, Y.; YUAN, L.; SONG, L.; WU, Z. Effects of the polysaccharide fraction of *Urtica fissa* on castrated rat prostate hyperplasia induced by testosterone propionate. **Phytomedicine**

ZYYAT, A.; LEGSSYER, A.; MEKHFI, H.; DASSOULI, A.; SERHROUCHNI, M.; BENJELLOUN, W. Phytotherapy of hipertension and diabetes in oriental Morocco. **Journal of Ethnopharmacology**, v 58, p 45-54, 1997.

ANEXO A- Figura do Metabolismo Vegetal

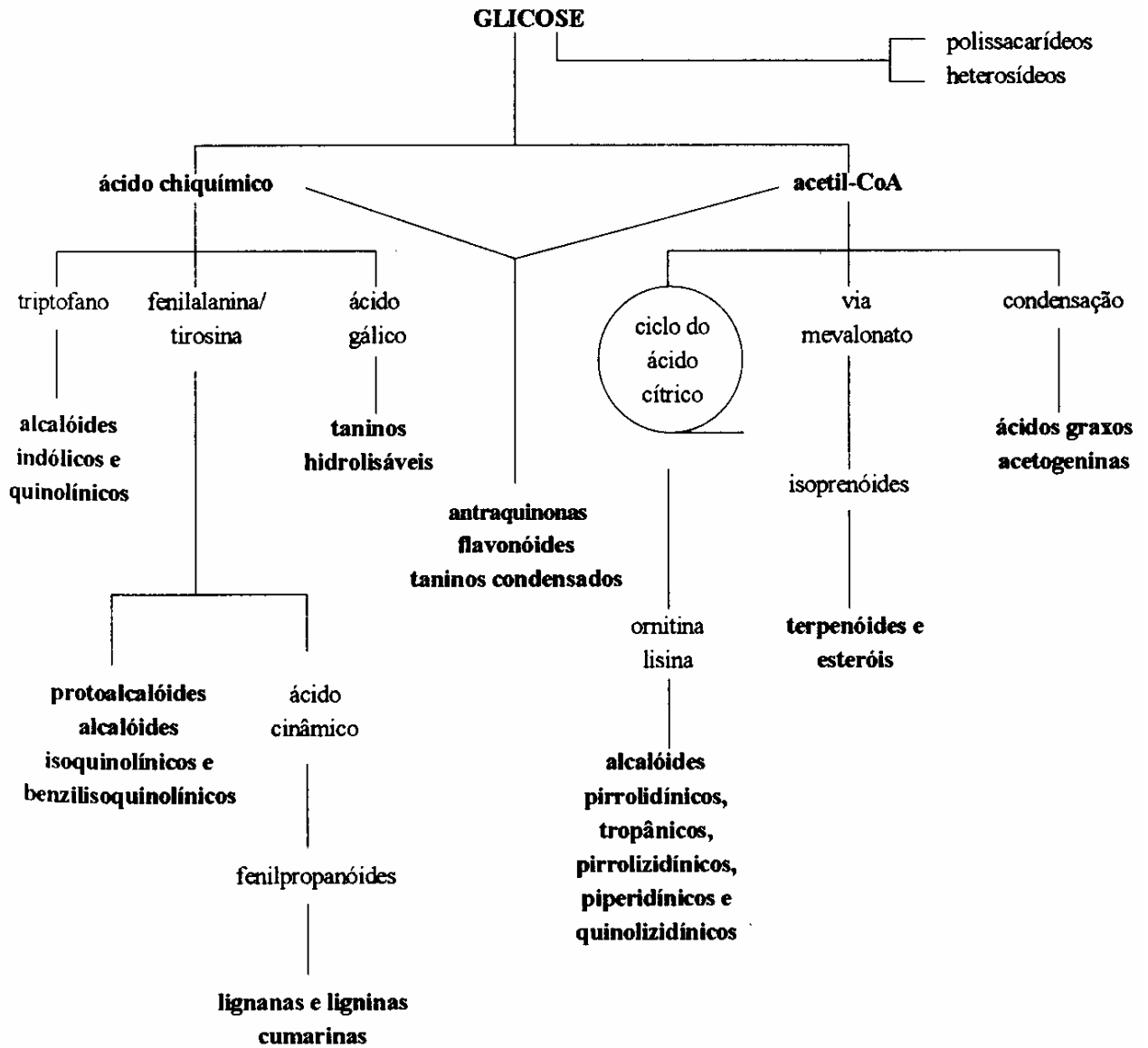


Figura 1: Visão simplificada do metabolismo secundário e sua inter-relação com o metabolismo primário (SANTOS, 2004).

* SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p 403-434.