



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA - UNEB
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - PPGFARMA**

REBECA OLIVEIRA DE SANTANA

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* DE
EXTRATOS DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS POR
PACIENTES COM SUSPEITA DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR
ERVAS**

Salvador – Bahia
2022

REBECA OLIVEIRA DE SANTANA

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* DE
EXTRATOS DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS POR
PACIENTES COM SUSPEITA DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR
ERVAS**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Erika Maria de Oliveira Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Raymundo Paraná Ferreira Filho

Linha de Pesquisa: (Linha 1) - Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais

Salvador – Bahia
2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

OLIVEIRA DE SANTANA, REBECA

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS in vitro DE
EXTRATOS DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS POR
PACIENTES COM SUSPEITA DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR
ERVAS / REBECA OLIVEIRA DE SANTANA. - Salvador, 2022.

109 fls : il.

Orientador(a): ERIKA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO.

Coorientador(a): RAYMUNDO PARANÁ FERREIRA FILHO.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da
Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2022.

1.Fitoquímica. 2.Citotoxicidade. 3.Lesão Hepática. 4.Produtos
Naturais.

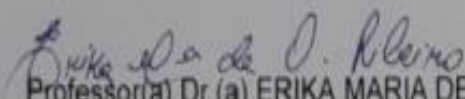
CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* DE EXTRATOS DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS POR PACIENTES COM SUSPEITA DE LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR ERVAS"

REBECA OLIVEIRA DE SANTANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 24 de fevereiro de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

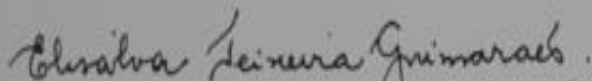


Professor(a) Dr.(a) ERIKA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Doutorado em Química

Universidade Federal da Bahia

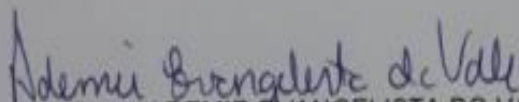


Professor(a) Dr.(a) ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES

Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Doutorado em Patologia

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA



Professor(a) Dr.(a) ADEMIR EVANGELISTA DO VALE

Universidade Federal da Bahia - UFBA

Doutorado em Química

Universidade Federal da Bahia

Dedicatória

Dedico este trabalho em primeiro lugar à **Deus**, que sempre me deu forças nas horas mais difíceis e me apresentou com a família que tanto amo. Dedico aos **Meus Pais**, Idelvan Brandão de Santana e Vanusia de Araújo Oliveira, pelo amor, apoio e ensinamentos de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, que nos dá o dom da vida e vida em abundância. Agradeço a ele também, que me carregou quando me faltaram forças.

Aos meus tesouros, motivos de alegria e razão do meu viver, Idelvan Brandão de Santana e Vanusia de Araújo Oliveira, meu agradecimento eterno, pelo apoio e por tudo que representam em minha vida e nas minhas realizações. À minha orientadora Prof. Dra. Erika Maria de Oliveira Ribeiro, pelo aceite, confiança, paciência, dedicação, ensinamentos e compreensão. Fica aqui o meu agradecimento e a minha admiração pelo exemplo de competência.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Raymundo Paraná, à Profa. Dra. Juceni Pereira e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), por me deixar fazer parte deste trabalho, por estar no grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Aos Professores Dr. Ademir, Dr. Victor Hugo e Dr. Genario Oliveira, pela transmissão de conhecimentos científicos e trocas de experiência.

Aos meus colegas do LPPN, Ferdinando, Diogo, Caio, Ivie, Gildeon, Danilo, Luiza, pela paciência e apoio nesta pesquisa.

À Prof. Dra. Elisalva e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e aos meus colegas de mestrado, Luciano, Tatiana, Dahara e Juliana, pelos ensinamentos, apoio, paciência e motivação no laboratório de pesquisa da Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

A Universidade Estadual da Bahia em particular e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA) pelo ensino de qualidade e pela excelente formação que proporcionam aos alunos. Em especial ao Coordenador de Mestrado, Prof. Dr. Aníbal de Freitas, aos professores e a secretária Sra. Léia Omena pelo modo prestativo e eficiente com que sempre atenderam as minhas necessidades.

A vida, por colocar em meu caminho pessoas incríveis e por me permitir vencer mais esse desafio....

À todos que estiveram presentes direta ou indiretamente nesta etapa e contribuíram com a realização deste projeto.

Muito obrigada!!!

Epígrafe

Pedras no caminho?

Eu guardo todas.

Um dia vou construir um castelo.

(Nemo)

SANTANA, Rebeca Oliveira. **Análise fitoquímica e atividades biológicas *in vitro* de extratos de produtos naturais utilizados por pacientes com suspeita de lesão hepática induzida por ervas.** Salvador - Bahia, 2022. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Bahia, 2022.

RESUMO

O potencial hepatotóxico vinculado a medicamentos eletivos, como elaborações à base de plantas e suplementos dietéticos, está crescendo. Os últimos anos apresentaram-se relatos que os fitoterápicos podem ocasionar um amplo espectro de lesões hepáticas, contaminando grande parte das células presentes no fígado e nas vias biliares, acarretando desde leve elevação assintomática das enzimas hepáticas até hepatite aguda ou crônica. Sendo assim, este trabalho buscou avaliar o perfil fitoquímico e atividades biológicas, principalmente a atividade citotóxica de extratos de produtos naturais utilizados por pacientes com suspeita de Lesão Hepática induzida por Ervas do inglês *Herbal Induced Liver Injury* (HILI), do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), localizado na cidade de Salvador- BA. Para este fim, amostras foram cedidas por pacientes do HUPES com suspeita de HILI, desde a planta inteira até um medicamento fitoterápico. Como resultado, foi possível a identificação de diversas classes de metabólitos em todas as espécies. No teste do sequestro do radical livre DPPH, todos os extratos mostraram boa atividade antioxidante, sendo o extrato metanólico da espécie *Maytenus ilicifolia* com maior AA ($IC_{50} = 0,219$ mg/ml). Todos os extratos exibiram concentrações significativas de fenólicos e flavonoides totais. No teste da atividade inibitória da AChE, apenas duas amostras (D1C e AMM) demonstraram porcentagem de inibição. No teste citotóxico frente à *Artemia salina*, os extratos de valores de CL_{50} fortemente tóxicos foram AEM (10 μ g/ml), AMC (48,66 μ g/ml) e LMM (0,0451 μ g/ml). Na avaliação da citotoxicidade em células, não houve atividade citotóxica e antitumoral significativa. Supostamente, as espécies vegetais sozinhas, não estão causando hepatotoxicidade. Possivelmente, houve uma interação planta-medicamento ou planta-alimento, questões de posologia e dose inadequadas utilizadas pelos pacientes acometidos por lesão hepática. Sugere-se ser necessário realizar outros testes para avaliar atividade antitumoral com uma maior quantidade de extrato de cada espécie, sendo interessante a realização de estudos *in vivo* utilizando fígado de camundongos.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoquímica, Citotoxicidade, Produtos naturais, Lesão hepática.

SANTANA, Rebeca Oliveira. **Phytochemical analysis and in vitro biological activities of extracts of natural products used by patients with suspected herbal-induced liver injury.**.. Salvador - Bahia, 2021. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Bahia, 2021.

ABSTRACT

The hepatotoxic potential linked to elective drugs such as herbal preparations and dietary supplements is growing. In recent years there have been reports that herbal medicines can cause a wide spectrum of liver damage, contaminating a large part of the cells present in the liver and bile ducts, causing from mild asymptomatic elevation of liver enzymes to acute or chronic hepatitis. Therefore, this work sought to evaluate the phytochemical profile and biological activities, especially the cytotoxic activity of extracts of natural products used by patients with suspected Herbal Induced Liver Injury (HILI) Herbal Induced Liver Injury (HILI), from the Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), located in the city of Salvador-BA. For this purpose, samples were provided by HUPES patients with suspected HILI, from the whole plant to a herbal medicine. As a result, it was possible to identify several classes of metabolites in all species. In the DPPH free radical scavenging test, all extracts showed good antioxidant activity, with the methanolic extract of the species *Maytenus ilicifolia* having the highest AA (IC₅₀ = 0.219 mg/ml). All extracts exhibited significant concentrations of total phenolics and flavonoids. In the AChE inhibitory activity test, only two samples (D1C and AMM) showed percentage inhibition. In the cytotoxic test against *Artemia salina*, the extracts with highly toxic LC₅₀ values were AEM (10 µg/ml), AMC (48.66 µg/ml) and LMM (0.0451 µg/ml). In the evaluation of cytotoxicity in cells, there was no significant cytotoxic and antitumor activity. Supposedly, plant species alone are not causing hepatotoxicity. Possibly, there was a plant-drug or plant-food interaction, issues of dosage and inadequate dose used by patients affected by liver injury. It is suggested that it is necessary to carry out other tests to evaluate antitumor activity with a greater amount of extract of each species, in addition to obtaining in vivo studies of these samples in mouse liver.

Keywords: Phytochemistry, Cytotoxicity, Natural Products, HILI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Reações de Fase I e Fase II do Mecanismo de Biotransformação de Xenobióticos.	19
Figura 2:	Redução de DPPH.	45
Figura 3:	Estrutura do β -caroteno (A) e do ácido linoleico (B). Ao lado reação de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.	47
Figura 4:	Mecanismo mostrando a reação das substâncias fenólicas com reagente de Folin-Ciocalteu.	49
Figura 5:	Mecanismo mostrando a complexação entre o flavonóide e o cloreto de alumínio (AlCl_3) com formação de complexo estável (flavonóide-Al).	50
Figura 6:	Reação da enzima acetilcolinesterase.	52
Figura 7:	Redução de resazurina em resorufina.	53
Figura 8:	Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos metanólicos e fase clorofórmicas das espécies vegetais em estudo, através do método DPPH.	63
Figura 9:	Porcentagem da quantidade de <i>Nauplius</i> mortos nos extratos clorofórmicos das espécies vegetais estudadas.	69
Figura 10:	Porcentagem da quantidade de <i>Nauplius</i> mortos nos extratos metanólicos das espécies vegetais estudadas.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e circunstância. Brasil, 2017.	21
Tabela 2:	Relação dos produtos naturais indicando nome científico, nome popular, substâncias bioativas e atividades biológicas reportadas na literatura científica.	30
Tabela 3:	Relação dos produtos naturais utilizados por pacientes com suspeita de lesão hepática induzida por ervas do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES).	41
Tabela 4:	Triagem fitoquímica dos extratos de plantas suspeitas de serem hepatotóxicas.	54
Tabela 5:	Teste qualitativo para triterpenos e esteroides.	55
Tabela 6:	Quantificação de fenólicos totais em mg de EAG/g de extrato.	56
Tabela 7:	Quantificação do teor de flavonóides totais em EQ/mg de extrato.	59
Tabela 8:	Concentração Inibitória dos Extratos Avaliados.	63
Tabela 9:	Resultados do teste de inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.	66
Tabela 10:	Resultados da atividade citotóxica frente à <i>Artemia salina</i> com os extratos metanólicos e clorofórmicos das espécies estudadas.	70
Tabela 11:	Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade para determinação de CI_{50} .	71
Tabela 12:	Atividade citotóxica das frações clorofórmica e metanólica dos extratos vegetais estudados.	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Distribuição geográfica no mundo das famílias de cada espécie estudada.	26
Quadro 2:	Relatos descritos na literatura científica sobre a atividade citotóxica das amostras com suspeita de HILI, através do cultivo de linhagens.	35
Quadro 3:	Denominação de cada extrato, de acordo com o nome popular da planta medicinal e solvente extrator.	42
Quadro 4:	Porcentagem de inibição e classificação da intensidade de inibição segundo espécies e extratos utilizados.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Abs	Absorbância
AChE	Acetilcolinesterase
AEC	Extrato Clorofórmico de Anis Estrelado
AEF	Associação Europeia do Fígado
AEM	Extrato Metanólico de Anis Estrelado
ALT	Alanina Aminotransferase
AMC	Extrato Clorofórmico de Amora Preta
AMM	Extrato Metanólico de Amora Preta
AST	Aspartato Aminotransferase
BHT	Hidroxitolueno de butila
CAT	Centro de Informação e Assistência Toxicológica
CIOMS	<i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
CL	Concentração Letal
CVC	Extrato Clorofórmico de Chá Verde
CVM	Extrato Metanólico de Chá Verde
DILI	<i>Drug-Induced Liver Injury</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EQ	Equivalente de Quercetina
ESC	Extrato Clorofórmico de Espinheira Santa
ESM	Extrato Metanólico de Espinheira Santa
FA	Fosfatase Alcalina
GPRD	<i>General Practice Research Database</i>
HC	Extrato Clorofórmico de Hibisco

HCA	Análise por Agrupamento Hierárquico
HILI	<i>Herbal Induced Liver Injury</i>
HM	Extrato Metanólico de Hibisco
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgar Santos
IC	Concentração Inibitória
LMC	Extrato Clorofórmico de Leite de Moreira
LMM	Extrato Metanólico de Leite de Moreira
LSN	Limite Superior do Normal
MS	Ministério da Saúde
MTT	- 3- [4,5- dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil brometo tetrazolina
NPC	Extrato Clorofórmico de Nogueira-pecã
NPM	Extrato Metanólico de Nogueira-pecã
PCA	Análise de Componentes Principais
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNIPT	Programa Nacional de Informações sobre Plantas Tóxicas
PNPME	Plano Nacional de Plantas Medicinais e Ervas
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia
PPC	Extrato Clorofórmico de Picão Preto
PPM	Extrato Metanólico de Picão Preto
SBH	Sociedade Brasileira de Hepatologia
SINITOX	Sistema Nacional de Informações sobre Farmacologia Tóxica
SOS	Síndrome de Obstrução Sinusoidal
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1 O Uso de Plantas Medicinais na Antiguidade e na Atualidade	16
3.2 Considerações Gerais sobre a Lesão Hepática Induzida por Ervas ..	18
3.3 Aspectos Botânicos e Fitoquímicos da Espécies estudadas	22
3.4 Uso das Linhagens Celulares na Avaliação do Potencial Citotóxico de Plantas Medicinais	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Obtenção das Amostras	41
4.2 Preparação das Amostras	42
4.3 Screening Fitoquímico	44
4.3.1 Alcaloides	44
4.3.2 Cumarinas Voláteis	44
4.3.3 Flavonoides	44
4.3.4 Saponinas	44
4.3.5 Esteroides e Triterpenos	44
4.3.6 Taninos	45
4.4 Análise Quantitativa da Atividade Antioxidante pelo Método de Sequestro de Radical Livre 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila (DPPH)	45
4.5 Atividade Antioxidante (Inibição da Oxidação do β-Caroteno/Ácido Linoleico).....	46
4.6 Fenólicos Totais	48
4.7 Flavonoides Totais	49
4.8 Teste de Letalidade da Artemia salina (<i>Naupliis</i>)	51
4.9 Atividade Inibitória da Enzima Acetilcolinesterase	51
4.10 Atividade Citotóxica em Células Normais e Tumoriais.....	53

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Screening Fitoquímico	54
5.2 Determinação da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre DPPH	56
5.3 Inibição Da Oxidação Do B-Caroteno/Ácido Linoleico	58
5.4 Teor de Fenólicos Totais	62
5.5 Flavonoides Totais	68
5.6 Atividade Inibitória da Enzima Acetilcolinesterase	67
5.7 Teste de Toxicidade frente à Artemia salina	68
5.8 Avaliação da Atividade Citotóxica em Células Normais e Tumoriais.....	71
6 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS.....	81
Anexo A. Artigo publicado em Revista A3.....	82

1 INTRODUÇÃO

Um dos mais antigos métodos utilizados pelo homem, com o intuito de cura, prevenção e tratamento de doenças, é o emprego de plantas com fins medicinais. A Organização Mundial da Saúde (OMS), no começo dos anos 90, anunciou que 65 a 80% da população de países emergentes necessitavam das plantas medicinais como único acesso aos cuidados essenciais de saúde. No momento atual, a maioria da venda de plantas medicinais é realizada em comércios de produtos naturais e farmácias, em que preparações vegetais são vendidas com rótulos industriais (JÚNIOR; PINTO, 2005).

Em países emergentes, o uso de ervas medicinais repercutiu particularmente no propósito de dar maior valor a medicina tradicional e de investigar a possibilidade de usá-la em cuidados primordiais da saúde. Já em outros países como Estados Unidos e Inglaterra, os dirigentes de saúde foram pressionados a aderir medidas impostas pelo interesse popular na utilização de plantas medicinais. No entanto, a grande parte dos fitoterápicos que são usados no momento atual por automedicação ou por indicação médica não tem os seus malefícios bem estudados. Sendo assim, o uso inapropriado de um produto, pode levar a sérios problemas de saúde (SILVEIRA *et al.*, 2008).

A planta medicinal é um xenobiótico, ou seja, um produto estranho ao organismo com fins terapêuticos, que ao ser ingerido pelo homem, sofre modificações e pode, desta forma, gerar produtos tóxicos, causando por exemplo hepatotoxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A hepatotoxicidade é uma lesão no fígado causada por ingestão, inalação ou administração parenteral de agentes farmacológicos ou químicos. É um problema relevante na prática clínica, correspondendo a cerca de 0,2% de todas as internações hospitalares e 2 a 3% das internações por efeitos adversos de medicamentos (SBH, 2010).

Há inúmeros fatores responsáveis por provocar intoxicações devido ao uso de plantas medicinais como, por exemplo, a falta de informação em relação a formas de cultivo associada ao verdadeiro reconhecimento farmacobotânico do vegetal, referências insuficientes sobre reações adversas, esquema posológico, espaço de tempo a ser usado, entre outras e, especificamente, as consequentes interações medicamento-medicamento. Frequentemente, um único fármaco não é o bastante para o tratamento de uma doença. Deste modo, dois ou mais fármacos serão

prescritos pelo profissional de saúde e esta associação, nem sempre, mudará o estado do paciente, isso porque medicamentos podem interagir entre si, trazendo a denominada "interação medicamentosa" que poderá ser compreendida como "alteração no efeito de uma droga causada por outra, ingeridas ao mesmo tempo". Essas interações não se limitam, exclusivamente, ao mundo dos compostos químicos sintetizados, mas também com aqueles contidos em plantas que são utilizadas na produção de chás, xaropes caseiros e medicamentos fitoterápicos (NICOLETTI *et al.*, 2007).

Segundo a Associação Europeia do Fígado (AEF), o potencial de hepatotoxicidade vinculado a medicamentos eletivos, como elaborações à base de plantas e suplementos dietéticos, está crescendo. Os últimos anos apresentaram-se relatos que os fitoterápicos podem ocasionar um amplo espectro de lesões hepáticas, contaminando grande parte das células presentes no fígado e nas vias biliares, mudando de leve elevação assintomática das enzimas hepáticas até hepatite aguda ou crônica, cirrose, insuficiência hepática aguda, colangite crônica, síndrome de obstrução sinusoidal (SOS), esteatose macro e microvesicular e danos vasculares. Dando a ênfase ao SOS, alcaloides de pirrolidizina são compostos químicos causadores de mais de 8.000 casos em todo o planeta e compreendem uma das principais razões desta síndrome (ANDRADE *et al.*, 2019).

A lesão hepática induzida por drogas (DILI) é um dano ao fígado que pode ser causado pela exposição a qualquer tipo de medicamento, sendo uma reação adversa medicamentosa atípica, e é a causa mais comum de remoção de medicamentos do mercado farmacêutico. A incidência de DILI é variável. Alguns fatores de risco que amplificam a possibilidade de mais casos de DILI incluem hipersensibilidade, idade, gênero, consumo de bebida alcoólica, uso simultâneo de drogas e histórico clínico atual ou passado de doença hepática, além de condições genéticas e ambientais (CANI-PANIAGUA *et al.*, 2019).

A Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH) enviou um questionário para os grandes centros de transplante do Brasil, e analisou que um total de 1.622 transplantes foram feitos devido a casos de hepatite fulminante, sendo que 30% foram originados por medicamentos. Os agentes envolvidos que se destacaram foram os tuberculostáticos (20%), fitoterápicos (16%), paracetamol (16%) e alfametildopa (16%) (SBH, 2011). Diversos produtos naturais podem interagir com medicamentos

sintéticos, intervindo no seu metabolismo e alterando o resultado terapêutico ou intensificando seus efeitos hepatotóxicos (SOUZA, 2011).

Nesse contexto, o uso tradicional e popular não é suficiente para ratificar eticamente as plantas medicinais com medicamentos efetivos e seguros, em outros termos, para fins terapêuticos, as plantas medicinais não se distinguem de qualquer outro medicamento sintético e a sua recomendação ou a autorização oficial de seu uso precisará ser baseada em evidências experimentais conclusivas, de que os riscos para a vida do ser humano são menores que os benefícios que possam sobrevir. O candidato a medicamento necessita ter sua ação comprovada e a sua letalidade potencial analisada cientificamente, como qualquer outro medicamento (NICOLETTI *et al.*, 2010).

Nesse cenário de validação de um medicamento fitoterápico, os experimentos de toxicidade *in vitro*, apresentam importância na redução de custos associados à avaliação de inúmeros compostos bioativos e estabelecendo um complemento aos testes em animais, a partir da conexão com informações de toxicidade *in vivo*. Para uma análise eficaz da citotoxicidade, as triagens *in vitro* podem ser utilizadas para diferenciar aspectos gerais de toxicidade celular por meio de ensaios em massa. Estes ensaios, dentre diversas outras aplicabilidades como por exemplo efeito antioxidante, imunomodulação e testes *in vitro*, podem ser empregados tanto para identificar substâncias potencialmente tóxicas ao organismo, quanto para avaliar a atividade citotóxica e descrever o mecanismo de ação de compostos que possam vir a ser utilizados com finalidade anticancerígena, por exemplo, pois os mesmos, em teoria, podem culminar com a inibição da proliferação celular (SLATER, 2001).

Um outro ensaio relevante para ampliar o conhecimento em relação às especificidades biológicas de espécies vegetais, é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Estas sinapses estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central e periférico, sendo essencial para a homeostase de inúmeras funções do organismo (ARAÚJO; SANTOS; e GONÇALVES, 2016). Compostos inibidores da AChE aumentam os níveis de acetilcolina endógena e possivelmente são úteis no tratamento sintomático de atividades anticancerígenas, bem como potenciais para o tratamento de doenças do sistema nervoso que produzem espécies reativas de oxigênio, como a doença de Alzheimer e a Encefalopatia hepática. A encefalopatia hepática é a perda da função

cerebral que ocorre em indivíduos com lesão hepática grave, devido ao acúmulo de substâncias tóxicas no sangue, normalmente eliminadas pelo fígado, e estas chegam até o cérebro (UMEIO *et al.*, 2011; MSD, 2021).

A existência de centros de referência na assistência e pesquisa em DILI/HILI permite a melhor compreensão dessas doenças, e a investigação destes agentes suspeitos de DILI como: chás, cápsulas ou outras formas farmacêuticas advindas de plantas medicinais, se torna imprescindível para a investigação diagnóstica. Portanto, o estudo da composição fitoquímica como também de atividades biológicas *in vitro*, tais como, atividade citotóxica, antioxidante e anticolinesterásica são importantes para uma possível colaboração no conhecimento científico quanto ao uso seguro de plantas medicinais, além de fornecer mais informações a respeito das amostras estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a composição fitoquímica e atividades biológicas de extratos de produtos naturais utilizados por pacientes com suspeita de HILI do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), localizado na cidade de Salvador- BA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Identificar os metabólitos secundários nos extratos;
- 2.2.2 Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e a sua influência na inibição da enzima acetilcolinesterase;
- 2.2.3 Testar a atividade citotóxica dos extratos, frente à *Artemia salina*.
- 2.2.4 Analisar a atividade citotóxica dos extratos vegetais em células normais e tumorais.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NA ANTIGUIDADE E NA ATUALIDADE

Civilizações antigas possuem referências históricas às plantas medicinais. Muito antes do surgimento de qualquer forma de escrita, os humanos usavam as plantas, algumas delas como alimento e outras como remédios. Em seus experimentos com ervas, houve sucessos e fracassos. As plantas medicinais poderiam curar, mas em outras ocasiões podiam matar ou ter efeitos colaterais graves. A descoberta de propriedades úteis ou prejudiciais das plantas é realizada por meio do conhecimento empírico, por exemplo, por meio da observação humana do comportamento animal. Além disso, há relatos lendários de que o poder dos deuses é atribuído às plantas porque seu uso faz parte de rituais religiosos, que colocam as pessoas em contato direto com os deuses. Essas valiosas informações eram inicialmente repassadas às gerações futuras de forma oral, para que, depois, na forma escrita, fossem compiladas e arquivadas (TOMAZZONI *et al.*, 2006).

Textos chineses relatam o nome, dosagem e indicação do uso de plantas para tratamento de doenças. Registros foram encontrados no manuscrito egípcio "*Ebers Papyrus*" datado de 1500 AC., que contém informações sobre 811 prescrições e 700 medicamentos. Algumas dessas plantas ainda estão em uso, como o ginseng (*Panax spp.*), a éfedra (*Ephedra spp.*), a cássia (*Cassia spp.*), e ruibarbo (*Rheum palmatum L.*), inclusive como fonte para a indústria farmacêutica (DUARTE, 2006)

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram compostos principalmente por plantas e extratos vegetais, que podem ser descritos na farmacopeia da época. Assim, na Farmacopeia Geral do Reino e do território de Portugal (1794), entre os produtos denominados "medicamentos simples", encontram-se 30 produtos de origem mineral, 11 produtos de origem animal e cerca de 400 tipos de plantas. Ou seja, as plantas medicinais e seus extratos constituíam a maior parte dos medicamentos, quase nada diferente dos medicamentos usados na medicina popular da época. No século XX, a tendência de separar princípios ativos começou a aparecer (SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2000).

Em 1926, Rodolpho Albino Dias da Silva escreveu a primeira Farmacopeia Brasileira denominada "Farmacopeia Verde", que continha 183 espécies de plantas medicinais brasileiras, incluindo macro e micro descrições. O consumo de plantas

medicinais com base nas tradições familiares tornou-se uma prática comum na medicina popular. Muitos fatores contribuíram para o aumento do uso deste recurso, incluindo os efeitos colaterais do uso a longo prazo de medicamentos industrializados, a dificuldade das pessoas em ter acesso a cuidados médicos, o aumento do consumo de produtos naturais e o uso da medicina tradicional chinesa e ocidental integrada em métodos para estudar saúde e bem-estar (BRASIL, 2019).

Atualmente, o uso de plantas medicinais tem aumentado. Dois fatores podem explicar esse aumento. O primeiro, é o avanço no campo da ciência, que possibilita o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos seguros e eficazes. A segunda tendência é que as pessoas estão cada vez mais buscando tratamentos alternativos e com menos custos (BRUNING; MOSEGUI; e VIANNA, 2012).

No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia (PNPMF) foi promulgada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Em 24 de dezembro de 2007, é publicada a Portaria nº 3.237, na qual, os medicamentos fitoterápicos foram incluídos na lista de referência de medicamentos de atenção primária à saúde e suprimentos auxiliares, pela primeira vez. O Ministério da Saúde (MS) criou o comitê em 2008 e lançou o Plano Nacional de Plantas Medicinais e Ervas (PNPME), e aprovou o Regulamento do MS/GM nº 886 em 2010. Neste mesmo ano, a Farmácia Viva foi regulamentada e a fitoterapia inserida no SUS, com o objetivo de garantir o uso seguro e racional das plantas medicinais (VIEIRA; LEITE, 2018).

Com o crescimento da ciência e tecnologia, as plantas medicinais vêm sendo pesquisadas em relação a sua eficiência terapêutica, tornando-se prescritas por muitos profissionais da saúde na atualidade. Infelizmente, ainda existe uma visão da população que o uso de espécies vegetais é totalmente seguro e não traz eventos adversos (CAMPOS *et al.*, 2016). Isso é preocupante, pois todas as espécies vegetais apresentam uma proporção de toxicidade pelo fato de fornecerem metabólitos, que podem agir tanto farmacologicamente, quanto toxicologicamente, pois caso as plantas medicinais sejam utilizadas em posologia, indicação clínica ou tempo inadequados, estas, podem causar danos ao organismo, principalmente ao fígado, que é o órgão no qual ocorre o metabolismo de substâncias (PINHEIRO *et al.*, 2020).

3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR ERVAS

O dano ao fígado causado pela ingestão de ervas é chamado de "lesão hepática induzida por ervas" (HILI) e ocorre em pessoas suscetíveis. As manifestações clínicas da HILI são as mesmas do dano hepático induzido por drogas (DILI), como icterícia, dores abdominais e inchaço nas pernas e tornozelos, coceira na pele, urina escura, fezes claras ou esbranquiçadas, náuseas, vômitos e fadiga crônica. Além disso, HILI e DILI têm características comuns porque ambas as condições são causadas por componentes químicos que podem ser produzidos por métodos naturais ou sintéticos. Esses produtos químicos naturais e sintéticos são estranhos ao corpo humano e, portanto, precisam ser eliminados pelo metabolismo. Devido ao uso de uma variedade de ervas e suplementos dietéticos não comerciais e não sujeitos a receita, a incidência de HILI é mais difícil de registrar do que a DILI. Além disso, a incidência de HILI é subestimada porque os pacientes costumam não relatar o uso de ervas (AMADI; ORISAKWE, 2018).

A lesão hepática está relacionada à necrose celular, aumento da peroxidação lipídica dos tecidos e diminuição dos níveis de glutathione. Além disso, os níveis séricos de muitos marcadores bioquímicos, como transaminase, fosfatase alcalina, bilirrubina, triglicerídeos e colesterol na doença hepática, estão elevados. O fígado desempenha um papel central na transformação e limpeza de produtos químicos e é suscetível à toxicidade de fármacos (SEIF, 2016).

A metabolização de substâncias e xenobióticos acontecem em duas fases, I e II (figura 1). A fase I, envolvendo a reação de oxidação, redução e hidrólise, sendo que os produtos finais desta reação são mais tóxicos do que a substância original e pode ter função carcinogênica, na qual são codificados pelas enzimas do citocromo P450 que atuam na biotransformação na fase I. A fase II envolve a conjugação e acetilação, tornando o composto mais hidrofílico. Para receber o metabolismo da fase II, o composto ou xenobiótico não necessariamente precisa ser metabolizado na fase I. E alguns compostos, ao serem metabolizados na fase I já podem ser eliminados, sem que tenham que receber metabolismo na fase II, desde que o produto seja um composto inativo e já biotransformado que possa ser eliminado pela urina ou bile (SANTOS; LIMA, 2016).

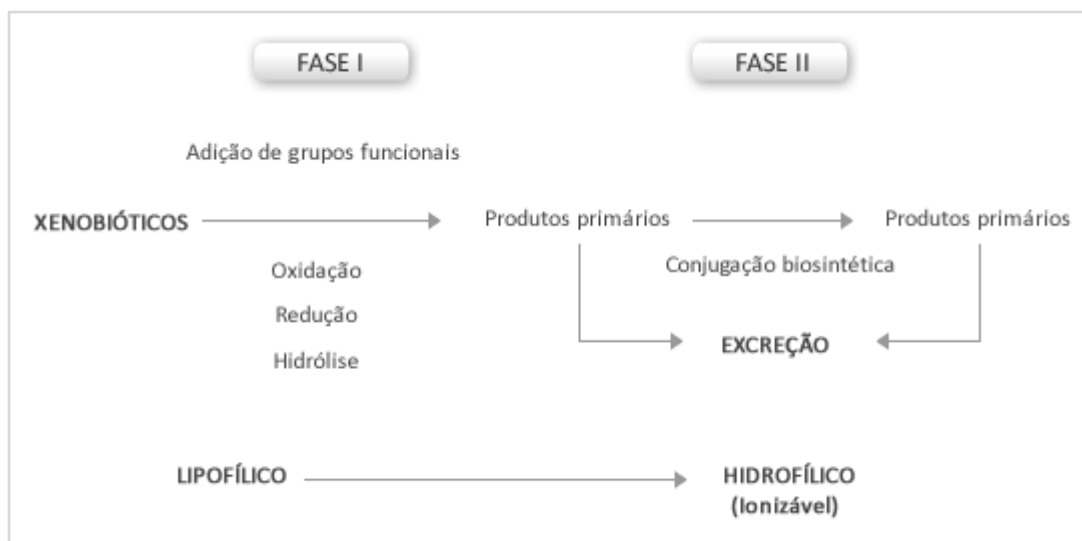


Figura 1: Reações de Fase I e Fase II do Mecanismo de Biotransformação de Xenobióticos.

Fonte: <http://tics.ifsul.edu.br/matriz/conteudo/disciplinas/toxa/ub/1/3.html>

Em um estudo prospectivo conduzido em um hospital alemão, observou-se que de 21.470 pacientes recebendo produtos naturais, 844 casos (3,93%) tinham níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) e 26 casos de HILI (0,12%). Tais dados demonstram ainda mais uma forte demanda pela busca de evidências científicas para comprovar a eficácia e segurança de ervas medicinais. As principais questões de HILI incluem o cálculo do risco de HILI (incidência e prevalência de HILI), as características clínicas de HILI e a determinação da lista de ervas patogênicas, incluindo compostos relacionados e a população suscetível com sua variação genética. Este conhecimento permite que as pessoas explorem os principais mecanismos de HILI e as melhores estratégias para preveni-los (BYEON *et al.*, 2019).

De acordo com Jonathan *et al.* (2011), como os pacientes bebem chás e utilizam medicamentos prescritos e sem receita, muitas vezes é difícil determinar a causa e o efeito do dano hepático do uso de plantas medicinais. Portanto, geralmente é impossível medir a interação entre ervas e outras drogas. Além disso, em pacientes com hepatotoxicidade, as razões para confundir as causas da hepatotoxicidade são a potencial multiplicidade de ingredientes em um determinado produto (alguns dos quais podem não estar indicados no rótulo) e as mudanças sazonais na colheita de plantas medicinais.

Devido ao seu metabolismo único e estreita relação com o trato gastrointestinal, o fígado é suscetível a danos causados por drogas e outras substâncias. Setenta e

cinco por cento do sangue que chega ao fígado vem diretamente dos órgãos gastrointestinais e entra no baço pela veia porta, trazendo drogas e xenobióticos em forma quase não diluída. A lesão hepática é definida como um aumento nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) mais de três vezes que o limite superior do normal (LSN). O nível de fosfatase alcalina (FA) é mais do que o dobro do LSN; o nível de bilirrubina total associado a ALT ou ALP elevados é mais do que o dobro do LSN (MUMOLI *et al.*, 2006).

Em relação à epidemiologia, deve-se ressaltar que as pesquisas epidemiológicas sobre o risco de DILI iniciaram-se na década de 1990 (EINAR *et al.* 2019). Esses estudos foram baseados no acesso ao *General Practice Research Database* (GPRD) no Reino Unido. Antigamente, muitos medicamentos usados estavam envolvidos na toxicidade hepática, por meio de relatos de casos e relatos espontâneos de medicamentos indesejáveis às autoridades nacionais. O primeiro estudo populacional de danos hepáticos relacionados à medicamentos foi realizado em uma cidade no norte da França. Todos os novos casos de DILI sintomáticos foram coletados prospectivamente por médicos. A incidência de DILI encontrada foi de 13,9 por 100.000 habitantes. Um total de 12% das pessoas precisou de hospitalização, enquanto 6% das pessoas morreram. Estendendo esses resultados a toda a população em geral, na França, pode haver mais de 8.000 casos a cada ano, resultando em aproximadamente 500 mortes (EINAR *et al.*, 2019).

Em 2014, foi estimado o DILI no Estado de Delaware. Gastroenterologistas foram convidados a participar da vigilância do DILI e identificou-se 23 pacientes. Destes 23 casos, 20 atenderam aos critérios para suspeita de DILI, e 43% dos casos foram atribuídos a produtos naturais. Com base nesses dados, a incidência estimada de DILI é de 2,7 casos por 100.000 indivíduos. Este estudo foi a primeira estimativa prospectiva de DILI nos Estados Unidos, mas como o monitoramento de DILI é limitado a gastroenterologistas, sua incidência pode ser subestimada (ZHENG *et al.*, 2019).

No Brasil, com o objetivo de controlar e registrar a ocorrência de intoxicações por plantas, foi criado em 1998, o Programa Nacional de Informações sobre Plantas Tóxicas (PNIPT), como parte do Sistema Nacional de Informações sobre Farmacologia Tóxica (SINITOX, 2012).

Em 2017, o SINITOX, registrou 821 casos de intoxicações causadas por plantas. Dentre os casos, 610 foram por acidente individual. Quatro casos ocorreram por automedicação. Treze casos por abuso do uso da planta medicinal, 1 caso por ingerir alimentos após ter ingerido o chá ou fitoterápico advindo da planta. Vinte e quatro casos pelo uso indevido ou inadequado da planta. Na tabela 01, mostra-se casos registrados de intoxicação no ano de 2017. Registros de casos nos anos de 2018 a 2021, não são explicitados no SINITOX.

Tabela 1 - Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Circunstância. Brasil, 2017.

Circunstância	Acidente Individual	Acidente Coletivo	Acidente Ambiental	Ocupacional	Uso Terapêutico	Presc.Méd.	Erro de Administração	Auto Medicação	Abstinência	Abuso	Ingestão de Alimentos	Tentativa Suicídio	Tentativa Aborto	Violência/ Homicídio	Uso Indevido	Ignorada	Outra	TOTAL	
	Agente	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº
Medicamentos	5051	17	-	8	953	19	1392	397	4	45	-	9983	16	18	106	2096	532	20637	27,11
Agrot/Uso Agrícola	860	23	8	530	-	-	5	-	-	-	2	861	1	6	13	230	9	2548	3,35
Agrot/Uso Doméstico	629	5	-	24	-	-	2	1	-	1	-	89	-	-	13	59	8	831	1,09
Prod.Veterinários	396	-	1	42	-	-	7	4	-	1	-	160	-	-	19	78	1	709	0,93
Raticidas	509	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	487	-	6	-	142	1	1151	1,51
Domissanitários	3351	11	-	145	-	-	5	-	-	6	-	236	-	1	9	880	8	4652	6,11
Cosméticos	877	-	-	5	3	-	4	-	-	1	-	12	-	2	3	93	67	1067	1,40
Prod.Quím.Industriais	1924	14	2	400	-	-	3	-	-	19	-	126	2	4	15	359	10	2878	3,78
Metais	26	-	-	10	-	-	-	-	1	-	-	4	-	-	-	13	1	55	0,07
Drogas de Abuso	59	-	-	1	1	-	1	-	68	2410	2	18	1	7	4	151	20	2743	3,60
Plantas	610	6	-	20	-	-	-	4	-	13	1	16	7	-	24	102	18	821	1,08

Fonte: SINITOX (2017).

Infelizmente, a maioria das ervas e plantas medicinais que as pessoas usam não tem características toxicológicas e farmacodinâmicas bem conhecidas. Possivelmente, as substâncias tóxicas presentes nas plantas variam muito em estrutura e propriedades químicas. No Brasil, a notificação de incidentes toxicológicos não é obrigatória, o que favorece a subnotificação. Isso, aliado à heterogeneidade da distribuição de Centros de Assistência Toxicológica (CAT), dificulta o estabelecimento de um marco nacional e a definição de ações públicas que viabilizem o desenvolvimento de programas de prevenção, controle de casos de intoxicações e ações para auxiliar o atendimento (diagnóstico e tratamento) do paciente envenenado (BRASIL, 2017).

Vale ressaltar que a quantidade de subnotificações impossibilita a exatidão dos dados, sendo ainda uma dificuldade determinar a realidade do número de casos de

intoxicação e acidentes com plantas. Porém, mesmo havendo um número pequeno desses registros, trata-se de um grave problema de saúde pública, uma vez que se deve considerar não apenas os valores percentuais, mas as consequências do efeito tóxico no organismo dos pacientes atendidos (BALTAR *et al.*, 2016).

A falta de estratégias para controlar, prevenir e tratar as intoxicações representa um grande desafio para as instituições públicas de saúde. É importante realizar cada vez mais trabalhos de conscientização sobre os riscos da ingestão de plantas desconhecidas, atentar para o uso de plantas como remédios e medidas preventivas que devem ser tomadas. Além do trabalho de divulgação de informações sobre plantas venenosas, é fundamental o desenvolvimento de projetos interdisciplinares para ampliar o conhecimento da biodiversidade brasileira de espécies vegetais nas áreas de química e farmacologia tóxica (SINITOX, 2016).

3.3 ASPECTOS BOTÂNICOS E FITOQUÍMICOS DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

A identificação das plantas é um dos pontos mais relevantes no campo da fitoterapia. Análises taxonômicas erradas podem não só levar o indivíduo a usar uma planta sem o composto ativo de interesse, como também o incentivar a utilizar uma planta que é tóxica, sem que o mesmo saiba o seu grau de toxicidade. O processo de identificar plantas é feito cada vez que se almeja compreender uma nova planta descoberta, e esta, só pode ser realizada por um botânico especialista em um gênero ou família. O reconhecimento correto se dá em herbário ou pelo uso de chaves de identificação, informes e imagens achadas em monografias e teses (SILVA; SANTOS e RABELO, 2010).

Muitos são os acontecimentos de intoxicação com plantas, pois as semelhanças de estruturas de uma planta induzem o ser humano a utilizar uma espécie confiando ser outra. No entanto, tal dilema deve ser evitado em trabalhos científicos e as pesquisas obtidas devem chegar até a sociedade. É relevante que a correta identificação botânica, possibilita um levantamento bibliográfico concedendo correlações de informações obtidas com estudos que foram realizados anteriormente, e assim é promovido a veracidade dos resultados encontrados sobre tais plantas (BORGES *et al.*, 2016).

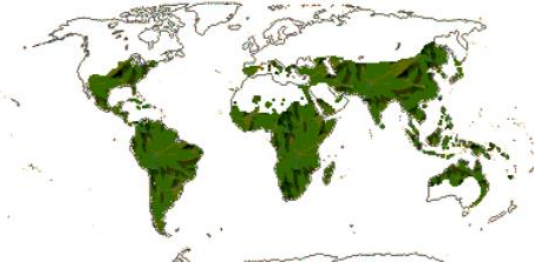
De um mesmo modo, os aspectos fitoquímicos são significativos tendo como objetivo conhecer os compostos bioativos das espécies vegetais e avaliar a presença nos mesmos, detectando grupos de metabólitos secundários relevantes e úteis quanto marcadores químicos no estudo de plantas medicinais (BESSA *et al.*, 2013), além de contribuir na procura de princípios ativos contra diversas doenças.

Tais pesquisas são beneficiadas pela pluralidade de compostos químicos, disponibilidade de matéria prima e seus produtos, que muitas vezes ultrapassam os medicamentos já disponíveis. Como por exemplo, muitas plantas têm amplo espectro de atividade antimicrobiana (SILVA, 2017).

Cada espécie de planta tem sua classificação taxonômica, de acordo com o nível de parentesco. As famílias botânicas agrupam os gêneros que são semelhantes e, de certo modo, os gêneros compreendem as espécies que mais se igualam entre si. De acordo com a família, gênero e espécie, é possível encontrar melhores informações como distribuição geográfica, descrição botânica, sobre cada planta que é selecionada para um estudo (MACHADO; VARGAS, 2018).

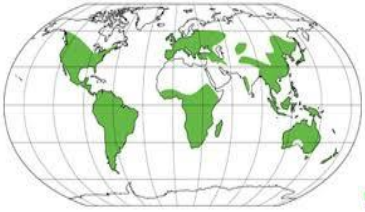
A seguir, estão explícitos no Quadro 01, a distribuição geográfica, descrições botânicas das famílias das espécies estudadas neste trabalho, e, na Tabela 02, encontra-se a relação das espécies *Maclura tinctoria* (L.), *Bidens pilosa* L, *Camellia sinensis* L., *Hibiscus rosa-sinensis*, *Morus nigra*, *Carya illinoensis*, *Illicium verum* e *Maytenus ilicifolia*, indicando nome científico, nome popular, substâncias bioativas e atividades biológicas reportadas na literatura.

Quadro 1: Distribuição geográfica no mundo das famílias de cada espécie estudada.

Família Moraceae 	Espécie	Quantidade de Gêneros e Espécies no Mundo	Referências
	Folhas da <i>Maclura tinctoria</i> L.  Fonte: https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/10279-2/	37 gêneros e aproximadamente 1.050 espécies.	BERG, 1972; BERG, 1984.
	Frutos da <i>Morus nigra</i> L.  Fonte: https://www.sitiodamata.com.br/amora-morus-nigra		

Família Asteraceae 	Flores de <i>Bidens pilosa</i> (L.)  http://maisplantas.blogspot.com/2016/11/bidens-pilosa-1.html	Cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies.	BARROSO <i>et al.</i>, 1991; NAKAJIMA; SEMIR, 2001; NIELSEN <i>et al.</i>, 2002; ROQUE; BAUTISTA, 2008; GONÇALVES; LORENZI, 2007.
Família Theaceae 	Folhas e flores da <i>Camellia sinensis</i> (L.).  Fonte: https://safarigarden.commercesuite.com.br/muda-de-camelia-sinensis-cha-verde-ja-produz-flores	Cerca de 10 gêneros e 195 espécies	PRINCE; PARKS, 2001; MARINHO <i>et al.</i>, 2015.
Família Malvaceae 	Folhas e flores <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. 	Inclui mais de 240 gêneros e 4.225 espécies.	NETO, 2014; ALVES, 2011.

	Fonte: http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/hibiscus-rosa-sinensis-l		
Família Juglandaceae 	Folhas e frutos da <i>Carya illinoensis</i>  https://www.nativnurseries.com/products/native-pecan-seedlings-for-sale-carya-illinoensis	6 gêneros e cerca de 100 espécies de árvores, variando de grande a média.	STELLA; LUCHESE, 2015; BOSCARDIN; COSTA, 2018.
Família Illiciaceae 	Folhas, flores e frutos da <i>Illicium verum</i> Hook  Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Illicium_verum	Composta por um único gênero, <i>Illicium</i>, com cerca de 35 espécies.	WANG <i>et al.</i>, 2010; NIANHE <i>et al.</i>, 2008; SILVA <i>et al.</i>, 2020.
Família Celastraceae	Folhas e frutos da <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek	98 gêneros e cerca de 1.264 espécies.	SPIVEY <i>et al.</i>, 2002; CRONQUIST, 1988;

 Celastraceae	 Fonte: https://hortodidatico.ufsc.br/espinheira-santa/		LAWRENCE, 1971.
---	--	--	--

Fonte: Autora

Tabela 2 – Relação dos produtos naturais indicando nome científico, nome popular, substâncias bioativas e atividades biológicas reportadas na literatura científica.

Nome Científico	Nomes Populares	Descrição da Espécie	Substâncias Bioativas	Atividades Biológicas	Referências
<i>Maclura tinctoria</i> (L.)	Aiúva, leite de moreira, itajubá, amora-branca.	Árvore, caducifólia, heliófita, espécie secundária inicial, clímax exigente em luz. Sua altura atinge até 25 m e seu diâmetro até 90 cm.	Flavonoides, ligninas, carboidratos, taninos condensados, alcaloides.	Efeito cicatrizante e adstringente, antirreumático, anti-inflamatório, analgésico, antifúngico, anti-HIV.	BOURDY <i>et al.</i> , 2004; BOURDY, CHAVES-DEMICHÉL, ROCA-COULTHARD, 2004; USTULIN <i>et al.</i> , 2009; Oliveira & Saito, 1989.
<i>Morus nigra</i> (L.)	Amora preta	Espécie exótica originária da China e Japão, no Brasil e muito cultivada para produção de folhas para criação do bicho da seda. Seus frutos são drupas comestíveis, consumidas in natura ou na forma de doces e geleias.	Antocianinas, flavonoides, fenólicos totais.	Laxativos, vermífugos, expectorante, eméticos, hipoglicêmicos, anti-inflamatórios, antianemico, hipertensivos, anticancerígeno, antioxidante, antibacteriano, antiviral	FANG <i>et al.</i> , 2005; PAWLOWSKA <i>et al.</i> , 2008; PÉREZ-GREGORIO <i>et al.</i> , 2011; ZAFRA-STONE <i>et al.</i> , 2007; ÖZGEN <i>et al.</i> , 2009; ERCISLI; ORHAN, 2007.
<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão preto, carrapicho, amor-seco	Planta herbácea, ereta, com porte variando entre 20 e 150 cm com folhas opostas, simples, pecioladas e fendidas.	Alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas.	Cicatrizante, anti-inflamatório, hipoglicemiante, antimalárico, antibacteriano, antirreumático, antitumoral, antidiarreico.	KUMAR <i>et al.</i> , 2010; ALVAREZ <i>et al.</i> , 1996; ALONSO, 2004; MEDEIROS <i>et al.</i> , 2013; Rodrigues <i>et al.</i> , 2006; DE-LA-CRUZ

<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.	Chá verde, oolong, chá preto, chá-da-índia.	Árvores (até 20 metros) ou frequentemente arbustos.	Alcaloides púricos, polifenóis, flavonoides, catequinas.	Anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetor, antimicrobiana, hipoglicemiante, inibidora da enzima conversora de angiotensina e antimutagênica.	Fiorini et al., 2005; Kalra et al., 2005; Nag-C/haudhuri et al., 2005; Yam et al., 1997; Turchetti et al., 2005; Barbosa-Filho et al., 2005; Barbosa-Filho et al., 2006; Santhosh et al., 2005; Liang et al., 2001; Punyasiri et al., 2004.
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Pampulha, hibisco-da-china, mimos-de-vênus.	Arbusto de até 5 metros, com ramos cilíndricos e glabros e tronco liso e flexuosos. Folhas alternas, estípulas caducas, de pecíolo piloso, lâmina foliar simples ovada, com margem serrada. Flores com brácteas e sépalas esverdeadas, pétalas inteiras, avermelhadas.	Antocianinas totais, carotenoides, compostos fenólicos totais, flavonoides, carboidratos.	Antioxidante, cicatrizante, antidepressivo, antibacteriano efeito hipoglicêmico diurético, anti-inflamatório, analgésico, hipotensor, expectorante.	SACHDEWA et al., 2001; SACHDEWA & KHEMANI., 2003; MOQBEL et al., 2011; PILLAI & MINI, 2016; LIN et al., 2007; SILVA et al., 2019; ONYENEKWE et al., 1999; MOJIMINIYI et al., 2007; AJAY et al., 2007; ALI et al., 2003.
<i>Carya illinoensis</i>	Noz pecã, nogueira-pecã.	Árvore alta podendo atingir de 25 a 45 metros de altura e diâmetro de copa e 5 metros de circunferência de tronco. Produz mais de 100 kg de nozes por planta.	Alcaloides, terpenos, compostos fenólicos, compostos aromáticos, triterpenos, ligninas, taninos, antocianinas, glicosídeos cianogênicos.	Antibacteriana, diurético, antioxidante, hipotensor, vermífida, hipoglicêmico.	TAIZ; ZEIGER, 2013; CASTRO et al., 2004; FERREIRA; AQUILA, 2000; SIMÕES et al., 2010; NOVAES, 2011; PINTO et al., 2002; BHARDWAJ; SHARMA, 2017; RECKZIEGEL, 2011

<i>Illicium verum</i> Hook	Anis – estrelado, anis-da-sibéria, anis-verdadeiro, badiana, badiana-decheiro, funcho-da-china, anis-da-china e badiana-da-china.	Árvore perene de porte médio, originária do sudoeste da China.	Terpenos, polifenóis totais, açúcares redutores, taninos, flavonoides, saponinas, alcaloides e cumarinas.	Expectorante, relaxante, espasmolítica, carminativa, estomática, antisséptica, antifúngico, antibacteriano, antiviral, antioxidante.	SAMPAIO et al., 2019; CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; HERRERA, 2009; SCOPEL et al., 2016; SINGH et al., 2006; SUNG; KIM; KIM, 2012; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000; NARDONI et al., 2015; DWIVEDY et al., 2018; ROCHA NETO et al., 2019.
-----------------------------------	---	--	---	--	--

Fonte: Autora (2021)

3.4 USO DAS LINHAGENS CELULARES NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE PLANTAS MEDICINAIS

A implantação de linhagens celulares foi uma das maiores evoluções na história do cultivo celular. A linhagem celular é o conjunto de células específicas derivadas de um subcultivo continuado de uma população de células primárias, na qual pode ser utilizada para determinar dados, com conteúdo único e estocado em um contentor próprio, sob circunstâncias estabelecidas de armazenamento. A diferenciação de uma linhagem provém de um banco de dados referente ao desenvolvimento populacional, citogenética, predisposição celular a amostras virais, reconhecimento da espécie e tecido de origem (BRETAS *et al.*, 2011).

Para que a célula se mantenha viva, o meio deve oferecer todos os nutrientes, vitaminas e íons inorgânicos, elementos necessários ao crescimento das células e um ambiente similar a um organismo. Em 1955, a primeira análise sistemática dos recursos nutricionais importantes para a proliferação das células *in vitro*, foi feita por Harry Eagle. Com o auxílio de colaboradores, Eagle criou um meio pequeno e essencial para a cultura, denominado meio EMEM, contido de aminoácidos, vitaminas, soro animal, sais e carboidratos (TAVEIRAS, 2007; KRETZMER, 2002; BRETAS *et al.*, 2011).

Uma das revoluções na história do cultivo de células animais foi a obtenção das linhagens celulares do tecido pulmonar de feto humano feminino (WI-38 e MRC-5), que possibilitaram ampliar o número de vacinas habilitadas para uso humano. A compra e a utilização de linhagens certificadas se tornaram um meio indispensável para o aperfeiçoamento de novos medicamentos, avaliação da citotoxicidade de plantas medicinais, de biopolímeros usados para a produção de próteses ortopédicas e, atualmente, com a otimização da engenharia de tecidos, a cultura de agrupamentos de células, permitindo a elaboração de enxertos para transplantes cirúrgicos (KRETZMER, 2002).

O fato de que tumores humanos poderiam dar origem a linhagens celulares foi crescendo e se tornando importante na cultura celular. Em 1951, George Gey, cultivou pela primeira vez células de tecido tumoral humano, a linhagem de carcinoma epitelial humano (HeLa), que é utilizada até hoje. Já no ano de 1962, Nakamura e outros

estudiosos, no Japão, designaram a linhagem VERO, proveniente do rim de macaco-verde africano. Esta linhagem foi aprovada para a produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que considerou-se ser um interessante modelo para o avanço de novas pesquisas relacionado às vacinas (PERES, 2005).

Muitas outras linhagens foram descobertas e sendo estudadas para atividade citotóxica de fármacos e plantas medicinais como por exemplo, células de câncer humano oral (KB), fígado (HepG2), cólon (CaCO2), mama (MCF-7), câncer colorretal (RKO), câncer de pulmão (A549), câncer nasofaríngeo (CNE-2), melanoma maligno (B16), células de macrófagos murinos (RAW 264.7), carcinoma epidermóide humano (KB-3-1), entre outras linhagens (OLIVEIRA; MACHADO; e RODRIGUES, 2014).

Realizar testes de toxicidade celular traz os primeiros conhecimentos sobre a seguridade das substâncias em análise. Desta forma, muitas moléculas futuras são desprezadas logo de início, em razão da sua toxicidade celular. Os testes *in vitro* de citotoxicidade são indispensáveis e essenciais para designar a toxicidade celular inicial, em outros termos, a capacidade específica de uma substância provocar apoptose e alterações na célula, resultante de uma lesão das atividades celulares normais (EISENBRAND *et al.*, 2002).

Uma substância relativamente citotóxica é caracterizada por aquela que dispõe um componente ou um elemento químico em número suficiente para ocasionar a morte celular. A quantidade de células danificadas revela a dose e a eficácia do composto investigado que faz com que ocorra a apoptose. A definição da porção liberada da substância tóxica é proporcional à dose captada pela célula (REUTER *et al.*, 2008).

Na análise da citotoxicidade celular são usados métodos de forma direta, que é a contagem celular, e de forma indireta, na qual trata-se de identificar estruturas celulares ou medir o metabolismo celular para dimensionar células na cultura. Um exemplo de forma direta, é a contagem de células em câmara de Neubauer, a qual utiliza-se o corante azul de tripano. Este corante não atravessa a membrana, corando de azul somente as células mortas em virtude do extrato ou fármaco testado (ALVES; GUIMARÃES, 2018).

Um método indireto amplamente utilizado é o ensaio MTT (3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), proposto pelo pesquisador Mosmann no ano de 1983, que tem como função avaliar a viabilidade e o aumento de células após a exposição a compostos nocivos, e também caracterizar a dose tóxica de novos medicamentos (SILVA *et al.*, 2011).

O ensaio de redução do MTT fundamenta-se em medir o dano causado pelo extrato através da verificação da atividade da succinato desidrogenase, uma enzima mitocondrial. A viabilidade celular é quantificada pela redução do MTT, um sal solúvel em água e de cor amarela, à formazan, um sal de cor púrpura e insolúvel em água (VELOSO *et al.*, 2010).

Outra forma de analisar a viabilidade celular é utilizando o reagente Alamar *Blue* (Resazurina) que ao sofrer redução é convertido em um composto fluorescente (Resorufina). A redução da Resazurina à Resorufina ocorre dentro das células vivas pelas enzimas redutoras e, portanto, a fluorescência/absorbância é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas, ou seja, é um corante usado para medir a viabilidade das células (MUNSHI; TWINING; DAHL, 2014).

Tanto o MTT quanto o Alamar *blue* são de alta qualidade, porém o ensaio azul de alamar possibilita uma vantagem de maior sensibilidade, na medida em que podem detectar densidades celulares tão baixas quanto 200 células/poço. As análises do MTT são colorimétricas, enquanto que no Alamar blue pode ser medida usando a detecção colorimétrica ou de fluorescência. MTT não é um produto solúvel, de modo que as células devem ser lisadas para solubilizar o sal de formazan antes da medição da absorbância. O Alamar *blue* não requer lise celular, permitindo o monitoramento cinético das mesmas amostras em diferentes pontos de tempo (HAMID *et al.*, 2004).

Existem na literatura científica vários relatos sobre a atividade citotóxica de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. No que diz respeito a estes relatos, no Quadro 2, são apresentadas informações sobre a citotoxicidade em linhagens celulares, das espécies estudadas neste trabalho, suspeitas de HILI. Em relação à espécie *Maclura tinctoria*, não foram encontrados relatos sobre sua atividade citotóxica em células. Deste modo, este será o primeiro trabalho realizado e publicado sobre a atividade citotóxica da *M. tinctoria* em linhagens celulares.

Quadro 2: Relatos descritos na literatura científica sobre a atividade citotóxica das amostras com suspeita de HILI, através do cultivo de linhagens celulares pelo método de bioensaio MTT.

ESPÉCIE / AMOSTRA	SUBSTÂNCIAS TESTADAS	TIPO DE EXTRATO	LINHAGENS CELULARES	MÉTODO	POTENCIAL CITOTÓXICO	REFERÊNCIAS
<i>Bidens pilosa</i> L.	NSE	Acetato de Etila	RAW 264.7	MTT	Exibiu a atividade mais significativa inibidora (IC ₅₀ = 36,2 µg / ml).	CHIANG <i>et al.</i> , 2004.
		Butanólico			Atividade moderada com (IC ₅₀ = 250,8 µg / ml).	
	NSE	Extrato aquoso	DU-145; MCF-7; MDA-MB-231; MCF-12A	MTT	<i>B. pilosa</i> inibiu a proliferação em 10% nas linhas celulares de carcinoma. O IC ₅₀ variou entre 145 e 200 µg / ml.	STEEMKAMP; GOUWS, 2006.
	fenil-1,3,5-heptatriino	<i>n</i> -hexano; clorofórmico, metanólico e acetato de etila	KB; HepG2; CaCO 2; MCF-7.	MTT	Dentre todos os extratos, o extrato <i>n</i> -hexano apresentou atividade anticâncer e antimalárica promissora.	KUMARI <i>et al.</i> , 2008.
	NSE	Butanólico	MCF-7; HepG2; MGC 803; e RKO	MTT	Apresentaram menor efeito antiproliferativo contra as células MCF-7, RKO e HepG2 (p<0,05).	WU <i>et al.</i> , 2013.
		Aquoso				

		Acetato de Etila			Exibiu atividades citotóxicas mais altas contra todas as células tumorais ($p=0,01$), particularmente as células RKO com taxa inibitória de 92,87%.	
	NSE	Metanólico	HeLa; HepG2; KB-3-1	MTT	Maior atividade contra as células KB-3- 1 com valores de IC_{50} 99,56 $\mu\text{g/ml}$. Para a inibição de células HepG2 e HeLa foram consideradas 210,8 $\mu\text{g / ml}$ e 179,3 $\mu\text{g / ml}$ respectivamente.	SINGH <i>et al.</i> , 2017.
	3-O-galato epigallocatequina	Acetato de Etila e Metanólico	HSC-2; HSC-4; MKN-45; CaCO-2.	MTT	Teve um valor IC_{50} de 14,1, 18,2, 17,3 e 40,6 μM contra células HSC-2, HSC-4, MKN-45 e Caco-2, respectivamente.	KITAGAWA <i>et al.</i> , 2016
	Chakasaponinas I e II				Os valores de IC_{50} para as células HSC-2, HSC-4, MKN-45 e Caco-2 foram iguais a 4,6, 17,5, 16,8 e 30,2 μM , respectivamente.	
	Florateasaponina A				Os valores de IC_{50} para as células HSC-2, HSC-4, MKN-45 e Caco-2 foram iguais a 4,4, 6,2, 4,5 e 19,3 μM , respectivamente.	

<i>Camellia sinensis</i> L. Kuntze	(-) epigallocatequina galato (ECGC) Quercetina Ácido gálico	Não especificado	OSCC-3; SCC-61; SQ-20B; HepG2.	MTT	Todos os extratos são citotóxicos para as células HepG2, com o ECGC demonstrando citotoxicidade dominante, sendo que a maior inibição (82%) foi mostrada por quercetina, com 25 μ M (IC_{50} = 11,90 μ M). Já para as células restantes, a quercetina se mostrou mais citotóxica com IC_{50} entre 75 e 505 μ M.	RAMIREZ <i>et al.</i> , 2004; RAMIREZ <i>et al.</i> , 2016.
	Galato de epigallocatequina (GELC)	Não especificado	HeP2 e sua sublinha CK2	MTT e análise morfológica	GEC e GELC não foram tóxicos na faixa de concentração de 2,5 μ mol a 50 μ mol. A maior concentração de ECG (500 μ mol) causou efeito tóxico semelhante em ambas as linhagens celulares. GELC mostrou maior potencial citotóxico, mesmo em concentrações cinco vezes menores do que em uma xícara normal de chá verde.	DURGO <i>et al.</i> , 2011.
	Galato de epicatequina (GEC)					
	5,5 -penta-hidroxi-cis-estil- bene (1), resveratrol (2), oxiresveratrol (3), norartocarpina (4), kuwanon C (5), morusina (6), cudraflavona A (7), kuwanon G (8), albaflurano C (9), mulberrofurano G (10), 3-acetil-O- a- amirina (11), 3-acetil-O- b- amirina (12), ácido ursólico - 3-O-acetato (13) e uvaol (14).	Extrato clorofórmico	MCF-7 e HepG2	MTT	O composto 5 foi o mais ativo contra ambas as linhas celulares investigadas com um valor IC_{50} de 3,92 IM. Para a HepG2, a maioria dos compostos suprimiu o crescimento com um IC_{50} de 9,54 a 44,71 IM. Os compostos terpenóides apresentaram atividade relativamente fraca, uma vez que os compostos 13 e 14 tiveram IC_{50} 165,70 e 94,70 IM, respectivamente.	ABDEL <i>et al.</i> , 2019.

Morus nigra L	NSE	Extrato etanólico	HaCat; L-929; e B16F10	MTT	As IC ₅₀ calculados para a citotoxicidade foram 107,2 ug/ml para o melanoma murino, 324,2 ug/mL para a queratinócitos humanos e 116,3 g/mL para o de fibroblastos de rato. Concluiu-se que o extrato da <i>M. nigra</i> foi mais tóxico para as células B16F10.	FREITAS <i>et al.</i> , 2016.
	NSE	Etanólico, metanólico e clorofórmico,	OVCAR-8; SF-295; e HCT-116	MTT	Os extratos causaram mais de 75% de inibição do crescimento celular em qualquer linhagem, sendo considerados ativos.	SOUZA <i>et al.</i> , 2016.
	NSE	Extrato de dimetilsulfóxido	PC-3 e células de fibroblastos do prepúcio.	MTT	O extrato da planta exibiu citotoxicidade seletiva moderada contra células PC-3 em comparação com células de fibroblastos do prepúcio.	TURAN <i>et al.</i> , 2016.
Hibiscus rosa-sinensis	NSE	Extrato aquoso	B16F10	MTT	Este extrato inibiu o crescimento de células de melanoma de uma maneira dependente da dose, reduzindo-as em 2 vezes a 1 mg / ml e 4 vezes a 2 mg / ml.	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2016.
	NSE	Extrato aquoso	ER+ CMTN	MTT	O extrato de hibisco foi capaz de induzir seletivamente a apoptose em células de câncer de mama triplo-negativas e positivas para receptor de estrogênio de uma maneira dependente da dosagem. Foi capaz de aumentar o estresse oxidativo e diminuir o potencial de membrana mitocondrial em comparação com tratamentos individuais.	NGUYEN <i>et al.</i> , 2019.
	NSE	Extratos acetônicos de grãos e cascas	T24 LCC-PK1	MTT	O extrato da casca teve um IC ₅₀ de 1,8 mg /ml, e o extrato do grão um valor de IC ₅₀ (citotoxicidade mais baixa) de 4,6 mg/ml.	ROSA <i>et al.</i> , 2014

<i>Carya illinoensis</i>	NSE	Extrato metanólico	MCF-7	MTT	O ensaio de MTT mostrou que o extrato da casca de noz-pecã apresentou citotoxicidade contra células MCF-7 ($IC_{50} = 74,11 \mu g/ml$). A maior dose testada ($25 \mu g / ml$) foi capaz de inibir 93% do crescimento das células MCF-7.	HILBIG <i>et al.</i> , 2017
	NSE	Extrato bruto de nozes	CaCO-2	MTT	Os extratos brutos de nozes de concentrações variáveis foram adicionados às células durante 1h e não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as células da amostra e as células de controle. A partir disso, concluiu-se que os fenólicos de pecã não eram tóxicos para as células em nenhuma das concentrações examinadas no estudo.	KELLETT <i>et al.</i> , 2019.
<i>Illicium verum</i>	Óleos essenciais de frutas e sementes	Extrato bruto	MCF7; T47D; MDA-MB-231; K562 e SH-SY5Y	MTT	A espécie <i>Illicium verum</i> , apesar de aparentemente ativo contra uma variedade de linhagens de células cancerosas na literatura citados pelos autores, o seu efeito citotóxico foi inativo ($IC_{50} > 100 ppm$).	NAJAR <i>et al.</i> , 2019.
	Óleo essencial somente de frutos	-	HCT 116; HT-29 e CCD-18co	MTT	Os resultados mostraram que esta espécie tem atividade antiproliferativa moderada contra a linha de células HCT 116 e HT-29, com um valor IC_{50} de $50,34 \pm 1,19 \mu g/ml$. Quanto à toxicidade contra células de cólon humanas normais (CCD-18co), o IC_{50} foi de $200 \pm 2,29 \mu g/ml$.	ASIF <i>et al.</i> , 2016.
	Pristimerina	Extrato etanólico	HL-60; K-562; SF-295; HCT- 8; e	MTT	A análise de MTT mostrou que a pristimerina exibiu atividade citotóxica contra todas as cinco linhagens de células cancerosas. Os valores de IC_{50} variaram de	COSTA <i>et al.</i> , 2008.

Maytenus ilicifolia			MDA / MB-435		0,55 a 3,2 IM em MDA / MB-435 e K-562, respectivamente.	
	Maytefolina A uvaol-3-cafeate betulina eritrodiol	Extrato etanólico e metanólico	HL-60 e KB/S	MTT	Apenas o eritrodiol apresentou atividade citotóxica significativa com IC ₅₀ de 7,0 mg/ml, enquanto todos os outros compostos apresentaram valores de IC ₅₀ superiores a 10 mg / ml. Nenhum desses compostos induziram alterações morfológicas em células HL-60 com concentrações de 0,05-25 mg/ml.	OHSAKI et al., 2004.

*NSE: não houve substâncias específicas;

*RAW 264.7 (Linhagem de macrófagos); DU-145 (células de carcinoma da próstata); MCF-7 e MDA-MB-231 (células de câncer de mama); MCF-12A (células da mama não maligna); KB (células de câncer humano oral); HepG2 (Células de Carcinoma hepático); CaCO-2 (células do câncer de cólon); MGC 803 (câncer gástrico); RKO (câncer colorretal); HeLa (carcinoma epitelial humano); KB-3-1 (carcinoma epidermóide humano); HSC-2, HSC-4 e MKN-4 (células do carcinoma gástrico humano); OSCC-3, SCC-61 e SQ-20B (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço humano); HeP2 (células de carcinoma da laringe humana); HaCat (células de queratinócitos humanos); L-929 (células de fibroblastos); B16F10 (células de melanoma murinho); OVCAR-8 (câncer de ovário); SF-295 (câncer no cérebro); HCT-116 (câncer de cólon); PC-3 (células de adenocarcinoma de próstata humana); ER+ (células de câncer de mama positivas para receptor de estrogênio); CMTN (células de câncer de mama humano triplo-negativas); T24 (câncer de bexiga); LCC-PK-1 (células epiteliais renais); K562 (eritroleucemia mielóide crônica humana); SH-SY5Y (célula de tumor maligno); CCD-18co (células de cólon humanas normais); HL-60 (leucemia promielocítica); SF-295 (glicoblastoma); KB/S (células do carcinoma epidermóide de boca).

Fonte: Autora (2021)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram cedidas por pacientes atendidos no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) com suspeita de HILI, desde a planta inteira até um medicamento fitoterápico. A tabela 3 apresenta a relação dos produtos naturais que foram cedidos pelos pacientes com suspeita de lesão hepática induzida por ervas. No total foram 09 amostras, advindo de pacientes individualmente, sendo planta inteira, folhas secas, raízes ou cascas, sendo que uma das amostras é o chá misto Detox (rasuras de folhas, caules, raízes e cascas) uma mistura com mais de 70 espécies, e por isto não está especificado na tabela abaixo.

Tabela 3 – Relação dos produtos naturais utilizados por pacientes com suspeita de lesão hepática induzida por ervas do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES).

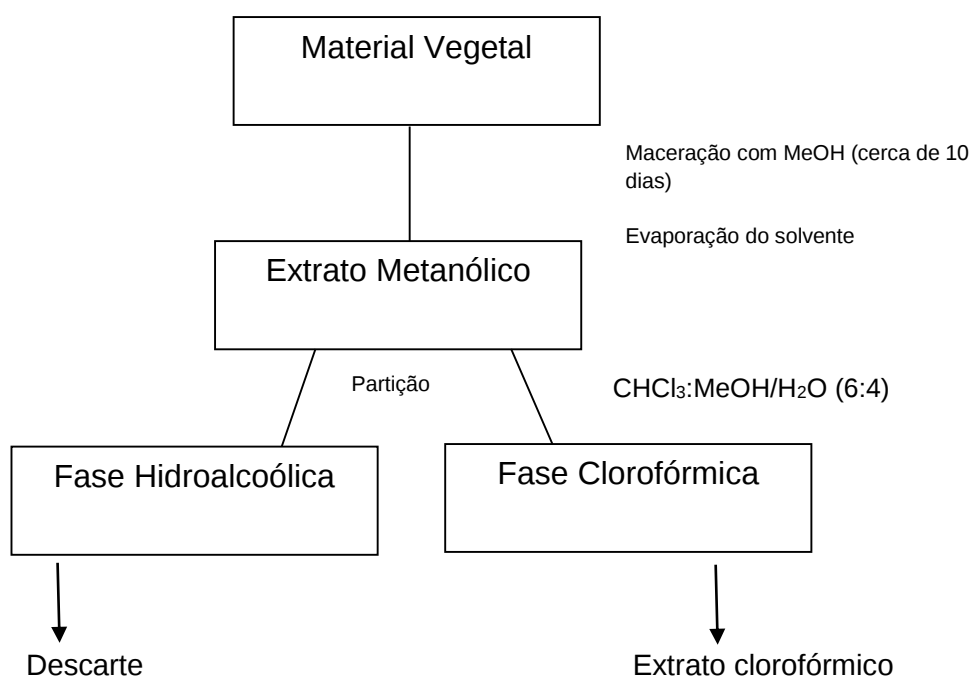
NOME CIENTÍFICO	FAMÍLIA	NOME POPULAR	FORMA / ASPECTO
<i>Maclura tinctoria</i>	Moraceae	Leite de moreira	Cápsulas
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	Picão preto; carrapicho	Planta inteira
<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Chá verde	Pó
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Malvaceae	Hibisco	Flores desidratadas
<i>Morus nigra</i>	Moraceae	Amora Preta	Folhas rasuradas
<i>Carya illinoensis</i>	<u>Juglandaceae</u>	Nogueira-pecã	Casca pulverizada
<i>Illicium verum</i>	<u>Illiciaceae</u>	Anis estrelado	Folhas
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Celastraceae	Espinheira santa	Folhas desidratadas

Fonte: Autora (2021)

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A extração foi realizada com base no método de maceração. Utilizou-se 10 g do material recebido, de acordo com a disponibilidade da amostra. O fluxograma 1 indica os procedimentos realizados.

FLUXOGRAMA 1 – Esquema geral de partição e separação dos principais metabólitos presente nas plantas



Foram obtidos 20 extratos, sendo 10 extratos metanólicos e 10 extratos clorofórmicos. No qual as amostras foram codificadas com as iniciais do nome popular de cada espécie e solvente extrator utilizado, conforme Quadro 3.

Quadro 03. Código de cada extrato, de acordo com o nome popular da planta medicinal e solvente extrator.

NOME POPULAR / PLANTA MEDICINAL	Solvente Extrator	SIGLA / AMOSTRA
Chá detox misto I	Metanol	D1M
	Clorofórmio	D1C

Chá detox misto II	Metanol	D2M
	Clorofórmio	D2C
Hibisco	Metanol	HM
	Clorofórmio	HC
Nogueira-pecã	Metanol	NPM
	Clorofórmio	NPC
Picão preto	Metanol	PPM
	Clorofórmio	PPC
Anis estrelado	Metanol	AEM
	Clorofórmio	AEC
Chá verde	Metanol	CVM
	Clorofórmio	CVC
Espinheira Santa	Metanol	ESM
	Clorofórmio	ESC
Leite de Moreira	Metanol	LMM
	Clorofórmio	LMC

Fonte: Autora (2021)

4.3 SCREENING FITOQUÍMICO

Os extratos das amostras foram submetidos à ensaios fitoquímicos segundo a metodologia adaptada de Bessa, Terrone e Santos (2007), para a identificação de alcaloides, cumarinas voláteis, flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos e/ou esteroides.

4.3.1 ALCALOIDES

Para identificação de alcaloides foi adicionado 2,0ml de ácido clorídrico 10% em 2,0 ml do extrato metanólico a 2 mg/ml e aquecido por 10 minutos. Após resfriamento foram adicionadas 3 a 4 gotas do reagente de Dragendorff. Leve turbidez ou formação de precipitado roxo ou laranja, indicam reação positiva.

4.3.2 CUMARINAS VOLÁTEIS

Em um tubo de ensaio foram colocados 2,0 ml do extrato metanólico a 2 mg/ml e uma tampa de papel filtro impregnada de uma base forte (KOH 10%), levou-se a banho maria a 100°C por alguns minutos. A observação de fluorescência sob luz UV no papel filtro indica a presença de cumarinas voláteis.

4.3.3 FLAVONÓIDES

Em 2,0ml do extrato metanólico a 2 mg/ml foram adicionados alguns fragmentos de magnésio e, pelas paredes do tubo, 2 gotas de ácido clorídrico diluído.

4.3.4 SAPONINAS

Em 2,0 ml do extrato metanólico a 2 mg/ml foram adicionados 5,0 ml de água fervente. Após resfriamento e agitação vigorosa, o surgimento de espuma persistente por 20 minutos caracteriza presença de saponinas.

4.3.5 ESTEROIDES E TRITERPENÓIDES

Com o extrato pronto, foram realizados testes em tubos de ensaio, sendo utilizadas as reações de Salkowski (reação 01) e Liberman-Burchard (reação 02), com extrato clorofórmico a uma concentração de 2 mg/ml. O desenvolvimento de uma cor azulada significará a presença do núcleo esteroide, na reação 01. Na reação 02, apresentará uma coloração roxa, caso haja presença de esteroides e triterpenos (SILVA; LIMA, 2016).

4.3.6 TANINOS

Em 2,0 ml do extrato metanólico a 2 mg/ml foram adicionadas 5,0ml de água destilada e 1 ou 2 gotas de cloreto férrico 10%. A coloração azul indicou a possível presença de taninos hidrolisáveis e a coloração verde de taninos condensados.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA (DPPH).

O teste de atividade antioxidante, frente ao sequestro de radicais livres DPPH, foi adaptado da metodologia utilizada por Almeida e colaboradores (2006). Este método, foi a primeira técnica desenvolvida para quantificar a atividade antioxidante (AA) de metabólitos, descoberta na década de 50. O DPPH é um radical de nitrogênio instável, e dispõe de uma cor roxa que ao reagir com compostos redutores, ou seja, antioxidantes, é convertido em difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) (figura 2), o qual possui cor amarela, provocando assim uma descoloração do meio (GULÇIN, 2012).

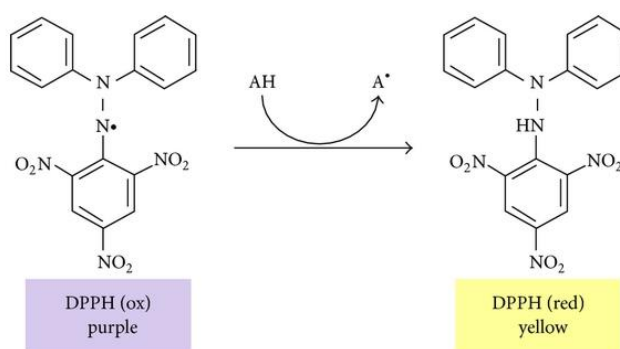


Figura 2. Redução do DPPH

Fonte: adaptado de Pires *et al.* (2017)

Inicialmente, realizou-se uma triagem com os 20 extratos numa concentração de 1,0 mg/ml com objetivo de identificar se estes apresentavam ou não atividade. Desta forma, se o extrato não apresentar tal atividade, não será interessante a realização de diluições seriadas, a fim de se obter a concentração inibitória e prosseguir com a redução da concentração neste extrato para alcançar a concentração inibitória ou concentração equivalente (IC₅₀) que é a quantidade de

extrato necessário para inibir a concentração inicial de DPPH em 50% (LOGANAYAKI, SIDDHURAJU e MANIAN, 2013).

Diluiu-se os extratos em MeOH, adquiriu-se uma solução mãe de 1,0 mg/mL utilizada para triagem, em seguida foram feitas diluições decrescentes (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 e 0,015625 mg/mL). Colocou-se 50 µL destas amostras na microplaca de 96 poços. Em seguida adicionou-se em cada poço 200 µL da solução de DPPH (200 Mm). Como padrão usou-se o antioxidante hidroxitolueno de butila (BHT) e como branco substituiu a solução do extrato por MeOH.

A placa foi incubada em local com ausência de luz por 30 minutos, em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 600 nm. Após a leitura, calculou-se a porcentagem de atividade pela fórmula: % de inibição do radical DPPH = $((\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}) / (\text{Abs do controle}) \times 100)$ (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Através destes dados foi possível construir a curva % de inibição do radical DPPH *versus* concentração, e por interpolação obteve-se o valor da IC₅₀.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO DO β-CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO).

O teste de oxidação do β-caroteno/ ácido linoléico (figura 3) analisa a atividade de inibição dos radicais livres produzidos durante a peroxidação do ácido linoléico (ALMEIDA *et al.*, 2006). A oxidação do ácido linoleico leva a formação de radicais peroxila, os quais são formados pela perda de um átomo de hidrogênio presente no grupo metileno deste ácido (KUMARAN e KARUNAKARAN, 2006).

Os radicais peroxila, vão atacar as ligações duplas do β-caroteno, e como consequência, haverá também a formação de radicais livres nesses compostos. A presença de compostos antioxidantes nas amostras a serem testadas, minimizará a oxidação do β-caroteno. Assim, a taxa de degradação deste dependerá da quantidade de antioxidantes presentes na amostra (ISMAIL *et al.*, 2010). Quanto menor a quantidade de antioxidantes presente no extrato a ser testado, maior será a degradação do β-caroteno e vice-versa.

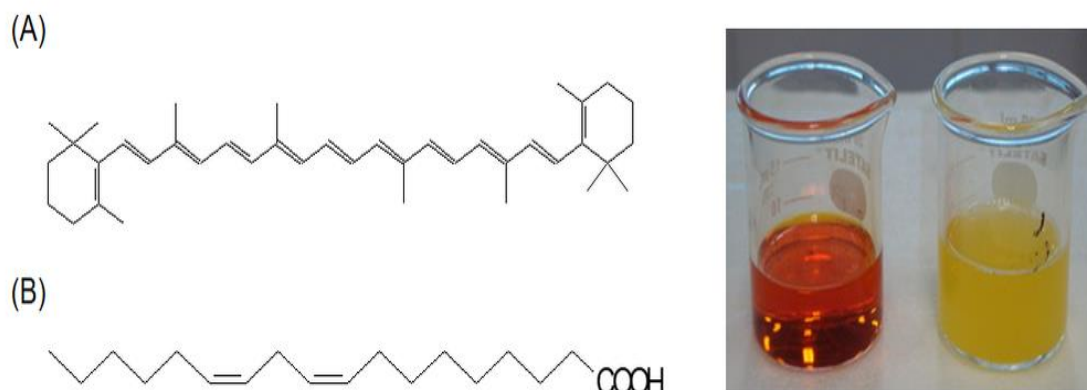


Figura 3. Estrutura do β -caroteno (A) e do ácido linoleico (B). Ao lado reação de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.

Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antioxidante.html>

O teste de Inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoléico foi realizado através de um método originalmente descrito por Marco (1968) modificado por Miller (1971) com sucessivas modificações.

Primeiramente fez-se necessário a realização de uma triagem com todos os extratos na concentração de 1,0 mg/ml com intuito de identificar quais destes apresentavam inibição da oxidação do β -caroteno. No preparo da solução reativa, adicionou-se em um erlenmeyer de 250mL: 20 μ L de ácido linoléico como agente oxidante (TCI), 200 μ L de Tween 20 como agente emulsificante (SYNTH), 1000 μ L de CHCl_3 e 1000 μ L de β -caroteno (SIGMA-ALDRICH) na concentração de 2,0 mg/mL. O Erlenmeyer foi coberto por papel alumínio com a finalidade de evitar o contato dos reagentes com a luz. Em seguida, a solução foi submetida a secagem em rota evaporador (BUSCHI-SWITZERLAND) a 60°C até a total evaporação do CHCl_3 (2-4 horas).

Com o fim da secagem da solução, adicionou-se lentamente em constante agitação 100 mL de água ultrapura. Para a leitura da absorbância (600 nm), usou-se uma microplaca de 96 poços de fundo chato (KASVI). Em cada cavidade da placa adicionou-se 200 μ L da solução, 10 μ L da amostra e 10 μ L de MeOH (controle).

A primeira leitura da placa de ELISA foi registrada como tempo zero (T0), em seguida para acelerar a reação, a placa foi levada a uma estufa de secagem e esterilização (SL-100/ SOLAR) a 45°C para que iniciasse o descolorimento do β -caroteno. A cada 20 minutos realizou-se a leitura da absorbância até atingir duas

horas após o início do descoramento. Esta leitura foi realizada em triplicata e auxílio de um espectrofotômetro de microplaca (EL800/BioTek). Como padrão usou-se o BHT, e para cálculo da concentração inibitória (IC_{50}) utilizou-se as seguintes concentrações das amostras: 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0mg/mL. Os resultados foram determinados em porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno através da formula:

$$\%I = (Abic-Abfc) - (Abiam-Abfam) / (Abic-Abfc) \times 100,$$

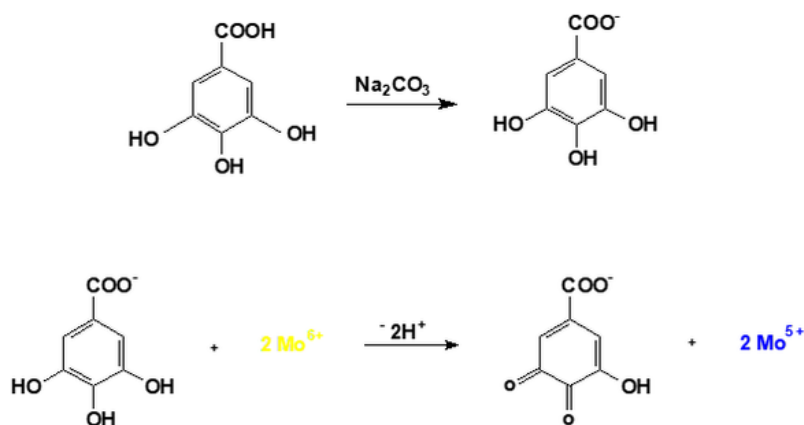
onde: Abic = Absorbância inicial do controle, Abfc = Absorbância final do controle, Abiam = Absorbância inicial da amostra e Abfam = Absorbância final da amostra (ALMEIDA et al., 2006).

4.6 FENÓLICOS TOTAIS

A determinação no teor de fenólicos totais nos extratos clorofórmico e metanólico foram determinadas usando o reagente Folin-Ciocalteu em microplaca de 96 poços como descrito por Singleton e colaboradores (1999), adaptado por Sivakumar e colaboradores (2005) e Garcia e colaboradores (2015).

O ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu é um método espectrofotométrico baseado na interação entre substâncias redutoras com este reagente. Este reagente é formado por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico. O molibdênio e o tungstênio encontram-se em estado de oxidação 6+. No entanto, quando em contato com agentes redutores, como os compostos fenólicos, tem como produto os chamados molibdênio e tungstênio de coloração azul, os quais seus estados de oxidação encontram-se entre 5+ e 6+. Esta mudança de coloração permite a determinar a concentração das substâncias redutoras (SOUSA *et al.*, 2007).

A figura 4 mostra a reação de substâncias redutoras em contato com o reagente de Folin-Ciocalteu. Os compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais, quando entram em contato com substâncias com pH alcalino ($pH > 7$) formam como produto o ânion fenolato. Este ânion, reduz o reagente de Folin-Ciocalteu (Amarelo) e consequente há formação dos óxidos de tungstênio e molibdênio (Azul) (PIRES *et al.*, 2017).



Fonte: Oliveira e colaboradores (2009).

Figura 4: Mecanismo mostrando a reação das substâncias fenólicas com reagente de Folin-Ciocalteu

Para a realização do teste, 20 μL do extrato na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ (em triplicata) foram adicionados nos poços da microplaca, acrescentou-se 100 μL do reagente de Folin–Ciocalteu diluído em água destilada na proporção de 1:4, e agitador por 60s, e aguardou por quatro minutos, após este tempo adicionou-se 75 μL de uma solução de carbonato de sódio (100 $\mu\text{g/mL}$) e agitador por 60s. Após duas horas de incubação na ausência de luz e temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 750 nm no leitor de microplaca (BioRad Elx800). No branco da reação, substitui-se a amostra por água destilada. Para fins de cálculo subtraiu-se a absorbância dos extratos pela absorbância do branco.

Para a construção da curva de concentração versus absorbância, foi preparada uma solução mãe com o ácido gálico. Este foi diluído em água destilada até uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, em balão volumétrico de 10 mL. Em seguida foram preparadas nove soluções-padrão que variaram de 10 a 500 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

4.7 FLAVONÓIDES TOTAIS

O teor total de flavonóides dos extratos foi determinado pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl_3) adaptado por Chatatikun e Chiabchalard (2017). Segundo Popova e colaboradores (2004), neste método ocorre uma reação de complexação entre o íon alumínio (Al^{3+}) e os grupos carbonila e hidroxilas

presentes nas moléculas de flavonóides, a qual apresenta como produto um complexo flavonóide-Al de coloração amarela (Figura 5).

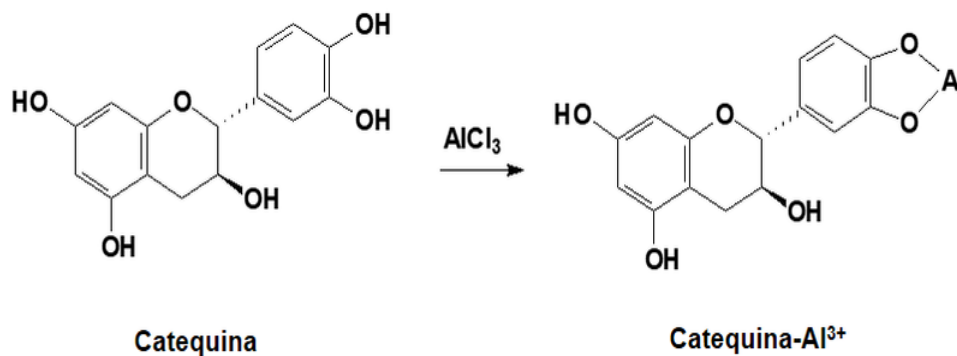


Figura 5: Mecanismo mostrando a complexação entre o flavonóide e o cloreto de alumínio (AlCl_3) com formação de complexo estável (flavonóide-Al).

Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antioxidante.html>

Os extratos foram diluídos em EtOH 80% com auxílio de um Banho Ultrassom (QUIMIS modelo) para solubilidade total das amostras. 50 μL dos extratos na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (em triplicata), foram adicionados a microplaca de 96 poços, em seguida adicionou-se 10 μL do reagente AlCl_3 (10%), seguido da adição de 150 μL de EtOH (95%) juntamente a 10 μL de acetato de sódio (1M). O branco foi preparado substituindo a amostra por EtOH (80%). Os reagentes foram misturados com pequenos movimentos da microplaca sobre uma estrutura lisa e armazenados na ausência de luz em temperatura ambiente por 40 minutos. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 415 nm.

A construção da curva de concentração versus absorbância foi realizada através do preparo de uma solução mãe, na qual utilizou-se como padrão a quercetina. Esta foi diluída em EtOH (80%) até uma concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, em balão volumétrico de 10mL. Em seguida, passou por diluição seriada cujas concentrações variaram de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. O teor de flavonóides totais, foram expressos em mg equivalentes de quercetina por grama de extrato.

4.8 TESTE DE LETALIDADE DA *Artemia salina* (Nauplius)

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e de fácil manutenção na área laboratorial, na qual consiste na exposição dos *Nauplius* durante 24 ou 48 horas a diferentes concentrações de amostras em estudo, com o propósito final de avaliar o quantitativo de organismos vivos e mortos (PIMENTEL *et al.*, 2011).

A metodologia empregada para avaliar a toxicidade dos extratos vegetais em estudo, baseou-se em Meyer e colaboradores (1982), na qual os ovos da *Artemia salina* foram colocados em um aquário de acrílico com metade das laterais cobertas de papel alumínio, com solução salina e uso de bomba Power 100 para obter a oxigenação. Utilizou-se uma placa de plástico com orifícios e após a eclosão dos *Nauplius*, as larvas migraram do lado escuro para o lado luminoso, feito por uso de lâmpada fluorescente, onde puderam ser coletadas vivas com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Em triplicata, adicionou-se 10 *nauplius* em 5 ml de água do mar e tubos foram colocados em sonicador. O volume do tubo foi completado com água do mar para 5 ml. Após 24 h em contato com a suspensão dos extratos, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave dos tubos. Os *Nauplius* foram contados novamente após esse período e os valores anotados para estimar a concentração letal média (CL₅₀).

4.9 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A enzima acetilcolinesterase (AChE) tem atividade muito importante no desenvolvimento do impulso nervoso. Esta enzima age como potente inibidor do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas (MOTA *et al.*, 2012). A acetilcolina por sua vez ao ser hidrolisada forma como produto o acetato e tiocolina (Figura 6). Nenhum destes produtos tem efeito transmissor significativo, logo, ocorre o fim da ação do transmissor (KATZUNG, MASTERS e TREVOR, 2014).

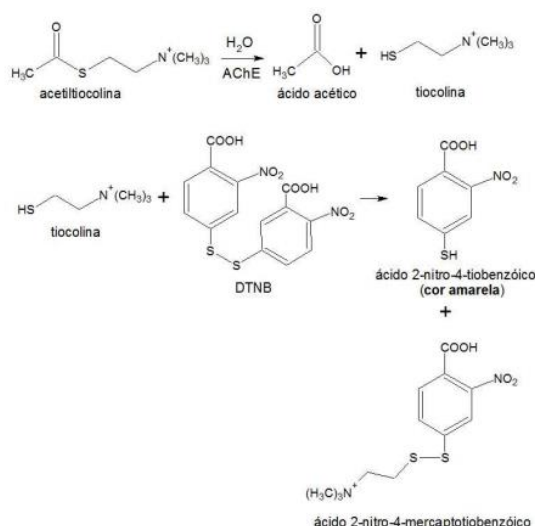


FIGURA 6: Reação da enzima acetilcolinesterase.

Fonte: adaptado de Barbosa *et al.* (2010)

O teste foi realizado em microplaca de 96 poços (KASVI) com base no método espectrofotômetro proposto por Ellman e colaboradores (1961) e modificações realizadas por Rhee e colaboradores (2001).

A tiocolina formada como produto na quebra da acetiltiocolina reage com o DTNB ou reagente de ELLMAN e produz 2- nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e o ácido 2-nitro- 4-tiobenzóico de coloração amarela. A queda da absorbância no final do teste indica que a amostra em estudo apresenta ação inibitória da enzima acetilcolinesterase (BARBOZA *et al.*, 2010).

Para realização deste teste, foram colocados em cada cavidade da microplaca, 140 µL de tampão fosfato (pH = 7,5), 10 µL da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL), 20 µL de DTNB (10mM) e 20 µL da amostra. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. Para dar início à reação, acrescentou-se o substrato acetilcolina iodada. Como padrão foi usado a eserina (fisiostigmina) e MeOH como controle.

A placa foi incubada na ausência de luz, com o monitoramento da reação realizado a cada 10 minutos durante 1 hora. Os resultados foram calculados em porcentagem de inibição através da seguinte fórmula: $\%I = (Abc - Abam) / Abc \times 100$, onde: Abc = Absorbância do controle e Abam = Absorbância da amostra (Adaptado de HASNAT, PERVIN e LIM, 2013). Os valores de IC₅₀ foram adquiridos a partir da construção de uma curva de concentração em mg/mL *versus* porcentagem de inibição com auxílio do programa Excel® 2016.

4.10 ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos testados e determinar o valor de IC₅₀, foi utilizado o método colorimétrico do Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA). O Alamar Blue (resazurina) é um indicador que produz uma mudança colorimétrica e um sinal fluorescente em resposta à atividade metabólica. A resazurina é reduzida em resorufina por células metabolicamente ativas. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do Resazurina em Resorufina (figura 7) reflete a viabilidade celular (AHMED *et al.*, 1994).

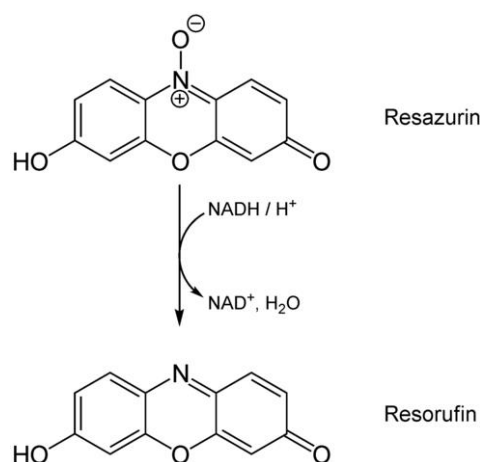


Figura 07: Redução do Resazurina em Resorufina

Fonte: <https://www.wikiwand.com/pt/Resazurina>

A linhagem de células cancerosas, hepatocarcinoma humano (HepG2) e uma linhagem celular não cancerosa, fibroblasto pulmonar humano (MRC-5), foram adquiridas e cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador – BA.

No ensaio em questão, as células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade pré-definida de $0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderentes. As frações metanólica e clorofórmica dos extratos de: Noz pecã, chá verde, detox 1, detox 2, espinheira santa, anis, picão preto, hibisco, amora, leite de moreira e o controle positivo (DOX; doxorubicina), controle de droga com atividade antitumoral já reconhecida, foram adicionados em uma série de 8 concentrações (50 a 0,39 µg/ml) para os extratos e 0,021 a 2,7 µg/mL para doxorubicina. Para o controle negativo foi

adicionada a mesma quantidade do DMSO (0,025%). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram adicionados 20 µL/poço de Alamar Blue e as placas foram incubadas por mais 4 h. A leitura das placas foi feita no espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

Após execução dos experimentos, foram calculados os valores de IC₅₀ (concentração inibitória para 50% das células cancerígenas) e CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células normais) utilizando dados obtidos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SCREENING FITOQUÍMICO

A partir da realização da caracterização fitoquímica foi possível constatar os grupos dos compostos químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas, como alcalóides, cumarinas voláteis, taninos, saponina, flavonóides, esteróides e triterpenóides. Para a confirmação ou não da presença de metabólitos secundários nas espécies avaliadas neste trabalho, foram utilizadas reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração ou precipitação característica de cada classe de metabólitos, indicando assim a sua presença ou ausência. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos após a realização da triagem fitoquímica.

Tabela 4: Triagem fitoquímica dos extratos de plantas suspeitas de serem hepatotóxicas.

AMOSTRAS	TANINOS	FLAVONOIDES	CUMARINAS	SAPONINAS	ALCALOIDES
AMORA PRETA	-	+	-	-	-
PICÃO PRETO	+	+	+	-	+
NOGUEIRA-PECÃ	+	+	-	-	-
ESPINHEIRA SANTA	+	+	-	-	+
HIBISCO	+	+	-	-	-
ANIS ESTRELADO	+	+	+	-	-
CHÁ VERDE	-	+	+	-	+

*(+) presença e (-) ausência de metabólitos secundários

Dos extratos das plantas estudadas, apenas o chá verde e a amora preta não apresentaram taninos em sua composição. Todas as espécies possuem flavonoides, ao contrário de saponinas que não se mostraram presentes em nenhuma espécie estudada. Cumarinas foram encontradas apenas nas espécies hibisco e chá verde. . Na análise de alcalóides, a espinheira santa, o chá verde e picão preto expressaram resultados positivos quanto a presença de alcalóides, já a amora preta, nogueira-pecã, hibisco e anis estrelado apresentaram resultados negativos.

Outros compostos importantes e que têm sido identificados nos extratos das plantas estudadas neste trabalho, são os triterpenos e esteroides, que por sua vez são compostos promissores para o estudo de novos medicamentos, e, compreendem uma variedade de compostos com especialidades biológicas já descritas na literatura, como ação anti-inflamatória, antibacteriana e analgésica (Oliveira e Almeida, 2016). Na tabela 5, estão os resultados dos testes realizados para determinar a existência de triterpenos e esteroides.

Tabela 5: Teste qualitativo para Triterpenos e Esteroides

AMOSTRAS	REAÇÃO DE SALKOWSKI	REAÇÃO DE LIEBBERMAN-BURCHARD
Amora	+	+++
Carrapicho/picão preto	++	+++
Nogueira-pecã	+	+
Espinheira santa	+	+++
Hibiscus	+	**
Anis Estrelado	+	+
Chá verde	-	-
Leite de Moreira	+++	+++
Chá Detox Misto	+++	+++

(+) Resultado fraco positivo; (++) forte positivo; (+++) fortemente positivo.

(-) Resultado negativo

**Na reação L.B. observou-se formação de fases, sobrenadante azulado e fundo amarelado, obtendo depois resultado positivo.

Foram realizados dois testes, Reação de Salkowski e Reação de Lieberman-burchard. Os resultados foram identificados como (+) fraco positivo, (++) forte positivo, (+++) fortemente positivo e (-) negativo. Todas as espécies, com exceção do chá verde, confirmaram presença de triterpenos e esteroides nos dois testes realizados.

Os extratos de leite de moreira e chá detox misto destacaram-se pela presença de “fortemente positivo” nos dois testes realizados. Dzuback *et al.* (2006), afirma que os triterpenos representam 30% dos constituintes químicos da planta leite de moreira.

Em relação ao chá detox misto, este é composto por mais de 70 espécies. Segundo Casanova e Costa (2017), a combinação de substâncias de várias espécies pode influenciar na biodisponibilidade de compostos ativos.

5.2 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Segundo Soares *et al.* (2008), os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização.

Os resultados da quantificação de fenólicos totais estão expostos na tabela 6. Tais resultados foram expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $y = 0,0013x - 0,0141$, onde “y” é a absorbância das amostras medidas a 750nm, “x” é a concentração de ácido gálico e o coeficiente de correlação foi $R^2 = 0,9997$.

Tabela 6: Quantificação de Fenólicos Totais em mg de EAG/g de Extrato.

Espécie / Amostra	Extrato MeOH	Extrato CHCl ₃
	(mg EAG/g de extrato)	(mg EAG/g de extrato)
<i>Maclura tinctoria</i> (Leite de Moreira)	25,46 (± 0,01)	23,15 (±0,01)

<i>Morus nigra</i> (<i>Amora preta</i>)	30,07 ($\pm 0,039$)	19,53 ($\pm 0,001$)
<i>Maytenus ilicifolia</i> (<i>Espinheira santa</i>)	49,31 ($\pm 0,003$)	37,00 ($\pm 0,023$)
<i>Camellia sinensis</i> (<i>Chá verde</i>)	20,85 ($\pm 0,004$)	18,53 ($\pm 0,001$)
<i>Carya illinoensis</i> (<i>Nogueira-pecã</i>)	31,61 ($\pm 0,01$)	199,30 ($\pm 0,073$)
<i>Illicium verum</i> (<i>Anis estrelado</i>)	23,92 ($\pm 0,003$)	173,15 ($\pm 0,011$)
chá detox misto 1	53,15 ($\pm 0,011$)	101,65 ($\pm 0,011$)
chá detox misto 2	33,15 ($\pm 0,004$)	37,00 ($\pm 0,012$)
<i>Bidens pilosa</i> (<i>Picão preto</i>)	15,46 ($\pm 0,007$)	57,00 ($\pm 0,015$)
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (<i>Hibisco</i>)	13,15 ($\pm 0,002$)	18,53 ($\pm 0,01$)

Percebe-se que todos os extratos exibiram números significativos de compostos fenólicos em sua constituição, com relevância para aqueles que mostraram valores de equivalência de ácido gálico por grama de extrato acima de 100, como é o caso dos extratos NPC (*Carya illinoensis*), AEC (*Illicium verum*) e D1C (chá detox misto 1) com 199,30 mg EAG/g, 173,15 mg EAG/g e 101,65 mg EAG/g, respectivamente. Todos os outros 17 extratos, exibiram teor de fenólicos abaixo de 100. Prado e colaboradores (2009), afirmam que essa variação de valores dos compostos fenólicos de um solvente para outro, resultam da natureza química dessas substâncias fenólicas e da interação com outros nutrientes que existem na amostra.

Sabe-se que substâncias polares tem maior afinidade por solventes polares e apolares por solventes apolares. Sendo assim, sugere-se que os compostos fenólicos existentes nas amostras dos vegetais noqueira-pecã, anis estrelado e chá detox misto I, tenham mais afinidade por solventes apolares, já que o clorofórmio apesar de ser polar, é de baixa polaridade. De acordo com Firmo *et al.* (2014), vários aspectos, tais como, cultivo da planta, condições climáticas, características genéticas da planta,

estresses biótico e abiótico e outros, podem interferir na determinação de fenólicos em vegetais e, possivelmente também na AA.

Sendo assim, os fenólicos por conter em sua estrutura grupamentos hidroxilas, tem a capacidade de inativar radicais livres. Pois esses grupos hidroxilas possuem a habilidade de ligar-se aos radicais presentes no organismo, bloqueando sua ação, impedindo dessa forma, danos e/ou oxidação de partes celulares (SEVERO *et al.*, 2009).

5.3 FLAVONÓIDES TOTAIS

O método de quantificação de flavonoides por espectrofotometria, é uma técnica mais acessível, prática e menos oneroso e, devido às duplas ligações presentes nos anéis aromáticos, os flavonoides podem ser analisados na região do ultravioleta ou visível (SOBRINHO *et al.*, 2012).

Atualmente mais de 8000 estruturas de flavonoides já foram identificadas. Este grande número resulta de várias combinações entre vários grupos hidroxila e metoxila substituídos no esqueleto básico. Nas plantas, estes compostos geralmente ocorrem como glicosídeos, mas as suas estruturas podem ser mais complexas, como ésteres catequinas ou chalconas prenilados (SOARES *et al.*, 2015).

A tabela 7, mostra os resultados da quantificação de flavonóides totais. Após a quantificação, um gráfico com a intercalação de absorbância *versus* a curva de calibração da quercetina foi construído, a qual, a equação da curva de calibração da quercetina foi $y = 0,0043x + 0,0026$, onde “y” é a absorbância das amostras medidas a 415nm, “x” é a concentração da quercetina e o coeficiente de correlação foi $R^2 = 0,9995$.

Tabela 07: Quantificação do teor de flavonóides totais em EQ/mg de extrato.

	<i>Extrato MeOH</i>	<i>Extrato CHCl₃</i>
<i>Espécie / amostra</i>	EQ/mg de extrato	EQ/mg de extrato

Espinheira Santa (ESM / ESC)	71,95 ($\pm 0,01$)	26,60 ($\pm 0,014$)
Picão Preto (PPM / PPC)	25,91 ($\pm 0,005$)	82,65 ($\pm 0,01$)
Chá Detox Misto II (D2M/D2C)	42,19 ($\pm 0,017$)	55,44 ($\pm 0,01$)
Chá detox misto I (D1M / D1C)	42,42 ($\pm 0,009$)	39,63 ($\pm 0,011$)
Hibisco (HM/HC)	28,23 ($\pm 0,001$)	32,42 ($\pm 0,003$)
Anis Estrelado (AEM/AEC)	44,74 ($\pm 0,011$)	46,60 ($\pm 0,007$)
Amora Preta (AMM/AMC)	74,74 ($\pm 0,22$)	16,37 ($\pm 0,005$)
Chá Verde (CVM/CVC)	26,37 ($\pm 0,004$)	62,65 ($\pm 0,006$)
Leite de Moreira (LMM/LMC)	32,88 ($\pm 0,006$)	22,42 ($\pm 0,005$)
Nogueira-pecã (NPM/NPC)	67,90 ($\pm 0,014$)	37,07 ($\pm 0,007$)

Fonte: Autora

Como descrito na tabela acima, foi possível verificar, através do método colorimétrico do AlCl_3 , que todos os extratos exibiram em sua composição química razoável quantidade de flavonoides.

Os extratos PPC (82,65 EQ/mg), AMM (74,74 EQ/mg), ESM (71,95 EQ/mg), NPM (67,90 EQ/mg) e CVC (62,65 EQ/mg) se distinguiram em relação aos outros extratos, demonstrando maior quantidade de flavonoides, sendo que os extratos AMC e LMC expressaram teores menores de flavonoides, 16,37 e 22,45 EQ/mg de extrato, respectivamente.

Segundo Simões *et al.* (2016), os menores valores achados aplicam-se possivelmente a degradação de substâncias em relação ao maior tempo de extração usado. Isso pode acontecer devido a rápida decomposição dos metabólitos secundários na presença de oxigênio e temperaturas elevadas, o que pode afetar o seu potencial biológico.

Analisando a tabela 10, foi possível também observar, que houve uma variação significativa no teor de flavonoides ao se variar o solvente extrator. Para Zuanazzi e Montanha (2004), solventes de menor polaridade como o clorofórmio possibilitam a extração de flavonoides como flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonoides, isoflavonas entre outras substâncias, ao passo que, solventes de maior polaridade,

como o metanol, extraem agliconas polihidroxiladas, flavonas e flavonóis mais polares.

Os flavonoides estão associados a uma enorme diversidade de atividades biológicas, enfatizando-se a ação antioxidante, antitumoral, antiviral, entre outras. A atividade antioxidante dos flavonoides se dá pelo seu método de sequestrar radicais livres e provocar a quelação de íons metálicos. Os flavonoides doam átomos de hidrogênio, auxiliando assim os tecidos das respostas causadas pela peroxidação lipídica e radicais livres (SAVI *et al.*, 2017). Estas informações corroboram com os resultados do teste de DPPH do presente estudo, onde amostras que deram boa atividade antioxidante, também apresentaram maior quantidade de flavonoides.

Dando ênfase às espécies que demonstraram maior teor de flavonoides, existem outros estudos que ratificam os resultados aqui apresentados. Alves e colaboradores (2016), obtiveram uma concentração de flavonóides totais similar entre extratos de folhas secas da espinheira santa (43,71 EQ/mg) e extrato de folhas frescas (41,59 EQ/mg). Neste estudo, o composto de maior concentração no extrato seco foi a quercetina, em sequência o ácido cafeico. No extrato fresco, foi a quercitrina seguido pela quercetina.

Resultados obtidos através do estudo de Marino e colaboradores (2019), demonstraram o teor de flavonoides da *M. ilicifolia* em duas amostras A e B, uma adquirida em farmácia de manipulação e a outra em uma loja de produtos naturais, tendo como valores 64,38 e 71,86 EQ/mg de extrato, respectivamente. Os autores ainda relatam que os flavonóides existentes nesta espécie são agentes responsáveis por diminuir a secreção ácida da mucosa gástrica, por resultado antagônico de receptores H2.

DEBA e colaboradores (2007), encontraram flavonoides nos extratos de raízes, caules e folhas do picão preto, 47,6 e 30,7 EQ/mg de extrato. Já WU *et al.* (2012), encontraram valores maiores que o do presente estudo, cerca de 95,29 EQ/mg nos extratos etanólicos (75:25, v: v) através da planta inteira. Tais oscilações confirmam que o solvente utilizado na extração e o tempo de extração, assim como a origem das espécies são condições relevantes para obtenção de extratos com perfis químicos importantes.

Rosa e colaboradores (2011), analisou o teor de flavonoides de grãos de noqueira-pecã, nos quais as concentrações variaram de 26,30 a 36,10 EQ/mg de extrato, resultados menores do que o mostrado no presente estudo. Os autores retratam que esses valores são consideravelmente mais elevados do que as concentrações de flavonóides totais determinadas em cascas desta espécie com o mesmo método colorimétrico. Ressalta-se que neste estudo foram utilizadas cascas pulverizadas para constituir o extrato.

Na pesquisa de Cardoso (2011), as frações butanólicas e de acetato de etila das folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* mostraram 0,104 mg/ml de flavonoides totais. As frações de maior polaridade foram as que apresentaram maior concentração de flavonóides. Assim como, no estudo de Sobota *et al.* (2016), o extrato aquoso da *H. rosa sinensis* através do método de infusão, apresentou uma concentração de 71,58 EQ/mg de extrato, já pelo método de decocção mostrou 18,49 EQ/mg, no qual o presente estudo apresentou valores menores de flavonoides. Os autores afirmam que os extratos por decocção demonstram uma maior variedade de compostos que os extratos obtidos por infusão.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH

Antioxidantes são compostos que protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos que podem provocar oxidação em excesso, tendo a capacidade de bloquear uma ação oxidativa (SANTOS, 2006).

Uma ação oxidante em uma célula ou tecido traz mudanças nas propriedades físico-químicas da membrana celular, tendo como consequência perda da seletividade nas trocas iônicas, alterações de permeabilidade, formação de produtos citotóxicos, risco de liberação do conteúdo das organelas culminando com a morte celular (ENGERS; BEHLING; e FRIZZO, 2011).

Inicialmente, foi realizada uma triagem com os 20 extratos na concentração de 1 mg/ml para saber quais possuíam uma boa porcentagem de inibição, sendo determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical livre DPPH.

Como resultado, apenas metade (n=10) dos extratos, sendo estes PPM (%AA=75,24), AEM (%AA=68,36), CVC (%AA=63,26), CVM (%AA=79,68), ESM (%AA=66,81), LMC (%AA=71,80), D1M (%AA=72,25), D1C (%AA=66,81), D2M (%AA=68,47) e D2C (%AA=65,37), os que apresentaram uma porcentagem significativa de inibição quando comparado ao padrão BHT (%=78,35). Todos os demais extratos apresentaram uma inibição abaixo de 60 %. Após a triagem, os 10 extratos foram testados em cinco concentrações diferentes para cálculo de IC₅₀, como é visto na figura 7.

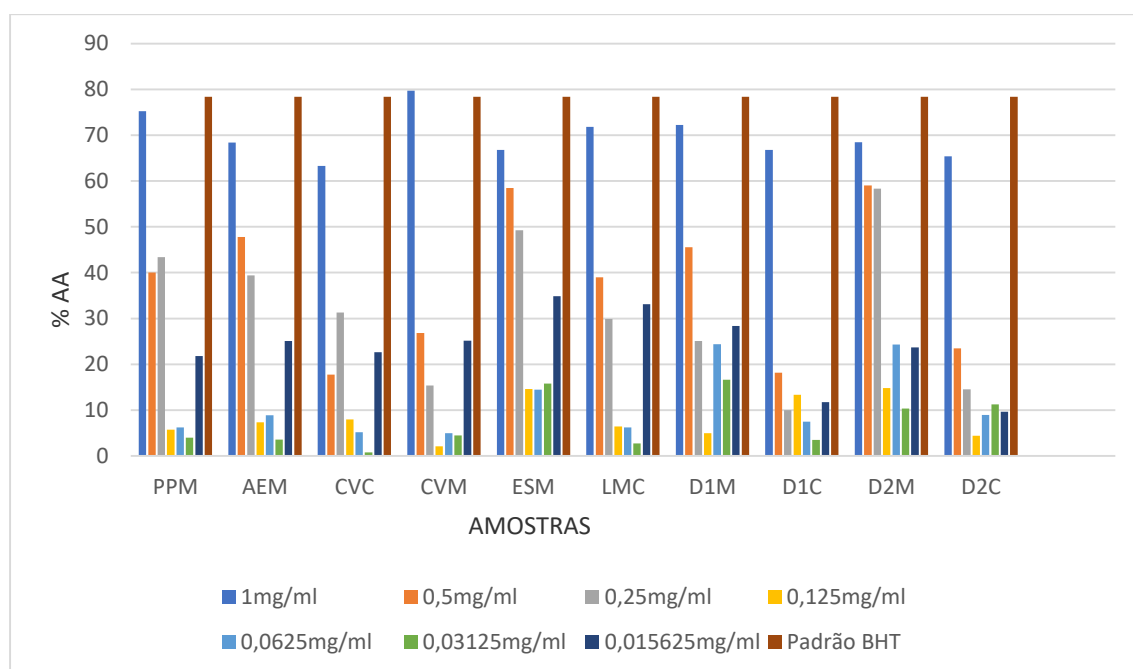


FIGURA 8: Porcentagem de Atividade Antioxidante dos Extratos Metanólicos e Fases Clorofórmicas das Espécies Vegetais em Estudo, através do Método DPPH.

Fonte: autora

De acordo com Silva *et al.* (2009), neste ensaio, o resultado pode ser expresso em IC₅₀, que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical DPPH, sendo que quanto menor o IC₅₀, maior a atividade antioxidante (AA) do extrato.

Portanto, todos os extratos mostraram boa atividade antioxidante, sendo o extrato metanólico da espécie *Maytenus ilicifolia* com maior AA (IC₅₀ = 0,219 mg/ml) e o chá detox misto II metanólico (IC₅₀ <0,1) apresentando atividade pró-oxidante (Tabela 8). Essa ação pró-oxidante, é um indicativo que o extrato D2M, possivelmente

apresenta uma baixa capacidade de doar elétrons e, conseqüentemente um baixo potencial em relação a quelação de metais.

Tabela 8: Concentração Inibitória dos Extratos Avaliados.

Espécie	Extratos	(IC₅₀ = mg/ml)
<i>Bidens pilosa</i>	PPM (metanólico)	0,615 (± 0,041)
<i>Illicium verum</i>	AEM (metanólico)	0,535 (±0,041)
<i>Camellia sinensis</i>	CVC (clorofórmico)	0,827 (±0,015)
<i>Camellia sinensis</i>	CVM (metanólico)	0,687 (±0,025)
<i>Maytenus ilicifolia</i>	ESM (metanólico)	0,219 (±0,038)
<i>Maclura tinctoria</i>	LMC (clorofórmico)	0,665 (±0,003)
Chá detox misto	D1M (metanólico)	0,620 (±0,035)
Chá detox misto	D1C (clorofórmico)	0,829 (± 0,043)
Chá detox misto	D2M (metanólico)	<0,1 (±0,055)
Chá detox misto	D2C (clorofórmico)	0,810 (± 0,007)

Diversos pesquisadores da literatura científica utilizaram o método DPPH para estudar o potencial antioxidante de espécies vegetais relatadas neste trabalho. No estudo de Frabetti e colaboradores (2008), o extrato hidroalcólico de folhas da espécie *M. ilicifolia* mostrou intensa AA na concentração 1 mg/ml, com a inibição de 72,90%, assim como, Negri e colaboradores (2009), obtiveram dados da AA do extrato etanólico da espinheira santa, mostrando uma concentração inibitória de 0,248 mg/ml.

Chang *et al.* (2007), estudaram a AA da fração acetato de etila (EA) e butanólica (BuOH) da planta inteira de *B. pilosa* no método DPPH. Observou-se que as frações EA e a BuOH exibiram concentração inibitória de 36,2 µg/ mL e 250,8 µg/ ml, respectivamente, revelando uma AA. Os autores ainda relatam que a AA está diretamente associada ao teor de fenólicos do extrato, isto é, quanto mais compostos fenólicos, maior a atividade.

Já Córtez-Rojas e colaboradores (2013), demonstraram em seu estudo que o extrato de folhas e flores da *Bidens pilosa* apresentaram melhor AA, em comparação com os extratos de raiz e caule e a maior AA foi obtida no método de extração por maceração com IC₅₀ de 17,80 µg/ml. No presente estudo, avaliou-se a planta inteira, tendo como resultado, o extrato metanólico com maior AA em relação ao extrato clorofórmico.

A porcentagem de inibição do extrato metanólico da espécie *I. verum* mostrou-se um pouco menor (68,36%) no presente estudo, do que o encontrado no estudo de Yamina *et al.* (2013), que ficou entre 72,23% e 92,53% (extrato etanólico), e no estudo de Dias *et al.* (2015), que apresentou 91,51% de inibição (extrato etanólico). Possivelmente, essa diferença está relacionada a polaridade dos solventes. Rockenbach e colaboradores (2008), afirmam que a polaridade do solvente e o tipo de solvente podem impactar na transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é a peça-chave na medida da AA. Os autores ainda reiteram que os atributos físico-químicos dos solventes se igualam em maior grau às propriedades da maioria das substâncias fenólicas presentes nas amostras estudadas.

Guimarães (2011), confirmou que os chás advindos da *Camellia sinensis* demonstraram ter uma boa AA, com 89,26% de inibição, que pode ser conferida à existência de compostos fenólicos, dando ênfase aos taninos (ácido gálico) e flavonoides (miricetina, quercetina, catequinas e canferol), assim como, na pesquisa de Ferrari e Soares (2015), obteve-se 85,15% de inibição, como resultado da análise da atividade sequestrante de radicais livres.

Lamounier (2010), comparou o extrato da madeira com o extrato da casca da amoreira, sendo que os mesmos apresentaram boa AA com uma CE₅₀ 18,74 µg/ml e 20,97 µg/ml, respectivamente. O autor afirma que a madeira da amoreira possui maior AA que a casca, devido ao teor de fenóis existente em maior quantidade na madeira.

O chá detox misto demonstrou boa AA nas duas frações, diferenciando no tipo de solvente usado para extrair os compostos, sendo o extrato metanólico com maior AA que o clorofórmico. Santos (2014), certifica que, devido ao metanol ser um solvente bastante polar, facilita-se a extração de uma maior quantidade de compostos, em relação ao clorofórmio com menor polaridade. No chá detox II metanólico obteve-se

um $IC_{50} < 0,1$ o qual sugere-se que existam compostos tão ativos, que não foi possível mensurar a sua concentração inibitória.

5.5 INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO DO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

Realizou-se uma triagem com os 20 extratos para obter a porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno. O padrão sintético utilizado foi o BHT e para controle, o solvente metanol. Segundo Almeida *et al.* (2006), o mecanismo de oxidação do β -caroteno/ ácido linoleico analisa a ação de inibir radicais livres provocados durante a peroxidação do ácido linoleico. A técnica está baseada em parâmetros espectrofotométricos da descoloração (oxidação) do β -caroteno causado pelo processo de degradação oxidativa do ácido linoleico.

Os resultados mostraram que as amostras AMC (%AA=79,34), PPM (%AA=60,86), LMC (%AA=75,00), NPC (%AA=61,95) e D1M (%AA=82,60), apresentaram maior AA em relação as outras amostras que obtiveram porcentagem abaixo de 60%. Foi possível observar, que diferentemente dos resultados obtidos no método DPPH, as amostras com clorofórmio expressaram porcentagem de inibição melhores, comparado aos extratos metanólicos. Sultana e colaboradores (2007), relatam que no método da oxidação do β -caroteno, geralmente as melhores atividades antioxidantes são exibidas para amostras apolares.

De um certo modo, o clorofórmio é um solvente com menor polaridade comparado ao metanol. Possivelmente, os extratos clorofórmicos apresentam em sua composição compostos de baixa polaridade em relação aos extratos metanólicos, o que justifica este resultado.

Por um outro lado, algumas amostras exibiram atividade pró-oxidante, como HC (%=-28,26), CVM (%=-8,69), ESC (%=-22,82), LMM (%=-89,13) e D2C (%=-20,62). Rabelo e colaboradores (2014), mencionam que possivelmente, os valores negativos na porcentagem de AA estejam associados aos compostos existentes no extrato vegetal, que ao contrário de exercerem doação de hidrogênio ou elétrons, reduzem o radical, viabilizando um efeito inverso, comportando-se como agente pró-oxidante.

Para determinar a concentração inibitória (IC_{50}), utilizou-se os extratos com maior porcentagem de inibição. O extrato AMC ($IC_{50} = 0,05$ mg/ml) demonstrou menor concentração inibitória, conseqüentemente maior atividade antioxidante. Já o extrato

NPC (IC_{50} = 0,72 mg/ml) apresentou maior concentração inibitória, sendo assim, menor atividade antioxidante, conforme tabela 9.

Tabela 9: Resultados do teste de Inibição da Oxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

ESPÉCIES	TIPO DE EXTRATO	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (IC_{50} mg/ml)
<i>Morus nigra</i>	AMC (clorofórmico)	0,05 ($\pm$ 0,015)
<i>Bidens pilosa</i>	PPM (metanólico)	0,47 ($\pm$ 0,003)
<i>Maclura tinctoria</i>	LMC (clorofórmico)	0,62 ($\pm$ 0,005)
<i>Carya illinoensis</i>	NPC (clorofórmico)	0,72 ($\pm$ 0,018)
Chá Detox misto I	D1M (metanólico)	0,43 ($\pm$ 0,009)

Fonte: Autora (2021)

5.6 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

O teste da atividade inibitória da AChE foi realizado com os 20 extratos, na concentração de 1 mg/ml. Destes, apenas duas amostras demonstraram porcentagem de inibição da enzima AChE. No Quadro 4, estão descritas as porcentagens de inibição. Vinutha *et al.* (2007), estabeleceu a classificação de porcentagem de inibição em inibidores potentes (>50%), moderados (30-50%) e fracos (<30%).

QUADRO 4: Inibição e classificação da intensidade de inibição segundo espécies e extratos utilizados.

ESPÉCIE	TIPO DE EXTRATO	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO (%)	INTENSIDADE DE INIBIÇÃO
<i>Morus nigra</i>	AMM (metanólico)	0,67 ($\pm$ 0,012)	FRACO
	AMC (clorofórmico)	-	-
Chá detox misto	D1M (metanólico)	-	-
	D1C (clorofórmico)	1,61 ($\pm$ 0,232)	FRACO

Eserina (Padrão)	-	86,72 ($\pm$ 0,017)	POTENTE
------------------	---	----------------------	---------

Observa-se que os extrato AMM e D1C apresentaram baixa porcentagem de inibição, quando comparado ao padrão eserina. De acordo com Mukherjee *et al.* (2007), a fisostigmina (eserina) é um alcaloide isolado da espécie *Physostigma venenosum*, sendo um dos primeiros inibidores de AChE descoberto.

Em um estudo realizado por Souza (2011), o extrato aquoso e etanólico das folhas de *Morus nigra* inibiram outro modelo de enzima, a alfa-glicosidase com IC₅₀ de 188,40 µg/ml, mas não inibiram a atividade da enzima alfa-amilase. O autor reforça que esta inibição é devido ao composto isolado desoxinojirimicina. Possivelmente, o baixo percentual de inibição da acetilcolinesterase visto na presente pesquisa, deve-se ao fato de não existirem substâncias com atividade inibitória, essencialmente, para esta enzima.

Lopes e colaboradores (2002) relatam que, as famílias de plantas mais investigadas quanto à atividade da inibição de AChE são Apiaceae, Leguminosae, Lamiaceae e Asteraceae, devido as mesmas, apresentarem em sua composição alta quantidade de compostos alcaloides. Dentre as famílias citadas, a Asteraceae, espécie *Bidens pilosa*, uma das espécies do atual estudo, não apresentou nenhuma atividade inibitória frente à AChE.

5.7 TESTE DE TOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* é considerado um dos métodos principais, no universo dos estudos científicos, para analisar a toxicidade de espécies vegetais (HOCAYEN *et al.*, 2012). Geralmente, as substâncias analisadas são supostamente tóxicas em altas concentrações. Sendo assim, um estudo da letalidade em um microcrustáceo, pode ser útil como um teste rápido e fácil durante a análise do potencial tóxico de extratos vegetais (LHULLIER *et al.*, 2006). Entretanto, muitos fatores interferem no êxito do teste de toxicidade utilizando *nauplius*, como luz, temperatura, alimentação da *Artemia* sp., tempo de eclosão dos ovos, água utilizada no teste, contaminação das vidrarias e das substâncias (BUENO; PIOVEZAN, 2011).

Inicialmente, foi realizado o cálculo de médias e porcentagens do número de *Artemia salina* nas concentrações de 1000 µg/ml, 500 µg/ml e 250 µg/ml, para os extratos metanólicos e clorofórmicos de cada espécie. Dos extratos clorofórmicos, o AEC destacou-se apresentando maior mortalidade nas três concentrações sendo, 100% nas concentrações 1mg/ml e 0,5 mg/ml e 90% em 0,25 mg/ml. O extrato ESC expressou a menor mortalidade nas concentrações 1 mg/ml (66%), 0,5 mg/ml (46%), 0,25 mg/ml (46%). Na concentração de 0,25 mg/ml, o extrato LMC sobressaiu-se apresentando 40% de mortalidade, como descrito na figura 9.

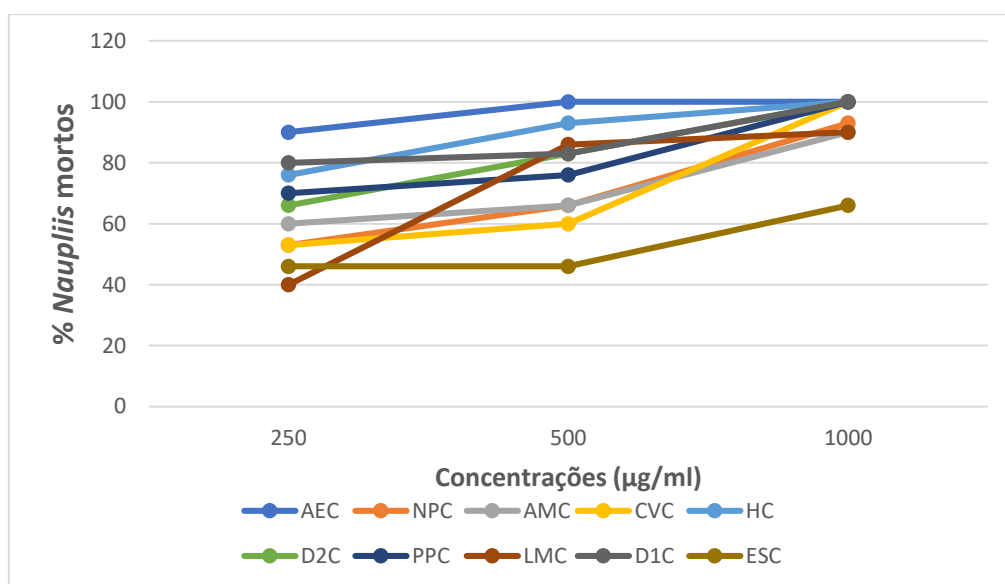


FIGURA 9: Porcentagem da quantidade de *Nauplius* mortos nos extratos clorofórmicos das espécies vegetais estudadas.

Fonte: Autora

Quanto aos extratos metanólicos, o NPM apresentou a maior porcentagem de mortalidade nas 3 concentrações, em relação aos outros extratos, sendo 100%, 90% e 73% em 1000 µg/ml, 500 µg/ml e 250 µg/ml, respectivamente. Tratando-se em menor porcentagem de mortalidade dos *Nauplius*, o extrato PPM se destacou, sendo 36%, 30% e 30% nas concentrações 1000 µg/ml, 500 µg/ml e 250 µg/ml, respectivamente, como é mostrado na figura 10.

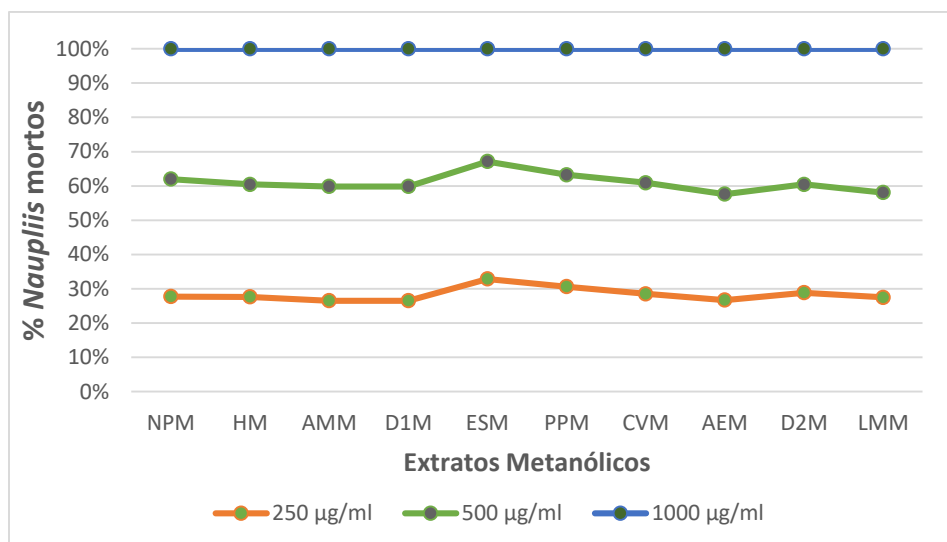


FIGURA 10: Porcentagem da quantidade de *Nauplius* mortos nos extratos metanólicos das espécies vegetais estudadas. Fonte: Autora

Através das porcentagens realizou-se o cálculo de CL_{50} , a Concentração Letal que pode levar à morte 50% dos organismos testados. Nguta e colaboradores (2012), estabeleceram que extratos com valores de CL_{50} entre 500 e 1000 µg/ml são ditos fracamente tóxicos, CL_{50} entre 100 e 500 µg/ml moderadamente tóxicos e CL_{50} menores que 100 µg/ml são fortemente tóxicos. O extrato só é considerado atóxico quando os valores estiverem acima de 1000 µg/ml.

Dos extratos avaliados, três apresentaram valores de CL_{50} fortemente tóxicos como AEC (10 µg/ml), AMC (48,66 µg/ml) e LMM (0,0451 µg/ml). Apenas dois extratos se mostraram atóxicos, com valores de CL_{50} acima de 1000 µg/ml, como AEM (3.508,77 µg/ml) e PPM (2.674,42 µg/ml), conforme tabela 10.

TABELA 10: Resultados da Atividade Citotóxica frente à *Artemia salina* com os extratos metanólicos e clorofórmicos das espécies estudadas.

ESPÉCIES	TIPO DE EXTRATO	ATIVIDADE CITOTÓXICA (CL_{50})
<i>Illicium verum</i>	AEM	3.508,77 µg/ml
	AEC	10 µg/ml
	NPC	196,62 µg/ml

<i>Carya illinoensis</i>	NPM	534,12 µg/ml
	AMC	48,66 µg/ml
<i>Morus nigra</i>	AMM	171,62 µg/ml
	CVC	261,13 µg/ml
<i>Camellia sinensis</i>	CVM	406,16 µg/ml
	HC	765,30 µg/ml
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	HM	294,11 µg/ml
	D2C	171,62 µg/ml
Chá detox misto II	D2M	355,19 µg/ml
	PPC	194,65 µg/ml
<i>Bidens pilosa</i>	PPM	2.674,42 µg/ml
	LMC	205,83 µg/ml
<i>Maclura tinctoria</i>	LMM	0,0451 µg/ml
	D1C	776,17 µg/ml
Chá detox misto I	D1M	172,62 µg/ml
	ESC	489,51 µg/ml
<i>Maytenus ilicifolia</i>	ESM	523,39 µg/ml

Um dos extratos clorofórmicos que se apresentou moderadamente tóxico frente a *Artemia salina* foi da amostra chá verde ($CL_{50} = 261,13 \mu\text{g/ml}$), e, consultando a literatura científica sobre a toxicidade desse chá, foi possível constatar que há relatos de lesão hepática causada pelo seu uso. Souza em 2011, afirmou que entre os anos de 1999 a 2008, 34 casos de hepatotoxicidade foram relatados após o uso do chá verde. O tipo de lesão hepática foi hepatocelular, além de hepatite fulminante. No mesmo ano, Stickel e colaboradores, relataram que o exame histológico do fígado de pacientes que utilizaram em excesso o chá verde, apresentaram reações

inflamatórias e colestase. No entanto, os pacientes estavam usando juntamente com o chá verde outros produtos com hepatotoxicidade relatada.

Ao contrário do chá verde, não foram achados na literatura dados que comprovem um quadro de hepatotoxicidade nas outras espécies.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS

Para avaliação da citotoxicidade, foram utilizadas uma linhagem de células cancerosas (HepG2) e uma linhagem celular não cancerosa (MRC-5), dispondo do método colorimétrico Alamar Blue para avaliação. A linhagem celular HepG2 corresponde ao hepatocarcinoma humano enquanto a célula normal MRC-5 configura-se como fibroblasto pulmonar humano.

Não foi observada atividade citotóxica relevante entre os extratos testados, sendo obtidos valores de IC₅₀ e CC₅₀, maiores que 50 µg/ml. Sendo que o primeiro é a concentração inibitória 50% - concentração que inibe o crescimento celular em 50%, avaliando a atividade antitumoral (HepG2) e o segundo é a concentração citotóxica 50% - concentração que mata 50% das células, para avaliar a citotoxicidade frente às células não-tumorais (MRC-5).

Referente a atividade na maior concentração testada (50 µg/mL) (tabela 12), dentre as frações metanólicas, o extrato de Chá verde (CVM) foi quem demonstrou maior atividade citotóxica IC₅₀ 12,68% (± 11,77), o qual no teste da *Artemia salina* apresentou-se moderadamente tóxico com CL₅₀ 406,16 µg/ml, em contraponto, o extrato de Amora (AMM), demonstrou menor atividade citotóxica 1,71% (± 2,29).

Quando avaliadas a fração clorofórmica, o Anis (AEC) foi quem demonstrou maior atividade citotóxica 13,73% (± 4,38).em oposição à fração clorofórmica do Hibisco (HC) que exibiu menor atividade citotóxica 1,18% (± 0,65). Quando avaliada a atividade citotóxica frente as células normais do pulmão, todos os extratos apresentaram CC₅₀ > 50 µg/ml.

Possivelmente, estas espécies vegetais sozinhas não causam lesão em células normais do fígado, os hepatócitos, então, uma possível explicação para um

quadro hepatotóxico dos pacientes que fizeram uso das espécies vegetais estudadas neste trabalho, é a dose em excesso, posologia inadequada e o uso concomitante de medicamentos sintéticos com plantas medicinais, pois sabe-se que estas podem apresentar compostos em diferentes concentrações e podem interagir com outras substâncias.

Souza e colaboradores (2017), afirmam que as preparações à base de plantas contêm vários fitoquímicos ativos em diversas proporções que podem, como qualquer outra substância farmacológica ativa, alterar os sistemas enzimáticos, transportadores ou processos fisiológicos do organismo.

Cardoso e colaboradores (2009), expõem que há relatos da interação do chá verde com medicamentos sintéticos, a exemplo de contraceptivos orais (pode prolongar a quantidade de cafeína no sangue circulante, e, portanto, aumentar os efeitos estimulantes), antibióticos beta-lactâmicos (aumento da efetividade) e buspirona (aumento da concentração plasmática). Outra interação é de substâncias como esteroides anabólicos, cetoconazol, amiodarona e metotrexato com a espinheira santa, tendo como efeito a hepatotoxicidade.

Tabela 12. Atividade citotóxica das frações clorofórmica e metanólica dos extratos vegetais estudados.

Código do Extrato	Maior Concentração utilizada no estudo $\mu\text{g/mL}$	% inibição células cancerosas	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	CC_{50} $\mu\text{g/mL}$
AEM	50	4,70 ($\pm 3,89$)	>50	>50
D1C	50	NÃO FOI POSSÍVEL		
D1M	50	6,06 ($\pm 6,79$)	>50	>50
NPM	50	8,44 ($\pm 9,69$)	>50	>50
PPM	50	5,30 ($\pm 1,69$)	>50	>50
AMM	50	1,27 ($\pm 1,14$)	>50	>50
HC	50	1,18 ($\pm 0,65$)	>50	>50
ESM	50	1,71 ($\pm 2,29$)	>50	>50
NPC	50	7,72 ($\pm 1,82$)	>50	>50
CVC	50	6,07 ($\pm 4,6$)	>50	>50
CVM	50	12,68 ($\pm 11,77$)	>50	>50
PPC	50	13,61 ($\pm 5,79$)	>50	>50
D2M	50	7,10 ($\pm 9,6$)	>50	>50
AMC	50	10,91 ($\pm 2,23$)	>50	>50
HM	50	10,47 ($\pm 6,85$)	>50	>50
LMM	50	9,48 ($\pm 6,35$)	>50	>50

AEC	50	13,73 ($\pm 4,38$)	>50	>50
ESC	50	9,33 ($\pm 3,42$)	>50	>50
LMC	50	10,53 ($\pm 5,58$)	>50	>50
DOX	2,7	81,9 ($\pm 1,25$)	0,38 ($\pm 0,12$)	1,14 ($\pm 0,8$)

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes.

Fonte: Autora (2021)

Vale ressaltar que não foi possível avaliar o extrato D1C. Durante a execução do experimento foi visualizada a formação de uma espécie de "gel" que não possibilitava a quantificação em espectrofotômetro. Na suspeita de contaminação foi solicitada outra amostra que apresentou o mesmo problema. Provavelmente, existe alguma interação entre o extrato e o meio de cultura utilizado (a base de água).

6. CONCLUSÃO

Os *screening* fitoquímico de todas as espécies estudadas apresentaram a maioria das classes de metabólitos secundários, o que torna as mesmas, espécies promissoras para estudos mais aprofundados.

No teste de inibição do radical livre DPPH, os extratos metanólicos das amostras estudadas se mostraram com maior atividade antioxidante, já no teste de inibição do β -caroteno/ácido linoléico, os extratos clorofórmicos se destacaram quanto à sua atividade antioxidante. Quanto ao teor de fenólicos totais, os extratos NPC, AEC e D1C exibiram maiores concentrações, já os extratos PPC, AMM, ESM, NPM e CVC destacaram-se com maiores teores de flavonoides totais. Possivelmente, espécies que possuem maior quantidade de flavonoides e fenólicos tem uma maior probabilidade de conter substâncias com ação antioxidante.

No teste da atividade inibitória da AChE, dos 20 extratos, apenas o AMM e D1C exibiram o percentual de inibição, no entanto, com fraca intensidade, demonstrando que possivelmente a maioria das espécies não possuem compostos inibidores de AChE.

Todos os extratos se mostraram tóxicos à *Artemia salina*, com exceção dos extratos AEC e PPM que obtiveram concentrações de LC₅₀ maior que 1 mg/ml. No entanto, ressalta-se que há limitações com este teste, devido a existência de fatores interferentes como temperatura, luz e tempo de eclosão dos ovos.

Em relação aos testes de citotoxicidade em células tumorais não foi observada atividade relevante entre os extratos. Sugere-se ser necessário realizar outros testes para avaliar atividade antitumoral com uma maior quantidade de extrato de cada espécie, sendo interessante a realização de estudos *in vivo* utilizando fígado de camundongos.

Do mesmo modo, nenhuma espécie se mostrou tóxica para células normais do pulmão. Supostamente, as espécies vegetais sozinhas, não estão causando hepatotoxicidade. Possivelmente, houve uma interação planta-medicamento ou planta-alimento, questões de posologia e dose inadequadas utilizadas pelos pacientes acometidos por lesão hepática.

Há pouco estudo quanto às interações planta-medicamento e planta-alimento. Dessa forma, é importante conhecer ao menos as classes de compostos presentes na espécie vegetal, pois assim é possível inferir a possibilidade dessas interações.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I. et al. Growth, yield and quality of *Rosa hybrida* as influenced by various micronutrients. **Pak. J. Agric. Sci.**, v. 47, p.5-12, 1994.

ALMEIDA, N.F.L. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Viçosa - MG. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V. 90, N. 4, P. 316-320, 2006.

ARAÚJO, C.R.M.; SANTOS, V.L.A.; GONÇALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual em Química**, Petrolina – PE, v.8, n.6, p.1818-1834, nov. /2016.

ALVES, A.O. et al. Análise fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Maytenus ilicifolia*. **Anais de Congresso Brasileiro de Ciências e tecnologia de alimentos**. FAURGS, Gramado – RS, V..6, p. 1-8, out. /2016.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Capítulo 5 – Cultivo celular. Disponível em: http://www.epsiv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo_5_vol2.pdf, acesso: 30/04/2021.

AMADI, C.N.; ORISAKWE, O.E. Lesões hepáticas induzidas por ervas em países em desenvolvimento: uma atualização. **Revista de Farmacologia e Toxicologia**, Pourt Harcourt, v.6, p.24, abr. /2018.

ANDRADE, R. et al. Painel de diretrizes de prática clínica. **Jornal de Hepatologia**. Vol. 3, p.17-25, 2019.

BALTAR, S.M.A. et al. Epidemiology of plant poisoning cases reported at the Toxicological Assistance Centre of Pernambuco (CEATOX-PE) between 1992 and 2009. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol, 10(4), 375-547, Out-Dez 2016.

BARBOSA, C. K. R. et al. Qualidade microbiológica de plantas medicinais cultivadas e comercializadas em Montes Claros - MG. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 1, p. 77- 81, 2010.

BESSA, N. G. F. D. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.4, 692-707, 2013.

BORGES, K.C.A.S. et al. Identificações Botânicas e Lâmina Histológicas. Editora UniFOA. Disponível em: <http://editora.unifoa.edu.br/index.php/identificacao-botanica-e-laminas-histologicas-unifoa-tres-pocos/> > acesso em 05/04/2021.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução**. Determina a publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. Diário Oficial da União. Resolução nº. 89, 16 de março de 2017. Disponível em: Acesso em: 24/07/2020.

BRASIL. **Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente**. Comissão Assessora de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Plantas Medicinais e Fitoterápicos. / Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. – São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 4ª edição, 2019.

BRETAS, R.M. **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais**, 2011. 170p. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. RJ, 2011.

BRUNING, M.C.B.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANNA, C.M.M. The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do

Iguaçu – Paraná: the viewpoint of health professionals. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.17, n.10, p.2675-2685, 2012.

BYEON, C.K. et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 14, n. 4, 2019.

CAMPOS, S.C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.373-382, 2016.

CASANOVA, L.M.; COSTA, S.S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Rev. Virtual Quim.**, 9 (2), 575-595, 2017;

CHANG, S.L. et al. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN-gamma expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112(2), p. 232-236, 2007.

CÓRTEZ-ROJAS, D.F. et al. Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: a key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n1, p. 28-35, Jan./Feb. 2013.

DEBA, F. et al. Chemical Composition and Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities of The Essential Oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. **Food Cont.**, v. 19, p. 346-352, 2008.

DZUBACK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenes and their therapeutic implications. **Natural Products Reportes**, v. 23, p.394-411, 2006.

DIAS, E.C.M. et al. Uso de fitoterápicos e potenciais riscos de interações medicamentosas: reflexões para prática segura. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 41, n.2, p. a2306, 2015.

Duarte, A. M. **Plantas Medicinais em Áreas Urbanas do Planalto Sul Catarinense**. 2006.(Dissertação de Mestrado) – Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC, Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ambiente e Saúde, Lages,2006.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

ENGERH, V.K.; BEHLING, C.S.; FRIZZO, M.N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto & Saúde**, v.10, n.20, p. 93-102, 2011.

FIRMO, W.C.A., et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde.**, v.20(1), p.7-12, 2014.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, vol. 86, p. 345–391, 2012;

HAMID, R.et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 703-710, 2004.

HOCAYEN, P.A.S. et al. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Revista de Botânica Florianópolis**, n. 41, p. 23-31. 2012.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. Clinical Chemistry. 3 ed. St Louis: Mosby-year book, 1996;

KIM WR, et al. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*. 47(4):1363– 70, 2008;

KLEINER D.E, et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**. 41 (6):1313-21, 2005;

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells – mini-review - **Applied Microbiology and Biotechnology**, Hannover, v.59, p.135 – 142, 2002.

KUO YT, et al. Alpha-lipoic acid induces adipose triglyceride lipase expression and decreases intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. **Eur J Pharmacol**. 692(1-3):10-8, 2012;

KVIECINSKI, M.R. et al. Brazilian *Bidens pilosa* linne yields fraction containing quercetin-derived flavonoid with free radical scavenger activity and hepatoprotective effects. **Libyan Journal of Medicine**.6(1):1-8, 2011.

LEWIS P.J.S. et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. **Hepatology**. 54(5):1767–76, 2011;

LOPES, S. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. **Life Sci**, 11;71 (21): 2521-9, 2002;

MARINO, P.A. et al. Phytochemical screening and assay of total polyphenols and flavonoids in different samples of holy thorn (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Braz. J. Hea. Rev.**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 6, 1049-1062, mar./apr. 2019;

MATTEONI CA, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**.116(6):1413-1419, 1999;

MILLER, A. M. et al. Molecular Mechanisms of Alcoholic Liver Disease: Innate Immunity and Cytokines. **Alcohol Clin. Exp. Res**. 35: 787–793, 2011;

MOTTA, V.T. Bioquímica clínica para o laboratório (princípios e interpretações). 5 ed. **Medbook**. 2009;

MUKHERJEE, P.K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**. 14(4), p.289-300, ap./ 2007;

MUNSHI, S.; TWINING, R., RUSSELL, C. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 70, n. 2, p. 195-198, 2014.

NUNES, P.P.; MOREIRA, A.L. Fisiologia Hepática (Texto de Apoio). Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, **Serviço de Fisiologia**, p.1- 26, 2007.

OLIVEIRA, C. O. Introdução à Biologia Vegetal. 2. ed. Revisão Ampliada. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2003.

OLIVEIRA, L.A.R.; MACHADO, R.D.; RODRIGUES, A.J.L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.16, n.1, p.32-40, 2014.

OLIVEIRA, N.T.; ALMEIDA, S.S.M.S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida Aublet (Apocynaceae)*. **Macapá**, v. 6, n. 1, p. 20-25, 2016,

PERES, L.E.P. Metabolismo Secundário. Disponível no site: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>. Acesso em: 04 de abril de 2021.

PERON, A.P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera Less.* e *Solanum melongena L.* em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 127-130, abr./jun. 2008.

PINHEIRO, J.A.S. et al. Hepatotoxic properties in medicinal plants and herbal products. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás - RRS-FESGO**, Vol.03, n.1, pp. 132-137, Jan – Jul 2020.

PIZARRO, A. P. B. et al. Aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p. 23-29, 1999.

RAMALHO, B. R. **Terapia com células-tronco mesenquimais de medula óssea e ácido hialurônico em calvária de coelhos**. Bauru, 2007. 140p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade do Sagrado Coração, SP, 2007.

REUTER, S. et al. Modulation of anti_apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemistry Pharmacology**, v. 76, p. 40-51, 2008.

ROSA, L.A.L. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de grãos e cascas de noz-pecã mexicana (*Carya illinoensis*). **J. Agric. Food Chem.** 59, 152-162, 2011.

SANTOS, A. A.; GRAÇA, J. R. V. Bases celulares da fisiopatologia gastrointestinal. Gastroenterologia e Hepatologia: sinais, sintomas, diagnóstico e tratamento. Ceará: Edições UFC, 2010.

SAVI, P.R.S. et al. Analysis of total flavonoids present in some of the most consumed conventional and organic fruits and vegetables in southern Brazil. **Demetra**, 12(1); 275-287, 2017.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. (Ed.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Ed.UFSC, 2003.

SEVERO, J. et al. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Braz. Jour. Food Technol.**, Pelotas, II SSA, Edição Especial, 2009.

SILVA, P. B. et al. Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.4, p.447-55, 2011.

SILVA, R.O.P; LOPES, A.F.; FARIA, R.M.D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**. 18: 116- 122, 2008.

SLATER, K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 70-74, 2001.

SOBOTA, J.F. et al. Physical-chemical profile and antioxidant activity of the calyx of the species *Hibiscus sabdariffa* L. from the aqueous and alcoholic extract obtained by infusion and decoction. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol, 10(1), 1-93, Jan-Mar 2016.

Sociedade Brasileira de Hepatologia. **Toxicidade hepática de chás, ervas e fitoterápicos**. Federação Brasileira de Gastroenterologia, 2010.

SOUZA, A.F.M. Toxicidade hepática de chás, ervas e fitoterápicos. Sociedade Brasileira de Hepatologia. p.03, 2011. Disponível em: <https://www.sbhepatologia.org.br/fasciculos/25.pdf> < acesso em 05/04/2021>.

SOUZA, J.B. et al. Medicinal plant versus conventional medicine interaction in arterial hypertension treatment, **Revista Infarma**, v.29, n.2, p.90-99, mar. /2017.

SOUZA, P.M. **A atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma do cerrado**. (2011) [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília – DF, 2011.

SOUZA, S. M. **Atividade Antibacteriana de Cumarinas Naturais e Derivados**. (2005) (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal De Santa Catarina-SC, 94 p., 2005.

STICKEL, F. et al. Review of liver injury associated with dietary supplements. **Liver Int.**, v. 31, p. 595–605, 2011.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto: Enfermagem, Florianópolis**, v. 15, n. 1, p. 115-121, jan./mar. 2006.

UMEIO, S.H. et al. Avaliação das propriedades antioxidantes, anticolinesterásicas e citotóxicas dos frutos de *Allophylus edulis* (A.ST.-HIL., CAMBESS. & A. JUSS.) RADLK. (SAPINDACEAE). **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 167-171, maio/ago. 2011.

VELOSO, C.C. et al. Pyrostegia venusta attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, p.335-8, 2010.

WU, J. et al. Investigation of the extracts from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata* Sch. Bip. for antioxidant activities and cytotoxicity against human tumor cells. **J. of Nat. Med.**, v. 67, p. 17-26, 2012.

YAO, L.H. et al. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant and Foods for Human Nutrition**. V. 59, p.113 – 122, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA QUALIS A3

Aspectos botânicos, fitoquímicos e citotóxicos de espécies vegetais pertencentes às famílias Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae e Illiciaceae: uma revisão da literatura

Botanical, phytochemical and cytotoxic aspects of vegetable species belonging to the Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae and Illiciaceae: a literature review

Aspectos botânicos, fitoquímicos y citotóxicos de las especies vegetales de las Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae e Illiciaceae: revisión de la literatura

Recebido: 03/12/2021 | Revisado: 09/12/2021 | Aceito: 15/12/2021 | Publicado: 22/12/2021

Rebeca Oliveira de Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1119-9700>

Universidade do Estado da Bahia, Brasil

E-mail: becafarmac@gmail.com

Erika Maria de Oliveira Ribeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6491-7585>

Universidade do Estado da Bahia, Brasil

E-mail: eribeiro@uneb.br

Luciano Vasconcellos Pacheco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6210-3828>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: lucianofcd@hotmail.com

Elisalva Teixeira Guimarães

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9274-2957>

Universidade do Estado da Bahia, Brasil

E-mail: etguimaraes@uneb.br

Genario Oliveira Santos Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7766-2238>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: genariofarma@yahoo.com.br

Ademir Evangelista do Vale

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0651-1752>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: advale@gmail.com

Raymundo Paraná Ferreira Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4019-4597>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: unif@svn.com.br

Resumo

A presente revisão integrativa tem por objetivo apresentar informações botânicas, fitoquímicas e citotóxicas sobre espécies vegetais usadas popularmente. Como estratégia para busca de artigos, utilizaram-se as bases de dados de Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), a *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), a *Science Direct*, e o *Google Scholar*, e, foram selecionados trabalhos nos idiomas português, inglês e espanhol. Após a leitura do resumo, foram incluídos estudos que atendiam aos requisitos do tema abordado. Foram excluídos os trabalhos que, após leitura na íntegra não abordaram diretamente a temática proposta. Observaram-se registros do uso de plantas medicinais datados desde 1500 A.C, associado a isso, a "Farmacopeia Verde", de 1926, foi o primeiro documento oficial brasileiro com descrições botânicas de algumas plantas medicinais. Referente às famílias Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae e Illiciaceae, a mais abundante mundialmente foi a Asteraceae com cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies, enquanto a Theaceae, com cerca de 10 gêneros e 195 espécies, foi a menos encontrada. Observou-se que os ensaios de citotoxicidade, *in vitro*, tanto por métodos direto quanto indiretos, configuram-se como uma ferramenta para avaliar toxicidade das plantas medicinais e algumas atividades biológicas. Nesse contexto, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* é uma ferramenta preliminar para avaliar a toxicidade e atividade biológica de uma planta medicinal.

Palavras-chave: Botânica; Fitoquímica; Citotoxicidade; Plantas medicinais.

Abstract

This integrative review aims to present botanical, phytochemical and cytotoxic information about plant species commonly used. As a strategy to search for articles, the databases of Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Science Direct, and Google Scholar were used. selected works in Portuguese, English and Spanish. After reading the abstract, studies that met the requirements of the topic addressed were included. Works that, after reading in full, did not directly address the proposed theme were excluded. Records of the use of medicinal plants dating back to 1500 BC were observed. Associated with this, the "Green Pharmacopoeia", from 1926, was the first official Brazilian document with botanical descriptions of some medicinal plants. Concerning the families Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae and Illiciaceae, the most abundant worldwide was the Asteraceae with about 1,600 genera and 23,000 species, while Theaceae, with about 10 genera and 195 species, was the least found . It was observed that the cytotoxicity assays, in vitro, both by direct and indirect methods, are configured as a tool to assess the toxicity of medicinal plants and some biological activities. In this context, in vitro cytotoxicity assays are a preliminary tool to assess the toxicity and biological activity of a medicinal plant.

Keywords: Botany; Phytochemistry; Cytotoxicity; Medicinal plants.

Resumen

Esta revisión integradora tiene como objetivo presentar información botánica, fitoquímica y citotóxica sobre las especies de plantas de uso común. Como estrategia de búsqueda de artículos se utilizaron las bases de datos de Literatura Latinoamericana y Caribeña en Ciencias de la Salud (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Science Direct y Google Scholar, trabajos seleccionados en portugués, inglés y español. Luego de la lectura del resumen, se incluyeron los estudios que cumplieron con los requisitos del tema abordado. Se excluyeron los trabajos que, después de leerlos íntegramente, no abordaran directamente el tema propuesto. Se observaron registros de uso de plantas medicinales que datan del 1500 aC Asociado a esto, la "Farmacopea Verde", de 1926, fue el primer documento oficial brasileño con descripciones botánicas de algunas plantas medicinales. En cuanto a las familias Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae e Illiciaceae, la más abundante a nivel mundial fue la Asteraceae con cerca de 1.600 géneros y 23.000 especies, mientras que Theaceae, con cerca de 10 géneros y 195 especies, fue la menos encontrada. Se observó que los ensayos de citotoxicidad, in vitro, tanto por métodos directos como indirectos, se configuran como una herramienta para evaluar la toxicidad de plantas medicinales y algunas actividades biológicas. En este contexto, los ensayos de citotoxicidad in vitro son una herramienta preliminar para evaluar la toxicidad y la actividad biológica de una planta medicinal.

Palabras clave: Botánica; Fitoquímica; Citotoxicidad; Plantas medicinales.

1. Introdução

Um dos mais antigos métodos utilizados pelo homem, com o intuito de cura, prevenção e tratamento de doenças, é a utilização de ervas medicinais. A Organização Mundial da Saúde (OMS), no começo dos anos 90, anunciou que 65 a 80% da população de países emergentes necessitavam das plantas medicinais como único acesso aos cuidados essenciais de saúde. No momento atual, a maioria da comercialização de plantas medicinais é feita nas lojas independentes do varejo de produtos naturais e farmácias, nas quais preparações vegetais são vendidas com rótulos industriais (Júnior & Pinto, 2005).

Em países emergentes, isto repercutiu na valorização da medicina tradicional e sua utilização nos cuidados primordiais da saúde. Já em outros países, como Reino Unido e Alemanha, os dirigentes de saúde foram pressionados a aderir medidas reivindicadas pelo interesse popular para utilização de plantas medicinais. No entanto, a grande parte dos fitoterápicos atualmente utilizados seja por automedicação ou por indicação médica, não apresentam o perfil de segurança bem estudado. Sendo assim, o uso inapropriado de um produto, pode culminar em problemas sérios para a saúde (Silveira *et al.*, 2008).

A planta medicinal é considerada um xenobiótico, ou seja, um produto estranho ao organismo, que ao ser ingerido pelo ser humano, podendo ser ou não biotransformados pode expor o organismo a substâncias tóxicas, causando hepatotoxicidade, por exemplo (Oliveira *et al.*, 2014). Esta pode ser causada por ingestão, inalação ou administração parenteral de agentes farmacológicos ou químicos. É um problema relevante na prática clínica, correspondendo a cerca de 0,2% de todas as internações hospitalares e 2 a 3% das internações por efeitos adversos de medicamentos (Sociedade Brasileira de Hepatologia – SBH, 2010).

Há inúmeros fatores responsáveis por provocar intoxicações como a hepatotoxicidade, devido ao uso de ervas medicinais como, por exemplo, falta de informação em relação a formas de cultivo, limitações no reconhecimento farmacobotânico do vegetal, referências bibliográficas insuficientes sobre reações adversas, desconhecimento do esquema posológico, interações medicamento-medicamento e medicamento-alimento, dentre outras (Nicoletti *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o uso tradicional e popular não é suficiente para ratificar eticamente as plantas medicinais com medicamentos efetivos e seguros, em outros termos, para fins terapêuticos, as plantas medicinais não se distinguem de qualquer outro medicamento sintético e a sua recomendação ou a autorização oficial de seu uso precisará ser baseada em evidências experimentais conclusivas, de que os riscos para a vida do ser humano são menores que os benefícios que possam sobrevir, sendo assim, o candidato a medicamento necessita ter sua ação comprovada e a sua letalidade potencial analisada cientificamente, como qualquer outro medicamento (Nicoletti *et al.*, 2010).

Nesse cenário de validação de um medicamento fitoterápico, os experimentos de toxicidade *in vitro*, apresentam importância na redução de custos associados à avaliação de inúmeros compostos bioativos e estabelecendo um complemento aos testes em animais, a partir da conexão com informações de toxicidade *in vivo*. Para uma análise eficaz da citotoxicidade, as triagens *in vitro* podem ser utilizadas para diferenciar aspectos gerais de toxicidade celular por meio de ensaios em massa. Estes ensaios, dentre diversas outras aplicabilidades como por exemplo efeito antioxidante, imunomodulação e testes *in vitro*, podem ser empregados tanto para identificar substâncias potencialmente tóxicas ao organismo, quanto para avaliar a atividade citotóxica e descrever o mecanismo de ação de compostos que possam vir ser utilizados com finalidade anticancerígena, por exemplo, pois os mesmos, em teoria, podem culminar com a inibição da proliferação celular (Slater, 2001).

A existência de centros de referência na assistência e pesquisa em lesão hepática induzida por ervas e fitoterápicos como por exemplo, o Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), situado na cidade de Salvador – BA, permite uma melhor compreensão de doenças hepáticas, e a investigação de agentes suspeitos existentes na composição química de chás, cápsulas ou outras formas farmacêuticas advindas de plantas medicinais, sendo imprescindível para a investigação diagnóstica. Algumas espécies das famílias Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Juglandaceae, Celastraceae, Illiciaceae, utilizadas por pacientes do HUPES, estão sendo investigadas quanto à sua hepatotoxicidade. Diante do exposto, a presente revisão tem por objetivo apresentar informações botânicas, fitoquímicas e citotóxicas sobre espécies vegetais destas famílias usadas popularmente, a fim de colaborar com o universo científico em futuras pesquisas.

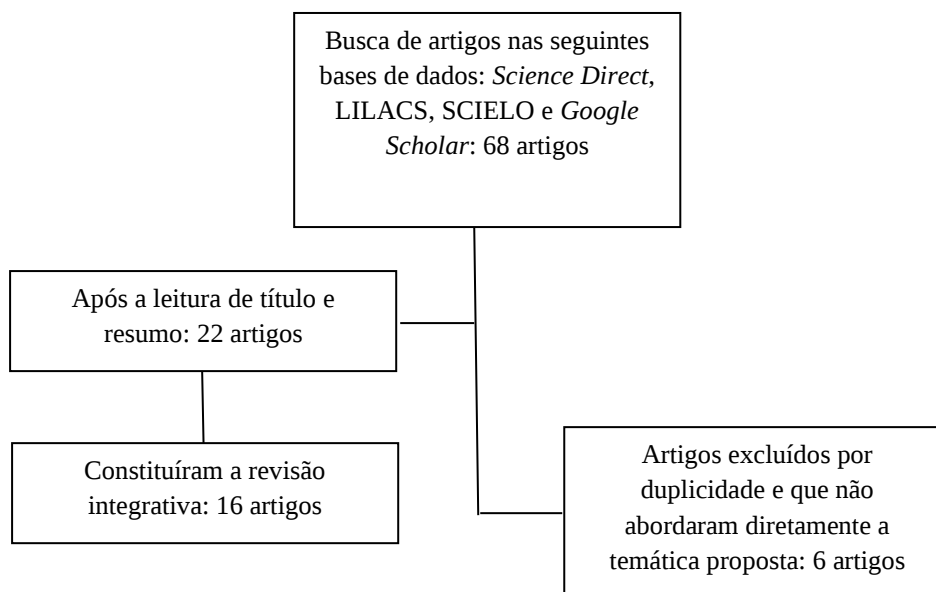
2. Metodologia

O presente artigo trata-se de uma revisão integrativa da literatura científica, com enfoque nos aspectos botânicos, fitoquímicos e citotóxicos de espécies vegetais como: *Maclura tinctoria*, *Morus nigra*, *Bidens pilosa*, *Camellia sinensis*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Carya illinoensis*, *Illicium verum*, *Maytenus ilicifolia*.

Como estratégia para busca de artigos, utilizaram-se as bases de dados de Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), a *Scientific Electronic Library Online (SCIELO)*, a *Science Direct*, e o *Google Scholar*. Como critério de inclusão, foram selecionados os artigos em português, inglês e espanhol, que atendessem aos requisitos do tema abordado, como a fitoquímica, botânica e a citotoxicidade das espécies vegetais em estudo.

Foram excluídos trabalhos que, não abordaram diretamente a temática proposta. Para a busca dos artigos, foram utilizados os seguintes descritores, isolados ou em combinação: botânica, fitoquímica, citotoxicidade, plantas medicinais, nos três idiomas pré-selecionados. Não houve limitação do ano de publicação dos artigos selecionados para esta revisão. No Fluxograma 1, são expostos as bases de dados utilizadas e o número de artigos selecionados.

Fluxograma 1. Descrições das buscas nas bases de dados.



Fonte: adaptado do fluxograma PRISMA. Elaborado pelos Autores (2021).

3. Resultados e Discussão

3.1 O uso de plantas medicinais na antiguidade e na atualidade

Muito antes do surgimento de qualquer forma de escrita, os humanos usavam as plantas, algumas delas como alimento e outras como remédios. A descoberta de propriedades úteis ou prejudiciais das plantas realizava-se por meio do conhecimento empírico, por exemplo, por meio da observação humana do comportamento animal. Além disso, há relatos lendários de que o poder dos deuses é atribuído às plantas porque seu uso faz parte de rituais religiosos, que colocam as pessoas em contato direto com os deuses. Essas valiosas informações eram inicialmente repassadas às gerações futuras de forma oral, para que, depois, na forma escrita, fossem compiladas e arquivadas (Tomazzoni *et al.*, 2006).

Textos chineses relatam o nome, dosagem e indicação do uso de plantas para tratamento de doenças. Registros foram encontrados no manuscrito egípcio "*Ebers Papyrus*" datado de 1500 A.C, que contém informações sobre 811 prescrições e 700 medicamentos. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas atualmente, como o ginseng (*Panax spp.*), a éfedra (*Ephedra spp.*), a cássia (*Cassia spp.*), e ruibarbo (*Rheum palmatum L.*), inclusive como fonte para a indústria farmacêutica (Duarte, 2006).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram compostos principalmente por plantas e extratos vegetais, que podem ser descritos na farmacopeia da época. Assim, na Farmacopeia Geral para o Reino Unido e domínios de Portugal (1794), entre os produtos denominados "medicamentos simples", encontram-se 30 produtos de origem mineral, 11 produtos de origem animal e cerca de 400 tipos de plantas. Ou seja, as plantas medicinais e seus extratos constituíam a maior parte dos medicamentos, quase nada diferente dos medicamentos usados na medicina popular da época. Entretanto, no século XX, a tendência de separar princípios ativos começou a aparecer (Schenkel *et al.*, 2000).

Em 1926, Rodolpho Albino Dias da Silva escreveu a primeira Farmacopeia Brasileira denominada "Farmacopeia Verde", que continha 183 espécies de plantas medicinais brasileiras, incluindo suas descrições botânicas. O consumo de plantas medicinais com base nas tradições familiares tornou-se uma prática comum na medicina popular. Muitos fatores contribuíram para o aumento do uso dessa prática, incluindo os efeitos colaterais e as reações adversas do uso contínuo de medicamentos industrializados, a dificuldade do acesso aos cuidados médicos, o aumento do consumo de produtos naturais e o uso da medicina tradicional chinesa e ocidental integrada em métodos para estudar saúde e bem-estar (Brasil, 2019).

Atualmente, o uso de plantas medicinais tem aumentado. Dois fatores podem explicar esse aumento. O primeiro é o avanço no campo da ciência, que possibilita o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos seguros e eficazes. Associado a isso, a segunda tendência é alicerçada no fato do incremento da demanda por tratamentos alternativos como aromaterapia, floralterapia, uso de chás, fitoterápicos, o qual estão inseridos na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), entre outros cuidados com o uso de plantas (Brasil, 2006; Bruning et al., 2012).

Nesse sentido, qualquer que seja a aplicação desejada a uma planta medicinal em qualquer período histórico, sobretudo atualmente, é imprescindível conhecê-la de maneira mais vasta possível. Dessa forma, a fusão de dados sobre a botânica, distribuição geográfica e a fitoquímica são essenciais para compreender o universo das espécies vegetais.

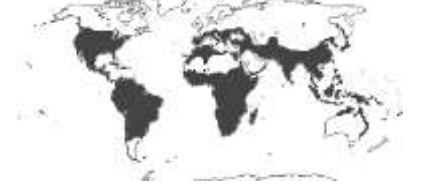
3.2 Aspectos botânicos e fitoquímicos das espécies vegetais pertencentes às famílias em estudo

A identificação das plantas é um dos pontos mais relevantes no campo da fitoterapia. Análises taxonômicas equivocadas podem não só levar o indivíduo a utilizar uma determinada espécie sem o composto ativo de interesse, assim como incentivar a utilização de plantas tóxicas, desconhecendo o grau de toxicidade. O processo de identificação vegetal é realizado com finalidade de compreender uma nova espécie vegetal descoberta, sendo atribuição exclusiva dos botânicos especialistas em um determinado gênero ou família (Silva et al., 2010).

De acordo com Borges *et al.* (2016), é relevante que a correta identificação botânica, possibilite levantamento bibliográfico concedendo correlações das informações obtidas com estudos realizados anteriormente. Dessa forma, é fomentada a veracidade dos resultados encontrados. Nesse contexto, dispondo de informações tais como: família, gênero e espécie, é possível alcançar outras características como a distribuição geográfica e descrição botânica, de cada espécie vegetal estudada (Machado & Vargas, 2018). Sendo assim, é demonstrado no Quadro 1, a distribuição geográfica e descrição botânica das famílias Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae e Illiciaceae, e suas respectivas espécies vegetais.

Quadro 1. Distribuição Geográfica no Mundo das Famílias Moraceae, Asteraceae, Theaceae, Malvaceae, Junglandaceae, Celastraceae e Illiciaceae, e suas respectivas espécies vegetais.

Família Moraceae 	Espécie	Quantidade de Gêneros e Espécies no Mundo	Referências
	Folhas da <i>Maclura tinctoria</i> L.  Fonte: https://sites.unicentro.br/wp/manejoflor-estal/10279-2/		
	Frutos da <i>Morus nigra</i> L.  Fonte: https://www.sitiodamata.com.br/amora-morus-nigra	37 gêneros e aproximadamente 1.050 espécies.	BERG, 1972; BERG, 1984.
FAMÍLIA ASTERACEAE 	Flores de <i>Bidens pilosa</i> (L.)  Fonte: http://maisplantas.blogspot.com/2016/11/bidens-pilosa-l.html	Cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies.	BARROSO <i>et al.</i>, 1991; NAKAJIMA; SEMIR, 2001; NIELSEN <i>et al.</i>, 2002; ROQUE; BAUTISTA, 2008; GONÇALVES; LORENZI, 2007.
Família Theaceae 	Folhas e flores da <i>Camellia sinensis</i> (L.).  Fonte: https://safarigarden.commercesuite.com.br/muda-de-camellia-sinensis-cha-verde-ja-produz-flores	Cerca de 10 gêneros e 195 espécies	PRINCE; PARKS, 2001; MARINHO <i>et al.</i>, 2015.

FAMÍLIA MALVACEAE 	Folhas e flores <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.  Fonte: http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/hibiscus-rosa-sinensis-l	Inclui mais de 240 gêneros e 4.225 espécies.	NETO, 2014; ALVES, 2011.
FAMÍLIA JUGLANDACEAE 	Folhas e frutos da <i>Carya illinoensis</i>  Fonte: https://www.nativnurseries.com/products/native-pecan-seedlings-for-sale-carya-illinoensis	6 gêneros e cerca de 100 espécies de árvores, variando de grande a média.	STELLA; LUCCHESI, 2015; BOSCARDIN; COSTA, 2018.
FAMÍLIA ILLICIACEAE 	Folhas, flores e frutos da <i>Illicium verum</i> Hook  Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Illicium_verum	Composta por um único gênero, <i>Illicium</i>, com cerca de 35 espécies.	WANG <i>et al.</i>, 2010; NIANHE <i>et al.</i>, 2008; SILVA <i>et al.</i>, 2020.
FAMÍLIA CELASTRACEAE 	Folhas e frutos da <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek  Fonte: https://hortodidatico.ufsc.br/espinheira-santa/	98 gêneros e cerca de 1.264 espécies.	SPIVEY <i>et al.</i>, 2002; CRONQUIST, 1988; LAWRENCE, 1971.

Fonte: Autores (2021).

Dentre as famílias citadas, as mais abundantes de acordo com sua distribuição pelo mundo, são Asteraceae, com cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies, e Celastraceae, com cerca de 98 gêneros e 1.264 espécies. A família menos encontrada foi a Theaceae, com cerca de 10 gêneros e 195 espécies. Conhecer a distribuição geográfica de famílias de espécies vegetais permite obter a localização para coletar a espécie para estudos, avaliar as condições ambientais como clima, tipo de

solo, além de outros fatores bióticos. Obtendo informações sobre as famílias, é interessante estudar sobre seus aspectos fitoquímicos.

Segundo Bessa *et al.* (2013), os aspectos fitoquímicos são relevantes tendo como objetivo conhecer os compostos bioativos das espécies vegetais e avaliar a presença nos mesmos, detectar grupos de metabólitos secundários relevantes e úteis como marcadores químicos no estudo de plantas medicinais, além de contribuir na procura de princípios ativos contra diversas doenças.

Nesse contexto, Silva e Santos (2017) menciona que as pesquisas utilizando espécies vegetais são beneficiadas pela pluralidade de compostos químicos, disponibilidade de matéria prima e seus produtos, que muitas vezes ultrapassam os medicamentos já disponíveis. Como por exemplo, o fato de muitas plantas deterem amplo espectro de atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras atividades biológicas. Por fim, na Tabela 1, encontra-se a relação de exemplo de espécies pertencentes a cada família, *Maclura tinctoria* L., *Bidens pilosa* L., *Camellia sinensis* L., *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Morus nigra* L., *Carya illinoensis* L., *Illicium verum* L. e *Maytenus ilicifolia* L., indicando nome científico, nome popular, substâncias bioativas e atividades biológicas *in vitro*, reportadas na literatura.

Tabela 1. Relação das espécies vegetais indicando nome científico, nome popular, substâncias bioativas e atividades biológicas reportadas na literatura científica.

Nome Científico	Nomes Populares	Descrição da Espécie	Substâncias Bioativas	Atividades Biológicas	Referências
<i>Maclura tinctoria</i> (L.)	Aiúva, leite de moreira, itajubá, amora-branca.	Árvore, caducifólia, heliófita, espécie secundária inicial, clímax exigente em luz. Sua altura atinge até 25 m e seu diâmetro até 90 cm.	Flavonoides, ligninas, carboidratos, taninos condensados, alcaloides.	Efeito cicatrizante e adstringente, antirreumático, anti-inflamatório, analgésico, antifúngico, anti-HIV.	BOURDY <i>et al.</i> , 2004; BOURDY, CHAVES-DEMICHIEL, ROCA-COULTHARD, 2004; USTULIN <i>et al.</i> , 2009; Oliveira & Saito, 1989.
<i>Morus nigra</i> (L.)	Amora preta	Espécie exótica originária da China e Japão, no Brasil e muito cultivada para produção de folhas para criação do bicho da seda. Seus frutos são drupas comestíveis, consumidas in natura ou na forma de doces e geleias.	Antocianinas, flavonoides, fenólicos totais.	Laxativos, vermífugos, expectorante, eméticos, hipoglicêmicos, anti-inflamatórios, antianemico, hipertensivos, anticancerígeno, antioxidante, antibacteriano, antiviral	FANG <i>et al.</i> , 2005; PAWLOWSKA <i>et al.</i> , 2008; PÉREZ-GREGORIO <i>et al.</i> , 2011; ZAFRA-STONE <i>et al.</i> , 2007; ÖZGEN <i>et al.</i> , 2009; ERCISLI; ORHAN, 2007.
<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão preto, carrapicho, amor-seco	Planta herbácea, ereta, com porte variando entre 20 e 150 cm com folhas opostas, simples, pecioladas e fendidas.	Alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas.	Cicatrizante, anti-inflamatório, hipoglicemiante, antimalárico, antibacteriano, antirreumático, antitumoral, antidiarreico.	KUMAR <i>et al.</i> , 2010; ALVAREZ <i>et al.</i> , 1996; ALONSO, 2004; MEDEIROS <i>et al.</i> , 2013; Rodrigues <i>et al.</i> , 2006; DE-LA-CRUZ
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.	Chá verde, oolong, chá preto, chá-da-índia.	Árvores (até 20 metros) ou frequentemente arbustos.	Alcaloides púricos, polifenóis, flavonoides, catequinas.	Anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetor, antimicrobiana, hipoglicemiante, inibidora da enzima conversora de angiotensina e antimutagênica.	Fiorini <i>et al.</i> , 2005; Kalra <i>et al.</i> , 2005; Nag-C/haudhuri <i>et al.</i> , 2005; Yam <i>et al.</i> , 1997; Turchetti <i>et al.</i> , 2005; Barbosa-Filho <i>et al.</i> , 2005; Barbosa-Filho <i>et al.</i> , 2006; Santhosh <i>et al.</i> , 2005; Liang <i>et al.</i> , 2001; Punyasiri <i>et al.</i> , 2004.
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Pampulha, hibisco-da-china, mimo-de-vênus.	Arbusto de até 5 metros, com ramos cilíndricos e glabros e tronco liso e flexuosos. Folhas alternas, estípulas caducas, de	Antocianinas totais, carotenoides, compostos fenólicos totais,	Antioxidante, cicatrizante, antidepressivo, antibacteriano efeito hipoglicêmico	SACHDEWA <i>et al.</i> , 2001; SACHDEWA & KHEMANI., 2003; MOQBEL <i>et al.</i> , 2011; PILLAI & MINI, 2016;

		pecíolo piloso, lâmina foliar simples ovada, com margem serreada. Flores com brácteas e sépalas esverdeadas, pétalas inteiras, avermelhadas.	flavonoides, carboidratos.	diurético, anti-inflamatório, analgésico, hipotensor, expectorante.	LIN et al., 2007; SILVA et al., 2019; ONYENEKWE et al., 1999; MOJIMINIYI et al., 2007; AJAY et al., 2007; ALI et al., 2003.
<i>Carya illinoensis</i>	Noz pecã, nogueira-pecã.	Árvore alta podendo atingir de 25 a 45 metros de altura e diâmetro de copa e 5 metros de circunferência de tronco. Produz mais de 100 kg de nozes por planta.	Alcaloides, terpenos, compostos fenólicos, compostos aromáticos, triterpenos, ligninas, taninos, antocianinas, glicosídeos cianogênicos.	Antibacteriana, diurético, antioxidante, hipotensor, vermífica, hipoglicêmica.	TAIZ; ZEIGER, 2013; CASTRO et al., 2004; FERREIRA; AQUILA, 2000; SIMÕES et al., 2010; NOVAES, 2011; PINTO et al., 2002; BHARDWAJ; SHARMA, 2017; RECKZIEGEL, 2011
<i>Illicium verum Hook</i>	Anis – estrelado, anis-da-sibéria, anis-verdadeiro, badiana, badiana-decheiro, funcho-da-china, anis-da-china e badiana-da-china.	Árvore perene de porte médio, originária do sudoeste da China.	Terpenos, polifenóis totais, açúcares redutores, taninos, flavonoides, saponinas, alcaloides e cumarinas.	Expectorante, relaxante, espasmolítica, carminativa, estomática, antisséptica, antifúngico, antibacteriano, antiviral, antioxidante.	SAMPAIO et al., 2019; CHOUKSEY; UPMANYU; PAWAR, 2013; HERRERA, 2009; SCOPEL et al., 2016; SINGH et al., 2006; SUNG; KIM; KIM, 2012; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000; NARDONI et al., 2015; DWIVEDY et al., 2018; ROCHA NETO et al., 2019.

Fonte: Autores (2021).

Dentre as atividades biológicas mencionadas, a citotoxicidade com finalidade preliminar para estudos de uma eventual atividade antitumoral é uma das mais estudadas e relevantes para a pesquisa científica. De acordo com Nascimento *et al.* (2008), laboratórios de pesquisas de espécies vegetais, têm acrescentado em seus estudos, ensaios biológicos, com uso de linhagens celulares, objetivando isolar e avaliar extratos vegetais na busca por novos compostos com atividade antitumoral, além de avaliar o potencial citotóxico das espécies.

No entanto, nos estudos avaliados não foram encontradas informações acerca de toxicidade hepática, apenas quanto a sua expressão em outros sistemas biológicos. Em um dos trabalhos da tabela 01, foi verificado ensaios que foi associado a ação hepatoprotetora de extratos de *Camellia sinensis*.

3.3 Uso de linhagens celulares na avaliação do potencial citotóxico de plantas medicinais

Segundo Bretas (2011), a implantação da utilização de linhagens celulares, para avaliação da toxicidade de plantas medicinais, foi uma das maiores evoluções na história do cultivo celular. Define-se como linhagem celular como uma população celular específica derivada de um subcultivo continuado de uma população primária. Sendo assim, como aplicação prática, o cultivo de linhagens celulares pode ser utilizado para obter dados, sob circunstâncias estabelecidas de armazenamento. Em 1955, a primeira análise sistemática dos recursos nutricionais importantes para a proliferação das células *in vitro*, foi feita por Harry Eagle. Com o auxílio de colaboradores, Eagle criou um meio essencial para o cultivo celular, denominado meio EMEM, contido de aminoácidos, vitaminas, soro animal, sais e carboidratos (Taveiras, 2007; Kretzmer, 2002; Bretas, 2011).

Nesse sentido, uma das revoluções na história do cultivo celular foi a obtenção das linhagens do tecido pulmonar (fibroblastos) de feto humano feminino (MRC-5 e WI-38, respectivamente), que possibilitaram ampliar o número de vacinas

habilitadas para uso humano. A compra e a utilização de linhagens certificadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC) se tornaram um meio indispensável para o aperfeiçoamento de novos medicamentos e avaliação da citotoxicidade de plantas medicinais (Kretzmer, 2002).

A realização dos testes de toxicidade celular propicia os primeiros conhecimentos sobre a segurança das substâncias em análise, mesmo que de maneira preliminar e que nem sempre apresenta correlação com os resultados *in vivo*. Desta forma, muitos estudos de moléculas com potencial terapêuticos tem o estudo interrompido ainda em fase inicial, em razão da elevada citotoxicidade. Portanto, os testes *in vitro* de citotoxicidade são indispensáveis e essenciais para designar a toxicidade celular inicial, em outros termos, a capacidade específica de uma substância provocar morte celular proveniente de diferentes vias, tais como apoptose, autofagia e necrose (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Os métodos direto e indireto podem ser utilizados para análise da citotoxicidade, o primeiro compreende a contagem celular de maneira que, o segundo objetiva identificar estruturas celulares ou medir o metabolismo celular para dimensionar a correspondente viabilidade. Um exemplo de forma direta é a contagem de células em câmara de Neubauer, na qual utiliza-se o corante azul de tripan. A técnica fundamenta-se no fato do cromóforo ser negativamente carregado e não interagir com as células a menos que a membrana esteja danificada, por exemplo, em virtude de um extrato ou fármaco testado (Alves & Guimarães, 2018). Em contraponto, um método indireto amplamente utilizado é o ensaio MTT (3- [4, 5-dimethyl-2-thiazolyl] - 2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), proposto pelo pesquisador Mosmann no ano de 1983, que tem como função avaliar a viabilidade celular após a exposição aos compostos estudados (Silva *et al.*, 2011).

O ensaio de redução do MTT fundamenta-se em avaliar o dano causado pelo extrato através da mensuração da atividade da succinato desidrogenase, uma enzima mitocondrial. A viabilidade celular é quantificada pela redução do MTT, um sal solúvel em água e de cor amarela, à formazan, um sal de cor púrpura e insolúvel em água (Veloso *et al.*, 2010). Existem na literatura vários relatos sobre a atividade citotóxica de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. No que diz respeito a estes relatos, no Quadro 2, são apresentadas informações sobre a citotoxicidade em linhagens celulares, das espécies mencionadas. Em relação à espécie *Maclura tinctoria*, não foram encontrados relatos sobre sua atividade citotóxica em células.

Quadro 2. Relatos descritos na literatura científica sobre atividade citotóxica de espécies vegetais, avaliada em linhagens celulares pelo método MTT.

Espécie / amostra	Substâncias testadas	Tipo de extrato	Linhagens celulares	Método	Potencial citotóxico	Referências
<i>Bidens pilosa</i> L.	NSE	Acetato de Etila	RAW 264.7	MTT	Exibiu a atividade mais significativa inibidora ($IC_{50} = 36,2 \mu\text{g/ml}$).	CHIANG <i>et al.</i> , 2004.
		Butanólico			Atividade moderada com ($IC_{50} = 250,8 \mu\text{g/ml}$).	
	NSE	Extrato aquoso	DU-145; MCF-7; MDA-MB-231; MCF-12A	MTT	<i>B. pilosa</i> inibiu a proliferação em 10% nas linhas celulares de carcinoma. O IC_{50} variou entre 145 e 200 $\mu\text{g/ml}$.	STEEMKAMP; GOUWS, 2006.
	fenil-1,3,5-heptatriino	<i>n</i> -hexano; clorofórmico, metanólico e acetato de etila	KB; HepG2; CaCO 2; MCF-7.	MTT	Dentre todos os extratos, o extrato <i>n</i> -hexano apresentou atividade anticâncer e antimalárica promissora.	KUMARI <i>et al.</i> , 2008.
	NSE	Butanólico Aquoso Éter petróleo	MCF-7; HepG2; MGC 803; e RKO	MTT	Apresentaram menor efeito antiproliferativo contra as células MCF-7, RKO e HepG2 ($p < 0,05$).	WU <i>et al.</i> , 2013.
		Acetato de Etila			Exibiu atividades citotóxicas mais altas contra todas as células tumorais ($p = 0,01$), particularmente as células RKO com taxa inibitória de 92,87%.	
	NSE	Metanólico	HeLa; HepG2; KB-3-1	MTT	Maior atividade contra as células KB-3- 1 com valores de IC_{50} 99,56 $\mu\text{g/ml}$. Para a inibição de células HepG2 e HeLa foram consideradas 210,8 $\mu\text{g/ml}$ e 179,3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.	SINGH <i>et al.</i> , 2017.
<i>Camellia sinensis</i> L. Kuntze	3-O-galato epigallocatequina	Acetato de Etila e Metanólico	HSC-2; HSC-4; MKN-45; CaCO-2.	MTT	Teve um valor IC_{50} de 14,1, 18,2, 17,3 e 40,6 μM contra células HSC-2, HSC-4, MKN-45 e Caco-2, respectivamente.	KITAGAWA <i>et al.</i> , 2016
	Chakasaponinas I e II				Os valores de IC_{50} para as células HSC-2, HSC-4, MKN-45 e Caco-2 foram iguais a 4,6, 17,5, 16,8 e 30,2 μM , respectivamente.	
	Florateasaponina A				Os valores de IC_{50} para as células HSC-2, HSC-4, MKN-45 e Caco-2 foram iguais a 4,4, 6,2, 4,5 e 19,3 μM , respectivamente.	
	(-) epigallocatequina galato (ECGC) Quercetina Ácido gálico	Não especificado	OSCC-3; SCC-61; SQ-20B; HepG2.	MTT	Todos os extratos são citotóxicos para as células HepG2, com o ECGC demonstrando citotoxicidade dominante, sendo que a maior inibição (82%) foi mostrada por quercetina, com 25 μM ($IC_{50} = 11,90 \mu\text{M}$). Já para as células restantes, a quercetina se mostrou mais citotóxica com IC_{50} entre 75 e 505 μM .	RAMIREZ <i>et al.</i> , 2004; RAMIREZ <i>et al.</i> , 2016.

	Galato de epigallocatequina (GELC)	Não especificado	HeP2 e sua sublinha CK2	MTT e análise morfológica	GEC e GELC não foram tóxicos na faixa de concentração de 2,5 µmol a 50 µmol. A maior concentração de ECG (500 µmol) causou efeito tóxico semelhante em ambas as linhagens celulares. GELC mostrou maior potencial citotóxico, mesmo em concentrações cinco vezes menores do que em uma xícara normal de chá verde.	DURGO <i>et al.</i> , 2011.
	Galato de epicatequina (GEC)					
Morus nigra L	5,5 -penta-hidroxi-cis-estil- bene (1), resveratrol (2), oxiresveratrol (3), norartocarpetina (4), kuwanon C (5), morusina (6), cudraflavona A (7), kuwanon G (8), albaflurano C (9), mulberrofurano G (10), 3-acetil-O- a- amirina (11), 3-acetil-O- b- amirina (12), ácido ursólico -3-O- acetato (13) e uvaol (14).	Extrato clorofórmico	MCF-7 e HepG2	MTT	O composto 5 foi o mais ativo contra ambas as linhas celulares investigadas com um valor IC ₅₀ de 3,92 IM. Para a HepG2, a maioria dos compostos suprimiu o crescimento com um IC 50 de 9,54 a 44,71 IM. Os compostos terpenóides apresentaram atividade relativamente fraca, uma vez que os compostos 13 e 14 tiveram IC 50 165,70 e 94,70 IM, respectivamente.	ABDEL <i>et al.</i> , 2019.
	NSE	Extrato etanólico	HaCat; L-929; e B16F10	MTT	As IC ₅₀ calculados para a citotoxicidade foram 107,2 µg/ml para o melanoma murino, 324,2 µg/mL para a queratinócitos humanos e 116,3 g/mL para o de fibroblastos de rato. Concluiu-se que o extrato da <i>M. nigra</i> foi mais tóxico para as células B16F10.	FREITAS <i>et al.</i> , 2016.
	NSE	Etanólico, metanólico e clorofórmico,	OVCAR-8; SF-295; e HCT-116	MTT	Os extratos causaram mais de 75% de inibição do crescimento celular em qualquer linhagem, sendo considerados ativos.	SOUZA <i>et al.</i> , 2016.
	NSE	Extrato de dimetilsulfóxido	PC-3 e células de fibroblastos do prepúcio.	MTT	O extrato da planta exibiu citotoxicidade seletiva moderada contra células PC-3 em comparação com células de fibroblastos do prepúcio.	TURAN <i>et al.</i> , 2016.
Hibiscus rosa-sinensis	NSE	Extrato aquoso	B16F10	MTT	Este extrato inibiu o crescimento de células de melanoma de uma maneira dependente da dose, reduzindo-as em 2 vezes a 1 mg / ml e 4 vezes a 2 mg / ml.	GOLDBERG <i>et al.</i> , 2016.
	NSE	Extrato aquoso	ER+ CMTN	MTT	O extrato de hibisco foi capaz de induzir seletivamente a apoptose em células de câncer de mama triplo-negativas e positivas para receptor de estrogênio de uma maneira dependente da dosagem. Foi capaz de aumentar o estresse oxidativo e diminuir o potencial de membrana mitocondrial em comparação com tratamentos individuais.	NGUYEN <i>et al.</i> , 2019.
Carya illinoensis	NSE	Extratos acetônicos de grãos e cascas	T24 LCC-PK1	MTT	O extrato da casca teve um IC ₅₀ de 1,8 mg /ml, e o extrato do grão um valor de IC ₅₀ (citotoxicidade mais baixa) de 4,6 mg/ml.	ROSA <i>et al.</i> , 2014

	NSE	Extrato metanólico	MCF-7	MTT	O ensaio de MTT mostrou que o extrato da casca de noz-pecã apresentou citotoxicidade contra células MCF-7 (IC ₅₀ =74,11 µg/ml). A maior dose testada (25 µg / ml) foi capaz de inibir 93% do crescimento das células MCF-7.	HILBIG <i>et al.</i> , 2017
	NSE	Extrato bruto de nozes	CaCO-2	MTT	Os extratos brutos de nozes de concentrações variáveis foram adicionados às células durante 1h e não houve diferenças significativas (p> 0,05) entre as células da amostra e as células de controle. A partir disso, concluiu-se que os fenólicos de pecã não eram tóxicos para as células em nenhuma das concentrações examinadas no estudo.	KELLETT <i>et al.</i> , 2019.
<i>Illicium verum</i>	Óleos essenciais de frutas e sementes	Extrato bruto	MCF7; T47D; MDA-MB-231; K562 e SH-SY5Y	MTT	A espécie <i>Illicium verum</i> , apesar de aparentemente ativo contra uma variedade de linhagens de células cancerosas na literatura citados pelos autores, o seu efeito citotóxico foi inativo (IC ₅₀ > 100 ppm).	NAJAR <i>et al.</i> , 2019.
	Óleo essencial somente de frutos	-	HCT 116; HT-29 e CCD-18co	MTT	Os resultados mostraram que esta espécie tem atividade antiproliferativa moderada contra a linha de células HCT 116 e HT-29, com um valor IC 50 de 50,34 ± 1,19 µg/ml. Quanto à toxicidade contra células de cólon humanas normais (CCD-18co), o IC 50 foi de 200 ± 2,29 µg/ml.	ASIF <i>et al.</i> , 2016.
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Pristimerina	Extrato etanólico	HL-60; K-562; SF-295; HCT- 8; e MDA / MB-435	MTT	A análise de MTT mostrou que a pristimerina exibiu atividade citotóxica contra todas as cinco linhagens de células cancerosas. Os valores de IC ₅₀ variaram de 0,55 a 3,2 IM em MDA / MB-435 e K-562, respectivamente.	COSTA <i>et al.</i> , 2008.
	Maytefolina A uvaol-3-cafeate betulina eritrodiol	Extrato etanólico e metanólico	HL-60 e KB/S	MTT	Apenas o eritrodiol apresentou atividade citotóxica significativa com IC ₅₀ de 7,0 mg/ml, enquanto todos os outros compostos apresentaram valores de IC ₅₀ superiores a 10 mg / ml. Nenhum desses compostos induziram alterações morfológicas em células HL-60 com concentrações de 0,05-25 mg/ml.	OHSAKI <i>et al.</i> , 2004.

*NSE: não houve substâncias específicas;

*RAW 264.7 (Linhagem de macrófagos); DU-145 (células de carcinoma da próstata); MCF-7 e MDA-MB-231 (células de câncer de mama); MCF-12A (células da mama não maligna); KB (células de câncer humano oral); HepG2 (Células de Carcinoma hepático); CaCO-2 (células do câncer de colón); MGC 803 (câncer gástrico); RKO (câncer colorretal); HeLa (carcinoma epitelial humano); KB-3-1 (carcinoma epidermóide humano); HSC-2, HSC-4 e MKN-4 (células do carcinoma gástrico humano); OSCC-3, SCC-61 e SQ-20B (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço humano); HeP2 (células de carcinoma da laringe humana); HaCat (células de queratinócitos humanos); L-929 (células de fibroblastos); B16F10 (células de melanoma murinho); OVCAR-8 (câncer de ovário); SF-295 (câncer no cérebro); HCT-116 (câncer de cólon); PC-3 (células de adenocarcinoma de próstata humana); ER+ (células de câncer de mama positivas para receptor de estrogênio); CMTN (células de câncer de mama humano triplo-negativas); T24 (câncer de bexiga); LCC-PK-1 (células epiteliais renais); K562 (eritroleucemia mielóide crônica humana); SH-SY5Y (célula de tumor maligno); CCD-18co (células de cólon humanas normais); HL-60 (leucemia promielocítica); SF-295 (glicoblastoma); KB/S (células do carcinoma epidermóide de boca).

Fonte: Autores (2021).

Destes, foi verificado que nenhum dos estudos, apresentou uma metodologia para avaliação de hepatotoxicidade, predominando atividade antitumoral dos compostos dos extratos vegetais. Segundo Sá *et al.* (2021), a pluralidade química desses compostos químicos possibilita diversas atividades biológicas, devido a vários mecanismos, comportando a elas, por exemplo, ação antiproliferativa e citotóxica.

O uso de compostos naturais ou derivados sintéticos como método para reverter e reduzir processos neoplásico estão evoluindo como terapêutica no tratamento do câncer. A biodiversidade de plantas medicinais que existem no Brasil, permite uma variedade de substâncias com potencial terapêutico que podem favorecer evidências de novos fármacos anticâncer com maior eficácia e menos toxicidade às células saudáveis (Cavalcante *et al.*, 2021).

4. Considerações Finais

A utilização de plantas com finalidade terapêutica está entrelaçada com a história da humanidade, sendo utilizadas desde a antiguidade. Ao longo do tempo, com a popularização do uso das plantas medicinais, faz-se necessária a correta identificação botânica e os estudos de toxicidade tanto para aspectos de segurança e efetividade, quanto para realização de levantamentos bibliográficos.

As espécies *Maclura tinctoria* L., *Bidens pilosa* L., *Camellia sinensis* L., *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Morus nigra* L., *Carya illinoensis* L., *Illicium verum* L. e *Maytenus ilicifolia* L, possuem uma diversidade de compostos químicos bioativos, além de diversas atividades biológicas reportadas na literatura, sendo de grande interesse científico para estudos de citotoxicidade e descobertas de novos fármacos. No entanto, nenhum trabalho reportou sobre ensaios que possam avaliar diretamente a hepatotoxicidade. Nesse contexto, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* tem papel fundamental, como ferramenta preliminar, para avaliar a toxicidade de uma planta medicinal e sua eventual atividade biológica.

Para estudos futuros, sugere-se: 1- a realização de ensaios *in vitro* em hepatócitos normais para determinar se estas espécies vegetais podem levar ou não a uma hepatotoxicidade. 2- Desenvolver uma fundamentação teórica mais consistente em relação a hepatotoxicidade, com a finalidade de unificar conhecimento. 3- Analisar através da cromatografia líquida de alta eficiência, descobertas de novas moléculas com atividade antitumoral.

Referências

- Alves, E. A., Guimarães, A. C. R. (2010). Cultivo celular. In: Molinaro, E. M., Caputo, L. F. G. & Amendoeira, M. R. R. (Org.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. (Livros Fundação Oswaldo Cruz) 2. 215-53.
- Bessa, N. G. F. D., Borges, J. C. M., Beserra, F. P., Carvalho, R. H. A. Pereira, M. A. B., Fagundes, R., Campos, S. L., Ribeiro, L. U., Quirino, M. S., Chagas, A. F. J. & Alves, A. (2013). Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 15(4), 692-707.
- Borges, K. C. A. S., Silva, M., Santos, N. T. & Moredjo, P. N. (2016) *Identificação botânica e lâminas histológicas*. (Livro Eletrônico) Centro Universitário de Volta Redonda - UniFOA Campus Três Poços, p.27.
- Brasil (2006) Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde*.
- Brasil (2019) Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente. Comissão Assessora de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. / Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. (4a ed.).
- Bretas, R. M. (2011) *Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais*. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. 170.
- Bruning, M. C. R., Mosegui, G. B. G. & Viana, C. M. M. (2012) The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu - Paraná: the viewpoint of health professionals. *Revista de Ciências em Saúde Coletiva*, 17, 10-22.
- Cavalcante, G. M., Barbosa, P. L. & Silva, A. A. (2021) Atividade antitumoral in vitro de *Prosopis juliflora* frente a células cancerígenas do tipo melanoma. *Research, Society and Development*, 10(4).

- Duarte, A. M. (2015) *Plantas Medicinais em Áreas Urbanas do Planalto Sul Catarinense*. (Dissertação de Mestrado) – Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC, Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ambiente e Saúde, Lages.
- Eisenbrand, G., Pool-zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, U. M., Carere, A., Kevekords, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R. & Kleiner, J. (2002) Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 193-236.
- Júnior, V. F. L., Pinto, A. C. & Maciel, A. M. M. (2005) Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28(3), 519-528.
- Kretzmer, G. (2002) Industrial processes with animal cells – mini-review – Applied. *Microbiology and Biotechnology*, Hannover, 59, 135 – 142.
- Machado, C. A. & Vargas, J. F. R. (2018) *Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Porto Alegre*. (Ebook Plantas medicinais e Fitoterápicos do Jardim Botânico de Porto Alegre) Rio Grande do Sul. Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul. Departamento de Ações em Saúde, p.85.
- Nascimento, J. E., Melo, A. F. M., Lima, T. C. S., Veras, J. F., Santos, E. M., Albuquerque, U. P. & Amorim, E. L. C. (2008) Estudo fitoquímico bioensaio toxicológico frente a larvas da artemia salina de três espécies do gênero *Phyllanthus*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, 29, 143-148.
- Nicoletti, M. A., Carvalho, K. C., Júnior, M. A. O., Bertasso, C. C., Caporossi, P. Y. & Tavares, A. P. L. (2010) Uso popular de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e/ou plantas medicinais: Principais interações decorrentes. *Revista Saúde - UnG*, América do Norte, 4.
- Nicolletti, A. M., Júnior, M. A. O., Bertasso, C. C., Caporossi, P. Y. & Tavares, A. P. L. (2007) Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas – Infarma*. 19(1/2).
- Oliveira, L. A. R., Machado, R. D. & Rodrigues, A. J. L. (2014) Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16(1), 32-40.
- Sá, R. E., Araújo, J. S., Souza, P. S. A., Araújo, D. D., Machado, F. S., Monteiro, L. D., Santos, J. C., Vasconcelos, V. R. M., Andrade, G. L., Souza, G. C. & Silva, L. F. (2021) Prospecção científica e tecnológica com ênfase na atividade anticâncer do óleo essencial de *Aeschynomene denticulata*. *Research, Society and Development*, 10(12).
- Schenkel, E. P., Gossman, G. & Petrovick, P. R. (2000) Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C.M.O. & Schenkel, E.P., *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ed. Porto Alegre/ Florianópolis; Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, Capítulo 15, p.301-322.
- Silva, A. F., Santos, U. P. & Rabelo, M. F. G. (2010) Identificação Botânica das Plantas medicinais. *Informe Agropecuário*, 31(255), 77-85.
- Silva, D. F. & Santos, M. G. (2017) Plantas medicinais, conhecimento local e ensino de botânica: uma experiência no ensino fundamental. *Revista Ciência & Ideias*, 8 (2), 140–164.
- Silva, P. B., Medeiros, A. C. M., Duarte, M. C. T., Ruiz, A. L. T. G., Kolb, R. M., Frei, F. & Santos, C. (2011) Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 13(4), 447-55.
- Silveira, P. F., Bandeira, M. A. M. & Arrais, P. S. D. (2008) Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 618-626.
- Slater, K. (2021) Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(1), 70-74.
- Sociedade Brasileira de Hepatologia (2010) *Toxicidade hepática de chás, ervas e fitoterápicos*. Federação Brasileira de Gastroenterologia.
- Taveiras, S. F. (2007) *Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo in vitro em cultura de células*. (Dissertação de Mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP.
- Tomazzoni, M. I., Negrelle, R. R. B. & Centa, M. L. (2006) Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto & Contexto: Enfermagem*, 15(1), 115-121.
- Veloso, C. C., Bitencourt, A. D., Cabral, L. D. M. & Franqui, S. L. (2010) *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 335-338.