

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-
QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIMICROBIANA DE *MORUS ALBA* L.
(MORACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Bugnotto Pereira

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS,
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA
DE *MORUS ALBA* L. (MORACEAE)**

por

Camila Bugnotto Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS,
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA DE *MORUS
ALBA L.* (MORACEAE)**

Elaborada por
Camila Bugnotto Pereira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Melânia Palermo Manfron, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)

Gizele Scott do Canto, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 16 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar os meus passos.

Aos meus pais, Léo (*in memoriam*) e Verani pelo amor, incentivo e exemplo de persistência.

Ao meu marido, Isaac, pelo companheirismo, carinho e imprescindível auxílio nas coletas.

Ao meu irmão, Gustavo, por sempre torcer por mim.

À orientadora Melânia Palermo Manfron, pela dedicação, orientação e contribuição em minha formação científica.

Aos colegas e amigos de laboratório Raquel, Rosana, Luisa, Aline, Rachel, Daiana, Tiago, Junior, Juliana, Alexandre e Vera pelos momentos de aprendizagem, companheirismo e amizade.

Aos funcionários do Departamento, Paulo e Renato pelos auxílios prestados.

Aos professores Rafael Noal Moresco, Sérgio Dalmoura, Sydney H. Alves pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Santa Maria por proporcionar qualificação através do programa de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, fornecido através da bolsa de estudos.

Obrigada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA DE *MORUS ALBA* L. (MORACEAE)

AUTORA: CAMILA BUGNOTTO PEREIRA
ORIENTADORA: MELÂNIA PALERMO MANFRON
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de março de 2012.

A família Moraceae compreende aproximadamente 1000 espécies, distribuídas em 61 gêneros. *Morus alba* possui flores pequenas, caule simples com até 10 metros de altura e folhas inteiras, serreadas ou lobadas, frutifica de setembro a novembro. *M. alba* é utilizada na medicina tradicional como hipoglicemiante, antioxidante, anti-inflamatória e no tratamento dos sintomas da menopausa. Flavonóides como quercetina, rutina e o alcalóide 1-deoxinojirimicina foram isolados e identificados nas suas folhas. O controle de qualidade físico-químico foi realizado com folhas de *M. alba* coletadas nas quatro estações. Os valores encontrados nas análises de perda por dessecação e matéria estranha estão de acordo com os estabelecidos para drogas vegetais. A coleta realizada em março apresentou o maior conteúdo de cinzas totais e insolúveis em ácido e o índice de intumescência foi mais elevado em setembro. As dosagens de polifenóis e flavonóides foram mais elevadas no verão. A avaliação da atividade anti-inflamatória de *M. alba* em modelo de indução de tecido granulomatoso demonstrou que os animais tratados com o extrato hidroetanólico apresentaram $20,24 \pm 6,94\%$ de inibição da formação de tecido granulomatoso enquanto que os tratados com nimesulida apresentaram $21,42 \pm 6,52\%$, confirmando significativa atividade anti-inflamatória. As dosagens de AST, ALT e creatinina foram realizadas com os mesmos animais, demonstrando ausência de indícios de toxicidade hepática e renal. Na determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, as frações acetato de etila e clorofórmio apresentaram as melhores atividades frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Prothoteca zophii* e *Candida albicans*. A citotoxicidade do extrato hidroetanólico por culturas de células de ovário de hamster chinês (CHO) e células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929 apresentaram, respectivamente, IC₅₀ de 0,34 mg/mL e 3,24 mg/mL, demonstrando ação citotóxica *in vitro*.

Palavras-chave: *Morus Alba* L. Parâmetros físico-químicos. Atividade anti-inflamatória. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Mastership Dissertation
Post- Graduation Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

DETERMINATION OF PHYSICAL CHEMICAL PARAMETERS, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *MORUS ALBA* L. (MORACEAE)

AUTHOR: CAMILA BUGNOTTO PEREIRA
ADVISER: MELÂNIA PALERMO MANFRON
Date and Location of Defense: Santa Maria, march 16th, 2012

The Moraceae family consists of approximately 1000 species, distributed in 61 genera. *Morus alba* has small flowers, simple stems up to 33 feet tall and whole leaves, serrated or lobed, fruit September to November. *M. alba* is used in traditional medicine as hypoglycemic, antioxidant, anti-inflammatory and in the treatment of menopausal symptoms. Flavonoids such as quercetin, rutin and alkaloid 1- deoxinojirimicina were isolated and identified in their leaves. The physico-chemical quality control was performed with *M. Alba's* leaves collected in four seasons. The values found in the analysis of loss on drying and foreign matter are agreement with established for herbal drugs. The collection made in March had the highest content of total ash and acid insoluble and swelling index was higher in September. The dosages of polyphenols and flavonoids were higher in summer. The evaluation of anti-inflammatory activity of *M. alba* in induction of granulomatous tissue showed that animals treated with hydroethanolic extract presented $20.24 \pm 6.94\%$ inhibition of the formation of granulomatous tissue while those treated with nimesulide has $21.42 \pm 6.52\%$, confirming significant anti-inflammatory activity. The dosages of AST, ALT and creatinine were performed with the same animals, demonstrating absence of toxicity in liver and kidney. In determining the *in vitro* antimicrobial activity, the fractions ethyl acetate and chloroform showed the best responses front of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Prothoteca zophii* and *Candida albicans*. The cytotoxicity of the hydroethanolic extract by cell cultures of Chinese hamster ovary (CHO) and cells of connective tissue of mouse (NCTC) clone 929 showed, respectively, IC_{50} of 0.34 mg/mL and 3.24 mg/mL.

Keywords: *Morus alba*. Anti-inflammatory activity. Antimicrobial activity. Physico-chemical parameters

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Figura 1 – <i>Morus alba</i> L..... | 13 |
| Figura 2 – Estrutura do alcalóide 1-deoxinojirimicina..... | 15 |
| Figura 3 – Metabolismo do ácido araquidônico..... | 17 |

3. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E MANUSCRITOS

3.1 Publicação I

| | |
|---|----|
| Figure 1 – <i>Morus alba</i> leaves | 26 |
| Figure 2 – Contents of polyphenols and flavonoids in ethanol extracts produced in four seasons..... | 35 |

3.2 Manuscrito I

| | |
|--|----|
| Figure 1 – Inhibition of inflammatory process following treatment with nimesulide and hydroethanolic 70 % extract of <i>Morus alba</i> leaves..... | 48 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

3. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3.1 Publicação I

| | |
|--|----|
| Table 1 – Loss on drying, mean \pm standard error of mean (SEM) of <i>Morus alba</i> leaves.. | 31 |
| Table 2 – Foreign matter, mean \pm standard error of mean (SEM) of <i>Morus alba</i> leaves.. | 31 |
| Table 3 – Determination of total ash, acid insoluble ash, mean \pm standard error of mean (SEM) of <i>Morus alba</i> leaves..... | 32 |
| Table 4 – Swelling index, mean \pm standard error of mean (SEM) of <i>Morus alba</i> leaves. | 33 |
| Table 5 – Bitterness index, yield, pH of <i>Morus alba</i> leaves..... | 34 |

3.2 Manuscrito I

| | |
|--|----|
| Table 1 – ALT, AST and creatinine (mean \pm SD) using a Cobas Mira apparatus (Roche) using conventional kits BIOCLIN®..... | 47 |
|--|----|

3.3 Publicação II

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de <i>Morus alba</i> ($\mu\text{g/mL}$), frente a seis diferentes microrganismos..... | 61 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINES - Antiinflamatório não esteroidal

ALT - Alanina aminotransferase

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária

AST - Aspartato aminotransaminase

BHA - butilhidroxianisol

CHO - Ovário de Hamster Chinês

CIM - concentração inibitória mínima

CL₅₀ – concentração letal média

COX – Cicloxigenase

DRC – doença renal crônica

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DNJ - 1-deoxinojirimicina

IL1- Interleucina 1

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LT- Leucotrienos

MTT - 3-(4,5 dimethylthiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

NCTC 929 - células do tecido conectivo de camundongo

PGE – Prostaglandina

PGI2 – Prostaciclina

Q3MG - quercetina-3-(6-malonilglicosídeo)

TNF- Fator de necrose tumoral

TX- tromboxano

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 2.1 Família Moraceae..... | 12 |
| 2.2 <i>Morus alba</i> L..... | 13 |
| 2.3 Processo inflamatório | 16 |
| 2.4 Anti-inflamatórios | 17 |
| 2.5 Toxicidade | 18 |
| 2.6 Atividade antimicrobiana | 20 |
| 3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E MANUSCRITO | |
| 3.1 PUBLICAÇÃO I - Physico-chemical quality control and dosage of total polyphenols, flavonoids of <i>Morus alba</i> leaves (Moraceae) | 23 |
| 3.2 MANUSCRITO I - Anti-inflammatory activity and biochemical parameters of the hydroethanolic extract of <i>Morus alba</i> L. (Moraceae) | 39 |
| 3.3 PUBLICAÇÃO II - Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de <i>Morus Alba</i> L. (Moraceae)..... | 49 |
| 4 DISCUSSÃO GERAL | 62 |
| 5 CONCLUSÕES | 66 |
| 6 REFERÊNCIAS | 67 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui tradição no uso de plantas com fins terapêuticos, principalmente pela facilidade de obtenção e baixo custo, porém há pouca comprovação de suas propriedades farmacológicas. A comercialização de plantas medicinais realizada em farmácias vem sendo praticada em mercados, lojas de produtos naturais e feiras. As drogas vegetais obtidas a partir destes mercados, geralmente não possuem certificação de qualidade e em muitos casos suas supostas propriedades farmacológicas não foram avaliadas cientificamente (VEIGA et al., 2005; FRANZOTTI, 2006). Recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução da diretoria colegiada (RDC) N°10 de março de 2010, regulamentou a produção, importação e comercialização de drogas vegetais.

Estudos com plantas medicinais e seus extratos vegetais são de grande relevância, tendo em vista a utilização de metabólitos secundários como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas (CORRÊA et al., 2008). Metabólitos secundários como os flavonóides são encontrados em muitas espécies de plantas e são responsáveis por atividades anti-inflamatória, antioxidante, citotóxica, hipoglicemiante, anticancerígena, entre outras (NOMURA et al., 1994; BIRT et al., 2001; HAVSTEEN, 2002).

A atividade anti-inflamatória dos flavonóides está relacionada a sua ação sobre os mediadores da inflamação, principalmente os provenientes do ácido araquidônico. Estes metabólitos podem inibir certos estágios da inflamação, incluindo a formação da granulação e artrite crônica. Seus efeitos podem ser mensurados através de mediadores da inflamação e também pela atividade antioxidante (BENAVENTE et al., 2008; MIYASHIRO, 2010).

A utilização de produtos naturais é questionável, principalmente pelo fato de haverem poucos estudos de eficácia e toxicidade, sendo que o uso por um determinado período pode acarretar efeitos indesejáveis como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, os quais podem ser avaliados através da determinação de parâmetros bioquímicos (SONAGLIO, 1987; YEONG et al., 1993). Os níveis séricos das aminotransferases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são indicadores de alteração funcional ou estrutural da célula hepática, sendo a relação AST: ALT útil no diagnóstico de doenças hepáticas. Testes de triagem como a medição dos níveis de creatinina e uréia são utilizados na avaliação da função renal (ANDRIOLO et al., 1989; ETTINGER et al., 1997).

A pesquisa de novas substâncias bioativas como os agentes antineoplásicos tem aumentado, principalmente devido à ausência de seletividade de alguns fármacos (RAFFERTY et al., 1996). A maioria dos antineoplásicos atuam sobre as células que estão no ciclo celular, há agentes que atuam dependentemente deste ciclo, necessitando de proliferação celular para exercer seus efeitos citotóxicos. Alguns desses têm ação preferencial em uma fase específica do ciclo celular, outros são citotóxicos em qualquer ponto do ciclo. Até recentemente o tratamento medicamentoso do câncer baseava-se exclusivamente em drogas citotóxicas (FUCHS et al., 2010). De 1981 a 2002, foram relatados 79 novos medicamentos com atividade antitumoral, sendo 9 obtidos de origem natural e 21 de forma semi-sintética, utilizando produtos naturais como protótipos (NEWMAN et al., 2003).

O estudo de substâncias de origem natural com atividade antimicrobiana vem crescendo devido à utilização indiscriminada dos antimicrobianos e ao surgimento de cepas resistentes aos diversos tipos de antibióticos. Desse modo a pesquisa com extratos vegetais pode auxiliar na descoberta de novos fármacos (MENEZES et al., 2004).

A seleção de plantas para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é baseada nos relatos sobre o efeito terapêutico de uma determinada espécie, sendo um valioso atalho para a descoberta de fármacos (ELISABETSKY, 2006). Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal encontram-se as plantas do gênero *Morus*, utilizadas na medicina popular como antioxidante, hipoglicemiante, hormonal e anti-inflamatória (NOTELOVITZ 1989; CHEN et al., 1995; YEN et al. 1996; CHOI et al. 2005).

Devido à diversidade na composição química dos metabólitos secundários e aos diversos usos populares de *Morus alba* L., este trabalho teve como objetivo estabelecer parâmetros de controle de qualidade, avaliar a ação farmacológica diante dos ensaios de atividade anti-inflamatória, citotóxica e antimicrobiana do extrato hidroetanólico, juntamente com a análise bioquímica de toxicidade hepática e renal através da dosagem sérica de marcadores bioquímicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Moraceae

A família Moraceae é composta por aproximadamente 61 gêneros, com mais de 1000 espécies, está presente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As plantas da família Moraceae são predominantemente arbustivas ou arbóreas, raramente herbáceas, possuem tronco ereto e flexível, raízes lenhosas e profundas, ganhando consistência após cinco anos, medem aproximadamente 60 cm de diâmetro e 15 m de altura (CRONQUIST, 1981; CORRADELLO, 1987). Suas folhas são inteiras, simples, dispostas alternadamente e constituídas por proteínas, fibras, vitamina C e minerais, apresentam ainda uma glicoproteína denominada Moran A, a qual se atribui um efeito antidiabético (JOLY, 1975; CRONQUIST, 1981; ANDALLU, et al. 2001).

Os efeitos dos compostos provenientes do córtex das raízes das plantas da família Moraceae foram elucidados por meio de experimentos e aplicações clínicas encontradas na literatura. Estudos preliminares com diferentes modelos experimentais confirmam as atividades analgésicas, diuréticas, sedativas e anticonvulsivantes relatadas na medicina chinesa (GULUBOVA et al. 1975).

No gênero *Morus* estão classificadas espécies como *Morus rubra*, *Morus rósea*, *Morus triscuspidata*, *Morus nigra* e *Morus alba*, sendo as duas últimas as mais cultivadas pelo fato de não possuírem espinhos (DONADIO, 2007; GOMES, 2007).

Morus alba é uma árvore asiática que possui fitoesteróides e vem sendo utilizada nas terapias de reposição hormonal, no combate aos sintomas do climatério, também é usada por suas ações adstringentes, antioxidantes e como adjuvantes no tratamento de infecções (BYAMBAA, et al., 2004, FRANCO, 2005).

2.2 *Morus alba* L.

Originária das regiões temperadas da China (figura 1) e conhecida como amoreira branca, possui caule simples com até 10 metros de altura e folhas inteiras, alternas, serradas ou lobadas com cor verde-clara e flores pequenas (DONADIO, 2007; GOMES, 2007). Por ser uma planta rústica adapta-se a diversos tipos de solo, preferindo os úmidos e profundos, exceto os encharcados, possui crescimento rápido e frutifica de setembro a novembro (DONADIO et al., 1998). Devido ao elevado teor proteico é utilizada como forrageira na alimentação do bicho da seda (JULIATTO, 1985; TINOCO et. al., 1992). As folhas de *M. alba*, são utilizadas na medicina popular como hipoglicemiante, antioxidante, no tratamento de sintomas da menopausa e como anti-inflamatória (NOTELOVITZ 1989; CHEN et al., 1995; YEN et al. 1996; CHOI et al. 2005). Metabólitos secundários como os flavonóides quercetina, rutina e o alcalóide 1-deoxinojirimicina foram identificados por KIM et al., (1999) e KIMURA et al., (2004) nas folhas de *M. alba*.



Figura 1- *Morus alba* L.

Fonte: http://www.cirrusimage.com/tree_white_mulberry.htm

Estudos indicam que a ingestão de substâncias antioxidantes extraídas de plantas é inversamente proporcional à mortalidade por doença coronariana, incentivando o desenvolvimento de métodos para determinar a capacidade antioxidante das plantas (HERTOG et al., 1993; PEREZ et al., 2006).

Kim et al., (1999), isolaram nove flavonóides no extrato metanólico das folhas de *M. alba*: kaempferol - 3 - O - β - D-glicopiranosídeo; Kaempferol - 3 - O - (6" - O - acetil) - β - D-glicopiranosídeo; quercetina - 3 - O - (6" - O - acetil) - β - D - glicopiranosídeo; quercetina-3-O - β - D - glicopiranosídeo; kaempferol - 3 - O - α - L - rhamnopiranosil - (1 - 6) - β - D-glicopiranosídeo; quercetina - 3 - O - α - L - rhamnopiranosil - (1 - 6) - β - D - glicopiranosídeo; quercetina - 3 - O - β - D - glicopiranosil - (1 - 6) - β - D - glicopiranosídeo, quercetina -3,7 - di - O - β - D - glicopiranosídeo e quercetina. Estes compostos foram avaliados quanto a capacidade antioxidante pelo método DPPH e o composto quercetina apresentou capacidade antioxidante mais elevada que o referência butilhidroxianisol (BHA), utilizado como controle.

Muitas espécies de plantas são utilizadas para tratar os sintomas do Diabetes mellitus (DM) como é o caso da *M. alba*, utilizada pela medicina chinesa como anti-hiperglicêmico por apresentar em suas folhas um potente inibidor da α -glicosidase, o alcalóide 1-deoxinojirimicina (DNJ), (figura 2), com atividade semelhante aos antidiabéticos orais (RAHMAN et al., 1989; HANDA et al., 1989; CHEN et al., 1995; NASH et al., 1996). Segundo Lima et al. (2001), este composto possui efeito inibidor sobre a enzima glicosidase, responsável pela digestão de carboidratos e monossacarídeos no processo de absorção intestinal, exercendo assim um efeito antidiabético.

O DM está entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais e apesar dos progressos em seu tratamento, ainda não é possível controlar de fato suas conseqüências, sendo uma doença de distúrbio crônico que afeta o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, levando a hiperglicemia (BRANSOME, 1992). O efeito hipoglicemiante de *M. alba* foi comprovado no estudo realizado por Suphaket et al., (2009), ao administrar extratos das folhas de *M. alba* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg por um período de 12 dias, observou uma redução significativa nos níveis de glicose em ratos diabéticos induzidos por streptozotocina.

A literatura comprova que muitas plantas medicinais apresentam substâncias tóxicas e/ou composição química variável, entretanto, são frequentemente comercializadas em feiras, mercados e cultivadas em residências, necessitando de estudos de controle de qualidade (MACIEL et al., 2002; CAPASSO et al., 2000).

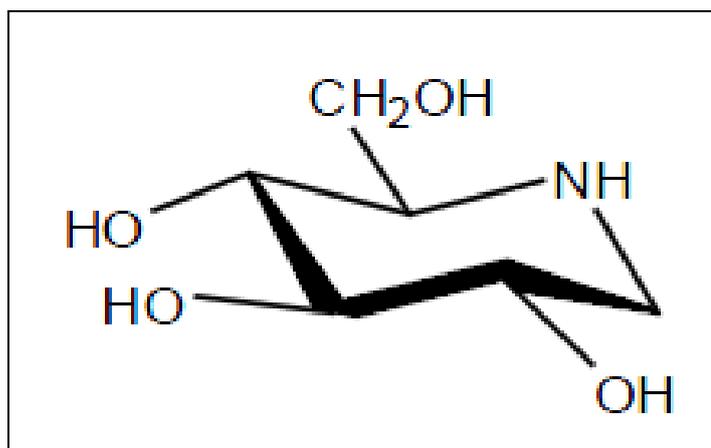


Figura 2- Estrutura do alcalóide 1-deoxinojirimicina (Kimura et al.; 2004).

Segundo Balunas e colaboradores (2005), as plantas medicinais constituem importante fonte para obtenção de medicamentos, sendo que 48% dos medicamentos utilizados na terapêutica provêm direta ou indiretamente de produtos naturais.

A qualidade das drogas vegetais deve ser garantida por análises microbiológicas e físico-químicas, através de testes de autenticidade como caracterização organoléptica, identificação macro e microscópica, pureza, integridade, matéria estranha, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, perda por dessecação, contaminantes microbiológicos, metais pesados e ainda por determinações qualitativas e quantitativas dos princípios ativos (F. BRAS, 1988; OMS, 1998; BRASIL, 2004).

As análises microbiológicas e físico-químicas são importantes para o controle de qualidade, porém nem todas as drogas possuem parâmetros estabelecidos que auxiliem nas análises (BABY et al., 2005). Segundo Fisher (2007), muitos fatores podem influenciar a qualidade da matéria prima-vegetal como clima, água, calor, solo, sendo necessário levar em consideração o meio no momento do plantio, o qual pode causar diferenças na composição do produto vegetal, influenciando no efeito farmacológico. De acordo com Simões e colaboradores (2004), a qualidade da matéria-prima deve garantir o produto final com segurança e eficácia, o qual pode variar com o método de obtenção dos extratos, formulação e forma farmacêutica.

2.3 Processo inflamatório

O processo inflamatório é uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor que provoca distúrbios na membrana celular, ocasionando a ativação da enzima fosfolipase A2 e a liberação de ácido araquidônico. O metabolismo do ácido araquidônico (figura 3) pode seguir duas vias enzimáticas, levando a produção de mediadores da inflamação, os eicosanóides, através da via cicloxigenase (COX) produz tromboxano (TX), prostaciclina (PGI₂) e prostaglandinas (PGE) e pela via lipoxigenase produz leucotrienos (LT) (CONTRAN, et al.1997; KUMMER et al. 2002). O processo inflamatório envolve a fase aguda com resposta imediata e curta duração, caracterizada por febre, dor, emigração e acúmulo de leucócitos no foco da lesão formando o edema e a fase crônica com duração mais longa, associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual (CONTRAN et al.; 2005; ADER et al., 2006).

A inflamação granulomatosa é um tipo de reação inflamatória crônica caracterizada pelo acúmulo de células epitelióides e macrófagos ativados. Os granulomas consistem na agregação de macrófagos ativados, de aparência modificada (células epitelióides), envoltos por um colar de leucócitos e ocasionalmente células plasmáticas (ROBBINS et al., 1994). Dependendo do agente injuriante, a reação granulomatosa pode gerar dois tipos de granulomas: de corpo estranho quando for um irritante físico ou um granuloma imunológico, sendo uma inflamação crônica que persiste enquanto o material externo ou antígeno persistirem (THOMPSON 1984; RYAN 1996).

Através do método do granuloma que consiste na implantação de cilindros de algodão em ratos é possível avaliar a atividade anti-inflamatória de um determinado fármaco sobre um processo inflamatório. Este método apresenta reprodutibilidade confiável em razão da capacidade do cilindro implantado interferir com os componentes proliferativos do processo inflamatório, o qual está relacionado com o acúmulo de fluídos, infiltração de neutrófilos e materiais protéicos (BAILEY et al, 1982; LE et al., 2001). Ao final do ensaio o granuloma é caracterizado pela formação de cápsula fibrosa vascularizada, contendo fibroblastos e células mononucleares infiltrantes. Sendo assim, os resultados serão interpretados de forma que, quanto menor a cápsula fibrosa desenvolvida, melhor é o efeito anti-inflamatório do fármaco testado (BAILEY et al.,1982; DALMORA et al. 1996).

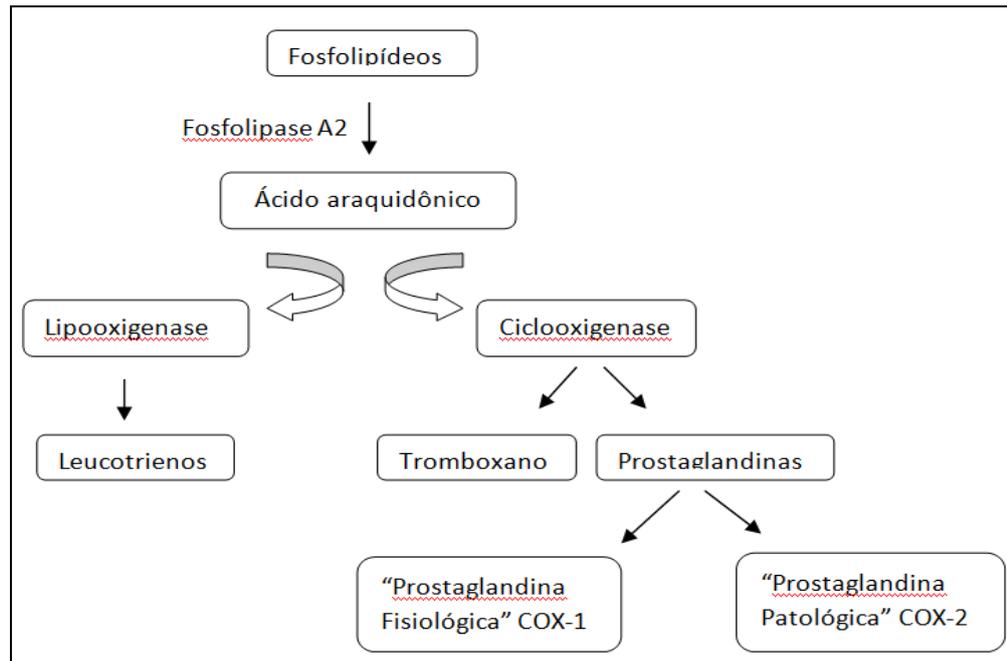


Figura 3- Metabolismo do ácido araquidônico e formação dos mediadores (HILÁRIO, 2006).

Cessada a ação do agente inflamatório, ocorre redução na liberação dos mediadores e a microcirculação recupera o estado hemodinâmico, o líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea. Nos casos de necrose, o tecido destruído é fagocitado ocorrendo cicatrização. Há agentes que podem manter as inflamações por longos períodos, pois agem repetidamente sendo de difícil eliminação (BOGLIOLO, 2011).

2.4 Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são drogas analgésicas e antipiréticas, as quais constituem um grupo heterogêneo de compostos que, em muitos casos, não estão relacionados quimicamente, porém compartilham de algumas ações terapêuticas e efeitos colaterais, sendo sua principal ação a inibição das vias cicloxigenases e lipoxigenases (CARVALHO et al. 2004). A maioria dos AINES podem causar efeitos adversos em uma fração considerável de pacientes tratados por via oral, como irritação da mucosa gástrica, toxicidade hepática e renal (KONTOGIORGIS et al. 2002). A nimesulida (AINES) derivada da sulfonamida atua como inibidor seletivo da COX-2 e é indicada no tratamento de

processos inflamatórios relacionados à liberação de prostaglandinas como em doenças artríticas, cefaléias e mialgias (FUCHS et al., 2010).

Os flavonóides são metabólitos secundários amplamente distribuídos em vegetais superiores, apresentando-se em altas concentrações em frutas, vegetais, grãos, sementes e chás (RAMELET, 2000). Estes compostos possuem ação sobre mediadores celulares como proteínas, enzimas e inibem as vias ciclooxigenase e lipoxigenase, combatendo radicais livres, prevenindo a peroxidação de lipídeos e regulando a produção de eicosanóides, sendo excelentes inibidores da inflamação (CHEN et al., 2000; RASO et al., 2001; HAVSTEEN, 2002).

Através de agentes inflamatórios como a carragenina, responsável pela liberação de prostaglandinas, é possível avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos vegetais, como observado no estudo realizado por Rotelli et al. (2003), onde verificou-se o efeito anti-inflamatório de alguns flavonóides em modelos experimentais de inflamação. O flavonol morina 25 mg/Kg administrada uma vez ao dia, durante seis dias, apresentou maior inibição do processo inflamatório em relação aos demais flavonóides.

Filho et al. (2006), por meio de uma revisão bibliográfica verificaram a atividade anti-inflamatória de 171 alcalóides, destes 137 apresentaram atividade, sendo o modelo de edema de pata induzido por carragenina o mais empregado para avaliação da atividade anti-inflamatória. Os alcalóides são mais comuns em plantas com flores e geralmente estão presentes em Papaveraceae, Papilionaceae e Solanaceae, também são encontrados em insetos, organismos marinhos, microrganismos e animais (Lewis, 1989). A colchicina, alcalóide utilizado clinicamente para tratar doenças artríticas e vaculites é conhecida por sua ação preventiva contra gota, redução da dor e inchaço em doenças inflamatórias e degenerativas (MALKINSON, 1982). Os alcalóides constituem a maior classe de substâncias vegetais secundárias e possuem notáveis atividades farmacológicas, sendo muitas vezes tóxicos ao homem (HARBORNE, 1991).

2.5 Toxicidade

Plantas medicinais utilizadas indiscriminadamente sem estudos que demonstrem eficácia e segurança podem apresentar reações indesejáveis como toxicidade, limitando seu uso e os benefícios esperados. Segundo Freshney (2005), toxicidade é um evento complexo *in vivo*,

podendo haver dano celular direto, gerando efeitos inflamatórios locais ou sistêmicos. Em casos de dano hepatocelular induzido por medicamentos, ocorre aumento nos níveis de AST e ALT na circulação (SETTY et al., 2007). A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST está presente na mitocôndria. Nos danos hepatocelulares leves, a ALT é predominante no soro, enquanto que em lesões graves há liberação de AST, essa diferença é utilizada no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas (MOTTA, 2003). De acordo com Oliveira (2004), a ALT é considerada o indicador mais específico de lesão hepática, uma vez que a AST, apesar de estar associada com a toxicidade hepática, pode apresentar-se elevada em enfermidades de outros órgãos, como músculo esquelético e coração.

O efeito tóxico provocado pelo uso de plantas medicinais pode ainda causar danos renais, o que pode ser avaliado através da concentração de constituintes de ocorrência normal no sangue como creatinina e uréia. A creatinina é um produto normal do metabolismo, excretada diariamente em quantidade proporcional a massa muscular, é sintetizada no fígado, rins, pâncreas e transportada para as células musculares, se difunde para o plasma e é removida por filtração glomerular (RAVEL, 1997; MOTTA, 2003). Situações em que ocorre elevação de creatinina no plasma podem estar associadas à deficiência no processo de filtração glomerular (LEHNINGER et al., 1995). Ao diminuir a atividade renal é desencadeado um quadro denominado insuficiência renal, diagnosticado como doença renal crônica (DRC) que leva ao acúmulo de substâncias nitrogenadas (uréia e creatinina), acompanhado ou não de diminuição da diurese (CONGER, 1998; COSENZA, 2010).

Níveis alterados de uréia no plasma não são bons indicadores de lesão renal, mas alterações nos níveis de creatinina são indicadores confiáveis para avaliar a presença de lesão, pois seu nível sérico não é influenciado pela dieta, idade ou sexo (ALVES, 2007).

Devido à dificuldade em monitorar os efeitos sistêmicos da toxicidade, muitos testes determinam os efeitos a nível celular, através do ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Neste ensaio os extratos dos materiais a serem testados são colocados em contato com uma cultura de células de mamíferos, em microplacas para cultura celular, de 96 poços. A avaliação da citotoxicidade pode ser realizada utilizando-se o método de incorporação do corante vital vermelho neutro que por ser solúvel em água, passa através da membrana plasmática e se concentra nos lisosomas de células vivas. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisosomais resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Através da intensidade da cor presente nos micropoços da placa, contendo células tratadas com diferentes diluições do extrato, pode-se verificar que onde há maior morte celular a

coloração torna-se transparente, pois não há captura do corante; caso contrário, micropoços onde há células vivas, a coloração é rosada. Portanto é possível distinguir entre células vivas e mortas pela medida da intensidade da cor final. O ensaio da citotoxicidade é considerado eficaz, de baixo custo, reprodutível e quantitativo, realizado pela medida de morte celular, sendo o IC_{50} a concentração do extrato que lesa ou mata 50% da população celular (DAGUANO et al., 2007).

A escolha das células para a realização dos testes de citotoxicidade deve considerar que os materiais podem não afetar os indivíduos com resposta imunológica normal, mas podem acarretar efeitos deletérios em indivíduos com deficiência na resposta imunológica. Conseqüentemente, a escolha de células com maior sensibilidade é primordial para assegurar o uso desses materiais (CRUZ et al. 1987). Os ensaios podem ser realizados utilizando linhagens celulares de fácil manuseio, com características estáveis e resultados reproduzíveis (CRUZ, 2003) como células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e linhagens NCTC clone 929.

2.6 Atividade antimicrobiana

O surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos incentivam a busca de novos princípios ativos com atividades antimicrobianas como os produzidos durante o metabolismo secundário das plantas (OLIVEIRA et al., 2006; MENDES et al., 2011).

De maneira geral, os flavonóides são relatados por suas atividades antimicrobianas, podendo ser avaliadas por diversos métodos, os quais se diferenciam no que se refere à sensibilidade ou aos seus princípios (SOUZA et al., 2000). Através do ensaio de microdiluição em caldo é possível determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são testados em diluições consecutivas, sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo. As CIM's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade. O método de diluição em caldo é aceitável para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente

antimicrobiano frente a um determinado isolado bacteriano (CALIXTO et al.; ANDREWS, 2001).

A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo, pois envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80, 96 ou mais poços, próprias para microdiluição. Os fatores primários que influenciam nos valores da CIM no método de diluição em caldo são os mesmos para a técnica de macrodiluição e microdiluição, ou seja, a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento microbiano (CHRISTOFILOGIANNIS, 2000; NCCL, 2003).

Pesquisadores têm avaliado o efeito dos extratos de plantas sobre microrganismos de ocorrência em diversas patologias pelos métodos de difusão em ágar, em disco de papel, microdiluição e bioautografia. Walker et al. (2009), confirmou a atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações acetato de etila, butanol, diclorometano e hexano de *Mirabilis jalapa* L. através do método de microdiluição em caldo, obtendo as melhores respostas para *Staphylococcus aureus* com a fração diclorometano (CIM=2,5mg/ml) e para *Saccharomyces cerevisiae* com a fração acetato de etila (CIM=0,156 mg/ml).

Mendes et al. (2011), empregando o método de disco difusão em ágar, avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. O extrato de *P. pilosa* apresentou atividade antibacteriana apenas contra *P. aeruginosa* e o extrato de *P. pellucida* apresentou frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo. O extrato etanólico de *P. pellucida* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* teve uma CIM de 62,5 mg/mL e *P. pilosa* apresentou CIM igual a 250µg/mL frente a *P. aeruginosa*.

Utilizando-se bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos foi determinada a atividade antimicrobiana *Tagetes minuta* L. - *Compositae* (Chinchilho) pelo método de difusão em ágar. Os extratos das folhas apresentaram uma fraca atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, enquanto o extrato diclorometano dos ramos e o extrato etanólico das cascas foram ativos contra *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. A maior atividade foi observada para o extrato diclorometano das cascas, que inibiu o crescimento de *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, esta atividade parece estar relacionada à presença de diterpenos no extrato.

3. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E MANUSCRITO

3.1 Publicação I

- Physico-chemical quality control and dosage of total polyphenols, flavonoids of *Morus alba* leaves (Moraceae). Revista Saúde (Santa Maria), vol. 37, n.2, jul./dez, 2011.

3.2 Manuscrito I

- Anti-inflammatory Activity and Biochemical Parameters of the Ethanol Extract of *Morus alba* L. (Moraceae).

3.3 Publicação II

- Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de *Morus Alba* L. (Moraceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.

PHYSICO-CHEMICAL QUALITY CONTROL AND DOSAGE OF TOTAL POLYPHENOLS, FLAVONOIDS OF *Morus alba* LEAVES (MORACEAE)

Camila B. Pereira^{1*}, Aline Marin², Tiago D. T. Mak²,
Raquel M. M. Necchi¹, Melânia Palermo Manfron^{1,2}

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil.

²Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil.

ABSTRACT: To establish parameters for quality control of *Morus alba* leaves were done tests of purity by determining the loss on drying, foreign matter, total ash, acid insoluble ash, swelling index, bitterness index, yield of crude extract, pH and organoleptic properties. The tests were done with samples collected on March, June, September and December according to Brazilian Pharmacopeia and World Health Organization. The percentage of loss on drying found are according to the established value of 14 %, the highest content was on September 12.89 ± 0.1400 %. The indices of foreign matter found are agreement with the amount allowed by Brazilian Pharmacopeia, which establishes a maximum of 2 % for most of the herbal drugs. The collect on March showed the highest content of total ash and acid insoluble ash, respectively, 20.48 ± 0.3517 % and 5.68 ± 0.1057 %. The swelling index showed higher values in samples collected on September 7.95 ± 0.2186 mL and on December 7.1 ± 0.8544 mL. The bitterness index was higher in the first two collections, 1.037 units/g in both. The yield produced was 18 % on March, 29.61 % on June, 26.47 % on September and 24.35 % on December. The pH of aqueous extract was neutral (pH 7.0) on March and slightly acid (pH 6.0) in other months. The four collect showed small variations in relation the organoleptic properties. It was done dosage of total polyphenols and flavonoids with 70% ethanol extracts of *M. alba* leaves. The content found of polyphenols were $6.467 \pm 0,012$; 5.503 ± 0.007 ; 6.016 ± 0.020 ; 6.943 ± 0.046 milligrams of gallic acid per gram of dried plant on March, June, September and December, respectively. The content of flavonoids found were 4.345 ± 0.008 ; 3.782 ± 0.016 ; 4.362 ± 0.005 ; 4.893 ± 0.013 milligrams of rutin per gram of dried plant.

Descriptors: *Morus alba*, Moraceae, Quality Control, Leaves

CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO E DOSAGEM DE POLIFENÓIS TOTAIS E FLAVONÓIDES NAS FOLHAS DE *Morus alba* (MORACEAE)

RESUMO: Visando estabelecer parâmetros para o controle de qualidade das folhas de *Morus alba* foram realizados ensaios de pureza através das determinações de umidade, matéria estranha, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, teor de mucilagem, índice de amargor, rendimento do extrato bruto, propriedades organolépticas e pH. Os ensaios foram realizados com amostras coletadas em março, junho, setembro e dezembro, de acordo com a Farmacopéia Brasileira e a Organização Mundial de Saúde. A perda por dessecação apresentou teor de umidade de acordo com o valor estabelecido de 14 %, o valor mais elevado foi em setembro $12.89 \pm 0,1400$ %. Os índices de matéria estranha encontrados estão de acordo com a quantidade permitida pela Farmacopéia Brasileira, que estabelece um máximo de 2% para a maioria das drogas vegetais. A coleta de março apresentou o maior teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, respectivamente, $20,48 \pm 0,3517$ % e $5,68 \pm 0,1057$ %. O índice de intumescência mostrou valores mais elevados nas amostras coletadas em setembro $7.95 \pm 0,2186$ mL e dezembro $7.1 \pm 0,8544$ mL. O índice de amargura foi mais elevado nas duas primeiras coletas $1,037$ unidades/g em ambas. O rendimento produzido foi 18 % em março, 29,61 % em junho, 26,47 % em setembro e 24,35 % em dezembro. O pH do extrato aquoso foi neutro (pH 7,0) em março e levemente ácido (pH 6,0) nos outros meses. As quatro coletas apresentaram pequenas variações em relação as propriedades organolépticas. Foi realizada dosagem de polifenóis e flavonóides com o extrato etanólico 70 % das folhas de *M. alba*. O valor de polifenóis encontrado em março, junho, setembro e dezembro foi $6.467 \pm 0,012$; 5.503 ± 0.007 ; 6.016 ± 0.020 ; 6.943 ± 0.046 miligramas de ácido gálico por grama de planta seca, respectivamente. O valor de flavonóides encontrado foi 4.345 ± 0.008 ; 3.782 ± 0.016 ; 4.362 ± 0.005 ; 4.893 ± 0.013 miligramas de rutina por grama de planta seca.

Descritores: *Morus alba*, Moraceae, Controle de qualidade, Folhas

* Aluna do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria.

INTRODUCTION

The use of medicinal plants in therapy requires quality of herbal drugs, which begins on the correct identification of species, planting, harvesting, preparation of plant extracts and medicines. Therefore, it is necessary to obtain parameters of quality for pharmaceutical purposes, which are set out in Pharmacopeias and Officers Codes.

Family Moraceae occurs in tropical and subtropical regions and subdivided into approximately 60 genera, which comprise about 1400 species.¹ The genus *Morus* is distinguished by its inflorescence spike amentacea type. Inflorescence is formed during months of July and August, with small flowers, often single-sex. They have corolla and a cup formed by four free sepals.² Due to diversity of species of fruits, they are known as white-mulberry (*M. alba*), blackberry (*M. nigra*), cranberry-red (*M. rubra*) and bramble-rose (*M. rosea*). The main cultivated are white-blackberry and blackberry because they don't have thorns. They are adapted to different soil types, except those with trend water logging.³⁻⁶ The Moraceae family leaves are rich in protein, fiber, minerals and vitamin C, they also show a type of glycoprotein, called moran A, which is attributed an antidiabetic effect.⁷ The genus *Morus* has a variety of phenolic compounds including isoprenyl flavonoids, coumarins, chromones and xanthenes. Many of these compounds exhibit biological properties such as antiinflammatory, diuretic and hypotensive effects.¹ The leaves, bark and branch of *M. alba* (Fig. 1), are used in traditional medicine as antihyperglycemic, to treat fever, to protect the liver, to improve eyesight and to strengthen joints.⁸⁻⁹ Due to lack *M. alba* in monographs, this work aims to establish standards of quality and purity of plant drug by physico-chemical analysis and evaluation of total polyphenols and flavonoids in four collections during the year. The physico-chemical analysis carried out were: determination of loss on drying, foreign matter, yield of ethanol extract, total ash, sulphated ash, swelling index, bitterness index, pH and organoleptic properties.

Figure 1. *Morus alba* leaves.

(Font: http://www.cirrusimage.com/tree_white_mulberry.htm)



MATERIAL AND METHODS

Plant material

The *Morus alba* leaves were collected in March, June, September and December 2010, in Santa Maria city, Rio Grande do Sul State, Brazil. A sample of plant material was identified by Dr^a Jumaida Maria Rosito and voucher specimens were deposited in the Herbarium of Biology Department of the Federal University of Santa Maria (UFSM) as voucher specimen SMDB 13079. The plant material was dried at 40 °C with air circulation and grounded in a knife mill.

Preparation of ethanol extract

The extracts were obtained by cold maceration of powdered plant drug (80 g) with drug solvent ratio 20 % (w/v) in 70 % hydroethanolic solvent during 30 days, after this, they were concentrated, lyophilized and calculated yield.

Physical-chemistry quality control

Loss on drying

The water determination was performed according to Brazilian Pharmacopeia.¹⁰ It was weighed exactly 1 g of powdered plant drug and it underwent heating in an oven at 105 °C during 5 hours. The loss of drying weight was calculated considering the air-dried sample. The analysis was performed in triplicate.

Foreign matter

Macro e microscopy examination was conveniently employed to determine the presence of foreign matter in powdered plant drug according to Brazilian Pharmacopeia.¹⁰ In the macroscopy examination, 25 g of plant drug was spread on a thin layer from which the foreign matter was selected by inspection through the magnifying less. The content of foreign matter was calculated considering the air-dried sample. The analysis was performed in triplicate.

Total ash

The analysis of total ash was conducted according to Brazilian Pharmacopeia.¹⁰ The powdered plant drug (3g) was accurately weighed into a crucible that has been previously ignited, cooled and weighed. Then the sample was ignited by gradual heating to 450 °C, cooled in a desiccator and weighed. For obtaining carbon-free ash, the residue was moistened whit 2 mL of water after cooling the crucible. The remaining material was dried on a water-bath and then placed on a hot-plate, being ignited again until constant weight. The residue was cooled in a desiccator for 30 minutes and weighed. Total ash content was calculated considering the dry material. The analysis was performed in triplicate.

Acid insoluble ash

The analysis of acid insoluble ash was conducted according to Brazilian Pharmacopeia.¹⁰ In the crucible containing the total ash, it was added 25 mL of

hydrochloric acid (70 g/L), covered with a watch-glass and boiled gently for 5 minutes. The watch-glass was rinsed with 5 mL of hot water and then this liquid was added to the crucible. The insoluble matter was collected on an ashless filter-paper and washed with hot water until the filtrate was neutral. Thereafter, the filter-paper containing the insoluble matter was transferred to the original crucible, which was dried on a hot-plate and ignited to constant weight. After cooling the residue in a desiccator, the crucible was weighted and the content of acid-insoluble ash calculated considering the dry material. The analysis was performed in triplicate.

Swelling index

The analysis of swelling index was conducted according to Brazilian Pharmacopeia.¹⁰ One gram of powdered plant drug was introduced into a 25 mL glass-stoppered measuring cylinder for the verification of the volume occupied by the sample. Next, 25 mL of water was added and the mixture was shaken thoroughly every 10 minutes for about 1 hour. After that, the mixture was stood for 3 hours at room temperature, and finally the volume in ml occupied by the plant material was remeasured. The test was performed in triplicate.

Bitterness index

The determination of the index of bitterness was performed according to Brazilian Pharmacopeia.¹⁰ The bitter properties of plant material were determined by comparing the threshold bitter concentration of the extract from the material with the concentration from a dilute solution of quinine hydrochloride. Drinking-water was the vehicle to the extraction of plant materials and for the mouth-wash after each tasting. It's was prepared a stock solution (St) of *M. alba* at 1 % (w/v). St was transferred to 10 tubes with volumes from 1 to 10 mL. The standard solution of quinine hydrochloride R was distributed in nine tubes from 0.042 to 0.058 mg/10 mL. The bitterness value was expressed in units equivalent to the bitterness of a solution containing 1 g of quinine hydrochloride in 2000 mL.

Yield

The analysis of yield was conducted according to Costa.¹¹ The yield was determined using the equation: $\text{Yield (\%)} = \text{Mf} / \text{Mi} \times 100$, where Mi is the initial mass of sample (g) and Mf is the final mass of the dry extract (g). Crude extracts were obtained by cold maceration of powdered plant drug (80 g) with drug solvent ratio 20% (w/v) in 70 % hydroethanolic solvent during 30 days and the yield determined. Botanical studies of yield must be performed as an indicative of correct amount of material to be collected for production of extracts and fractions used in pharmacological tests.

Organoleptic properties and pH

The organoleptic features analyzed were odour, flavor and color. The odour was checked by pressing of a small portion of leaves on the palm of the hand, inhaling slowly and repeatedly. The color of the leaves was analyzed with fresh plant under diffuse daylight. The flavor was tasted through the instillation of few drops on tongue of an aqueous solution 1 % (w/v) of the powdered plant drug heated on an electric-plate and brought to be boiling for 5 minutes.¹² pH was verified by potentiometry with the above solution, according to Brazilian Pharmacopeia.¹³

Dosage of total polyphenols

The dosage of polyphenols was performed through the Folin-Ciocalteu, with some modifications.¹⁴⁻¹⁵ Based on the solution of 0.04 % of the ethanol extract of *M. alba*, solutions was prepared in volumetric flasks at concentrations of 5,10,20,30 $\mu\text{g/mL}$. To this end, we used the required amount of solution of 0.04 % with addition of 1 mL of Folin-Ciocalteu for 5 minutes, 2 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) 20 % for 10 minutes. The solutions were homogenized, capped and protected from light and kept at room temperature. The absorbance was measured at 730 nm using water as a blank. The test was performed in triplicate. The standard curve was obtained using standard solutions of gallic acid at the same concentration of the sample. The content of total polyphenols was expressed as milligram of gallic acid equivalent per gram of dried plant.

Dosage of flavonoids

The dosage of flavonoids was performed according to a modified methodology from Rio¹⁶. Based on the solution of 0.04 % of the ethanol extract of *M. alba*, solutions was prepared in volumetric flasks at concentrations of 10,20,50,100,150 µg/mL . To this end, we used the required amount of solution of 0.04 % with addition of 75 µl of 5 % methanol (MeOH) solution of AlCl₃, 3.9 mL of methanol 70 % for 30 minutes. The solutions were homogenized, capped and protected from light and kept at room temperature. The absorbance was measured at 425 nm using MeOH 70% as a blank. The test was performed in triplicate. The standard curve was obtained using standard solutions of rutin at the same concentration of the sample. The flavonoids content was expressed as milligram of rutin equivalent per gram of dried plant.

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using One-way ANOVA followed by Tukey test using Graph Prism 5.0 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) and the results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Physico-Chemical Quality Control

The loss on drying of *M. alba* leaves showed a moisture content according to the established value of 14 %, which is the maximum limit recommended of moisture for plant drugs.^{12;13;17} According to Simões¹⁸ the water founded in the plant drug is directly related to its storage and microbial contamination or enzymatic degradation by action of the chemical constituents. The excess of water in the raw material enables the development of fungi and bacteria.¹⁹ Therefore, preliminary operations employed in the leaves were effective in standardizing of moisture content to established values. Through statistical analysis were checked significant differences in the loss on drying in the four collections (table 1).

Table 1. Loss on drying, mean \pm standard error of mean (SEM) of *Morus alba* leaves.

| Month | Mean (%) | SEM |
|-----------|----------|--------------|
| March | 9.73 | ± 0.1253 |
| June | 11.15 | ± 0.2118 |
| September | 12.89 | ± 0.1400 |
| December | 8.56 | ± 0.0808 |

Indices of foreign matter found in *M. alba* on March and June are agreement with the amount allowed by Brazilian Pharmacopeia,¹⁰ which establishes a maximum of 2 % for most of the herbal drugs (table 2). Collections made during September and December didn't show foreign matter. There weren't significant differences in the indices of foreign matter in the four collections. The amount of foreign matter may be related to the fact of leaves have been pre-selected and milled.²⁰ Analysis for determination of foreign matter has the purpose to identify portions or products not specified in the definition and description of the drug, besides impurities from mineral or organic nature, don't related to the drug.¹³

Table 2: Foreign matter, mean \pm standard error of mean (SEM) of *Morus alba* leaves

| Month | Mean (%) | SEM |
|-------|----------|--------------|
| March | 0.0200 | ± 0.0121 |
| June | 0.0126 | ± 0.0063 |

The determination of contenting total ash is important for quality control, since its aim is to check the presence of non-volatile inorganic impurities that may contaminate the plant drug.^{10;21} The collets that had the highest content of total ash was done on March (table 3). This can be explained by the higher amount of inorganic salts present in the first collection.¹⁷

In the analysis of acid insoluble ash was possible to observe a large discrepancy in values. In the gathering done on March and December, the content found was 5.68 % and 3.50 %, respectively. Through statistical analysis were checked significant differences in the content of total ash and acid insoluble ash in the four collections. Determination of ash insoluble in acid chloridric is intended to detect constituents of silica and siliceous constituents, wich above of the established for the plant drug indicates contamination by excess soil or sand.¹³ There is not maximum value for total ash and acid insoluble ash officially established for the species in study.

Table 3: Determination of total ash, acid insoluble ash, mean \pm standard error of mean (SEM) of *Morus alba* leaves.

| Month | Total ash (%) | Acid insoluble ash (%) |
|-----------|--------------------|------------------------|
| March | 20.48 \pm 0.3517 | 5.68 \pm 0.1057 |
| June | 9.57 \pm 0.4908 | 0.75 \pm 0.0333 |
| September | 11.88 \pm 0.2408 | 1.67 \pm 0.0738 |
| December | 17.86 \pm 0.4020 | 3.508 \pm 0.0601 |

Analyzing the swelling index, *M. alba* leaves showed the highest values in samples collected on September and December (Table 4). The significant differences were checked only in results obtained on September versus March and September versus June. Banderó²² found a quantity of swelling index of 2.03 mL to *Glechon spathulata*. This test serves to measure the volume (mL) occupied by plant matter plus mucilage or other material attached.^{12,13,17}

Table 4: Swelling index, mean \pm standard error of mean (SEM) of *Morus alba* leaves.

| Month | Mean (mL) | SEM |
|-----------|-----------|--------------|
| March | 5.83 | ± 0.1202 |
| June | 5.73 | ± 0.0882 |
| September | 7.95 | ± 0.2186 |
| December | 7.1 | ± 0.8544 |

Pharmacopeias and specialist books on herbal drugs include certain types of sensation like flavour. Analysis of the bitterness index is determined by comparing the threshold concentration of bitterness of an extract and the dilute solution of quinine chloride. Thus, there are astringent, oily, mucilaginous, bitter and pungent tastes. The bitterness index was higher in the first two collections (table 5), it shows that the drug contains bitter substances, especially considering the dilution used in the test. To Wasicky et al.,²³ bitterness index has solid bases theoretical and experimental, which competes with the best biological methods. However, Mello et al.,²⁴ affirmed that this test may introduce errors due to individual variability, since it doesn't statistically reproducing real information. Thus, to perform this test it is necessary a previous training of experimenter, which combined with statistical analysis, allow that the biological variability be minimized, becoming a reliable method.

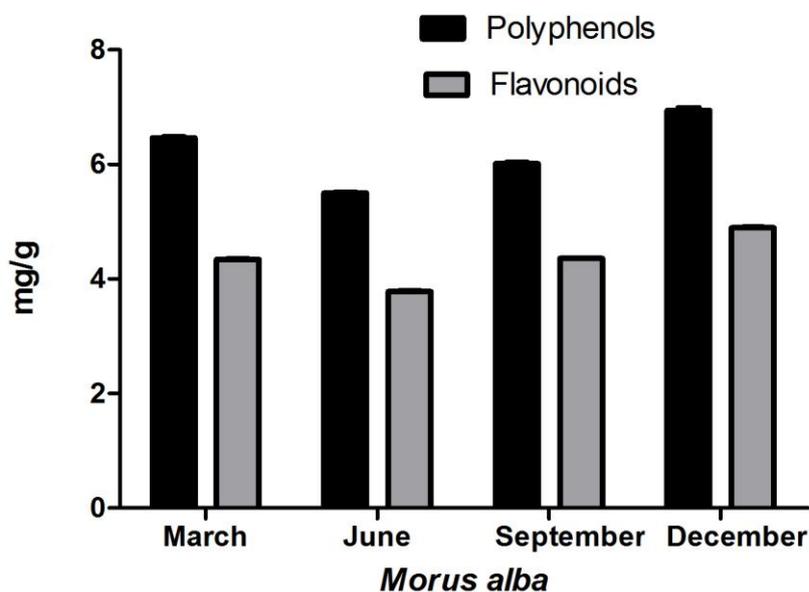
There were differences in about 11 % in yield's assessment of 70 % ethanol extracts. The highest yields were on June and September. The pH of the aqueous extract was neutral (pH 7.0) on March and slightly acid (pH 6.0) in other months, this suggests presence of neutral and acid substances, respectively, in *M. alba* leaves.

Table 5: Bitterness index, yield, pH of *Morus alba* leaves.

| Month | Bitterness index (units/g) | Yield (%) | pH |
|--------------|---------------------------------------|------------------|-----------|
| March | 1.037 | 18.0 | 7 |
| June | 1.037 | 29.61 | 6 |
| September | 0.84 | 26.47 | 6 |
| December | 0.84 | 24.35 | 6 |

In relation the organoleptic properties, the four collect showed small variations, they were odorless and the aqueous extract showed a slight bitter flavor. The fresh leaves showed a light green color in the collection of March, mid-green on June and September and dark green on December. Total polyphenols content found in ethanol extracts of *M. alba* on March, June, September and December were $6.467 \pm 0,012$; 5.503 ± 0.007 ; 6.016 ± 0.020 ; 6.943 ± 0.046 milligrams of gallic acid per gram of dried plant (figure 2). The regression curve obtained was $Y = 0.2879x - 0.0685$ ($R = 0.9912$). The highest content of polyphenols was found in collection on December (6.943 ± 0.046 mg/g). The content of flavonoids found was 4.345 ± 0.008 ; 3.782 ± 0.016 ; 4.362 ± 0.005 ; 4.893 ± 0.013 milligrams of rutin per gram of dried plant. The regression curve obtained was $Y = 0.1821x - 0.1545$ ($R = 0.9935$).

Figure 2: Contents of polyphenols and flavonoids in ethanol extracts produced in four seasons.



Plants can accumulate phenolic compounds in their metabolism under various stress conditions.^{25,26} Second Paliyath et al.,²⁷ most plants suffer physiological and biochemical damage by exposure to different temperatures. Sývacý et.al.,²⁸ found significant differences in polyphenol content of *M. nigra* and *M. alba* stem in the four seasons.

Through statistical analysis used in this study, was checked significant differences in the polyphenol and flavonoids content in four collections, only on March versus September there were not significant differences in flavonoids content. This fact can be explained by changes in climate, collection time, soil formation, plant age, temperature and total rainfall. The information obtained in this study has been relevant to characterization and physico chemical quality control of *M. alba* leaves.

CONCLUSION

Due to widespread use of *M. alba* leaves in traditional medicine, it is necessary to obtain quality standard for the use of this plant. The methods employed were adequate to assess the quality control of vegetable drugs in study, since it hasn't description in Pharmacopoeias. The dosages of polyphenols and flavonoids in the four collections showed higher content in summer.

REFERENCES

1. Nomura T, Hano T. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceus plants. *Nat. Prod. Rep.* 1994; 11: 205-18.
2. Corradello, EFA. *Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio, a trama de um segredo milenar*. São Paulo: Ícone. 1987; p. 101.
3. Donadio LC, Nachtigal, JC, CK, Sacramento. *Frutas exóticas*. Jaboticabal:FUNEP. 1998; p. 279.
4. Silva S. *Frutas no Brasil*. São Paulo: Nobel. 2001; p. 236.
5. Donadio LC. *Dicionário das frutas*. Jaboticabal. 2007; p. 300.
6. Gomes P. *Fruticultura brasileira* 13^a ed. São Paulo: Nobel. 2007; p. 446.
7. Andallu B, Vardacharyulun CH. Effect of mulberry leaves on diabetes. *Int. J. Diab. Dev. Countries*. 2001; 21: 147-51.
8. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999; 64: 555–59.
9. Kim SU, Kim LHS, Kim I, MY, Kim, KS Ahn. Determination of 1deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves through derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 2003; 1002:93–9.
10. Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu. 2000
11. Costa AF. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 4 ed.; 1994; v.2, p. 1117 .
12. World Health Organization. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneva, 1998, p.122.
13. Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu. 1988.
14. Simonovska B, Vovk I, Andresek S, Valentova K, Ulrichova J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography*. 2003; 1016(1), 89-98.

15. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 2004; 84:329-39.
16. Rio RGW. *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996
17. Hänsel R, Sticher O, Steinegge RE. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Berlin: Springer. 1999
18. Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. 5. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS. 1998, p. 173.
19. Farias, MR. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. et al (Org.). "*Farmacognosia: da planta ao medicamento*". 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC. 2003
20. Frasson, APZ, Bittencourt CF, Heinzmann BM. Caracterização físico química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Rev. Bras. Farmacog.* 2003; 13: 35-9.
21. Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. *Desenvolvimento tecnológico e produção e fitoterápicos*. In: Simões C.M.O, E.P. Schenkel, M.J.C.P. Gosmann, L.A. Mentz., P.R. Petrovick. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC. 2003
22. Banderó VC. Physico-chemical characterization for quality control of *Glechon spathulata*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. 2009
23. Wasicky R, Barbieri E, Weber H. *Contribuição para o método de dosagem de princípios ativos em drogas e preparações pelo amargor*. Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo. 1943; 3: 113-19.
24. Mello JCP, Petrovick PR. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. *Acta Farm Bonaerense*. 2000; 19: 211-15.
25. Pasqualini V., Robles C., Garzino S., Greff S., Bousquet MA, Bonin G.. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere*. 2003; 52:239-48.

26. Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*. 1994; 194: 541-49.
27. Paliyath G., Pinhero RG, Rao MV, Murr DP, Fletcher RA. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to the genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance in maize seedlings. *Plant Physiol*. 1997; 114:695-704.
28. Sývacý A., Sökmen M. Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.) Plant Growth Regulation. 2004; 44: 3251-256.

Anti-inflammatory Activity and Biochemical Parameters of the
Hydroethanolic Extract of *Morus alba* L. (Moraceae)

Camila B. Pereira^{1*}, Aline Marin², Sérgio L. Dalmora², Raquel M. M. Necchi¹,
Rafael N. Moresco², Melânia P. Manfron²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brasil.

² Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário,
Prédio 26, Santa Maria, Rio Grande do Sul, CEP 97105-900, Brasil.

SUMMARY.

We evaluated the anti-inflammatory activity of hydroethanolic 70 % extract of *Morus alba* L. leaves in a model of induction of granulomatous tissue and the kidney and liver toxicity through plasma dosage in rats. During 6 days were administered orally 1.5 ml, 3 times a day, of the hydroethanolic extract of *Morus alba* leaves. We used nimesulide 5 mg/kg/day as positive control and 20 % propyleneglycol as a negative control. After the treatment period, we assessed the formation of granulomas and the serum levels of AST, ALT and creatinine in all groups, noting that the animals treated with the extract showed 20,24±6,94% inhibition formation of granulomatous tissue while the positive control group showed 21,42±6,52%, confirming a significant anti-inflammatory activity. There was not a significant elevation of biochemical markers in relation to negative control.

Keywords: *Morus alba*, Anti-inflammatory, Granuloma, Toxicity.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: camilabugno@hotmail.com

INTRODUCTION

The Moraceae family consists of approximately 61 genera, with over 1000 species and it is present in tropical and subtropical regions of the world (Joly, 1975, Cronquist, 1981). Species of genus *Morus*, as *Morus rubra*, *Morus nigra* and *Morus alba* are used in Chinese medicine as hypoglycemic due to alkaloid 1-deoxynojirimycin (DNJ), which is a potent inhibitor of α -glucosidase and α -amylase intestinal. Among imino-sugars, DNJ is an alkaloid of naturally occurring and it has shown promising biological activities in vivo, similar to oral antidiabetics (Asano et al., 2001, Chen et al., 1995, Nash et al., 1996, Kimura et al., 2004).

Flavonoids are isoprenoid phenolic compounds found in many plant species, which are studied for their anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and analgesic effects (Nomura et al., 1994, Birt et al. 2001; Havsteen 2002). The flavonoids quercetin, rutin and alkaloid 1-deoxynojirimycin were identified by Kim et al. (1999) and Kimura et al. (2004) in *M. alba* leaves. Flavonoids act in inflammatory process through inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism, increasing capillary permeability and inhibiting protein exudation and leukocyte migration. Due to antioxidant properties, these compounds eliminate free radicals and prevent lipid peroxidation, which is related to inflammatory processes (Havsteen, 2002; Pelzer et al. 1998). The pharmacological study of natural compounds has great importance to develop new drugs for treatment of various diseases.

The anti-inflammatory activity of a particular drug can be assessed by the paw edema induced by carrageenin in rats. This model has several mediators acting in sequence to produce the inflammatory response (Winter et al., 1962). Through the ear edema induced by PMA (phorbol ester) in mice, it is possible to evaluate the anti-inflammatory activity, which is related to activation of phospholipase A2 and it is mainly mediated by prostaglandin E2 (Merlos et al. 1991). Another method is the test of granuloma, which consists of implantation

of cotton pellets in the back of rats, being characterized by the formation of vascularized fibrous capsule, fibroblasts and infiltrating mononuclear cells. The effect of tested drug is measured by the size of fibrous capsule developed. The lower developed fibrous capsule, the stronger anti-inflammatory effect of the tested drug (Bailey et al. 1982; Dalmore et al. 1996).

Many drugs can show as unwanted reaction the aggression to liver, limiting the use and its benefits. Hepatocellular damage, induced by drugs, can be translated by increasing of the enzymes aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) in circulation (Setty, et al., 2007).

Through the determination of constituents of normal occurrence in the blood, such as creatinine, it is possible to assess renal dysfunction associated with toxic effects. Creatinine is a normal product of metabolism and is excreted daily in an amount proportional to muscle mass. Situations where there is an increase of creatinine in plasma may be associated with disability in the process of glomerular filtration rate (Lehninger et al., 1995).

The anti-inflammatory activity of hydroethanolic 70% extract of *M. alba* leaves was determined using the granuloma test in rats. The renal and hepatic toxicity were evaluated through dosage of AST, ALT and creatinine

MATERIALS AND METHODS

Collection of botanical material and obtain the plant extract

The leaves of *Morus alba* L. were collected in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. A sample of the plant material was identified and deposited in the Herbarium of Biology Department of UFSM, as voucher SMDB 13.079. The hydroethanolic 70% extract was obtained by cold maceration and reduced to dry residue.

Animals

Were used Wistar rats weighing between 170 and 200 g, divided into 3 groups of 6 animals. The rats were kept in a vivarium of the Department of Industrial Pharmacy of UFSM with light and dark cycle of 12 h and 22 ± 2 °C, free access to food (standard rodent diet) and water. All procedures were performed according to recommendations of the International Committee for care of animals and in accordance with established national regulations for animal experimentation.

The induction of granulomatous tissue test

The animals were anesthetized in aseptic conditions and cylinders of sterile cotton, weighing 40 mg each, were implanted in the back of each animal according to Meier *et al.* and Niemegeers *et al.* The treatment was orally, by gavage, for six days, administering 1.5 ml of the hydroethanolic 70 % extract of *Morus alba* at a dose of 300 mg/kg/day, divided into 3 daily doses of 0.5 ml at intervals of 4 h. As negative control, were used a mixture of propyleneglycol/water (20:80 v/v) and, as positive control Nimesulide in the dosage 5 mg/kg/day administered 2 times a day on the range of 8 h. On the 7th day, the granulomas were removed and dried in a hot-house at 60 °C for 24 h, and after were immediately heavy on analytical scale. The weights of the granulomas were expressed in grams. The inflammatory inhibition, shown in percentage, was calculated by the difference between final and initial cotton weight of the granulomatous tissue.

Biochemical tests

The biochemical dosages were performed in all rats of the granuloma test. At the end of treatment, were collected 3 ml of blood via cardiac puncture of the test group, negative and positive control and placed in tubes with EDTA anticoagulant. These samples were

centrifuged at 2800 rpm for 15 min to separate plasma. AST, ALT and creatinine were measured in automated Cobas Mira® (Roche Diagnostics).

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The statistical analysis was performed using ANOVA, Kruskal-wallis and the results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The animals treated for six days with hydroethanolic extract of *M. alba* showed significant reduction in granuloma weight with an inhibition of inflammatory process of $20.24 \pm 6.94\%$ and the group treated with nimesulide showed an inhibition of $21,42 \pm 6,52\%$, compared with the negative control (Figure 1).

Figure 1.

Treatment with hydroethanolic extract of *M. alba* and nimesulide, compared with the negative control of propyleneglycol, showed that there is no evidence of hepatotoxicity and nephrotoxicity in the doses tested and time assessed (Table 1).

Table 1.

DISCUSSION

Through test of induction of granulomatous tissue formation was possible to confirm the traditional use of *M. alba* leaves as anti-inflammatory. The extract showed inhibition of the inflammatory process similar to nimesulide, showing significant activity.

In a study by Leite et al. (2010), it was proven anti-inflammatory activity of the extract of *Morus nigra*, belonging to Moraceae family, by inducing the formation of granulomatous tissue. The extract administered orally at doses of 30, 100 and 300 mg/ kg showed, in the highest dose, an inhibition of the formation of granulomatous tissue of 39.7% compared to the control group ($p < 0.05$).

The plants belonging to the genus *Morus* are great sources of phenolic compounds substituted isoprenoids, including flavonoids, which are responsible for many pharmacological activities such as anti-inflammatory, antimicrobial and anti-neoplásico (Nomura et al. 1994; Yamamoto et al. 2001 ; Cushnie et al., 2005). In *M. alba* leaves were isolated flavonoids such as quercetin, rutin and an alkaloid 1- deoxinojirimicin (Kim et al., 1999, Kimura et al., 2004).

Flavonoids are excellent inhibitors of inflammation for combating free radicals and regulate the production of eicosanoids (CHEN et al. 2000; SHALLOW et al. 2001; HAVSTEEN, 2002). The ability of these compounds to inhibit cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism contributes to its anti-inflammatory properties. Studies show that flavonoids increase capillary permeability and exert an inhibitory effect on protein exudation and leukocyte migration. The flavonoids are known for its antioxidant properties, they eliminate free radicals and prevent lipid peroxidation, which is related to inflammatory processes (PELZER et al. 1998).

Brandt et al. (2009) by preliminary toxicological evaluations showed that the hydroalcoholic extract of *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.)

used as anti-inflammatory and diuretic does not cause liver and kidney damage. Treatment with the administration of crude extract at a concentration of 300 mg / kg was performed with the phytochemical analysis, which revealed the presence of tannins, flavanones glycosides, alkaloids and polyphenols.

CONCLUSION

The extract of *Morus alba* leaves showed anti-inflammatory activity similar to nimesulide with absence evidence of hepatotoxicity and nephrotoxicity in the doses and time evaluated. Thus, the results call further studies with this species in order to determine the substances responsible for biological activity.

REFERENCES

1. Asano, N.; Yamashita, T.; Yasuda, K.; Ikeda, K.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Kato, A.; Nash, R. J.; Lee, H. S.; Ryu, K. S. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J. Agric. Food Chem.* v. 49, n° 9, p. 4208-4213, 2001.
2. Bailey, P.J. Biochemical study of the cotton pellets granuloma in rats. *Biochem. Pharmacol.* 31: 1213-8,1982.
3. Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* p.157–177, 2001.
4. Brandt, A.P.; Oliveira, L.F.S.; Fernandes, F.B., Alba, J. Avaliação *in vivo* do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). *Rev. Bras. Farmacogn.* 19 (2A): 388-393, 2009.

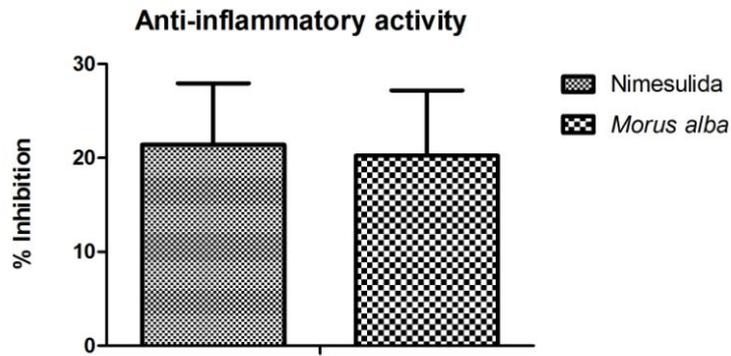
5. Chen, F. J.; Nakashima, N.; Kimura, I.; Kimura, M. Hypoglycemic activity and mechanism of extracts from mulberry leaves and cortex mori radices in streptozotocin induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi*. v. 115, p. 476-482, 1995.
6. Cronquist, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press*, p. 195-198, 1981
7. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 (5): 2005, 343– 356.
8. Dalmora, M.E.A. Interação do piroxicam com microemulsão catiônica e β -ciclodextrina: Formulação *in vitro* e avaliação biológica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria –UFSM, Brasil, 1996.
9. Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* v. 96, p. 67-202, 2002.
10. Joly, A. B. *Introdução à Taxonomia Vegetal*. Câmara Brasileira do Livro, 1975.
11. Kim, H. B.; Choung, W. Y.; Ryu, K. S. Sensory characteristics and blood glucose lowering effect of ice-cream containing mulberry leaf powder. *Korean J. Seric. Sci.* p. 129-134, 1999.
12. Kimura, T.; Kiyotaka, N.; Yuko, S.; Kenji, Y.; Masahiro, S.; Kohji, Y.; Hiroshi, S.; Teruo, M. Determination of 1 Deoxynojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *J. Agric. Food Chem.* v. 52, p.1415-1418, 2004.
13. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Princípios de bioquímica. Tradução de W.R. Loodi, e A.A. Simões. São Paulo, Sarvier, 839p., 1995.
14. Meier R., Schuler W., Desaulles P.L. Unisc Acid: tumor inhibitor isolated from Lichens. *Experimentia*, v.6, p.469-71.

15. Merlos, M., Gómez, L.A., Giral, M., Verticat, M.L., J. Garcia-Rafarel & J. Forn (1991) *Brit. J. Pharmacol.* 104: 990-4.
16. Nash R. J.; Watson, A. A.; Asano, N. In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*; Pelletier, S. W., Ed. Pergamon: Elmsford, NY; Vol. 11, Chapter 5, p. 345-376, 1996.
17. Niemegeers, C.J.E., Awouters F., Lenaerts F.M., Janssey A.J. The activity of suprofen on nystatin-induced paw oedema in rats. *Arzneimittel-Forschung*, v.23, p.1516-19.
18. Nomura, T.; Hano, Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceus plantas. *Nat. Prod. Rep.* v. 11, n° 2, p. 205-18.
19. Pelzer, L.E.; Guardia, T.; Juarez, O.A.; Guerreiro, E. Acute and choronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *II Farmaco*, v.53, p.421-424, 1998.
20. Setty, S.R.; Quereshl, A.A.; Swamy, V.; Patil, T.; Prakash, T.; Prabhu, K.; Gouda, A.V. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia*. V.78, p.451-454, 2007.
21. Yamamoto and Gaynor. Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer". *Journal of Clinical Investigation*. 107 (2): 135, 2001.
22. Winter, C.A., E.A. Risley & G.W. Nuss (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol.* 3: 544-7.

Table 1. ALT, AST and creatinine (mean ± SD) using a Cobas Mira apparatus (Roche) using conventional kits BIOCLIN®.

| <i>Dosage</i> | <i>Morus alba</i> | <i>Nimesulide</i> | <i>Propyleneglycol 20 %</i> |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| | <i>mean ± SD</i> | <i>mean ± SD</i> | <i>mean ± SD</i> |
| <i>ALT (U/L)</i> | 76,5±31,6 | 55,5±8,76 | 53,0±14,6 |
| <i>AST (U/L)</i> | 130,5±32,10 | 130,2.±14,26 | 132,7±20,94 |
| <i>Creatinine (mg/dL)</i> | 0,15±0,078 | 0,19±0,086 | 0,22±0,056 |

Figure 1. Inhibition of inflammatory process following treatment with nimesulide and hydroethanolic 70 % extract of *Morus alba* leaves.



**Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de
Morus Alba L. (Moraceae)**

**Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of crude extract obtained of
Morus Alba L. (Moraceae)**

RESUMO

O presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroetanólico e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica das folhas de *Morus alba* L. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Prothoteca zophii*. As frações que apresentaram melhores respostas para a atividade antimicrobiana foram acetato de etila e clorofórmica com CIM de 256 µg/mL. Não foi possível detectar atividade antimicrobiana para *Aspergillus fumigatus* em nenhuma das concentrações testadas.

A citotoxicidade do extrato hidroetanólico foi avaliada através de culturas de células de ovário de hamster chinês (CHO) e células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929, determinando o índice de citotoxicidade (IC₅₀). O IC₅₀ foi de 0,34 mg/mL para as células CHO e 3,24 mg/mL para as células NCTC 929.

De modo geral, as frações acetato de etila e clorofórmica das folhas de *M. alba* L. apresentaram moderada atividade antimicrobiana e o extrato bruto demonstrou ação citotóxica *in vitro* frente as células CHO e NCTC 929.

ABSTRACT:

This study evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of hydroethanolic extract and hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol fractions from *Morus alba* L. leaves. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Prothoteca zophii*. The fractions that better responded the antimicrobial activity were ethyl acetate and chloroform with CIM of 256 µg/mL. It was unable to detect antimicrobial activity for *Aspergillus fumigatus* in the tested concentrations. The cytotoxicity of the hydroethanolic extract was evaluated by cell cultures of chinese hamster ovary (CHO) and connective tissue of mouse clone 929 (NCTC), determining the level of cytotoxicity (IC₅₀). The IC₅₀ obtained was 0.34 mg/mL for CHO and 3.24 mg/ml for NCTC 929 cells.

In general, ethyl acetate and chloroform fractions from *M. alba* L. leaves showed moderate antimicrobial activity and its extract presented *in vitro* cytotoxicity against CHO and NCTC 929 cells.

Palavras-chave: *Morus alba* L., Atividade Antimicrobiana, Citotoxicidade, Moraceae.

Key words: *Morus alba* L., Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, Moraceae.

INTRODUÇÃO

Morus alba L. é uma espécie pertencente à família Moraceae, nativa da China e conhecida popularmente como amoreira branca. Suas folhas, raízes e galhos são usados como hipoglicemiante, antipirético, hepatoprotetor, anti-inflamatório, antioxidante e no tratamento dos sintomas do climatério (Chen et al., 1995; Yen et al. 1996; Zhishen et al., 1999; Choi et al. 2005). Nas folhas de *M. alba* foram identificados flavonoides como quercetina e rutina e o alcaloide 1-desoxinojirimicina (Kim et al., 1999; Kimura et al., 2004).

Muitas espécies vegetais apresentam atividades antimicrobianas devido às propriedades apresentadas pelos compostos sintetizados no metabolismo secundário. Os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (Gotlieb,

1981). Os alcaloides e as substâncias fenólicas, como fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas e flavonas são os principais grupos de compostos extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas (Singh et al., 2002, Hatano et al., 2005; Esquenazi et al., 2002). Essas propriedades podem ser detectadas, principalmente, por meio da observação de sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismo (Souza et al., 2000). O estudo da atividade antimicrobiana de compostos naturais é instigante, visto que o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos mais diversos tipos de antibióticos é cada vez maior, além da ocorrência de efeitos colaterais como diarreias e vômitos (Aderinokun et al., 1999).

Demonstrada a atividade antimicrobiana para a espécie vegetal avaliada é importante também conhecer a citotoxicidade que a mesma pode apresentar. Atualmente as substâncias selecionadas pelos testes em cultura de células estão sendo avaliadas em modelos experimentais de câncer, utilizando animais de laboratório (Carvalho, 2006).

Diante dos diversos usos populares e da composição química dos extratos de *Morus alba* L., o presente trabalho teve como objetivos: investigar a atividade antibacteriana, antifúngica e algicida *in vitro* do extrato hidroetanólico das folhas de *M. alba* e de suas frações frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Prothoteca zophii*. Assim como determinar a citotoxicidade *in vitro* frente às células de ovário de hamster chinês (CHO) e células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas de *Morus alba* L. foram coletadas na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma amostra do material vegetal foi identificada e depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, conforme exsicata SMDB 13.079.

Extração e fracionamento

O extrato foi obtido por maceração à frio do material vegetal em pó (80 g) com solução hidroetanólica 70% na proporção 2:8 (p/v) durante 30 dias. Em seguida, o extrato foi concentrado, liofilizado e uma parte (20 g) submetida a extrações sucessivas com solventes orgânicos de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, obtendo-se respectivamente as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e frações utilizou-se o método de microdiluição em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards CLSI M27 A3 (2008) para leveduras, CLSI M7 A6 (2003) para bactérias e CLSI M38 A (2002) para fungos filamentosos, determinando assim a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Preparação das placas de microdiluição

Para a execução dos testes foram utilizadas placas estéreis de microdiluição com cavidade com capacidade de 500 μ L, dispostas em 8 linhas e 12 colunas, totalizando 96 cavidades.

Preparação do inóculo

Os inóculos do fungo leveduriforme e de *Prototheca zopfii* foram preparados a partir de cultivos em ágar Sabouraud durante 48 h a 30 °C. A seguir preparou-se uma suspensão em salina 0,85% esterilizada, ajustando-se a turvação dos microrganismos em espectrofotômetro até se obter transmitância equivalente a solução-padrão da escala de Mc Farland 0.5 em comprimento de onda de 530 nm. A suspensão de trabalho foi obtida pela diluição 1:50, no

meio RPMI-1640, caracterizando-se em inóculo prévio. Esse, foi novamente diluído a 1:20 no mesmo meio. As placas com os patógenos foram incubadas a 35 °C durante 48 h.

A preparação do inóculo das espécies bacterianas foi realizada de modo similar, substituindo-se apenas os meios agar Sabourand e RPMI-1640, por agar Muller-Hinton (MH) e caldo Muller-Hinton. Os inóculos foram obtidos a partir de bactérias ativadas através de cultivos em ágar Muller Hinton durante 24 h a 35 °C. A seguir foi preparada uma solução em salina 0,85% esterilizada, ajustando-se a turvação em espectrofotômetro até obter transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de Mc Farland 0,5 em comprimento de onda de 630 nm. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:10 com meio líquido caldo Mueller-Hinton. As placas com os patógenos bacterianos foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

O inóculo para o fungo filamentoso foi preparado em ágar batata-dextrose durante 7 dias por 35 °C. Decorrido esse período, as colônias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de salina 0,85% esterilizada. A seguir, essa suspensão de conídios foi transferida para um tubo esterilizado, onde a densidade foi ajustada em espectrofotômetro a 530 nm, até atingir 80 a 82 % de transmitância. A suspensão foi diluída a 1:50 no meio de cultura. A seguir uma quantidade de 100 µL foi inoculada nas placas de microdiluição.

Inoculação no meio de cultura

As cavidades das placas de microdiluição contendo 100 µL do extrato bruto ou frações de *M. alba* foram inoculadas com 100µl de suspensão do inóculo com levedura e 10 µL de suspensão bacteriana. A cavidade do controle positivo continha 0,1 mL do inóculo e 0,1 mL do meio, sem extrato ou frações. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As concentrações do extrato variaram de 512 a 4 µg/mL.

Microrganismo

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 44373, *Aspergillus fumigatus* isolado clínico e *Prototheca zopfii* isolado clínico, disponíveis no Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM

Incubação e leitura do teste

As microplacas inoculadas com bactérias foram incubadas a 35 °C por 24 h, e as inoculadas com fungos foram incubadas a 35 °C por 48 h. A leitura foi realizada após período de incubação, mediante comparação visual com o controle de crescimento positivo. Os resultados foram expressos como concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração da amostra testada onde não foi visualizado crescimento do microrganismo.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com cultura de células NCTC 929

Os ensaios foram realizados *in vitro* utilizando a cultura de linhagem de células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929 (fibroblastos de mamíferos ATCC CCL-1) por incorporação do corante vermelho neutro (Nogueira et al. 2008). As células foram mantidas no meio mínimo essencial de Eagle (MEM) com 0,1 mM de 146 aminoácidos não essenciais, 1 mM de sódio e suplementado com 10 % de soro bovino fetal. As células de aderência foram tratadas com tripsina e a suspensão celular ajustada para 2×10^5 células/mL. O volume de 0,2 mL da suspensão celular foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços e colocado em incubadora de CO₂ a 37 °C por 24 h. Em seguida, as células foram expostas ao extrato das folhas de *M. alba* nas concentrações de 0,78 mg/mL; 1,56 mg/mL; 3,12 mg/mL; 6,25 mg/mL e como controle utilizou-se o meio de cultura. Cada concentração foi testada em

triplica e o vermelho neutro extraído com solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Foi determinada a absorvância a 540 nm em leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* com cultura de células CHO

Os ensaios foram realizados *in vitro* utilizando cultura de linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO) por incorporação do corante vermelho neutro (Nogueira et al. 2008). As células foram mantidas no caldo RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino. As células de aderência foram tratadas com tripsina e a suspensão celular ajustada para 2×10^5 células/mL. O volume de 0,2 mL da suspensão celular foi adicionado a cada poço da placa de 96 poços e colocado em incubadora de CO₂ a 37 °C por 24 h. Em seguida, as células foram expostas ao extrato das folhas de *M. alba* nas concentrações de 0,19 mg/mL; 0,39 mg/mL; 0,78 mg/mL; 1,56 mg/mL; 3,12 mg/mL e como controle utilizou-se o meio de cultura. Cada concentração foi testada em triplica e o vermelho neutro extraído com solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Foi determinada a absorvância a 540 nm em leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

RESULTADOS

Os microrganismos utilizados neste ensaio abrangeram a classe dos Gram-positivos (*S. aureus*), Gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa*), fungo filamentosos (*A. fumigatus*), fungo leveduriforme (*C. albicans*) e ainda a alga unicelular *P. zopfii*. Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana estão apresentados na Tabela 1. *E. coli* foi sensível à fração acetato de etila na concentração de 256 µg/mL (CIM), *S. aureus* apresentou sensibilidade frente ao extrato hidroetanólico bruto (512 µg/mL) e as frações butanólica (512 µg/mL) e clorofórmica (256 µg/mL); *P. aeruginosa* e *P. Zophii* foram sensíveis ao extrato e

às quatro frações, *C. albicans* foi sensível ao extrato hidroetanólico (512 µg/mL) e à fração acetato (256 µg/mL). *Aspergillus fumigatus* não apresentou sensibilidade nas concentrações testadas. Os resultados das concentrações inibitórias mínimas evidenciaram componentes químicos no extrato e nas frações com potencial efeito antibacteriano e antifúngico.

Tabela 1.

A atividade citotóxica em células CHO apresentou IC₅₀ (índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50 %) na concentração de 0,34 mg/mL, com intervalo de confiança superior e inferior de IC_{50S} 0,44 mg/ml e IC_{50I} 0,24 mg/ml, respectivamente. Para as células NCTC 929 o IC₅₀ foi obtido na concentração de 3,24 mg/ml, com IC_{50S} de 3,53 mg/ml e IC_{50I} de 2,98 mg/ml.

DISCUSSÃO

Várias razões levam pesquisadores a estudar a ação antimicrobiana dos metabólitos secundários, uma delas é o aumento da resistência bacteriana frente aos agentes antimicrobianos tradicionais. Segundo Bylka et al. (2004), a atividade antimicrobiana de um extrato pode ser devido a presença de flavonoides e taninos, os quais estão presentes nas folhas de *M. alba*, sugerindo uma possível atividade antimicrobiana. De acordo com Holetz et al. (2002), concentrações abaixo de 100 µg/mL apresentam boa atividade antimicrobiana, entre 100-500 µg/mL moderada e entre 500 e 1000 µg/mL fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. As frações que apresentaram moderada atividade antimicrobiana foram acetato de etila para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* e a fração clorofórmica para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *P. zopfii*. Esses microrganismos são responsáveis por diversas patologias como doenças respiratórias,

infecções intestinais, urinárias e septicemia, sendo de grande importância a descoberta da atividade antimicrobiana das folhas de *M. alba* L. frente a estes patógenos visando uma futura aplicação terapêutica (Urzua et al., 1998; Trabulsi et al., 1999). O extrato hidroetanólico e a fração butanólica apresentaram fraca atividade. A fração hexânica apresentou moderada atividade frente a *P. zophii*, patógeno oportunista de importância clínica em pacientes imunocomprometidos e de difícil erradicação com as drogas antifúngicas atualmente disponíveis (Lass et al., 2004).

Através da cultura de linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) por incorporação do corante vermelho neutro, foi determinado a IC_{50} do extrato de *M. alba* na concentração de 0,34 mg/mL. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Albuquerque (2009), que ao expor células CHO a diferentes concentrações do extrato de *Plathymentia reticulata* Benth. obteve IC_{50} de 0,331 mg/mL. No ensaio de citotoxicidade por meio da exposição do extrato de *M. alba* as células NCTC 929, foi obtido IC_{50} na concentração de 3,24 mg/mL, valor superior ao encontrado frente à exposição do extrato as células CHO (0,331mg/mL), demonstrando maior citotoxicidade diante das células CHO. Essa diferença nos valores obtidos para concentração inibitória varia de acordo com o tipo de célula usada no ensaio. Segundo National Institute of Health (1996) (NIH), dados *in vitro* podem ser úteis na estimativa das doses iniciais para os testes *in vivo* de toxicidade aguda, que irão reduzir o número de animais necessários para tais determinações.

O extrato de *M. alba* possui ação citotóxica *in vitro* frente as células testadas, podendo ser avaliado em modelos experimentais de câncer, utilizando animais de laboratório. Os dados obtidos encorajam a realização de novos estudos a fim determinar as substâncias que contribuem para a atividade biológica, entender seu mecanismo de ação e avaliar a toxicidade, visando uma possível aplicação farmacêutica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aderinokun GA, Lawoyin JO, Onyeaso CO. Effect of two common Nigerian chewing sticks on gingival health and oral hygiene. *Odont Trop*, 1999; 22(87): p.13-8.
2. Albuquerque LBL. Estudos *in vitro* e *in vivo* da *plathymenia reticulata* benth. [Dissertação]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba; 2009.
3. Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA. Natural flavonoids as antimicrobial agents. *J Am Nutraceutical Assoc*. 2004; 7:24-31.
4. Carvalho JE. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *MultiCiência*, Campinas, 2006; 7:18.
5. Chen FJ, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanism of extracts from mulberry leaves and cortex mori radices in streptozotocin induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi*. 1995; 115:476-482.
6. Choi EM, Hwang JK. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia*. 2005, 76:608-613.
7. Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. *Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard*. 3. ed. Wayne, PA: CLSI, 2008. M27-A3.
8. Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2003

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2002.
10. Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MMFS, Rodrigues HM, Tostes JBF, Rozental S, Silva AJR, Alviano CS. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, 2002, 53: 647-652.
11. Gotlieb, O. New and underutilized plants in the Américas: solution to problems of inventory through systematics. *Interciência*, 1981; 6: 22-9.
12. Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa T, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 2005; 66: 2047–2055.
13. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7):1027-31.
14. Kim HB, Choung WY, Ryu KS. Sensory characteristics and blood glucose lowering effect of ice-cream containing mulberry leaf powder. *Korean J. Seric. Sci.* 1999:129-134.
15. Kimura T, Kiyotaka N, Yuko S, Kenji Y, Masahiro S, Kohji Y, Hiroshi S, Teruo M. Determination of 1 Deoxynojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52:1415-1418.
16. Lass-florl C, Fille M, Gunsilius E, Gastl G. Disseminated Infection with *Prototheca zopfii* after Unrelated Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Journal of Clinical. Microbiology*. 2004; 42(10): 4907-4908.

17. Nogueira DR, Sangoi MS, Silva LM, Todeschini V, Dalmora SL. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. *J. Sep. Sci.* 2008; 31:3098.
18. Singh B, Sahu PM, Singh S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. *Fitoterapia.* 2002; 73:153-155.
19. Souza CAS, Avancini CAM, Wiest JM. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. – Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* São Paulo, 2004; 37:6.
20. Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. *Microbiologia* 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
21. Urzua A, Caroli M, Vasquez L, Mendonza L, Wilkens M, Tojo E. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.* 1998, 62: 251-254.
22. Yen GC, Wu S, Duh PD. Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of Mulberry (*Morus alba* L.) *Journal of agricultural and food chemistry.* 1996, 44(7); 1687-1690.
23. Zhishen JT, Mengcheng WJ. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. *Food Chemistry.* 1999, 64: 555–559.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *Morus alba* L. ($\mu\text{g/mL}$), frente a seis diferentes microrganismos.

| Microrganismos | CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| | EB | Fr. AcOEt | Fr. ButOH | Fr. Clo. | Fr. Hex. |
| <i>Escherichia coli</i> | >512 | 256 | >512 | >512 | >512 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 512 | >512 | 512 | 256 | >512 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 512 | 256 | 512 | 256 | 512 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | >512 | >512 | >512 | >512 | >512 |
| <i>Prototheca zopfii</i> | 512 | 512 | 512 | 256 | 256 |
| <i>Candida albicans</i> | 512 | 256 | >512 | >512 | >512 |

Concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato bruto e frações das folhas de *Morus alba* L. EB = extrato bruto, Fr. AcOEt = fração acetato de etila, Fr. ButOH = fração butanólica, Fr. Clo = fração clorofórmica, Fr. Hex = fração hexânica.

4. DISCUSSÃO GERAL

As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das ações terapêuticas. Muitas plantas não apresentam constituintes químicos conhecidos, necessitando de pesquisas e estudos de controle de qualidade (MACIEL et al., 2002). Estudos científicos como parâmetros físico-químicos e indicações terapêuticas envolvendo espécies vegetais proporcionam melhor aceitação médica, respaldados pela comprovação de sua eficácia, segurança e qualidade (QUEIROZ, 2008). Além desses, a padronização das condições de cultivo, tipo de solo, clima, irrigação, época do ano, período do dia, órgão vegetal e a ausência de contaminantes são fatores que asseguram a qualidade das drogas vegetais (OMS, 2003).

As características físico-químicas das drogas vegetais contribuem para a qualidade dos fitoterápicos e para o desenvolvimento de novos medicamentos (BUDEL et al., 2004). Desta forma, os resultados obtidos através de metodologias preconizadas pela Farmacopéia Brasileira (1988) e pela OMS (1998) são úteis no estabelecimento de parâmetros inexistentes nos compêndios oficiais para *Morus alba* L.

A pureza das amostras é um dos parâmetros utilizados no controle de qualidade das drogas vegetais e pode ser determinada através do conteúdo de materiais estranhos, teor de umidade e cinzas. Através da dessecação as drogas vegetais perdem água e matéria volátil, que nas amostras analisadas de *M. alba* representou 9,73; 11,15; 12,89; 8,56% respectivamente, nas quatro estações. Estes resultados são importantes no armazenamento, prevenindo a hidrólise de constituintes químicos e o crescimento microbiano (F. BRAS, 1988). A determinação da umidade na planta seca torna-se importante para a utilização da matéria-prima vegetal na produção industrial de fitoterápicos, como verificado nas amostras comerciais de folhas de *Mikania glomerata*, as quais apresentaram um teor de umidade de 9,55%, estando de acordo com o limite de 10% preconizado para a espécie (ALVARENGA et al., 2009). Os teores de umidade encontrados em *M. alba* estão de acordo com o teor máximo estabelecido nas diferentes farmacopéias, os quais variam entre 8 -14% para drogas vegetais.

O excesso de materiais estranhos está relacionado ao processo inadequado de separação das diferentes partes vegetais ou limpeza incorreta da planta (MELO et al., 2007). Nas folhas de *M. alba* foram encontrados, respectivamente, nos meses de março e junho 0,02 e 0,01% de material estranho, o qual mostrou-se ausente nos meses de setembro e dezembro.

Esses valores estão de acordo com o permitido pela Farmacopéia Brasileira (2000) que é de no máximo 2%, para a maioria das drogas vegetais.

O teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis e o teor de cinzas insolúveis em ácido fornece teores de sílica e constituintes silicosos, sendo utilizados como referências de qualidade e caracterização da matéria-prima vegetal (FARIAS, 2003; F. BRAS., 1998). Nas quatro estações em que se realizaram as determinações de cinzas totais foram obtidos 20,48; 9,57; 11,88; 17,86% e 5,68; 0,75; 1,67; 3,50% de cinzas insolúveis em ácido, respectivamente.

O teor de cinzas totais obtido na coleta de março foi maior que o encontrado nas folhas de *Ipomoea pés-caprae* (Convolvulaceae) (12,51%) e nas folhas de *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) (10,32%), entretanto, o teor de cinzas insolúveis no referido mês, foi menor que nas folhas de *I. pés-caprae* (12,60%) e *D. elliptica* (7,46%), respectivamente. (BARNI, et., 2008; SOARES, et al., 2005). De modo geral, o teor de cinzas totais obtido nas quatro estações foi maior que o recomendado para espécies como *Salvia officinalis* (8%) e *Operculina macrocarpa* (14%), (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1996; F. BRAS., 1959). Não existem teores máximos para cinzas totais e insolúveis estabelecidos oficialmente para *M. alba*, portanto, estes valores podem ser estabelecidos como parâmetros de qualidade.

O teor de mucilagem para *M. alba* determinado pelo índice de intumescimento foi de 5,83; 5,73; 7,95; 7,1 mL. Estes valores foram superiores aos encontrados nas folhas de *D. elliptica* e *D. rugosa*, os quais foram de 4,1% e 2,2%, respectivamente (JÁCOME, et. al., 2010).

As plantas com forte sabor amargo contribuem no processo digestivo, pois estimulam as secreções do trato gastrointestinal, especialmente do suco gástrico (MORS et al., 2000). O extrato aquoso de *M. alba* apresentou substâncias amargas com índices de amargor de 1,037; 1,037; 0,84; 0,84 unidades/g que comparado com *Baccharis cylindrica* (153,3 u/g), é baixo porém próximo ao encontrado em *Caesalpinia férrea* de 1,68 unidades/g (COSTA, 1987; FRASSON, et al., 2003).

Os rendimentos dos extratos hidroetanólicos obtidos nas quatro estações foram de 18; 29,61; 26,47; 24,35%, semelhante ao encontrado no extrato etanólico bruto das folhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) de 25,78% (FIUZA et al., 2008). Estes valores colaboram no estabelecimento de parâmetros preliminares de controle de qualidade para a espécie em estudo. As características organolépticas como sabor ligeiramente amargo do extrato aquoso de *M. alba*, as pequenas variações de cor e pH neutro a levemente ácido auxiliam na identificação.

Na determinação dos metabólitos secundários foram verificados maiores teores de polifenóis (6,943 mg ác.gál./g) e flavonóides (4,893 mg rut./g) no verão, estação em que ocorre uma maior exposição à luz. Segundo Silva et al., (2006), o fotoperíodo é considerado uma das principais variáveis que influenciam a produção de metabólitos secundários, fato comprovado no estudo realizado por Dudai et al., (1992), onde ocorreu aumento no teor de compostos fenólicos em *Origanum vulgare* em dias longos. Borella et al., (2001), encontrou maiores teores de flavonóides em *Bacharis trimera* coletada no verão em relação às plantas colhidas na primavera e no inverno.

Entre os fitoterápicos atualmente estudados, os flavonóides são destacados pelas suas ações terapêuticas demonstradas tanto experimentalmente quanto em humanos. O consumo destes compostos vem crescendo no tratamento dos sintomas da menopausa. Além disso, são utilizados tradicionalmente como anti-inflamatório, antimicrobiano, antineoplásico e antioxidante (MACHADO, et al., 2008).

As análises biológicas foram realizadas com o extrato de *Morus alba* obtido a partir da coleta de dezembro, o qual demonstrou maior teor de polifenóis e flavonóides. O extrato hidroetanólico de *Morus alba* apresentou 20,24±6,94% de inibição do tecido granulomatoso, demonstrando significativa atividade anti-inflamatória, enquanto que a nimesulida apresentou 21,42±6,52%. Esse modelo utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória tem sido adotado por outros pesquisadores e demonstrado boa reprodutibilidade. Pupo et al., (2008), através do método do granuloma analisou o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico de *Bouchea fluminensis* (Verbenaceae) administrado via oral nas doses de 25, 50 e 100mg/kg e verificou uma significativa diminuição nos granulomas dos animais tratados.

O extrato etanólico das folhas de *Conocliniopsis prasiifolia* administrado via oral apresentou efeito anti-inflamatório pelo método de indução de edema de pata por carragenina, sendo a atividade atribuída aos flavonóides presentes no extrato (SILVA et al., 2005).

A avaliação das atividades farmacológicas por diversos métodos é tão importante quanto à avaliação toxicológica, visando assegurar o uso seguro de um fitoterápico com ausência de toxicidade renal e hepática. Teixeira et al., (2009), avaliaram os efeitos tóxicos de uma solução aquosa de *Hypericum perforatum* (2mg/kg) e *Piper methysticum* (85,7mg/kg) administrada por gavagem durante 30 dias. Através das dosagens de AST, ALT e creatinina no plasma dos animais tratados com ambos os fitoterápicos, foi verificada ausência de alteração nos parâmetros bioquímicos, com valores de AST, ALT e creatinina, respectivamente, de 215,8 U/L, 68,5 U/L e 0,85 mg/dL. Brandt et al., (2009) demonstraram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Vitex megapotamica* utilizada como anti-inflamatória, não causou danos

hepáticos e renais na dosagem de 300 mg/kg, não havendo diferença significativa nos resultados obtidos de ALT e AST e creatinina, quando comparados ao grupo controle.

O tratamento realizado com extrato hidroetanólico de *M. alba* e nimesulida, quando comparado ao controle negativo de propilenoglicol, não apresentou alterações nos níveis de AST, ALT e creatinina, com valores de 130,5 U/L; 76,5U/L e 0,15 mg/dL para o grupo tratado com o extrato e 132,7 U/L; 53,0 U/L e 0,22 mg/dL para o grupo controle negativo, sugerindo ausência de danos hepáticos e renais.

O screening com extratos vegetais é de extrema importância devido à possibilidade de encontrar substâncias com atividade antimicrobiana mais eficaz e menos tóxica que as existentes (LIMA et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007). No estudo realizado com *M. alba*, as frações acetato de etila e clorofórmica demonstraram maior atividade frente aos microrganismos testados que as frações hexânica e butanólica. A fração clorofórmica apresentou moderada atividade antimicrobiana frente a *S.aureus*, *P. aeruginosa* e *P. zopfii*.

Simões et al., (2004) afirmaram que o fracionamento do extrato bruto com solventes de polaridade crescente possibilita inferir as possíveis classes de substâncias extraídas nas diferentes frações de acordo com as suas polaridades. Os lipídios, ceras e furanocumarinas são extraídos através da fração hexânica, com a fração clorofórmica obtém-se antraquinonas, alcalóides e cardiotônicos e com as frações acetato e butanólica extraem-se flavonóides, cumarinas e taninos. De acordo com estudos anteriores, metabólitos secundários como flavonóides e alcalóide estão presentes nas folhas de *Morus alba*, os quais possuem atividades antimicrobianas (SIMÕES et al., 2004). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os encontrados por Fukai et al., (2005), que ao analisarem compostos isolados de espécies de *M. alba* obtiveram MIC > 100 µg/ml para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

No ensaio de citotoxicidade o extrato hidroetanólico de *M. alba* apresentou IC₅₀ na concentração de 0,34 mg/ml frente as células CHO e 3,24 mg/ml frente as células NCTC 929, demonstrando potencial citotóxico perante as células testadas. Em um estudo realizado com o extrato etanólico de *Synadenium umbellatum* foi verificado potencial citotóxico sobre células da medula óssea de camundongos por meio da exposição a diferentes concentrações do extrato, por um período de 12, 24 e 48 horas, obtendo IC₅₀ na concentração de 7,9; 5,2 e 3,6 mg/mL, respectivamente (VALADARES, et al., 2007). De acordo com Turatti (2008), o extrato seco dos frutos de *Syzygium cumini* apresenta potencial citotóxico com IC₅₀ de 0,4 mg/ml frente às células CHO, o mesmo foi observado no estudo realizado por Nam et al., (2002) com o extrato aquoso das raízes de *Morus alba*, exibindo citotoxicidade sobre células K-562 e outras linhagens celulares.

5. CONCLUSÕES

- Os parâmetros físico-químicos estabelecidos são úteis no controle de qualidade de *Morus alba* L.
- Os maiores teores de polifenóis e flavonóides foram verificados com o extrato de *M. alba* preparado a partir da coleta realizada no verão.
- O extrato de *M. alba* inibiu significativamente a formação de tecido granulomatoso em ratos.
- Os teores de polifenóis e flavonóides do extrato hidroetanólico de *M. alba* podem justificar o seu uso como anti-inflamatório.
- *M. alba* na dose e no período avaliado apresentou ausência de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.
- As frações acetato de etila e clorofórmica de *M. alba* apresentaram atividade antimicrobiana.
- O extrato de *M. alba* apresentou ação citotóxica *in vitro* frente as células CHO e NCTC 929.

6. REFERÊNCIAS

- ADER, J.; CARRÉ, F.; DINH, X., AT. **Fisiologia**. 2ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2006.
- ALVES, N. M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental do extrato etanólico da casca do Guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Brasília. 2007.
- ALVARENGA, F.C.R.; GARCIA, E.F.; BASTOS, E.M. A. F.; GRANDI, T. S. M.; DUARTE, M.G.R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.19, n. 2, 2009.
- ANDALU, N.; VARDACHARYULU, CH. Effect of mulberry leaves on diabetes. **Int. J. Diab. Dev. C.** v. 21, n.3, p. 147-51, 2001.
- ANDREWS, J. M.; **J. Antimicrob. Chemother.** v. 48, n. 5, 2001.
- ANVISA. Guia para a avaliação da segurança de produtos cosméticos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 14 Out.2011.
- ANDALLU, B.; SURYAKANTHAM, V.; SRIKANTHI, B. L.; REDDY, G. K. Effect of mulberry *Morus indica* L. Therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. **Clinica Chimica Acta.** v. 314, p. 47–53, 2001.
- ANDRIOLO, A, BORGES, D. R. Enzimologia clínica em doenças do fígado. **Rev. Bras. Patol. Clin.** V.25, n.3, p. 98-8, 1989.
- BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; DIAS, T.C.S.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 17, p. 78–82, 2005.
- BAILEY, P. J. Biochemical study of the cotton pellets granuloma in rats. **Biochem. Pharmacol.** v. 31, n.7, p. 1213-8,1982.
- BALUNAS, M. J., KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences.** V. 78, n.5, p. 431-41, 2005.
- BARBOSA-FILHO J.M., NASCIMENTO-JUNIOR F.A., TOMAZ A.C.A., ATHAYDE-FILHO P.F, SILVA M.S., CUNHA E.V.L., SOUZA M.F.V., BATISTA L.M., DINIZ M.F.F.M.; Natural products with antileprotic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 17, p. 141 - 148, 2007.
- BARNI,S.T.; FILHO, V.C.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.19, n.4, p. 865-870, 2009.
- BARROS, G.C.; TRESVENZOL, L.M.F.; CUNHA, L.C.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Composicao Quimica, Atividade Antibacteriana e Avaliacao da Toxicidade

Aguda de *Vetiveria zizanoides* L. Nash (Poaceae). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 28, n.4, p. 531-7, 2009.

BORELLA, J.C. et al. Influência da adubação mineral (NP- K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* Less. (Asteraceae) - Carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n.1, p.101-4, 2001.

BRANDT, A.P.; OLIVEIRA, L.F.S.; FERNANDES, F.B., ALBA, J. Avaliação *in vivo* do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). **Rev. Bras. Farmacogn.** V.19, n.2A, p. 388-393, 2009.

BENAVENTE, G. O.; CASTILLO J. Review: Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 6185-6205, 2008.

BIRT, D. F., HENDRICH, S., WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacol. Ther.** p.157–177, 2001.

BITTENCOURT, P. L. S. L. C. **Fígado e drogas**. in: fígado e drogas: compêndio de hepatologia. 2ªed. São Paulo; p. 264-85, 1985.

BRANSOME, E. D. Financing the care of diabetes mellitus in the U.S. **Diabetes Care**, v. 15, p.1-5, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº48**, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRITISH Herbal Pharmacopoeia. 4. ed. Bournemouth: **British Herbal Medicine Association**, 1996.

BYAMBAA, E.; KUNINORI, S.; TAKUYA, K.; KEIKO, K.; ERDEMBILEG, A.; MASAYUKI, Y.; YOSUKE, Y. Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves and Their Major Flavonol Quercetin 3-(6-Malonylglucoside) Attenuate Atherosclerotic Lesion Development in LDL Receptor-Deficient Mice. **J. Nutr.** p. 729-734, 2004.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 14, n. 1, 2004.

BOGLIOLO, L. Inflamações, **Bogliolo Patologia** cap. 7, pag. 187. Ed Guanabara Koogan. 2011.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.**, v.14, p.401-418, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, M.; Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. v. 71, p.58-65, 2000.

CONTRAN R.S, KUMAR V., ROBBINS S. L, SCHOEN F. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.15 e 469, 1997.

COSENZA, G. P. **Efeito do extrato bruto das folhas de *echinodorus macrophyllus* e de frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas. Belo Horizonte. 2010.

CHEN, Y. C., YANG, L. L., LEE, T. J. F. Oroxylin a inhibition of lipopolysaccharide-induced inos and cox-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kb activation. **biochem. pharmacol.** V.59, p.1445–1457, 2000.

CHRISTOFILOLOGIANNIS, P.; **Aquaculture**. v.196, n. 297, 2000.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p.480, 2004.

CONGER, J. Prophylaxis and treatment of acute renal failure by vasoactive agents: the fact and the myths. **Kidney Int Suppl.**64:S23-6, 1998.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1485, 2005.

CHEN, F. J.; NAKASHIMA, N.; KIMURA, I.; KIMURA, M. Hypoglycemic activity and mechanism of extracts from mulberry leaves and cortex mori radices in streptozotocin induced diabetic mice. **Yakugaku Zasshi**. v. 115, p. 476-482, 1995.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and cytokines in RAW264.7 macrophages. **Fitoterapia**. v.76, p. 608-613, 2005.

CLEMES, S.M; ZENI, A.L.B; KRETZSCHMAR, M. Avaliação química de folhas de plantas medicinais nativas utilizadas no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí (PNSI) Chemical evaluation of leaves from medicinal native plants used in Itajaí Mountainrange National Park and surroundings. **Rev. Bras. Farm.** V.89, n.1, p. 10-12, 2008.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. **Columbia University Press**, p. 195-198, 1981

CRUZ, A. S. **Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos** (Tese). São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003.

CRUZ, A. S., CUPPOLINI, K.M.; MARTINEZ, CHO, SALLES, G.L.F. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. inst. adolfo lutz**. v.47, p. 51-57, 1987.

CORRADELLO, E. F. A. **Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio, a trama de um segredo milenar**. São Paulo: Ícone, p. 101, 1987.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S.S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, p. 785-797, 2008.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987. v. 3.

DAGUANO, J.K.M.F.; SANTOS, C.; ROGERO, S.O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Matéria (Rio de Janeiro)** v.12; n.1. 2007.

DALMORA, M. E. A. **Interação do piroxicam com microemulsão catiônica e β -ciclodextrina: Formulação in vitro e avaliação biológica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Brasil, 1996.

DOERN, G. V.; Tubert, T. A. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.32, n. 259, 1988.

DONADIO, L. C. **Dicionário das frutas**. Jaboticabal. p. 300, 2007.

DONADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: FUNEP, p. 279, 1998.

DUDAI, N.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; PALEVITCH, D.; HALEVY, A.H. Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affect by environmental conditions and flowering. **Physiologia Plantarum**, v.84, p. 453-459, 1992.

ELISABETSKY, E. **Remédio tem ciência? V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Medicinais. Livro de resumos**. Joinville, SC, 2006.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E.C. **Sistema Urinário. In: Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 4a ed., 2355-2374, 1997.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC. 2003

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2. ed. São Paulo: Siqueira. 1959.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4.ed. Parte I. São Paulo: Atheneu Editora, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ed. Parte I. São Paulo: Atheneu Editora, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ed. Parte II, Fascículo 1. São Paulo. Atheneu Editora, 1996.

FISHER, D. C. H. Controle de Qualidade de Fitoterápicos, In: Gil, E.S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, p. 289-327, 2007.

FILHO, J.M.B; PIUVEZAM, M.R.; MOURA, M.D.; SILVA, M.S.; LIMA, K.V.B.; LEITÃO DA-CUNHA, E.V. FECHINE, I.M. TAKEMURA, O.S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Rev. bras. farmacogn.** v.16, n. 1, 2006.

FIUZA, T.S.; REZENDE, M.H.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; BARA, M.T.F.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *eugenia uniflora* L. (myrtaceae). **Revista eletrônica de farmácia**. v.2, n.1, 2008.

FRAZOTTI, E. M. **Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: *Morus nigra* L., *Plectranthus ornatus codd.*, *ipomoea cairica* (L) *sweet e pouteria torta* (mart.) *radlk.*** 108f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, 2006.

FRANCO, L. C. L Fitoterapia em ginecologia: quando ela é melhor que o resultado. **Notícias acadêmia sul-americana de medicina integrada**. 1º semestre. Fevereiro de 2005.

FRASSON, APZ, BITTENCOURT CF, HEINZMANN BM. Caracterização físico química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Rev. Bras. Farmacog.** V.13, p.35-9. 2003.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5. ed. New Jersey: Wiley-Liss, 2005.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **Int. J. Microcirc. Clin.** v. 15, p. 17-21, 1995.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica Racional**. Guanabara Koogan, 4ª ed., Rio de Janeiro, 2010.

FUKAI, T.; KAITOU. K.; TERADA S. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**. V. 76, p. 708-11, 2005.

GOMES, P. **Fruticultura brasileira**. 13ª ed. São Paulo: Nobel, p. 446, 2007.

GULUBOVA R, BOIADEZHIEV TS. Morphological changes in the endocrine pancreas of the rabbit after the administration of Mulberry extrac. **Eksp Med Morfol.** V.14, n.3, p.166-71, 1975.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S. Hypoglycemic plants – a review. **Fitoterapia**, v. 60, p. 195-224, 1989.

HARBORNE, JB **Phytochemical methods**. 2 ed. Chapman e Hill. p. 288, 1991.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.** v. 96, p. 67-202, 2002.

HERTOG, M. G., FESKENS, E. J., HOLLMAN, P. C., KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342:1007-1011. [[Medline](#)]

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **J. Pediatr.** Rio de Janeiro. v.82, n.5, 2006.

- YEN, G. C.; WU, S.; DUH, P. D. Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of Mulberry (*Morus alba* L.) **Journal of agricultural and food chemistry**. V. 44, p. 1687-1690. 1996.
- YEONG, M. L.; WAKEFIELD, S. J.; FORD, H. C. Hepatocyte membrane injury and bled formation following low dose comfrey toxicity in rats. **Ind.j.exp. Pathol**, v.74, n.1, p.211-217, 1993.
- JÁCOME, P. R.L.R.; OLIVEIRA, V.D.C.; TEIXEIRA, M.A.; MARIANO, M.C.F.; OLIVEIRA, A.B. Comparative pharmacognostic study of leaves of *Davilla elliptica* A. St.-Hil. e *D. rugosa* Poir., Dilleniaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.20, n.3 Curitiba. 2010.
- JOLY, A. B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. Câmara Brasileira do Livro, 1975.
- JULIATTO, S. T. **Amoreira: híbridos mais produtivos**. São Paulo: CATI, p. 23, 1985.
- KIM, Y.S.; GAO, J.J.; LEE, W.C.; RYU, K.S.; LEE, K.R.; KIM, Y.C. Antioxidative Flavonoids from the Leaves of *Morus alba*. **Arch Pharm Res.** v.22, n.1, p.81-85, 1999.
- KIMURA, T.; KIYOTAKA, N.; YUKO, S.; KENJI, Y.; MASAHIRO, S.; KOHJI, Y.; HIROSHI, S.; TERUO, M. Determination of 1 Deoxynojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p.1415-1418, 2004.
- KNEKT, P., JARVINEN, R., REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **Br. Med. J.** p. 478-481.[[Abstract/Free Full Text](#)], 1996.
- KONTOGIORDIS, C.A. HADJIPAVLOU-LITINA, D.J. Non steroidal and anti-inflammatory and anti-allergy agents. **Current Chemistry.** V.9, p.89-98, 2002.
- KUMMER, C.L.; COELHO, T.C. Antiinflamatórios não esteroidais inibidores da ciclooxigenases-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Rev. Bras. Anestesiologia.** v.52, n.4, p.498-512, 2002.
- LE, B. D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. **Animal models of nociception Pharmacology.** v. 53, p.597-652, 2001.
- LEWIS, DA. **Anti-flamatory drugs from plant and marine sources**. Birkhause Verlag, Basel. 1989.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W.R. Loodi, e A. A. Simões. São Paulo, Sarvier, p. 839, 1995.
- LIMA, M.P.; PINTO, D.S.; LIMA, E.S.; FERREIRA, A.G. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) Avaliação da inibição de α -glicosidase por substâncias de *Hortia longifolia* (Rutaceae). **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2011.

LIMA I.O., OLIVEIRA R.A.G., LIMA E.O., FARIAS N.M.P., SOUZA E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 197 - 201, 2006.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MACIEL, M. A. M., ANGELO, C. P.; VALDIR, F. V. J. R. NOEMA, F. G.; AUREA, E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALKINSON, FD. Colchicine: new uses of an old, old drug. **Arch Dermatol.** n. 11, p. 453-457, 1982.

MELO, J.G. MARTINS, J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Bot. Bras.** V.21, n.1, p.27-36, 2007.

MENDES, L.P.M.1; MACIEL, K.M.1; VIEIRA, A.B.R.2; MENDONÇA, L.C.V.1; SILVA, R.M.F.1; ROLIM NETO, P.J. BARBOSA, W.L.R.1; VIEIRA, J.M.S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev. Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 32, n.1, p.121-125, 2011.

MENEZES, M.C.; SOUZA M.M.S.; BOTELHO, R.P. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos de plantas brasileiras sobre bactérias isoladas da cavidade oral de cães. **Rev. Univ. Rural.** v. 24, n.2, p.141-144, 2004.

MIYASHIRO, C. A. H. V. **Avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória do flavonóide rutina e derivados contendo metal de transição.** Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal plants of Brazil.** 6 ed. Algonac, Michigan: Reference Publications, p. 501, 2000.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o laboratório Princípios e Interpretações.** Ed. Educs, 4ª edição. 2003.

MURRAY, P. R.; **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., ASM Press: Washington, 1999.

NASH R. J.; WATSON, A. A.; ASANO, N. In **Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives**; Pelletier, S. W., Ed. Pergamon: Elmsford, NY; V. 11, Chapter 5, p. 345-376, 1996.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Approved Standard - M7-A6**, ed 6, v. 23, 2003.

NAM, S.Y., YI, H.K.; LEE, J.C.; KIM, J.C.; SONG, C.H.; PARK, J.W.; LEE, D.Y.; KIM J.S.; HWANG, E.P.H. *Cortex mori* extract induces cancer cell apoptosis through inhibition of microtubule assembly. **Arch Pharm Res.** V.25, p.191-6, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAAG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Nat. Prod. Rep.** v. 17, p. 1022-37, 2003.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceus plantas. **Nat. Prod. Rep.** v. 11, n. 2, p. 205-18.

NOTELOVITZ, M. Estrogen replacement therapy indications, contraindications and agent selection. **International Journal Gynecology Obstetrics**, London, v. 161, p. 8-17, 1989.

OLIVEIRA, S. T. **Alterações de compostos nitrogenados não protéicos em cães e gatos.** Seminário: UFRGS, 2004. Disponível em: [HTTP://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/alteracoes_nnp.pdf](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/alteracoes_nnp.pdf). Acesso em 25/03/09.

OLIVEIRA, F.P., LIMA, E.O., SIQUEIRA JÚNIOR, J.P., SOUZA, E.L., SANTOS, B.H.C., BARRETO, H.M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 510-516, 2006.

OMS – Quality control methods for plant materials. Geneva, Switzerland, 1998.

OMS – **Who Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations:** thirty seven report. Geneva, Switzerland, 2003.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p. 791-800, 2006.

PUPO, S.C.; PÉREZ DAVISON, G.; MARTINEZ-SÁNCHEZ, G.; TAKEMURA, O.S.; SILVA, A.V.; GONÇALVES, G.F.; DELAPORTE, R.H. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória crônica do extrato etanólico de *Bouchea fluminensis* (Verbenaceae). **Latin American Journal of Pharmacy.** V.27, n. 3, p. 364-8, 2008.

QUEIROZ, M.B.R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutia* (L.) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico.** Dissertação apresentada a faculdade de ciências da saúde da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em ciências da saúde. 2008.

RAFFERTY, J. A.; HICKSON, I.; LASHFORD, L. S. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. **Cancer Metastasis Rev.** v.15, p. 365, 1996.

RAHMAN, A. U.; ZAMAN, K. Medicinal plants with hypoglycemic activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 26, p. 1- 55, 1989.

RAMELET, A.A. Pharmacologic aspects of a phlebotropic drug in CVI associated edema. **Angiology.** V.51, p.19-23, 2000.

- RASO, G. M., MELI, R., DI C. G., PACILIO, M., DI C., R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2-expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci.** V. 68, p. 921-931, 2001.
- RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações clínicas dos dados laboratoriais.** 6ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.
- RYAN, G. B.; MAJNO, F. Inflammation. In: MAJNO, G.; JORIS, I. (ED.) **Cells, tissue and disease. Principles of general pathology.** Cambridge: Blackweel Science. p. 443. 1996.
- ROBBINS S. L.; COTRAN R.S.; **Pathologic basis of disease**, 5º ed. Philadelphia: W.B. Saunders company; p. 51-92, 1994.
- ROTELLI, A.E.; GUARDIÃ, T.; JUÁREZ, A.O.; ROCHA, N.E.; PELZER, L.E.; Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research.** V. 48, p.601-606, 2003.
- SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B. BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedella paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie.** v.58, n.8, p. 567-9, 2003.
- SETTY, S. R.; QUERESHIL, A. A.; SWAMY, V.; PATIL, T.; PRAKASH, T.; PRABHU, K.; GOUDA, A. V. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia.** V.78, p.451-454, 2007.
- SILVA, T. M. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; BATISTA, M. M.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17, p. 35-38, 2007.
- SILVA, F.G.; JANUÁRIO, AH.; PINTO, J.E.B.P.; NASCIMENTO, V.E.; BARIZAN, W.S.; SALES, J.F.; FRANÇA, S.C. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] coletadas nas estações seca e úmida. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu, v.8, n.2, p.19-25, 2006.
- SILVA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; OLIVEIRA, T.M.L.; DINIZ, M.F.F.M. Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. **Acta Farm. Bonaerense.** V.24, n. 4, p. 533-7. 2005.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5. Ed., Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 1102, 2004.

SOARES, M.L., REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D.; FIGUEIREDO, A.D.L.; BUSTAMANTE, K.G.L.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v.15, n.4, 2005.

SOUZA, C.A.S.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** V.37, n.6, São Paulo, 2000.

SONAGLIO, D. **Padronização do extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyroclines satureoides* (LAM) D.C Compositae (Marcela)**. Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Farmácia da UFRGS, 163p. Dissertação (Mestrado). 1987.

SUPHAKET, S., AMORNNAT, T.; PORNRUT, R.; KORNNANOK, I.; SEEWABOON, S. The study of hypoglycemic effects of the *Morus alba* L. leave extract and histology of the pancreatic islet cells in diabetic and normal rats. **Thammasat Medical Journal.** V. 9, n° 2, 148-155P. Klong Loun, Pathumthani, 12120 Thailand, 2009.

TEIXEIRA, L.T.A.; JÚNIOR, L.S.S.; QUEIROZ, F.M.; OLIVEIRA, C.N.; SCHWARZ, A. Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* e da *Piper methysticum* em ratos. **Rev. Bras. Toxicologia.** V.22, n.1-2, p.42-49, 2009.

TINOCO, S. T. J.; ALMEIDA, R. A. C. **Manual de sericicultura**. Campinas: CATI, p. 67, 1992.

THOMSON, R. G. **General veterinary pathology**. Philadelphia: Saunders, p. 163-217, 1984.

TURATTI, K.F.M. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: **Avaliação da qualidade, estudo morfoanatômico, estudo da atividade antimicrobiana, conservante, genotóxica, mutagênica, citotóxica e incorporação em formulações cosméticas para uso tópico**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2008.

TUROLLA MS, NASCIMENTO ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Cienc Farm.** V.42, p.289-306. 2006.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev Bras Cienc Farm.** v. 43, n. 4, 2007.

VEIGA J. V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura. **Quím. Nova,** v. 28, n° 3, p. 519-528, 2005.

WALKER, C.I.B.; ZANOTTO, C.Z; CERON, C.S.; POZZATTI, P.; ALVES, S.H.; MANFRON, M.P. Atividade Farmacologica e Teor de Quercetina de *Mirabilis jalapa* L. **Lat. Am. J. Pharm.** V. 28, n.2, p.241-6, 2009.