

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

Amanda Leitão Gindri

**ANÁLISE DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICIDADE DE  
*Ureia baccifera* GAUDICH**

Santa Maria, RS  
2016

**Amanda Leitão Gindri**

**ANÁLISE DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICIDADE DE *Urera  
baccifera* GAUDICH**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Farmacognosia, Fitoquímica e Farmacologia de Produtos Naturais e Bioativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Leitão Gindri, Amanda  
ANÁLISE DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICIDADE DE  
Urera baccifera GAUDICH / Amanda Leitão Gindri.- 2016.  
96 p.; 30 cm

Orientador: Sydney Hartz Alves  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Antitumoral 2. Antiviral 3. Isoflavonas 4. Plantas  
medicinais 5. Urticaceae I. Hartz Alves, Sydney II.  
Título.

---

©2016

Todos os direitos autorais reservados a Amanda Leitão Gindri. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.  
Endereço: Rua Ipiranga, nº370, Centro, São Francisco de Assis. CEP: 97.610-000.  
Fone: (0XX) 55 9653-7163. E-mail: amandagindri@gmail.com

**Amanda Leitão Gindri**

**ANÁLISE PRELIMINAR DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICIDADE  
DE *Urera baccifera* GAUDICH**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Farmacognosia, Fitoquímica e Farmacologia de Produtos Naturais e Bioativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**

Aprovado em 18 de julho de 2016



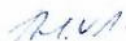
**Sydney Harts Alves, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



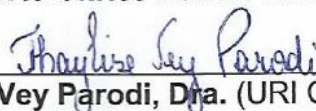
**Érico Silva De Loreto, Dr. (SOBRESP)**



**Lauren Rosa Crossetti Vaucher, Dra. (UFSM)**



**Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)**



**Thaylise Vey Parodi, Dra. (URI Campus de Santiago)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

*À professora Doutora Margareth Linde Athayde,  
querida mestre, minha eterna orientadora!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à professora Margareth Linde Athayde, que me acolheu gentilmente em meu mestrado e doutorado, acreditando e confiando em mim. Querida professora Marga, jamais esquecerei de seus conselhos, amizade, parceria e sorrisos. Muito obrigada por tudo!

Ao professor Sydney, que carinhosamente “me adotou” depois do momento difícil que todos passamos. Muito obrigada por todo apoio, palavras de incentivo e amizade! Certamente este trabalho não teria sido finalizado sem sua ajuda e apoio.

Aos amigos do PPGCF, professores, técnicos do departamento de Farmácia Industrial e colegas do Labfito, muito obrigada pelo conhecimento compartilhado e amizade. Agradeço também a UFSM e ao PPGCF pela oportunidade de cursar o mestrado e o doutorado nesta instituição e Programa de pós-graduação, gratuitos e de qualidade.

Pai e mãe: não tenho palavras para agradecer todo o incentivo, carinho, atenção e apoio que me deram em todas as fases da minha vida e em especial nesta que finalizo agora. Sem isso, jamais conseguiria.

Ao meu namorado Paulo, muito obrigada por todo amor, atenção e paciência sempre dispensada. Seu apoio e carinho incondicional foi essencial para concluir este trabalho.

Lucas e Litiele, muito obrigada por todo incentivo e carinho. Espero poder contribuir tudo isso e que possamos comemorar muitas coisas boas sempre juntos.

Aos meus tios e primos da família Gindri e os tios e primos da família Leitão, que estiveram comigo em todos os momentos, pessoalmente ou por Whatsapp: obrigada pelo apoio, carinho e diversão que seu convívio sempre proporciona. Vocês moram no meu coração!

Aos colegas e alunos da Uri Campus de Santiago e meninas do Labplam, agradeço seu carinho e incentivo. Obrigada por toda amizade e união. Vocês são como uma família para mim!

A todos os amigos que deram palavras de apoio e carinho e que de alguma forma auxiliaram para que este trabalho fosse concluído, meu muito obrigada!

Por que criar plantas venenosas?

"sua pergunta parte do princípio de que o veneno é algo ruim, uma coisa sem propósito. Muitas das supostas plantas ruins... contêm propriedades incríveis de curar ou são necessárias para criar maravilhas magníficas quando combinadas com outros elementos. Os humanos apressam-se em declarar que algo é bom ou ruim sem saber de fato."

(YOUNG, W.P., A Cabana. 1ª ed., Rio de Janeiro: Sextante, 2008, 240p).

"Só a dose faz o veneno."

*"Dosis sola facit venenum"*

(Paracelsus, 1538)

## RESUMO

### ANÁLISE DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICIDADE DE *Urera baccifera* GAUDICH

AUTORA: Amanda Leitão Gindri  
ORIENTADOR: Sydney Hartz Alves

A espécie *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd., nativa do Brasil, tem suas raízes utilizadas popularmente para micoses e hiperplasia prostática. Esta planta apresenta espinhos urticantes que causam irritações dérmicas e deram origem aos seus nomes populares: urtigão-do-mato, urtiga-brava e urtiga-vermelha. Na literatura poucos são os estudos acerca da toxicidade desta planta e somente estudos de atividade anti-inflamatória das suas folhas foram encontrados. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, antiviral, antifúngica, antibacteriana e antitumoral das folhas e raízes do vegetal, bem como avaliar sua genotoxicidade e citotoxicidade, correlacionando os resultados obtidos com seus constituintes químicos determinado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector diodos e detector de massas (CLAE-DD-EM). As folhas e raízes foram coletadas, extraídas por maceração e fracionadas com clorofórmio, acetato de etila e butanol. A atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foi realizada em camundongos *Swiss* adultos machos, a atividade antiviral foi determinada em células HEP-2 infectadas com Vírus Herpes tipo 1 e a atividade antimicrobiana em bactérias, fungos e algas foi realizada por microdiluição em caldo. A genotoxicidade foi realizada em radículas de *Allium cepa* (ensaio *in vivo*) e em dsDNA (ensaio *in vitro*), já a citotoxicidade *in vitro* foi verificada pelo ensaio clonogênico. A atividade antitumoral foi determinada em células de adenocarcinoma prostático humano. A quantificação de metabólitos secundários foi realizada em HPLC-DAD-MS, pesquisando-se a presença de diversos polifenóis. Nos ensaios realizados não foi verificada atividade anti-inflamatória e antinociceptiva para a planta por via oral, entretanto uma excelente atividade antiviral foi observada *in vitro* para todas as amostras. As frações da planta foram ativas contra *Klebsiella pneumoniae*, *Prototheca zopfii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Uma elevada genotoxicidade foi verificada para as raízes de *U. baccifera*, sendo esta mais reduzida para suas folhas, ocorrendo o inverso nos ensaios de citotoxicidade. As folhas da planta se mostraram mais ativas do que as raízes no ensaio de atividade antitumoral. Foram quantificadas nas amostras as isoflavonas daidzeína, genisteína e glicitina, substâncias correlacionadas com as ações farmacológicas observadas neste trabalho. As folhas e raízes apresentaram resultados promissores neste estudo, porém necessitam de maiores estudos antes de seu uso ser considerado seguro e eficaz como planta medicinal. Adicionalmente, se faz importante a descoberta dos mecanismos de ação antitumoral, antiviral e antibacteriano, além do isolamento dos constituintes ativos da planta.

**Palavras-chave:** Antitumoral. Antiviral. Daidzeína. Urticaceae. Urtigão-do-mato.



## ABSTRACT

### ANALYSIS OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES AND TOXICITY OF *Urera baccifera* GAUDICH

AUTHOR: Amanda Leitão Gindri  
ADVISER: Sydney Hartz Alves

The specie *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd., native of Brasil, has its roots popularly used to mycoses and prostatic hyperplasia. This plant presents stinging hairs that cause irritation in the skin and originated its folk's names: stinging nettle and red nettle. In the literature are present few studies concerning the toxicity of this plant and only anti-inflammatory activity of their leaves was found. That way, this study aim to test the anti-inflammatory, antinociceptiva, antiviral, antifungal, antibacterial and antitumor activities of the leaves and roots of the vegetable, as well as to evaluate their genotoxicity and cytotoxicity, correlating these results to the chemical constituents determined by High Performance Liquid Chromatography coupled in Diode Array Detector and Mass Detector (HPLC-DAD-MS). The leaves and roots was collected, extracted by maceration and fractioned with chloroform, ethyl acetate and butanol. The anti-inflammatory and antinociceptiva activities were made in Swiss adult male mice, the antiviral activity was determined in HEP-2 cells infected with Herpes Simplex Virus Type 1 and the antifungal, anti-algae and antibacterial activities was made in broth microdilution. The genotoxicity was conducted in *Allium cepa* rootlets (*in vivo* assay) and in dsDNA (*in vitro* assay). The *in vitro* cytotoxicity was performed in the clonogenic assay. The antitumor activity was evaluated in prostate adenocarcinoma cell line. The secondary methabolite quantification was performed in HPLC-DAD-MS, searching for several polyphenols. In these assays, the anti-inflammatory and antinociceptive activities were not evidenced by oral administration, although an excellent *in vitro* antiviral activity was evidenced to all samples. The plant fractions was active against *Klebsiella Pneumoniae*, *Prototheca zoppii* and *Saccharomyces cerevisiae*. High genotoxicity was verified to *U. baccifera* roots, being more reduced to its leaves, occurring the opposite in the cytotoxicity assay. This plant leaves showed more active than the roots in the antitumor assay. Were quantified in the samples the isoflavones daidzein, genistein and glycitin, substances correlated with the pharmacological activities observed in this work. The roots and leaves presented promising results in this study, however more studies are necessary before this plant be considered secure and effective for medicinal use. Additionally, it is important to elucidate the antitumor, antiviral and anti-bacterial mechanisms of action, besides the isolation of active constituents of this plant.

**Keywords:** Antitumor. Antiviral. Daidzein. Stinging Nettle. Urticaceae.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### 2. REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1</b> – Planta <i>Urera baccifera</i> (L.) Gaudich. ex Wedd. em seu habitat natural.....	23
<b>Figura 2</b> – Folhas de <i>Urera baccifera</i> (L.) Gaudich. ex Wedd.....	24
<b>Figura 3</b> – Espinhos urticantes dos caules de <i>Urera baccifera</i> (L.) Gaudich. Ex Wedd.....	24
<b>Figura 4</b> – Espinhos urticantes da parte dorsal das folhas de <i>Urera baccifera</i> (L.) Gaudich. Ex Wedd.....	25

#### 4.1 ARTIGO 1 – ANTIVIRAL, ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *Urera baccifera* (L.) GAUDICH

<b>Figure 1</b> - Time-course and dose-response curves of mouse ear edema induced by topical application of root and leaf of the <i>Urera baccifera</i> . The effects of these extracts are expressed as a change in ear thickness. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. for 6 animals. *P < 0.05 and **P < 0.01 vs. vehicle.....	41
<b>Figure 2</b> - Evaluation of antinociceptive pain against cold allodynia induced by acetone.....	41
<b>Figure 3</b> - Evaluation of spontaneous pain.....	42

#### 4.2 ARTIGO 2 – GENOTOXIC EVALUATION OF INFUSIONS OF *Urera baccifera* LEAVES AND ROOTS IN *Allium cepa* CELLS

<b>Figure 1.</b> Chromatogram and DAD of the standard oxalic acid in 4 mg/mL. The calibration curve with the standard and the samples were analyzed in triplicate.....	49
<b>Figure 2. A and B:</b> <i>Allium cepa</i> meristematic cells showing the alterations due to the action of oxalic acid. Black arrow: disorganization of the metaphase White arrow: lost chromosome; Gray arrow: anaphasic bridges. 40X. Scale: 10 $\mu$ m.....	50
<b>Figure 3.</b> <i>Allium cepa</i> meristematic cells showing the alterations due to the action of <i>U. baccifera</i> infusions. <b>A:</b> roots infusion (1 g/L). <b>B:</b> leaves infusion (75 g/L). Black arrow: breaks and lost chromosomes during metaphase. White arrow: anaphasic bridges and lost chromosomes in anaphase. 40X. Scale: 10 $\mu$ m.....	50

#### 4.3 MANUSCRITO 1 – *Ureara baccifera*: A POTENT GENOTOXIC AND CYTOTOXIC NETTLE ACTIVE AGAINST PROSTATIC TUMORAL CELLS WITH ISOFLAVONE CONTENT

<b>Fig. 1 -</b>	Percentage of fluorescence free dsDNA of the negative control (non-treated dsDNA sample) and <i>Ureara baccifera</i> ' roots and leaves extracts and fractions. NC: negative control (non-treated dsDNA sample). ***Statistically different from the negative control (non-treated dsDNA sample), analyzed by Dunnett test at $p < 0.05$ .....	62
<b>Fig. 2 -</b>	Percentage of cell viability of the control (non-treated cells - NC) and <i>Ureara baccifera</i> root and leaf extracts and fractions 72 hours after the treatment. ***Statistically different from the control (non-treated cells), analyzed by Dunnett test at $p < 0.05$ .....	65
<b>Fig. 3 -</b>	Percentage of surviving colonies of the negative control (NC), <i>Ureara baccifera</i> crude root and leaf extract and butanolic fraction. ***Statistically different from the negative control, analyzed by Dunnet test at $p < 0.05$ .....	66
<b>Fig. 4.</b>	BPC chromatograms of the butanolic fractions of <i>Ureara baccifera</i> leaves and roots. Highlighted the metabolite identified in this samples, daidzein.....	69

## LISTA DE TABELAS

### 2. REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Tabela 1</b> – Valores de capacidade antioxidante obtidos para <i>Urera baccifera</i> Gaudich.....	30
<b>Tabela 2</b> – Doseamentos de polifenóis em <i>Urera baccifera</i> Gaudich.....	31
<b>Tabela 3</b> – Doseamentos de flavonóides em <i>Urera baccifera</i> Gaudich.....	32
<b>Tabela 4</b> – Doseamentos de flavonóis, taninos condensados e alcaloides em <i>Urera baccifera</i> Gaudich.....	32

#### 4.1 ARTIGO 1 – ANTIVIRAL, ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *Urera baccifera* (L.) GAUDICH

<b>Table 1</b> – Results of cytotoxicity and antiviral activity of the roots and leaves.....	40
<b>Table 2</b> – Results of antimicrobial activity.....	41

#### 4.2 ARTIGO 2 – GENOTOXIC EVALUATION OF INFUSIONS OF *Urera baccifera* LEAVES AND ROOTS IN *Allium cepa* CELLS

<b>Table 1.</b> Quantification of oxalic acid in the leaves and roots of <i>Urera baccifera</i> .....	48
<b>Table 2.</b> Meristematic cells of <i>Allium cepa</i> in different steps of the cellular cycle, submitted to different treatments of <i>Urera baccifera</i> leaves and roots.....	49
<b>Table 3.</b> Dividing cells, cellular aberration and chromosome abnormalities caused by <i>U. baccifera</i> extracts in <i>A. cepa</i> cells....	51

#### 4.3 MANUSCRITO 1 – *Urera baccifera*: A POTENT GENOTOXIC AND CYTOTOXIC NETTLE ACTIVE AGAINST PROSTATIC TUMORAL CELLS WITH ISOFLAVONE CONTENT

<b>Table 1:</b> Daidzein quantification in <i>Urera baccifera</i> leaves and roots crude extract and fractions. The results are expressed in mg of standard/g of extract/fraction $\pm$ standard deviation (SD).....	68
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACV</b>	Acyclovir (aciclovir)
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance (análise de variância)
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>BuOH</b>	Butanolic fraction (fração <i>n</i> -butanol)
<b>CC<sub>50</sub></b>	Cytotoxic concentration 50% (µg/mL) (concentração citotóxica 50%)
<b>CE</b>	Crude extract (extrato bruto)
<b>CFA</b>	Complete freund's adjuvant (Adjuvante completo de Freund)
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	Ácido acético glacial
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroformic fraction (fração clorofórmio)
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide (dimetil sulfóxido)
<b>dsDNA</b>	DNA dupla fita (calf thymus DNA)
<b>EtOAc</b>	Ethyl acetate fraction (fração acetato de etila)
<b>EtOH</b>	Extrato etanólico
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum (soro fetal bovino)
<b>GS</b>	Pró oxidante de referência
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água destilada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HPLC-DAD-MS</b>	High performance liquid chromatography coupled with ultraviolet diodes array detector a mass spectrometry detector (Cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector ultravioleta diodos e detector de massas)
<b>HSV</b>	Herpes simplex virus (Herpes vírus)
<b>HSV-1</b>	Herpes simplex type 1 (Herpes vírus tipo 1)
<b>HSV-1-ACVR</b>	Acyclovir-resistant Herpes simplex virus type 1 (Herpes vírus tipo 1 resistente ao aciclovir)
<b>i.pl.</b>	Intraplantar (plantar surface) (superfície plantar)
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibitory concentration 50% (Concentração inibitória 50%)
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor-1
<b>MNCC</b>	Maximum noncytotoxic concentration (concentração máxima não-citotóxica)
<b>MTT</b>	3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>OA</b>	Oxalic acid (ácido oxálico)
<b>PC-3</b>	Prostate cancer cells (células de câncer de próstata)
<b>SD</b>	Standard deviation (desvio padrão)
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SI</b>	Selectivity index (índice de seletividade)
<b>TCID<sub>50</sub></b>	50% tissue culture infectious doses (dose infecciosa para 50% da cultura de tecidos)
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral).

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS .....	16
2.2 ESTUDOS DE TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS .....	17
2.3 ESTUDOS DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS ....	19
2.4 FAMÍLIA URTICACEAE .....	20
2.5 GÊNERO <i>URERA</i> .....	21
2.6 ESPÉCIE <i>Urera baccifera</i> (L.) GAUDICH. EX WEDD.....	22
<b>2.6.1 Descrição da espécie</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.2 Habitat, nomes e usos populares</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6.3 Atividades farmacológicas</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6.4 Atividade antioxidante e composição química</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6.5 Toxicidade</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.6 Estudos adicionais</b> .....	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 ARTIGO 1 – ANTIVIRAL, ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF <i>Urera baccifera</i> (L.) GAUDICH.....	36
4.2 ARTIGO 2 – GENOTOXIC EVALUATION OF INFUSIONS OF <i>Urera baccifera</i> LEAVES AND ROOTS IN <i>Allium cepa</i> CELLS.....	45
4.3 MANUSCRITO 1 – <i>Urera baccifera</i> : A POTENT GENOTOXIC AND CYTOTOXIC NETTLE ACTIVE AGAINST PROSTATIC TUMORAL CELLS WITH ISOFLAVONE CONTENT .....	54
<b>4.3.1 Introduction</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3.2 Methods and materials</b> .....	<b>57</b>
<b>4.3.3 Results and discussion</b> .....	<b>61</b>
<b>4.3.4 Conclusion</b> .....	<b>71</b>
<b>4.3.5 References</b> .....	<b>72</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico. As plantas são usadas para o tratamento e cura de enfermidades pela espécie humana desde o início de sua existência, e ainda hoje, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras (MACIEL et al., 2002).

Nos últimos anos a fitoterapia, como terapia medicinal, vem crescendo muito e desde o final da década de 90 já se notava um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando obter novos compostos com propriedades farmacêuticas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). O mercado mundial de fitoterápicos girava, no ano de 2001, em torno de 22 bilhões de dólares (YUNES et al., 2001) e em 2010, em cerca de 50 bilhões de dólares (GALILEU, 2010). Várias empresas nacionais têm utilizado matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de seus medicamentos, o que levou os fitoterápicos a se tornarem suporte na indústria farmacêutica genuinamente nacional, de pequeno e grande porte. O crescimento do mercado de fitoterápicos encontra-se na ordem de 15% ao ano, enquanto que o dos medicamentos sintéticos gira em torno de 3 a 4% (SIMÕES et al., 2010).

A maioria dos produtos naturais fabricados pela indústria brasileira está fundamentada somente no uso popular das plantas, sem nenhuma comprovação pré-clínica ou clínica, não podendo ser competitivo a nível nacional e muito menos internacional (YUNES et al., 2001). Mesmo não possuindo estudos sobre os constituintes químicos de algumas plantas medicinais, estas acabam sendo prescritas com frequência, devido às observações populares sobre o uso e eficácia das mesmas, o que acaba colaborando de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas desses vegetais (MACIEL et al., 2002).

Devido à grande utilização de plantas medicinais e medicamentos à base de plantas pela população, o Ministério da Saúde vem criando políticas para o uso de fitoterápicos, tais como: o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008), além da Comissão Técnica e Multidisciplinar de elaboração e atualização da Relação

Nacional de Plantas Medicinais - Renaplam e da Relação Nacional de Fitoterápicos - Renafito – COMAFITO (BRASIL, 2010).

Informações obtidas da medicina popular são um aspecto muito importante a ser considerado quando se procura obter substâncias ativas em uma planta. Também se consideram importantes as informações botânico-taxonômicas e químico-taxonômicas. É mais viável estudar primeiro a parte da planta utilizada popularmente e após as outras partes, pois na maioria dos casos ocorre a diferenciação significativa da constituição química da planta em partes distintas. É importante determinar a data e o local da coleta, pois esses fatores podem influenciar na biossíntese de metabólitos secundários. Para a separação, purificação e identificação dos constituintes químicos de uma planta se utilizam diferentes técnicas cromatográficas, tais como: cromatografia em coluna aberta (CC), com sílica gel como fase estacionária, cromatografia em camada delgada (CCD), que serve para identificar e reunir as frações separadas na CC, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que pode identificar e quantificar um composto, entre outras técnicas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Erroneamente, acredita-se que a toxicidade das plantas medicinais tem menor importância quando comparado com a dos medicamentos convencionais. Entretanto, sabe-se que a toxicidade de plantas medicinais, na realidade, é um problema de saúde pública (ALVES, 2007), pois muitas plantas contêm substâncias que são capazes de exercer ação tóxica sobre organismos vivos (MENGUE et al., 2001).

A utilização, o tempo de tratamento e o modo de preparo podem fazer com que as plantas apresentem ação tanto tóxica quanto terapêutica (GOMES et al., 2001). A intoxicação ocorre na maioria das vezes em razão da concentração excessiva da planta, quantidade e do uso de plantas com efeito tóxico. Por isto, faz-se necessário o uso de testes de toxicidade, que são utilizados para prever ou avaliar os efeitos tóxicos no organismo ou averiguar a toxicidade relativa das substâncias (AMARAL; SILVA, 2008).

A família Urticaceae é encontrada no Brasil, onde é representada por 8 Gêneros, dentre eles *Urtica* e *Urera*. A planta *Urera baccifera* (L.) Gaudich, pertencente à família citada, é um arbusto que apresenta pelos urticantes e é conhecido popularmente como urtiga-brava. Esta planta pode ser encontrada em florestas latifoliadas em altitude superior a 800 metros (MARTINS et al., 2006).



Poucos são os trabalhos encontrados na literatura acerca dos componentes químicos e toxicidade desta espécie.

As atividades anti-inflamatórias (BADILLA et al., 1999; 2006; BADILLA; MORA; POVEDA, 1999;) e antivirais (MARTINS et al., 2009) da planta *U. baccifera* já foram estudadas para suas folhas, apresentando bons resultados, entretanto não se sabe o potencial anti-inflamatório e antiviral das raízes do vegetal. A atividade antimicrobiana de algumas partes da planta foi pesquisada para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (MELENDEZ; CAPRILES, 2006; ONOFRE; HERKERT, 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* (ONOFRE; HERKERT, 2012), entretanto, se faz necessário uma avaliação com um maior número de microrganismos.

Portanto, levando em consideração a presença da espécie *U. baccifera* em nossa região bem como o uso popular de suas raízes como anti-inflamatória, antimicótica e no tratamento de hiperplasia prostática, percebe-se que é importante ser avaliado as ações farmacológicas das raízes e folhas da mesma, a fim de que seja traçado um paralelo entre as atividades das duas partes do vegetal. Adicionalmente, se faz necessário investigar a toxicidade da planta, para definir a possibilidade ou não de uso medicinal. Os estudos de atividade farmacológica e toxicidade aqui propostos tem a finalidade de nortear futuros estudos sobre o uso desta planta como fitoterápico e avaliar a eficácia e segurança de sua utilização.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas foi o primeiro recurso farmacológico usado pelas antigas civilizações e cada uma têm suas próprias referências históricas. Em suas experiências com ervas tiveram fracassos e sucessos, sendo que, na maioria das vezes, estas curavam, matavam ou produziam efeitos colaterais severos. As plantas são responsáveis pela cura ou pela morte de quem faz uso delas como forma de medicamentos. Os produtos naturais foram empregados inicialmente pelos chineses, sendo eles os primeiros a usufruir do potencial terapêutico que algumas plantas apresentam e a divulgar suas descobertas (MELO, 2003).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, mais de 80% da população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, utiliza tratamentos tradicionais à base de plantas para suas necessidades de atenção primária de saúde (BERMÚDEZ et al., 2005). Plantas medicinais são de grande importância para manter a saúde da população. Esse uso representa a cultura de um povo, sendo também parte de um saber utilizado e difundido de geração em geração pela comunidade (LEITE, 2000).

Os conhecimentos do uso desta terapia no estado do Rio Grande do Sul derivam dos índios e também dos colonizadores europeus que procuraram, pelo método de tentativa e erro, encontrar plantas medicinais análogas àquelas conhecidas por eles, em seus países de origem (MENTZ; LUTZEMBERGER; SCHENKEL, 1997).

## 2.2 ESTUDOS DE TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais da flora nativa brasileira são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Comparando com os medicamentos usados nos tratamentos convencionais, o estudo da toxicidade de plantas e fitoterápicos pode parecer irrelevante, o que é uma inverdade, pois a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

No Brasil, a ingestão de plantas para o tratamento de doenças é amplamente difundida e, na maioria dos casos, a escolha de uma terapia baseada em plantas medicinais ocorre sem orientação médica. Um dos principais problemas da utilização destes produtos é a crença de que produtos de origem vegetal são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos (GALLO; KOREN, 2001; CLARKE, 2007).

São muito comuns efeitos adversos provenientes do tratamento com medicamentos que possuem plantas medicinais. Estes efeitos podem advir de possíveis adulterações ou toxidade do próprio vegetal, bem como a ação sinérgica de plantas medicinais com outras plantas, medicamentos ou alimentos. Os produtos isolados de plantas compõem uma grande diversidade de compostos orgânicos naturais, oriundos do metabolismo primário e secundário, que podem exercer efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. As reações adversas que as plantas poderão desencadear podem ser decorrentes de seus próprios componentes, pela presença de um produto contaminante, ou pela preparação incorreta (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Nos últimos anos a procura de tratamentos naturais aumentou, no entanto não existem limites para o uso deste tipo de medicamento, não se fornecem informações sobre possíveis efeitos colaterais, e o consumo de plantas, da maneira como vem sendo realizado, representa um risco para a saúde humana. Estudos fitoquímicos e farmacológicos se tornam cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A forma mais usada e comum de se identificar espécies vegetais é através dos nomes populares, o que pode incorrer em acidentes e intoxicações. A mesma planta pode possuir mais de um nome popular, ou ainda, diferentes espécies podem possuir o mesmo nome (ALICE *et al.*, 2004). Portanto, a identificação errônea e o

desconhecimento podem levar os usuários a utilizar plantas que não possuam as substâncias responsáveis pela ação benéfica que se espera, ou então, utilizar plantas tóxicas (RITTER *et al.*, 2002).

O uso milenar de plantas como medicamentos vem mostrando ao decorrer dos anos que algumas plantas apresentam substâncias perigosas. Muitas pesquisas mostraram que muitas delas possuem componentes potencialmente agressivos e, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Levando em consideração a ampla aceitação do uso de plantas para o tratamento de patologias pela população e preocupada com o crescimento do registro de medicamentos fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 2004 a Resolução RE nº90, datada de 16 de março. Esta legislação traz o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. O guia tem por objetivo “indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de acordo com a Resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos” (BRASIL, 2004).

Para o registro de fitoterápicos é necessário que sejam testadas amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido. Os testes a serem realizados são: toxicidade aguda com uma espécie de mamífero; toxicidade de doses repetidas (longa duração) com pelo menos duas espécies de mamíferos (uma roedora e uma não-roedora) e avaliação de genotoxicidade, efetuado quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em seres humanos (BRASIL, 2004).

A RE nº 90/2004 preconiza que nos ensaios de genotoxicidade sejam realizadas: avaliação *in vitro* da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de dano a cromossomos de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo; e o teste de micronúcleo (avaliação *in vivo* do dano em cromossomos em células hematopoiéticas de roedores). Adicionalmente, para medicamentos fitoterápicos destinados para uso tópico é necessário que se realizem ensaios de sensibilização dérmica, irritação cutânea e ocular (BRASIL, 2004).

Devido a imensa biodiversidade de nosso país, a grande maioria das plantas não foi estudada do ponto de vista de seu potencial de toxicidade. Adicionalmente, une-se a este fato a ampla utilização de plantas para tratar ou prevenir males por parte da população. Dessa forma, estudos acerca da toxicidade de plantas

medicinais são importantes, a fim de definir o risco associado a este tipo de tratamento. Estes estudos podem levar a dois caminhos: caso seja comprovado potencial tóxico dos extratos da planta, o estudo de isolados da mesma deve ser realizado, a fim de determinar quais compostos são responsáveis pelas atividades farmacológicas benéficas, e trabalhar para que se tornem fármacos, e caso seja comprovada que esta planta não apresenta efeitos tóxicos, o uso de seu extrato, na forma de infusões e/ou decocções, pode ser considerado seguro pela população.

### 2.3 ESTUDOS DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS

Uma estratégia de estudo de plantas medicinais muito utilizada é o uso da etnofarmacologia como norteadora dos trabalhos. A abordagem etnofarmacológica combina informações adquiridas junto as comunidades locais que fazem uso da flora medicinal e os alia com estudos químicos e farmacológicos realizados em laboratórios de pesquisa especializados (SIMÕES, 2010, p.107-108).

Para que os fitoterápicos recebam um maior nível de aceitação médica são necessários que os estudos científicos sejam respaldados pela comprovação de sua eficácia terapêutica em experimentos farmacológicos pré-clínicos e clínicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1997).

A regulamentação e o registro de Medicamentos Fitoterápicos, bem como o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos são definidos pela Resolução da Diretoria colegiada - RDC nº 26/2014. O medicamento fitoterápico é aquele que comprova sua segurança e eficácia por meio de estudos clínicos e o produto tradicional fitoterápico comprova sua segurança e efetividade pela demonstração do tempo de uso na literatura técnico-científica (BRASIL, 2014).

Antes de serem disponibilizados ao consumo, o medicamento fitoterápico e o produto tradicional fitoterápico devem apresentar requisitos semelhantes de qualidade, diferenciando-se nos requisitos de comprovação da segurança e eficácia/efetividade, bulas/folheto informativo, embalagens, restrição de uso e de Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) (BRASIL, 2014).

Para que os estudos de atividade farmacológica sejam confiáveis, é necessário que a avaliação dos efeitos biológicos - *in vitro* e *in vivo* – seja realizada seguindo padrões estruturais e experimentais. Dentro destes padrões destaca-se que é importante que a Instituição de pesquisa possua um bom biotério e um

laboratório exclusivo para a realização dos experimentos. Além disso, a escolha dos modelos experimentais deve ser de maneira que possam ser reproduzidos corretamente e evitados os resultados falso-positivos. Adicionalmente, é importante que os experimentos sejam repetidos várias vezes a fim de se obter dados estatísticos que consigam comprovar a eficácia da planta. (CECHINEL FILHO; YUNES, 1997).

No estágio inicial dos estudos de propriedades farmacológicas de plantas é necessário realizar um estudo farmacológico preliminar do(s) extrato(s) bruto(s) em modelos experimentais relevantes relacionados à(s) ação(ões) farmacológica(s) sugerida(s) pelas informações populares. Após a comprovação da atividade nestes ensaios preliminares, deve-se fracionar os extratos e identificar sua composição química, a fim de nortear o estudo farmacológico completo, que só será realizado com a fração, composto ou preparação que se pretende usar nos estudos clínicos (SIMÕES, 2010, p.110).

## 2.4 FAMÍLIA URTICACEAE

Pertencente à ordem Rosales, a família Urticaceae possui representantes predominantemente herbáceos, sendo raras as plantas arbustivas e arbóreas. As folhas são inteiras, simples, de disposição alterna, algumas vezes oposta, com estípulas, lâminas pecioladas ou sésseis, raras vezes lobadas, inteiras ou denteadas, serradas ou crenadas, e em geral, trinervadas desde a base. Apresentam tricomas sem ramificações, às vezes urticantes (longos, em linha reta, rígidos e irritantes) em algumas espécies como *Urtica* e *Urera*, além de cristólitos de carbonato de cálcio na epiderme (ARAUCO; GUÉZOU, 2006; JOLY, 1998; STEINMANN, 2005).

Nesta família, as flores são muito pequenas, de sexo separado e, em muitas vezes, reunidas em densas inflorescências axilares com ou sem perianto. Quando há perianto, este pode ser formado por quatro ou cinco sépalas dispostas em duas séries. As flores masculinas em geral possuem quatro estames e um rudimento de ovário no centro (pistilódio). Os estames apresentam-se sempre como filetes curvados no botão. O botão abre-se explosivamente e o movimento lança o pólen no ar como uma poeira. Isto ocorre pela manhã, logo que a planta recebe os primeiros raios de sol. A flor feminina possui um único ovário unilocular e unilocular com um

só óvulo. Às vezes ocorrem estaminódios. Na família Urticaceae o fruto é aquênio ou drupa (JOLY, 1998; STEINMANN, 2005; ARAUCO; GUÉZOU, 2006).

Urticaceae é um grupo monofilético e circunscrita de modo amplo. As espécies herbáceas e lenhosas desta família apresentam cristólitos mais ou menos alongados, laticíferos restritos à casca ou muito reduzidos, que produzem seiva translúcida e mucilaginosa, gineceu pseudomonômero com óvulos basais, estames curtos e embriões retos (SYTSMA et al., 2002 apud ROMANIUC NETO et al., 2009).

A família é numerosa, varia de cerca de 40 a 50 gêneros e 700 a 1200 espécies de plantas monóicas e dióicas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, e concentradas no sudeste da Ásia. No Brasil ocorrem 12 gêneros e cerca de 80 espécies (LIMA et al., 2008; ROMANIUC NETO et al., 2009; STEINMANN, 2005). O maior gênero da família é o *Pilea*, outros exemplos são *Urtica* e *Urera* (JOLY, 1998).

A importância da família Urticaceae é grande, alguns gêneros, como *Boehmeria*, *Girardinia* e *Urtica* são cultivadas pelas fibras contidas em seus talos que são usadas para a fabricação de tecidos (STEINMANN, 2005). Algumas espécies pertencentes à família Urticaceae apresentaram atividade anti-inflamatória, antiviral, hipoglicemiante e cardiovascular (MARTINS et al., 2009).

## 2.5 GÊNERO URERA

O gênero *Urera* compreende arbustos, árvores e videiras, que ocorrem frequentemente na região ribeirinha e em mata cerrada na Mesoamérica. Esse gênero é caracterizado por frutos suculentos formados pela dilatação das tépalas, estigmas penicilados ou capitados, pistilódios glabros e pelos com a base bulbosa, que urticam em algumas espécies (MONRO; RODRIGUEZ, 2009).

Este gênero apresenta de 35 a 75 espécies distribuídas mundialmente, sendo característica de áreas abertas como pastagens, além de ser conhecida por apresentar tricomas urticantes e algumas vezes, espinhos nas folhas e caules. São plantas principalmente dióicas, com indumento de acúleos, filetes retos no botão, estigmas penicilados terminais e algumas vezes, espinhos grossos. As folhas são alternas, espiraladas até dísticas, com lâminas inteiras, lisas ou rugosas, estípulas axilares, livres ou cordadas na base. Há presença de estípulas, com nervuras peninérveas ou trinervadas desde a base, com cristólitos puntiformes, baciliformes ou

lineares. As inflorescências são altamente divididas, apresentam brácteas, flores pediceladas ou sésseis, filetes retos ou dobrados o botão, unissexuais. Perianto frutífero em geral carnosos e de várias cores (STEINMANN, 2005; ARAUCO; GUÉZOU, 2006; ROMANIUC NETO et al., 2009).

As plantas denominadas *Urera*, juntamente com as do gênero *Urtica*, são as urtigas das matas que, em geral, são consideradas como padrão de terra fértil e produzem queimaduras causadas pelos urticantes que se encontram nas porções vegetativas (JOLY, 1998).

A distribuição deste gênero é quase pantropical, estando presente na África, América Central, América do Sul, Ilhas do Caribe, sul do México, Austrália, Ilhas do Pacífico, mas ausente na Ásia. Dentro da família Urticaceae presente na Mesoamérica, o gênero *Urera* é o único que apresenta frutos suculentos brilhantes, sendo também caracterizado por liberar um látex aquoso em seus galhos quando cortados, e, em algumas espécies, pelos bulbosos pungentes. Este gênero inclui espécies que são utilizadas para tratar doenças inflamatórias, artrites, febres, hemorragias, erisipelas e sífilis, além de algumas espécies possuírem moderada importância como alimento para as lepidópteras (MONRO; RODRÍGUEZ, 2009).

## 2.6 ESPÉCIE *Urera baccifera* (L.) GAUDICH. EX WEDD.

### 2.6.1 Descrição da espécie

A espécie *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd. (Figura 1), é uma planta arbustiva dióica que possui cerca de 1 metro e meio de altura, sendo que alguns autores descrevem ser de 3 a 4 metros de altura, armada de espinhos urticantes que se estendem dos caules até as nervuras dorsais das folhas onde são bastante menores. Os ramos apresentam 0,5 a 1 cm de diâmetro, com tricomas urticantes desde a base. Os ramos novos são minúsculos-pubescentes como os pecíolos foliares quando novos (CORRÊA, 1984; ARAUCO; GUÉZOU, 2006; ROMANIUC NETO et al., 2009).



**Figura 1** – Planta *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd. em seu habitat natural.



Fonte: (GINDRI, 2012)

As folhas (Figura 2) são alternas, grandes e longo-pecioladas, com limbo oval-cordado, grosso-denteado nas margens, áspero na face e minúsculo-pubescente no verso, de mais ou menos 20 cm de comprimento e 14 cm de largura sobre o pecíolo de 10 a 15 cm de comprimento quando adulto. As folhas costumam ser menores na extremidade dos ramos do que as inferiores já adultas, na sombra o limbo chega a mais de 30 cm e o pecíolo até 37 cm de comprimento. Espinhos urticantes (Figuras 3 e 4) estão distribuídos por todo o limbo e cistólitos estão concentrados irradiados próximos às nervuras, com face adaxial hispida e abaxial opaca. São de 6 a 10 pares de nervuras secundárias, estípulas entre 0,5 e 2,5 cm de comprimento e pecíolos de 4 a 24 cm de comprimento, estriados (CORRÊA, 1984; ARAUCO; GUÉZOU, 2006; ROMANIUC NETO et al., 2009).

**Figura 2** – Folhas de *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.



Fonte: (GINDRI, 2012)

**Figura 3** – Espinhos urticantes dos caules de *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.



Fonte: (GINDRI, 2012)

**Figura 4** – Espinhos urticantes da parte dorsal das folhas de *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd.



Fonte: (GINDRI, 2012)

As flores encontram-se abaixo das folhas, apresentam de 6 a 13 cm, cor alaranjada a róseo-vinácea, pubescentes, assimétricas, pequenas em inflorescências axilares, menores que as folhas e, às vezes não atingindo o tamanho dos pecíolos. As sementes são ovais, estriadas, com cotilédones largos e embriões retos (CORRÊA, 1984; ARAUCO; GUÉZOU, 2006; ROMANIUC NETO et al., 2009).

### **2.6.2 Habitat, nomes e usos populares**

Esta planta está presente em florestas perenes ou sazonais, vegetação ribeirinha, do nível do mar até 1.400 metros, do México até Panamá, Colômbia, Peru, Bolívia, Brasil e Paraguai (MARTINS et al., 2009; MONRO; RODRIGUEZ, 2009). Foi verificada a presença da espécie *U. baccifera* em estudo da vegetação em Santa Maria, RS por Longhi e colaboradores (2000).



Os nomes populares de *U. baccifera* devem-se ao fato de suas folhas e caules serem recobertos por pelos urticantes. Dentre os principais nomes desta planta destacam-se ‘*nettles*’ ou ‘*stinging nettles*’ – em inglês, ‘*ortigas*’ – em espanhol, urtiga – em português, urtiga-brava, além de urtigão-do-mato, urtiga-vermelha, urtiga-da-folha-grande e urtigão (CORRÊA, 1984; BADILLA et al., 1999a; LONGHI et al., 2000; ROMANIUC NETO et al., 2009; LINDENMAIER; PUTZKE, 2011).

Na Região Central do Rio Grande do Sul, a infusão das raízes e folhas deste arbusto foi descrito como utilizado por 3 comunidades Mbya/Guaranis para infecção urinária. A espécie é nativa da região e seu nome Guarani é Pyno (LINDENMAIER; PUTZKE, 2011). Adicionalmente, as raízes desta planta são descritas como utilizadas medicinalmente pelos descendentes de poloneses em comunidades rurais no município de Erechim, RS (CHAVES; ZANIN, 2012). Toda a planta é descrita como hipotensora, podendo interferir no tratamento com anti-hipertensivos (TEIXEIRA, 2011).

Este arbusto é popularmente utilizado para condições inflamatórias. Suas folhas ou raízes podem ser utilizadas para infusão ou por via tópica. Existem relatos que os ameríndios costa-riquenhos enquanto atravessavam altas montanhas batiam em si mesmos com os caules espinhosos da planta para repelir calafrios. Seu efeito rubefaciente também é empregado em dores reumáticas e artrite (BADILLA et al., 1999a; VALADEAU et al., 2009).

O povo Anesha, também chamado Amuesha, é um grupo de povos ameríndios que moram na região central do Peru, na Cordilheira Oriental dos Andes, e possuem uma forte medicina tradicional. Este povo utiliza popularmente *U. baccifera* para diarreia e dor no estômago, sendo que seu modo de preparo seria, após algumas folhas da planta serem fervidas e o doente beber esta preparação, estas mesmas folhas seriam retiradas e aplicadas como cataplasma sobre a barriga. Já para dores reumáticas, poucas folhas são preparadas como chá e pequenas quantidades são bebidas regularmente. As folhas quentes também são aplicadas em cataplasma sobre a articulação dolorosa. Utilizada para tosse, gripes e resfriados com febre, uma pequena xícara de chá das folhas de *U. baccifera* é bebida três vezes por dia (VALADEAU et al., 2009; VALADEAU et al., 2010).

Em um guia preparado pelo Herbário Nacional da Costa Rica intitulado “Plantas a serviço da saúde”, a planta *U. baccifera* tem como usos populares: emenagogo (infusão), anti-inflamatório das mucosas (infusão), hemostático

(infusão), anti-infeccioso renal (decoção), alívio de queimaduras (infusão por via tópica), antimicótico, antiúlcero e contra erisipela (decoção de folhas sobre a pele). Conforme o manual, o uso desta espécie deve ser evitado para crianças menores de 5 anos, gestantes e adultos que fazem uso de medicamentos para doenças crônicas (HERNÁNDEZ, 2008).

Esta espécie de urtiga também foi descrita como utilizada para feridas e úlceras malignas em uma triagem das plantas utilizadas na medicina tradicional Maia (CAAMAL-FUENTES et al., 2011).

### 2.6.3 Atividades farmacológicas

As atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas das folhas de *U. baccifera* foram estudadas pelo grupo de Badilla e colaboradores (1999) em ratos Sprague-Dawley. As folhas da planta foram levadas a decoção com água destilada (1:10), a solução obtida foi concentrada (extrato bruto) e após secada levada a fracionamento com hexano, acetato de etila e butanol. O resíduo da extração foi particionado com metanol, dando origem a fração metanol e resíduo aquoso. Foram observados efeitos anti-inflamatórios e analgésicos no resíduo aquoso, bem como uma inibição do efeito de migração dos leucócitos e redução no exsudato pleural, além de atividade analgésica periférica na faixa de 25-100 mg/kg, via intraperitoneal. Não foi verificada atividade quando os extratos foram aplicados por via tópica (BADILLA et al., 1999a).

Uma atividade colinérgica foi proposta para o extrato aquoso (infusão, 1:10) das folhas de *U. baccifera* (BADILLA; MORA; POVEDA, 1999) pois foi observado que a planta promoveu câimbras abdominais e defecação em ratos Sprague-Dawley. Adicionalmente, a dose de 500 mg/kg via intraperitoneal do extrato etanólico das folhas produziu efeito similar ao padrão indometacina, utilizado no experimento. Entretanto, o extrato da planta não demonstrou efeito quando administrada por via oral. O mesmo foi classificado como levemente tóxico, pois sua DL<sub>50</sub> (dose letal em 50% dos animais tratados) foi 5,0 gramas/quilo (BADILLA; MORA; POVEDA, 1999).

Testes realizados com plantas nativas na Costa Rica utilizaram o extrato aquoso das folhas de *U. baccifera* (obtido por infusão, 10% p/v) contra o edema induzido pelo veneno da cobra *Bothrops asper*. Os cientistas testaram as doses de 250 e 500 mg/kg do extrato, via intraperitoneal, e mediram o edema na pata de ratos

Sprague-Dawley em 1, 2, 4, 6 e 24 horas. Foi verificado que os extratos da planta apresentaram uma leve redução (não-significativa estatisticamente) no edema induzido pelo veneno em todos os tempos medidos e nas duas concentrações testadas (BADILLA et al., 2006).

Experimentos que pesquisam a atividade antiviral “*in vitro*” dos extratos das partes aéreas de *U. baccifera* foram realizados por Martins e colaboradores (2009). Esses autores testaram os extratos particionados da planta (*n*-butanol, acetato de etila, hexano) e o extrato etanólico contra o Herpes vírus Tipo 1 (HSV-1) e Tipo 2 (HSV-2). Todos os extratos da planta – exceto o hexano - mostraram a máxima porcentagem de inibição contra HSV-1, sendo a fração mais ativa a *n*-butanol, seguida por acetato de etila e etanol. As frações de diferentes polaridades demonstraram mecanismos de ação diferentes, sendo capazes de inibir diferentes passos da replicação viral, diferentemente da ação do medicamento padrão para este tipo de infecção, o aciclovir. Os extratos etanólico e acetato de etila demonstraram agir na penetração viral, além disto, este último também age na inibição dos receptores celulares. Já o extrato *n*-butanol possui atividade virucida, apresentando uma leve ação nos receptores celulares. No entanto, os mesmos extratos não mostraram atividade contra HSV-2 (MARTINS et al., 2009).

Melendez e Capriles (2006) testaram a atividade antimicrobiana através da técnica de disco difusão, de 172 espécies de plantas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os autores utilizaram as folhas da planta *U. baccifera*, que foram submetidas a uma extração com metanol, filtradas e evaporadas até *secura*. Os extratos foram preparados na concentração de 1000 mg/mL. Não foi verificada atividade das folhas da planta na contra os dois microrganismos testados.

Onofre e Herkert (2012) testaram a atividade antimicrobiana de extratos aquoso, metanólico e etanólico obtidos das folhas, cascas e raízes de *U. baccifera*. Estes autores utilizaram o método de disco difusão com os microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As amostras foram testadas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39 e 0,19 mg/L. As melhores atividades foram observadas com os extratos metanólicos das folhas e raízes, com os valores de CIM (concentração inibitória mínima) variando entre 6,25 e 0,19 mg/L (6,25 e 0,19  $\cdot 10^{-6}$   $\mu$ g/mL) para *E. coli*, e para *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi observada a variação de 3,12 e 0,19 mg/L (3,12 e 0,19  $\cdot 10^{-6}$   $\mu$ g/mL). Os autores

consideraram que o extrato metanólico das folhas e raízes desta urtiga é ativo contra os microrganismos testados.

A atividade contra malária (*Plasmodium falciparum* FCR3 resistente a cloroquina) e *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/76/LTB-012) foi avaliada por pesquisadores do Peru. O extrato etanólico das folhas de *U. baccifera* mostrou um IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória 50%) contra *L. amazonensis* de 48,6 + 7,2 µg/mL e contra a malária não foi evidenciada atividade inibitória. Os autores consideraram uma boa atividade contra *L. amazonensis* e *P. falciparum* em uma dose menor que 10,0 µg/mL de extrato. Portanto, apesar da planta demonstrar atividade contra *L. amazonensis*, esta não foi considerada satisfatória (VALADEAU et al., 2009). O provável mecanismo de ação desta planta contra este microrganismo não foi descrito.

Plantas utilizadas popularmente na Guatemala para o tratamento de gonorreia foram testadas *in vitro* contra cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistente a penicilina isolada de um paciente sintomático. A tintura das raízes de *U. baccifera* (macerada com etanol 50%) não apresentou resultado (halo de inibição 6,0 ± 0,1 mm) contra este microrganismo (CÁCERES et al., 1995).

#### **2.6.4 Atividade antioxidante e composição química**

Martins e colaboradores (2006) realizaram o teste de capacidade antioxidante pelo método do DPPH (0,3 mM) nos galhos de *U. baccifera* (Tabela 1). A atividade foi evidenciada para os extratos diclorometano e acetato de etila, com IC<sub>50</sub> (índice que descreve a concentração necessária para inibir a auto oxidação do DPPH em 50%) de 37,05 e 57,20 µg/mL, respectivamente. Os autores consideraram uma boa capacidade antioxidante destas amostras quando comparado ao extrato etanólico da planta padrão *Gingko biloba* (IC<sub>50</sub> 38,91 µg/mL). Os extratos bruto, hexânico e *n*-butanólico não apresentaram boa capacidade antioxidante.

**Tabela 1** – Valores de capacidade antioxidante obtidos para *Urera baccifera* Gaudich.

Parte da planta	Extrato	IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± DP	Referência
Galhos	Etanol, hexano e <i>n</i> -butanol	> 1000	MARTINS et al., 2006
	Diclorometano	37,05	
	Acetato de etila	57,20	
Partes aéreas	Acetato de etila	120,16 ± 0,32	MANNION; MENEZES, 2010
Folhas	Extrato bruto (etanol)	118,31±0,000	GINDRI et al., 2014
	Clorofórmio	620,93±0,024	
	Acetato de etila	>1000	
	Butanol	388,43±0,04	
Raízes	Extrato bruto	189,49±0,008	
	Clorofórmio	187,62±0,012	
	Acetato de etila	>1000	
	Butanol	468,69±0,048	
Raízes	Extrato bruto (etanol)	188,57	GINDRI et al., 2010

DP: Desvio padrão.

O extrato bruto das raízes da planta apresentou valor de IC<sub>50</sub> de 188,57 µg/mL, quando testados pelo mesmo método (DPPH 0,3 mM) (Tabela 1), confirmando os valores elevados que o extrato bruto dos galhos obtido pelo grupo de pesquisa anterior. No mesmo estudo foi realizada uma análise fitoquímica qualitativa onde foram evidenciados heterosídeos flavonoídicos e purinas na casca, heterosídeos saponínicos apenas no miolo e taninos e mucilagens na casca e no miolo da raiz, além de ter sido quantificado compostos fenólicos totais (29,76 ± 1,5 mg/g de extrato – Tabela 2), flavonóides (16,42 ± 0,1 mg/g de extrato – Tabela 3), taninos condensados (19,11 ± 0,77 mg/g de extrato – Tabela 4) e alcalóides totais (1,58 ± 0,02 mg/g de extrato – Tabela 4) (GINDRI et al., 2010).



**Tabela 2** – Doseamentos de polifenóis em *Urera baccifera* Gaudich.

Parte da planta	Extrato	mg E.A.G. /g amostra $\pm$ DP	Referência
Partes aéreas	Acetato de etila	77,75	MANNION; MENEZES, 2010
Folhas	Extrato bruto (etanol)	61,55 $\pm$ 1,54	GINDRI et al., 2014
	Clorofórmio	36,27 $\pm$ 1,23	
	Acetato de etila	47,39 $\pm$ 0,99	
	Butanol	49,05 $\pm$ 0,88	
Raízes	Extrato bruto (etanol)	29,98 $\pm$ 1,27	
	Clorofórmio	46,59 $\pm$ 0,88	
	Acetato de etila	35,54 $\pm$ 0,45	
	Butanol	24,71 $\pm$ 0,45	

mg E.A.G./ g amostra: miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de amostra.

DP: Desvio padrão.

As partes aéreas de *U. baccifera* também tiveram seus compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante (captura do radical DPPH – 0,3 mM) quantificados, obtendo valores mais altos para a fração acetato de etila em todos os testes, sendo os valores: 77,75 mg/g (Tabela 2), 27,14 mg/g (Tabela 3) e IC<sub>50</sub> 120,16 $\pm$ 0,32  $\mu$ g/mL (Tabela 1), respectivamente (MANNION; MENEZES, 2010).

Uma análise qualitativa dos metabólitos secundários desta urtiga demonstrou resultados positivos para aminogrupos, antocianinas, antocianidinas e flavonóides, esteróides, fenóis com posição para livres, cumarinas, saponinas e ácidos orgânicos nas folhas e raízes. Na análise quantitativa, a planta mostrou valores significantes de compostos fenólicos (de 24,71 a 61,55 mg/g – Tabela 2), flavonoides (de 9,24 a 82,92 mg/g – Tabela 3), flavonóis (5,73 a 52,4 mg/g, alcaloides (0,394 a 11,3 mg/g – Tabela 4) e taninos condensados (0,19 a 2,46 mg/g – Tabela 4) principalmente na fração clorofórmio das folhas e raízes (GINDRI et al., 2014).

**Tabela 3** – Doseamentos de flavonóides em *Urera baccifera* Gaudich.

Parte da planta	Extrato	mg E.Q. /g amostra ± DP	Referência
Partes aéreas	Acetato de etila	27,14	MANNION; MENEZES, 2010
Folhas	Extrato bruto (etanol)	41,54±0,53	GINDRI et al., 2014
	Clorofórmio	82,92±1,68	
	Acetato de etila	55,76±1,25	
	Butanol	26,61±0,25	
Raízes	Extrato bruto (etanol)	16,13±0,22	
	Clorofórmio	76,78±0,85	
	Acetato de etila	15,38±0,75	
	Butanol	9,24±0,1	

mg E.Q./ g amostra: miligrama de equivalente de quercetina por grama de amostra.  
DP: Desvio padrão.

**Tabela 4** – Doseamentos de flavonóis, taninos condensados e alcaloides em *Urera baccifera* Gaudich.

	Folhas			
	Extrato bruto (etanol)	Clorofórmio	Acetato de etila	Butanol
Flavonóis (mg/g) ± DP	15,47±0,72	52,4±2,91	7,26±0,54	9,1±0,27
Taninos condensados (mg/g) ± DP	1,95±0,04	2,46±0,05	1,95±0,05	1,1±0,07
Alcaloides (mg/g) ± DP	2,34±0,02	7,5±0,01	0,94±0,02	0,694±0,01
	Raízes			
	Extrato bruto (etanol)	Clorofórmio	Acetato de etila	Butanol
Flavonóis (mg/g) ± DP	5,73±1,1	7,40±0,62	7,06±0,27	6,65±0,2
Taninos condensados (mg/g) ± DP	0,19±0,03	0,3±0,03	1,0±0,04	0,23±0,03
Alcaloides (mg/g) ± DP	1,6±0,04	11,3±0,03	2,79±0,03	0,394±0,03

DP: Desvio padrão.

Fonte: (GINDRI et al., 2014)

Os extratos brutos das duas partes da planta demonstraram uma moderada atividade antioxidante (IC<sub>50</sub>: 118,31 e 189,49 µg/mL, folhas e raízes,

respectivamente – DPPH 0,3 mM – Tabela 1). Ácido oxálico, um sal solúvel que pode ser encontrado em tecidos vegetais e possível causador de intoxicação por oxalato em seres humanos (NOONAN; SAVAGE, 1999), foi quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência nas raízes e folhas do vegetal, com concentração expressiva nas raízes (1,79 e 1,82 mg/g no extrato bruto e fração *n*-butanol, respectivamente), indicando toxicidade (GINDRI et al., 2014).

Uma análise de macro e micronutrientes de vegetais demonstrou para as folhas de *U. baccifera* teores de nitrogênio convertido em proteína (23%), Cálcio (5%), Magnésio (0,54%), Manganês (0,072%), fósforo (0,27%), Ferro (0,0209%), sódio (0,0108%), potássio (3,1%), Cobre (0,0008%), Zinco (0,0039%), enxofre (0,27%) e Boro (0,0053%). Os autores declaram que merece destaque o teor considerável de proteínas em % (base seca) da espécie *U. baccifera*, 23% (KINUPP; BARROS, 2008).

### 2.6.5 Toxicidade

Em testes realizados com o líquido extraído dos pelos urticantes de *U. baccifera*, que é descrito como tendo efeitos dermatológicos locais e sistêmicos em músculos lisos e veias sanguíneas terminais, Schäfer (2001) avaliou a reatividade cutânea deste líquido, aplicando-o em sete voluntários saudáveis. Foi observada uma sensação de queimação e dilatação imediata, que indicou a presença de histamina nos pelos urticantes desta planta e, além disso, a inoculação gerou uma reação eczematosa crônica que durou 2 semanas. Ainda não foram elucidados os componentes do líquido urticante da planta.

Em um estudo para avaliar parâmetros citogenéticos induzidos por extratos aquosos de plantas utilizados como anti-hipertensivas na Argentina, as raízes de *U. baccifera* demonstraram a diminuição não significativa do índice mitótico na planta teste (*Allium cepa*), entretanto, foram observadas uma produção significativa de anormalidades cromossômicas durante a divisão celular das células da planta teste (AMAT et al., 2001).

A genotoxicidade dos extratos brutos e frações das raízes e folhas de *U. baccifera* foram avaliadas frente a leucócitos (GINDRI et al., 2014). Neste estudo, a ação da planta foi comparada com o padrão ácido oxálico, anteriormente quantificado na amostra. O padrão e as frações butanólicas das folhas e raízes

promoveram uma redução na proliferação dos leucócitos. Adicionalmente, o ácido oxálico causou o maior percentual de mortes de leucócitos, bem como ambas frações butanólicas. Por fim, o índice mitótico nas mesmas amostras citadas foi o mais baixa e a produção de micronúcleos foi maior no padrão ácido oxálico e maiores nas frações butanólicas (apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre estes resultados e os obtidos pelas outras amostras). Este estudo indica que, apesar do padrão ácido oxálico ser responsável por efeitos genotóxicos, esta substância isoladamente não pode ser considerada o único responsável pelo efeito genotóxico da planta, pois ela foi quantificada em grandes quantidades nos extratos brutos das folhas e raízes da planta, e estes extratos não apresentaram elevada toxicidade em leucócitos.

#### **2.6.6 Estudos adicionais**

Dutra e Oliveira (2004) estudaram a relação entre formigas e borboletas e os frutos de *U. baccifera*, em uma floresta em Campinas, no sudeste do Brasil. Estes pesquisadores observaram que as formigas estavam presentes na planta o ano todo exceto durante o período de senescência da planta, sendo que todas as estruturas reprodutivas e vegetativas eram visitadas por estes animais. As lagartas estavam presentes no período chuvoso, após o período de senescência da planta. Também foi observado que os frutos ainda ligados a planta são atrativos efetivos para formigas. A interação entre as formigas e a planta foi citada como possivelmente mutualística, devido ao fato de que as formigas obtêm benefícios alimentares com a remoção dos frutos e podem ser responsáveis pela proteção da planta contra herbívoros, ao passo de que as formigas provavelmente colaboram para um aumento da germinação das sementes, pois estas consomem somente a polpa do fruto da planta.

Conforme outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, 22 espécies de formigas aparecem na planta, principalmente nas folhas, durante o ano todo, onde visitam os ramos e colhem frutos frescos. Estes autores também comprovaram que a presença das formigas efetivamente reduz o aparecimento de larvas lepidópteras na planta (DUTRA; FREITAS; OLIVEIRA, 2006).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as atividades farmacológicas das raízes e folhas da planta *Urera baccifera*, bem como pesquisar sua toxicidade *in vitro* e/ou *in vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* dos extratos brutos das raízes e folhas de *U. baccifera*, comparando os resultados para as folhas e raízes do vegetal;
- Analisar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos brutos e frações das folhas e raízes da planta frente a bactérias, fungos, algas e leveduras diversos, confrontando os resultados das diferentes amostras;
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos extratos e frações da espécie vegetal, frente a Herpes vírus tipo 1, comparando a capacidade anti-herpética das folhas e raízes;
- Estimar o potencial genotóxico *in vitro* das infusões das raízes e folhas do vegetal em radículas de *Allium cepa*;
- Determinar capacidade genomodificadora *in vitro* (genotóxica ou genoprotetora) dos extratos e frações de ambos órgãos vegetais da planta em DNA dupla fita pela técnica do picogreen®;
- Realizar ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular pelo ensaio de capacidade de formação de colônias (sobrevivência clonal) em células V-79 (fibroblastos do pulmão de hamster chinês);
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* dos extratos das folhas e raízes frente a células de adenocarcinoma de próstata;
- Determinar a constituição química das amostras obtidas das folhas e raízes do vegetal em HPLC-DAD-MS.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As metodologias, resultados e discussões desta tese de doutorado estão divididos em três capítulos: Artigo 1: atividades farmacológicas, Artigo 2: genotoxicidade e Manuscrito 1: genotoxicidade, citotoxicidade, atividade antitumoral e quantificação de metabólitos secundários em *Urera baccifera*.

### 4.1 ARTIGO 1 – ANTIVIRAL, ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *Urera baccifera* (L.) GAUDICH

As atividades farmacológicas testadas para a planta *U. baccifera* foram publicadas no periódico científico *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Qualis Capes B3), em 15 de março de 2014, sob o título “Antiviral, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Urera baccifera* (L.) Gaudich” (v. 8, n. 10, p. 284-291, DOI 10.5897/AJPP2013.3902, ISSN 1996-0816).

Full Length Research Paper

## Antiviral, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Uretra baccifera* (L.) Gaudich

Amanda Leitão Gindri<sup>1</sup>, Thaís Felli Kubiça<sup>2</sup>, Débora Nunes Mario<sup>3</sup>, Sara Marchesan Oliveira<sup>4</sup>, Cássia Regina Silva<sup>4</sup>, Thaíssa Nunes Cabreira<sup>4</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>1</sup>, Juliano Ferreira<sup>4</sup>, Luciane Terezinha Lovato<sup>2</sup>, Rudy Weiblen<sup>2</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>3</sup> and Margareth Linde Athayde<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Phytochemistry Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Virology Laboratory, Federal University of Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Mycological Research Laboratory, Federal University of Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>4</sup>Neurotoxicity and Psychopharmacology Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Received 28 September, 2013; Accepted 20 February, 2014

*Uretra baccifera* (Urticaceae) is a shrub used in folk medicine for rheumatic diseases and mycosis. This study aimed to test the antiviral, antinociceptive, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *U. baccifera* leaves and roots. The cytotoxic and antiviral activity was evaluated against Herpes virus type 1, *in vitro*. The antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3, M38-A2 and M7-A6 standardized reference method. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity were evaluated in ear edema measurement, complete Freund's adjuvant-induced nociception, measurement of cold allodynia and spontaneous nociception in male adult Swiss mice. *U. baccifera* roots and leaves presented anti-herpetic activity. The plant extract, predominantly the ethyl acetate and butanol fractions, also inhibit *Klebsiella pneumoniae*, *Prototheca zopfii* and *Saccharomyces cerevisiae* and did not show antinociceptive and anti-inflammatory effect on the tested experiments. The presence of biologically active products and the low cytotoxicity demonstrated by the extract and fractions of *U. baccifera* makes these extracts promising antiviral candidates. This nettle can also be considered a moderated antimicrobial agent against *K. pneumoniae*, *P. zopfii* and *S. cerevisiae*. However, antinociceptive and anti-inflammatory effects to the samples in this study were not observed.

**Key words:** Stinging nettle, herpes simplex type 1, Urticaceae, *Klebsiella pneumoniae*, *Prototheca zopfii*, *Saccharomyces cerevisiae*.

### INTRODUCTION

*Uretra baccifera* (L.) Gaudich Ex. Wedd is a shrub with one meter and a half of height, having many stinging trichomes on the stem and leaves. The stinging hairs of

the plant gave it its folk names as nettles in English and ortigas in Spanish. This shrub is popularly used for inflammatory diseases, where leaves or roots are prepared

\*Corresponding author: E-mail: margareth@smail.ufsm.br. Tel: 55 3220 8095..

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

by infusion to oral or topic use (Badilla et al., 1999a), and the rubefacient effect is also used for rheumatic pains and arthritis (Badilla et al., 1999a; Valadeau et al., 2009). By topic use, this plant is also used for dermal diseases. There are no references concerning the compounds of *U. baccifera* in the literature.

Herpes simplex type 1 is a pathogen of children and adults responsible for several disorders, including gingivostomatitis, pharyngitis, keratoconjunctivitis and encephalitis (Whitley, 2001). Despite the symptoms caused by herpes infections are self-limiting in healthy individuals, these can be extensive and prolonged in immunocompromised patients (Chen et al., 2000). Nucleoside analogues such as acyclovir and penciclovir are some drugs licensed for the treatment of Herpes simplex virus (Whitley, 2001). However, these agents may cause a variety of toxic side effects, and the emergence of viral strains resistant to these compounds have become a growing problem, especially in immunocompromised patients (Van De Perre et al., 2008). Thus, there is an increasing need for the discovery of more specific antiviral agents effective against the herpes simplex virus.

Natural products like plant extracts are very promising sources of compounds with antiviral activity, due to the very low toxicity that they show for cells, and also due to the great variety of chemical constituents they have (Jassin and Naji, 2003). Fractions obtained from aerial parts of *U. baccifera* showed a significant activity against HSV-1-ACVr (Martins et al., 2009). Moreover, studies of other species of Urticaceae also have demonstrated anti-HSV activity (Silva et al., 2010; Uncini et al., 2005).

The anti-inflammatory (Badilla et al., 1999a, b) tests already been performed with the aerial parts of *U. baccifera* obtained good results in the dosage of 25 to 100 and 500 mg/kg intraperitoneally administrated. Besides, *U. baccifera* aqueous extract in 250 and 500 mg/kg was capable of reducing the edema caused in mice by a snake venom intraperitoneally (Badilla et al., 2006). The roots and leaves of this nettle showed antimicrobial effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Onofre and Herkert, 2012), although the metanolic extract of leaves did not show effect against *E. coli* and *S. aureus* in other studies (Melendez and Capriles, 2006). Therefore, the aim of this study was a screening of cytotoxicity and antiviral activity against HSV-1, *in vitro*, besides that to test the antiviral, anti-inflammatory and antimicrobial activities of crude extract and chloroformic, ethyl acetate and butanol fractions from the roots and leaves of *U. baccifera*.

## METHODS AND MATERIALS

### Preparation of the sample extracts and fractions

The leaves and the roots of *U. baccifera* were collected in São

Francisco de Assis, RS, Brazil (S 29° 37.115' W 054° 53. 970'; precision: 2.5 m; altitude 150 m) in May, 2010. Prof. Dr. Renato Aquino Záchia identified the plant and a voucher deposited on the University Herbarium under number 13.070. The material (1,000 g of roots and 400 g of leaves) was dried, milled and taken to maceration with ethanol 70% (30 g of plant in 100 ml solvent), for 28 days, with daily agitation. Once every week, each extract were filtrated, giving the respective hydro-ethanolic extract and fresh extraction solvents were added. The extracts were pooled and the ethanol was eliminated on rotary evaporator, giving the aqueous extracts (roots and leaves separately). Part of the aqueous extract was totally dried, becoming the crude extract (CE), and part was fractionated with solvents of crescent polarity: chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc) and butanol (BuOH). In the fractionation process, to each 400 ml of aqueous extract, 200 ml of solvent were added, which was renovated many times until the exhaustion of the extract, when the next solvent is added in crescent order of polarity. The fractions were equally dried. The income of the leaves and roots were, respectively: CE: 31.5 and 22.3%; CHCl<sub>3</sub>: 2.2 and 0.54%; EtOAc: 1.1 and 0.3%; BuOH: 2.1 and 1.8%.

### Animals

Male adult Swiss mice (25 to 35 g), 56 animals, maintained in home cages under a 12:12 h light-dark cycle (lights on 06:00 h) and constant room temperature (22 ± 2°C) were used. The animals were acclimatized in the laboratory for at least 1 h before testing. The experiments were performed with the agreement of Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (Protocol number 67/2010) and were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for investigations of experiments in conscious animals (Zimmermann, 1983). The number of animals and intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of drug treatments.

### Cells and viruses

HEp-2 cells were maintained in minimum essential medium (MEM – GIBCO Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal bovine serum (SFB – GIBCO Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and amphotericin B (2.5 µg/ml). For the cytotoxicity and antiviral activity tests, cell cultures were prepared in 96 well plates and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The strain KOS of HSV-1 was kindly provided by Dr. Paulo Roehle from the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The virus stocks were prepared and titrated as previously described (Simões et al., 1999), and the aliquots were kept at -70°C.

### Cytotoxicity assay

The cytotoxic and antiviral tests were performed through the MTT colorimetric assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] according to Freitas et al. (2009), with minor modifications. HEp-2 cells were seeded into 96-well plates (2 × 10<sup>4</sup> cells/well) and incubated for 24 h at 37°C. After that, the minimum essential medium with 10% of fetal bovine serum and 200 µl/well of different concentrations of the crude extracts and fractions (1.95 to 250 µg/ml) was added onto subconfluent cells in six replicates for each concentration of the samples. Control wells without the extracts, containing only the culture medium, and the culture medium plus 1% ethanol were included. After 3 days of incubation



at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, the growth medium was removed and 50 µl of MTT solution (1 mg/ml) was added. The plates were re-incubated for 4 h and after removal of the MTT solution, dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to dissolve formazan crystals (100 µl/well). The supernatant was transferred to a new plate and the readings performed in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) reader at a wavelength of 540 nm. The viable cells percentage for each compound was calculated according to the formula: absorbance of the compound/absorbance of the cell control × 100%. The cytotoxic concentration of the sample that reduced the viable cell number by 50% (CC<sub>50</sub>) was determined from dose-response curves. Additionally the maximum noncytotoxic concentration (MNCC) of each compound was determined for subsequent use in antiviral tests (Freitas et al., 2009).

#### Antiviral evaluation

Briefly, 100 µl/well of MNCC of the compounds were added to preformed monolayers of HEP-2 cells and diluted 1:2 in 96 well plates. After that, a suspension of 100 µl/well containing 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml of virus was added to all the wells with the exception of the cell control. Control virus wells were kept without addition of the compound. After 72 h of incubation at 37°C and 5%, MTT was added following the procedure described. Acyclovir (10 µg/ml) was used as positive control for HSV-1 inhibition. The inhibition for each compound was calculated according to the formula: (compound absorbance – viral control absorbance) / (cell control absorbance – viral control absorbance) × 100%. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was defined as the concentration that inhibited 50% of viral replication when compared to virus controls and was determined from dose-response curves. The selectivity index (SI) was calculated as CC<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub> (Freitas et al., 2009).

#### Antimicrobial activity

The crude extract and the chloroform, ethyl acetate and butanol fractions were individually evaluated against *Aspergillus flavus* (clinical isolate), *Candida parapsilosis* (American Type Culture Collection - ATCC 90018), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida glabrata* (ATCC 2301), *Candida dubliniensis* (clinical isolate), *Candida albicans* (ATCC 28967), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 2857), *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990), *Malassezia pachi* (clinical isolate), *Prototheca zopfii* (clinical isolate), *Micrococcus* sp. (ATCC 7468), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Aeromonas* sp. (clinical isolate), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus agalactiae* (clinical isolate) and *Escherichia coli* (clinical isolate). The minimal inhibitory concentration (MIC) of each fraction against the tested microorganisms was determined by the broth microdilution method based on CLSI M27-A3, M38-A2 and M7-A6 standardized reference method. The experiments were performed in duplicate. Each extract and fraction was serially diluted in DMSO to generate stock solutions. After that, it was serially diluted in RPMI 1640 broth for fungi and Brain Heart Infusion (BHI) broth for bacteria, to obtain final concentrations ranging from 2000 to 15.625 µg/ml. The inoculums of bacteria were prepared from 24 h-culture in BHI agar; filamentous fungi from 7-day-culture in potato dextrose agar; yeasts from 48-h-culture in Sabouraud dextrose agar. After 24 h of incubation at 37°C for bacteria and 48 h at 30°C for fungi, MIC endpoint was considered the lowest concentration of extract and fraction that inhibited 100% growth. The results of the samples

were compared to the standard antibiotic amphotericin B.

#### *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity

Only the crude extracts of leaves and roots of *U. baccifera* were used in the *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive assays.

#### Ear edema measurement

Edema was expressed as an increase in ear thickness, which was measured before and after induction of the inflammatory response, using a digital micrometer (Starret Series 734) in animals anesthetized with isoflurane. The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges. The thickness was recorded in µm. To minimize variation, a single investigator performed the measurements throughout each experiment. The root (10 to 10000 µg/ear) or leaf (1000 to 10000 µg/ear) of *U. baccifera* or vehicle (acetone) was applied to the right ear by topical administration according to the method described previously, with some modifications (Silva et al., 2011).

#### Nociceptive parameters

##### *CFA*- induced nociception

To produce a nociceptive response, mice were lightly anaesthetized with 2% halothane via a nose cone and received 20 µl of complete Freund's adjuvant [CFA-1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin oil (85%) and mannide monooleate (15%)] subcutaneously on the plantar surface (intraplantar, i.pl.) of the right hind paw (Ferreira et al., 2001). To evaluate the nociceptive response, 48 h after CFA administration, the animals received oral administration of leaf and root extract of *U. baccifera* (100 mg/kg) or saline (10 ml/kg) used as vehicle.

##### Measurement of cold allodynia

Cold allodynia was used as a parameter of nociception, which was characterized by a nocifensive reaction of animals after evaporative cooling of topically applied acetone (Caspani and Heppenstall, 2009). For this, 20 µl of acetone was applied on the dorsal hind paw, ipsilateral to the injury, and the behavior was assigned as an arbitrary score. The nociceptive score was assigned as follows: 0 = no behavioral response, 0.5 = licking response, 1 = flinching and brushing of the paw, 2 = strong flinching, 3 = strong flinching and licking. Behavior was observed during the first 30 s after acetone application and evaluated before (basal) and several times after treatments or CFA injection.

##### Spontaneous nociception

Briefly, the animals that received previous injection of CFA were placed individually in chambers (transparent glass cylinders of 20 cm in diameter) for an adaptation period before treatment, and spontaneous nociception induced by only CFA was observed as described. The behavior of spontaneous nociception was observed during 30 s before (basal) and at 0.5, 1 and 2 h after treatment with leaf and root extract of *U. baccifera* (100 mg/kg) or saline solution (10 ml/kg).

**Table 1.** Results of cytotoxicity and antiviral activity of the roots and leaves.

Parameter		CC <sub>50</sub> µg/ml (±SD)	IC <sub>50</sub> µg/ml (±SD)	SI (CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
Roots	CE	>1083.32±102.34	27.39±4.52	39.55
	EtOAc	283.54±10.93	8.08±2.37	35.09
	CHCl <sub>3</sub>	131.36±8.43	9.23±3.58	14.23
	BuOH	>385.55±9.85	25.97±3.26	14.85
Leaves	CE	162.04±6.79	17.97±2.54	9.02
	EtOAc	176.04±8.54	25.30±4.69	6.96
	CHCl <sub>3</sub>	98.72±6.48	10.59±3.22	9.32
	BuOH	181.63±6.81	6.21±2.41	29.25
ACV (10 µg/ml)		>138.23	1.25±0.32	>110.58

CE: Crude extract; CHCl<sub>3</sub>: Chloroform fraction; EtOAc: Ethyl acetate fraction; BuOH: butanol fraction; ACV: acyclovir.

### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by Student's t-test or one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls' or Bonferroni post tests when appropriate, using GraphPad Software 4.0 (GraphPad, USA).

## RESULTS

### Antiviral activity

The results of the cytotoxicity and viral inhibition tests are shown in Table 1. *U. baccifera* best results was obtained with the CE and EtOAc fraction of the roots, and the BuOH fractions of the leaves. The BuOH fraction of the roots showed very low toxicity to the cells, however its IC<sub>50</sub> was high, implying a lower SI as compared to the fractions already cited. The cytotoxicity of this fraction was even lower than the cytotoxicity of the ACV. Although the remaining fractions of both the roots and the leaves showed higher cytotoxicity, they also demonstrated antiviral activity (Table 1). The cytotoxicity in this method can be evaluated by the CC<sub>50</sub> (cytotoxic effects on 50% of cultured cells) value, such that the lower it gets, the more toxicity the extract brings to the cells. Thus, the CE of roots can be considered a promising candidate of an antiviral phytochemical, due its high CC<sub>50</sub> (>1083.32 ± 102.34) and moderate IC<sub>50</sub> (27.39 ± 4.52) which resulted in the higher SI of the samples (39.55).

### Antimicrobial activity

The large amount of microorganisms tested in this study have the finality of making a screening analysis, to verify the possible action of *U. baccifera* extracts against a specific microbe. The serial dilution has the objective of evaluation, which is the smaller concentration that

was effective against the microorganisms. Usually, quantitative MIC determination is well accepted for proper evaluation of the antimicrobial activity of a plant extract (being the MIC of a plant extract below 1000 µg/ml) considered as significant (Rios and Recio, 2005). Therefore, only the samples that showed minimal inhibitory concentration (MIC) lower or equal to 1000 µg/ml for most of the microorganisms were listed on Table 2. The fractions obtained from the leaves were the only samples that have action against *K. pneumoniae*. EtOAc of the roots was the only sample that inhibited *S. cerevisiae*. However, to the alga *P. zopfii*, the fractions BuOH and EtOAc from both parts of the plant presented a MIC value considered significant, similarly to the roots CE.

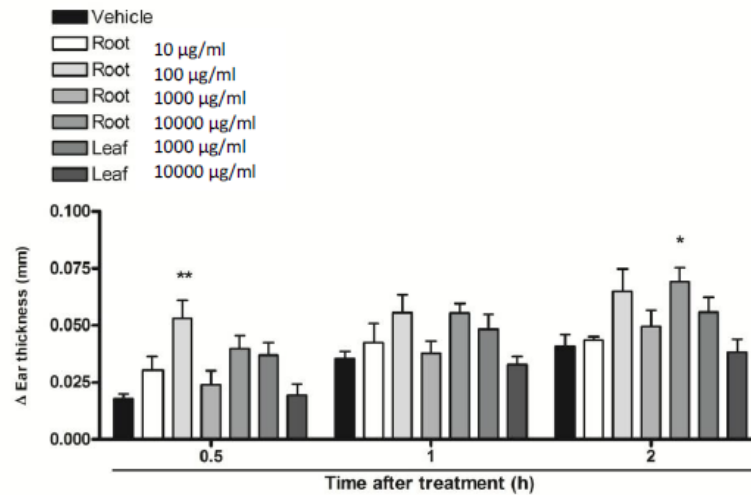
### Anti-inflammatory activity

On the ear edema evaluation, a graphic with time-course and dose-response curves of mouse ear edema induced by topical application of the plant was obtained (Figure 1). The data show that there is no occurrence of edematogenic effect, suggesting that *U. baccifera* leaves and roots does not have irritating effect. In the CFA-induced nociception test, it was observed that the roots and the leaves of the plant was not capable to reduce the paw withdrawal threshold induced by CFA at all time tested (data not shown). Therefore, *U. baccifera* did not present antinociceptive effect in this model of inflammatory pain. The antinociceptive pain against allodynia induced by acetone is shown in the Figure 2. The plant extract was not capable to revert the nociception induced by acetone on the animals who received CFA. In the spontaneous nociception experiment, the animals did not present spontaneous pain (Figure 3). The test shown that the crude extracts of the plant did not decrease the spontaneous pain of the mice in comparison

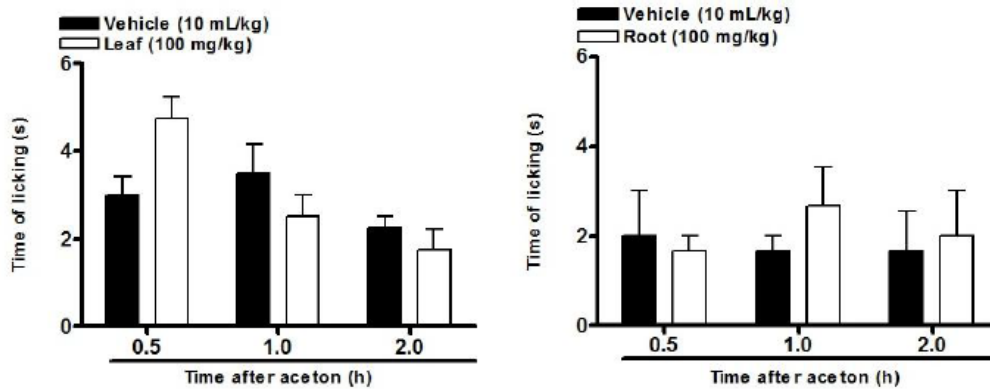
**Table 2.** Results of antimicrobial activity.

Parameter	CE (µg/ml)	CHCl <sub>3</sub> (µg/ml)	EtOAc (µg/ml)	BuOH (µg/ml)
<b>Leaf</b>				
<i>S. cerevisiae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. zopfii</i>	>1000	>1000	250	250
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	312	312	156
<b>Root</b>				
<i>S. cerevisiae</i>	>1000	>1000	250	>1000
<i>P. zopfii</i>	500	>1000	500	250
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000

CE: Crude extract; CHCl<sub>3</sub>: Chloroform fraction; EtOAc: Ethyl acetate fraction; BuOH: butanol fraction.



**Figure 1.** Time-course and dose-response curves of mouse ear edema induced by topical application of root and leaf of the *Urera baccifera*. The effects of these extracts are expressed as a change in ear thickness. Each column represents the mean ± S.E.M. for 6 animals. \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs. vehicle.



**Figure 2.** Evaluation of antinociceptive pain against cold allodynia induced by acetone.



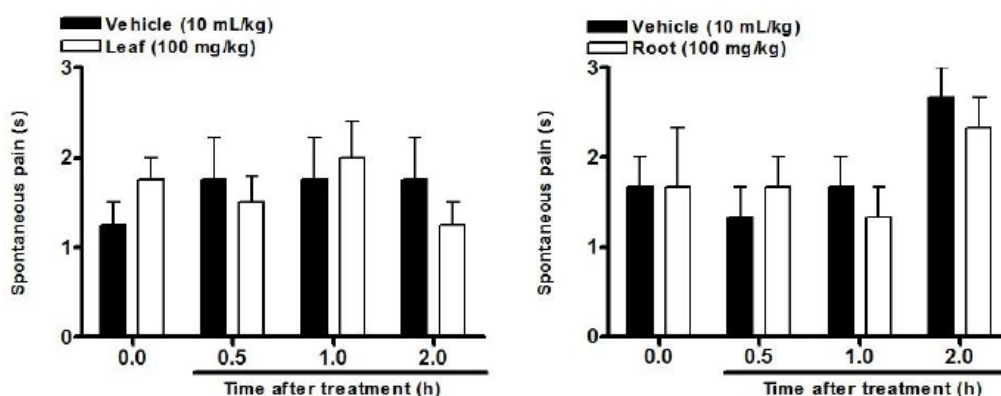


Figure 3. Evaluation of spontaneous pain.

with the vehicle.

## DISCUSSION

### Antiviral activity

The MTT method allows the evaluation of cytotoxicity of the samples in parallel with their antiviral activity, what is particularly important, since cytotoxic compounds sometimes behave as if they were active (Takeuchi et al., 1991). All samples tested showed anti-herpetic activity according to the parameters proposed by Amoros et al. (1992) and Cos et al. (2006) in order to consider a product as a potential antiviral candidate. *U. baccifera* is a plant classified in the Urticaceae family. The antiviral activity of other Urticaceae species has been confirmed in several studies (Silva et al., 2010; Uncini et al., 2005). The crude extract and the fractions methanol and butanol of *Cecropia glaziovii* Sneth leaves showed high activity against HSV-1 and HSV-2 (Silva et al., 2010). In addition, another study has shown that the species *Urtica dioica* was very effective to inhibit the syncytium formation by the feline immunodeficiency virus (FIV), which is regarded as a model for HIV (Uncini et al., 2005).

The plants have a wide variety and complexity of chemicals that are responsible for various biological effects, such as flavonoids, terpenoids, lignans, polyphenols, coumarins, saponins, alkaloids, thiophenes, proteins, peptides, and others (Jassin and Naji, 2003). The presence of phenolic compounds and flavonoids was previously confirmed in qualitative and quantitative tests for the roots and leaves of *U. baccifera* (Mannion and Menezes, 2010). The samples tested in this study have their content analyzed in a previous work (Gindri et al., 2014). The results showed  $29.98 \pm 1.27$ ,  $35.54 \pm 0.45$  and  $49.05 \pm 0.88$  mg/g of poly-phenols and  $16.13 \pm 0.22$ ,  $15.38 \pm 0.75$  and  $26.61 \pm 0.25$  of flavonoids, to the CE

CE and EtOAc of the roots, and the BuOH of the leaves, respectively. The phenolic compounds (Hudson, 1990; Sakagami et al., 1995; Van Den Berghe et al., 1986), particularly the flavones and flavonoids (Amoros et al., 1992), have been reported as having antiviral activity.

The proposed mechanisms by which the plant extracts and its compounds act on the viruses are variable, however several studies has shown that polyphenols act before virus entry, directly on the virus particle or avoiding the virus binding to the cells (Hudson, 1990; Sakagami et al., 1995; Van Den Berghe et al., 1986).

According to Hudson (1990), the viral inactivation is due to the *in vitro* binding of the polyphenols to the virus coat proteins. There are also studies showing that the antiviral activities of many natural products may occur by polyphenols binding either to the virus or to the proteins of the host cell membrane, thus preventing viral adsorption (Van Den Berghe et al., 1986). This view is reinforced by studies performed by Sakagami et al. (1995) which suggests that polyphenols act through direct inactivation of the virus and/or inhibition of the binding of the virus to the cells. Thus, the polyphenols may have an important role in the antiviral activity of the extracts of *U. baccifera*, although further studies are necessary to identify the mechanisms.

Furthermore, in our conditions, the BuOH fraction of the leaves of *U. baccifera* showed high antiviral activity against HSV-1, differently from the other fractions of the leaves (Table 1). Similar results have been observed by Martins et al. (2009) who reported that the butanol fractions of the aerial parts of *U. baccifera* showed high antiviral activity against HSV-1- ACVr (99.4%) *in vitro*, although in the same study the extracts did not show expressive percentage of viral inhibition against HSV-2- ACVr. It is important to highlight that in the *Urera* genus, there is the unique study available concerning the antiviral activity. Afterward, the probable presence of biologically

active compounds and the low cytotoxicity demonstrated by the extract and fractions of *U. baccifera* make this plant a promising antiviral candidate. Even though the indication for treatment is not yet possible, the observed activity justifies further studies on the elucidation of the mechanisms of virus inhibition. Moreover, the relatively high toxicity of the drugs approved for the treatment of herpetic infections and the continuous propagation of resistant viral strains emphasize the need for new antiviral agents (Van De Perre et al., 2008).

### Antimicrobial activity

CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and BuOH fractions of the leaves showed a good activity against *Klebsiella pneumoniae*, gram-negative bacteria with a prominent polysaccharide capsule, which can cause important hospital infections among adult and pediatric populations, showing that the fractionation of the crude extract can evidence very important antimicrobial activities, not accessible when only crude extracts are tested. The best value was obtained for BuOH (MIC: 156 µg/ml), and based on the criteria mentioned earlier, the fractions of the extracts of *U. baccifera* leaves could be considered active against this important pathogen. Being a well-known raw material in the baking and brewing industry, *Saccharomyces cerevisiae* is also used as a probiotic in humans. However, this fungus can be a singular cause of infections in humans by different forms of invasive infection after ingestion (Sidrim et al., 2003). Taking this to account, EtOAc and BuOH fractions of the roots can be a promising inhibitor of this microorganism, reaffirming the importance of fractionation of the crude extract.

In the same way, the EtOAc and BuOH fractions of leaves and roots and the crude extract of roots presented activity against *Prototheca zopfii*, algae, particularly difficult to eradicate with drugs and without protocol to treatment (Sidrim et al., 2003). Many plant constituents are related to antimicrobial activities as phenolics and polyphenols, terpenoids and essential oils, alkaloids, lectins and polypeptides (Cowan, 1999). The flavonoids are described to possess antifungal, antiviral and antibacterial activity in several studies (Cowan, 1999; Cushnie and Lamb, 2005; Hernandez, Tereschuk and Abdala, 2000; Oh et al., 2011) and can be responsible of the *U. baccifera* activity against *K. pneumonia*, *S. cerevisiae* and *P. zopfii*.

### Anti-inflammatory activity

In this study were tested the anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of *U. baccifera* in rats, using the concentrations of 100 and 10 to 1000 mg/kg of animal

weight administered orally, to the roots and the leaves, respectively, and these extracts did not show antinociceptive and anti-inflammatory effect in these experiments. Conversely, the plant showed anti-inflammatory and antinociceptive effects (Badilla et al., 1999a, b, 2006) only when the extracts were administered intraperitoneally, and in the last two studies, the dosages used were higher than those used in the present work, indicating that the plant can display anti-inflammatory and antinociceptive activities, but only when administered intraperitoneally and in high concentrations. Alkaloids (Barbosa-Filho et al., 2006; Matu and Staden, 2003) and diterpenes (Matu and Staden, 2003), as well as flavonoids (Ferrándiz and Alcaraz, 1991; Guardia et al., 2001), were cited as anti-inflammatory constituents of plants. Alkaloids and flavonoids were quantified in this plant, even though *U. baccifera* did not show anti-inflammatory and antinociceptive activities.

This study tested the antiviral, antinociceptive, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *U. baccifera* leaves and roots. The antinociceptive and anti-inflammatory effects were not evidenced when orally administered at the tested doses. On the other hand, this work provides new information about the antimicrobial activity of *U. baccifera*, showing that the fractions of this plant could be considered active against *K. pneumoniae*, *P. zopfii* and *S. cerevisiae*. Additionally, the plant showed a very good anti-herpetic activity, and the best results were obtained with the crude extract and ethyl acetate fractions of the roots and the butanol fractions of the leaves. The probable presence of biologically active compounds and the low cytotoxicity displayed by the extract and fractions of *U. baccifera* make these compounds promising antiviral candidates. This study became important due to the fact that there are few studies concerning the pharmacological activities of *U. baccifera*, and no study regarding activities of other species of *Urera* genus, which makes the genus a promising source of study.

### Conflict of interest

No competing interests were disclosed.

### ABBREVIATIONS

ACV, Acyclovir; ATCC, american type culture collection; BuOH, butanol fraction; CC<sub>50</sub>, cytotoxic concentration 50% (µg/ml); CE, crude extract; CFA, complete freund's adjuvant; CHCl<sub>3</sub>, chloroform fraction; DMSO, dimethyl sulfoxide; EtOAc, ethyl acetate fraction; FBS, fetal bovine serum; HSV, herpes simplex virus; HSV-1, Herpes simplex type 1; HSV-1-ACVR, acyclovir-resistant Herpes simplex virus type 1; IC<sub>50</sub>, inhibitory concentration; (µg/ml); i.pl., intraplantar (plantar surface); MNCC, maximum noncytotoxic concentration; SD, standard deviation; SI, selectivity index; TCID<sub>50</sub>, 50% tissue culture infectious



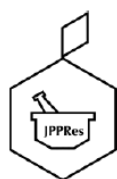
doses.

## REFERENCES

- Amoros M, Simões CMO, Girre L (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* 55:1732-1740.
- Badilla B, Mora G, Lapa AJ, Emim JAS (1999a). Anti-inflammatory activity of *Ureia baccifera* (Urticaceae) in Sprague-Dawley rats. *Rev. Biol. Trop.* 47:365-371.
- Badilla B, Mora G, Poveda LJ (1999b). Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of five Costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats. *Rev. Biol. Trop.* 47:723-727.
- Badilla B, Chaves F, Mora G, Poveda JL (2006). Edema induced by *Bothrops aspes* (Squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rican plant extracts. *Rev. Biol. Trop.* 54:245-252.
- Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MS, Batista Lima KV, Leitão da-Cunha EV, Fecine IM, Takemura OS (2006). Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Rev Bras. Farmacogn.* 16:109-139.
- Caspani O, Heppenstall PA (2009). TRPA1 and cold transduction: an unresolved issue? *J. Gen. Physiol.* 133:245-249.
- Chen Y, Scieux C, Garrait V, Socié G, Rocha V, Molina JM, Thouvenot D, Morfin F, Hocqueloux L, Garderet L, Espérou H, Sélimi F, Devergie A, Leleu G, Aymard M, Morinet F, Gluckman E, Ribaud P (2000). Resistant herpes simplex virus type 1 infection: an emerging concern after allogeneic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 31:927-935.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed., CLSI, Wayne, PA.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. M38-A2. CLSI, Wayne, PA.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute (2013). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 106:290-302.
- Cowan MM (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.
- Cushnie TPT, Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26:343-356.
- Ferrándiz ML, Alcaraz MJ (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* 32:283-288.
- Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Calixto JB (2001). Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41:1006-1012.
- Freitas AM, Almeida MT, Andrighetti-Fröhner CR, Cardozo FT, Barardi CR, Farias MR, Simões CM (2009). Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria augustifolia* leaves extract. *J. Ethnopharmacol.* 126:512-517.
- Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Pelzer LE (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *II Farmacologie* 56: 683-687.
- Hernandez NE, Tereschuk, ML, Abdala LR (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). *J. Ethnopharmacol.* 73:317-322.
- Hudson JB (1990). *Antiviral Compounds from Plants*. Boston; Boca Raton, Ann Arbor, CRC Press.
- Jassim SA, Najji MA (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* 95:412-427.
- Matu EN, van Staden J (2003). Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J. Ethnopharmacol.* 87:35-41.
- Melendez PA, Capriles VA (2006). Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine* 13:272-276.
- Mannion F, Menezes FS (2010). Antioxidant activity of *Ureia baccifera* Gaud extracts. *Trinity College Dublin: J. Pharm. Pharm. Sci.* 2:8-9.
- Martins FO, Gomes MMR, Nogueira FLP, Martins GR, Romanos MTV, Kaplan MAC, Menezes FS (2009). *In vitro* inhibitory effect of *Ureia baccifera* (L.) Gaudich. extracts against herpes simplex. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 1:581-584.
- Oh I, Yang W, Chung S, Kim T, Oh K, Shin J (2011). *In Vitro* Sortase: a Inhibitory and Antimicrobial Activity of Flavonoids Isolated from the Roots of *Sophora flavescens*. *Arch. Pharm. Res.* 34:217-222.
- Onofre SB, Herkert PF (2012). Antimicrobial Activity of Extracts Obtained from *Ureia baccifera* (L.) Gaudich. *Adv. Life Sci.* 2:139-143.
- Rios JL, Recio MC (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 100:80-84.
- Sakagami H, Sakagami T, Takeda M (1995). Antiviral properties of polyphenols. *Polyphenol Actual.* 12:30-32.
- Sidrim JJC, Rocha MFG, Câmara LMC, Brilhante RSN, Diogenes MJN, Oliveira AMA (2003). Onycholysis caused by a mixed infection of *Prototheca zopfii* and *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Newslett.* 25:69-71.
- Silva IT, Costa GM, Stoco PH, Schenkel EP, Reginatto FH, Simões CMO (2010). *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. *Lett. Appl. Microbiol.* 51:143-148.
- Silva CR, Oliveira SM, Rossato, MF, Dalmolin GD, Guerra GP, Prudente AS, Cabrini DA, Otuki MF, André E, Ferreira J (2011). The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. *Life Sci.* 20:88, 25-26, 1077-1087.
- Simões CM, Falkenberg M, Mentz LA, Schenkel EP, Amoros M, Girre L (1999). Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine* 6:205-214.
- Takeuchi H, Baba M, Shigeta S (1991). An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *J. Virol. Methods* 33:61-71.
- Uncini Manganeli RE, Zaccaro L, Tomei PE (2005). Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *J. Ethnopharmacol.* 98:323-327.
- Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Joaquina AC, Yannick E, Augusto LF, Gamboa Dionicia RR, Michel S, Denis C, Geneviève B (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the Leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J. Ethnopharmacol.* 123:413-422.
- Van De Perre P, Segondy M, Foulongne V, Ouedraogo A, Konate I, Huraux JM, Mayaud P, Nagot N (2008). Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy. *Lancet Infect. Dis.* 8:490-497.
- Van Den Berghe DA, Vlietinck AJ, Van Hoof L (1986). Plant products as potential antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur* 84:101-107.
- Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.
- Whitley RJ (2001). Herpes simplex virus. pp. 2461-2509. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DF (eds.) *Fields virology*, 4th ed, V. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

#### 4.2 ARTIGO 2 – GENOTOXIC EVALUATION OF INFUSIONS OF *Urera baccifera* LEAVES AND ROOTS IN *Allium cepa* CELLS

A fim de avaliar a segurança do uso das folhas e raízes de *U. baccifera* foi realizado ensaio de toxicidade *in vivo* com as infusões das folhas e raízes da planta em radículas de *A. cepa*. O artigo “Genotoxic evaluation of infusions of *Urera baccifera* leaves and roots in *A. cepa* cells”, descrito a seguir, foi publicado no ano de 2015 no periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research* (ISSN 0719-4250), volume 3, número 2, páginas 51-58.



## Genotoxic evaluation of infusions of *Urera baccifera* leaves and roots in *Allium cepa* cells

[Evaluación genotóxica de infusiones de hojas y raíces de *Urera baccifera* en células de *Allium cepa*]

Amanda L. Gindri<sup>1,2</sup>, Ana Paula D. Coelho<sup>3</sup>, Solange B. Tedesco<sup>3</sup>, Margareth L. Athayde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Phytochemical Research Laboratory, Industrial Pharmacy Department, Build 26, Room 115, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, ZIP Code 9105-900, Brazil.

<sup>2</sup>Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Santiago, ZIP Code 97700-000, Brazil.

<sup>3</sup>Cytogenetic Research Laboratory, Biology Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, ZIP Code 9105-900, Brazil.

E-mail: [amandagindri@gmail.com](mailto:amandagindri@gmail.com)

### Abstract

**Context:** The aqueous extracts of *Urera baccifera* Wedd. leaves and roots are used to inflammatory and infectious diseases in Brazilian folk medicine. Oxalic acid, a substance co-related with toxicity and stinging, was already quantified in this plant.

**Aims:** To evaluate the action of leaves and roots infusions (1, 30, 75 g/L) and the oxalic acid standard on mitosis as indicative of presumably antimutagenic and genotoxic actions, using the *Allium cepa* test.

**Methods:** Oxalic acid was quantified in the roots and leaves infusions by High-performance liquid chromatography (HPLC-DAD), with the mobile phase of 25 mM phosphate buffer (pH 2.5): acetonitrile at 95:5 (v/v). To the genotoxicity test, onion bulbs were used. After the rootlets germination, each bulb was submitted for 24 h of the individual treatments. Were analyzed 1000 cells per bulb, in a total of 5000 cells per treatment.

**Results:** Results showed that all concentrations of roots infusions induced chromosomes abnormalities, except for the highest, that caused a substantial inhibition in the mitosis, precluding to be observed abnormalities. In the leaves infusions, only the two higher concentrations caused the highest values of damage in the cellular cycle. The oxalic acid also caused abnormalities in the mitosis, and may be considered responsible by part of the genotoxic action of *U. baccifera*.

**Conclusions:** Oxalic acid can be responsible by part of the chromosomal abnormalities caused by *U. baccifera*, although, there must have more metabolites that evoke the same effect promoting the genotoxic effect of this nettle.

**Keywords:** Chromosome abnormalities; oxalic acid; stinging nettle; toxicity; Urticaceae.

### Resumen

**Contexto:** Los extractos acuosos de las hojas y raíces de *Urera baccifera* (L.) Ex.: Wedd. se utilizan en enfermedades inflamatorias e infecciosas en la medicina popular brasileña. El ácido oxálico, un compuesto co-relacionada con la toxicidad y el escozor, ha sido cuantificado en esta planta.

**Objetivos:** Evaluar la acción de las infusiones de las hojas y las raíces (1, 30, 75 g/L) y el estándar de ácido oxálico sobre la mitosis de raíces de *Allium cepa* como indicativo de presumbibles acciones antimutagénicas y genotóxicas.

**Métodos:** El ácido oxálico se cuantificó en las infusiones de raíces y las hojas por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-DAD), la fase móvil fue tampón de fosfato 25 mM (pH 2,5): acetonitrilo a 95:5 (v/v). Para la prueba de genotoxicidad se utilizaron bulbos de cebolla. Después de la germinación de las raicillas, cada bulbo se sometió a 24 h de tratamientos individuales. Se analizaron 1000 células por bulbo, un total de 5000 células por tratamiento.

**Resultados:** Los resultados mostraron que todas las concentraciones de infusiones de raíces indujeron anomalías cromosómicas, excepto la concentración más alta que causó una gran inhibición de la mitosis, lo que impide al estado de anomalías observadas. En las infusiones de hojas, sólo las concentraciones superiores indujeron los valores más altos de daños en el ciclo celular. El ácido oxálico también causó alteraciones en la mitosis.

**Conclusiones:** El ácido oxálico podría ser responsable de parte de las anomalías cromosómicas causadas por *U. baccifera*, aunque, hay que tener más metabolitos que evocan el mismo efecto, y actuar de forma sinérgica, favoreciendo el efecto genotóxico de esta ortiga.

**Palabras Clave:** Ácido oxálico; anomalías cromosómicas; ortiga brava; toxicidad; Urticaceae.

**Abbreviations:** AB: anaphasic bridges; AN%: chromosomes abnormalities perceptual; ANA: anaphase; BLC: breaks and lost chromosomes; BN: binucleate cells; DC: disorganised chromosomes; I: interphase; ME: metaphase; MI: mitotic index; MN: micronuclei; PRO: prophase; SD: standard deviation; Tel: Telophase

### ARTICLE INFO

Received | Recibido: February 23, 2015.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: May 14, 2015.

Accepted | Aceptado: May 15, 2015.

Available Online | Publicado en Línea: May 17, 2015.

Declaration of interests | Declaración de Intereses: The authors declare no conflict of interest.

Funding | Financiación: This work was supported by Federal University of Santa Maria (Brazil).

Academic Editor | Editor Académico: Berta Schulz.





---

## INTRODUCTION

---

*Ureca baccifera* (L.) Gaudich Ex. Wedd, popularly known as stinging nettle, is used to inflammatory diseases and rheumatic pains in Latin America folk medicine (Badilla et al., 1999a). Pharmacological activities of *U. baccifera* had already been confirmed by previous studies (Badilla et al, 1999a; Badilla et al, 1999b; Badilla et al, 2006; Martins et al, 2009; Onofre and Herkert, 2012; Gindri et al, 2014a), but few studies concerning their toxic activity were performed.

Crude extracts of *U. baccifera* roots and leaves present genotoxic effects in leukocytes, damage that was attributed to the presence of oxalic acid in the plant (Gindri et al., 2014b). The cytogenetic parameters induced by aqueous extracts of *U. baccifera* roots in *Allium cepa* show a non-significate reductions in the mitotic index, and a significate chromosome alterations during the division (Amat et al., 2002).

*Allium cepa* test is widely used to evaluate effects or damages that mutagenic agents might cause, especially by the capacity of this plant to be in a constant mitotic division, and also easily to identify the toxic effects and alterations that could occurring over a cell cycle of this plant (Tedesco and Laughinghouse IV, 2012).

Thus, in order to determine the potential anti-mitotic activity and genotoxicity actions of *Ureca baccifera*, roots and leaves infusions were analyzed using *Allium cepa* test, with the standard oxalic acid as reference.

---

## MATERIAL AND METHODS

---

### Plant material

The studied materials were collected from their natural habitats, in São Francisco de Assis, Brazil (29°37.115' S, 054°53.970'W; height 150 m), in November, 2012. The botanical identification of the material was performed by Prof. Dr. Renato Záchia. A voucher specimen was deposited in Herbarium of the Federal University of Santa Maria, Biology Department, with the number 13.070.

Aqueous extracts were obtained according ethnotherapeutic procedures, by infusion, in 1, 30, and 75 g/L.

### Oxalic acid quantification by high-pressure liquid chromatography

Oxalic acid was quantified in the infusions of roots and leaves following the Fu et al. (2006) methodology with minor modifications. High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT, reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC Solution 1.22 SP1, C-18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase was 25 mM phosphate buffer (pH 2.5): acetonitrile at 95:5 (v/v), at a flow rate of 0.8 mL/min and 20 µL of each sample were injected. The peak was identified by comparison with the retention time of the standard (Fig. 1) solution, at a wavelength of 207 nm. The concentrations of the samples were 5.0 mg/mL in distilled water and were tested in triplicate. The calibration curve of oxalic acid in the concentration range of 1.0 - 5.0 mg/mL was made in triplicate, and the equation obtained was  $y = 9116848x + 5156373$ ,  $R = 0.9967$ . The retention time of oxalic acid standard was 2.0 min.

### Genotoxic evaluation

Onion bulbs cultivated without the application of herbicides or fungicides were obtained to this test. The bulbs were scraped at the root to promote the emergence of new roots. To set-up the experiment allowing rootlets to grow, all bulbs were placed initially in a small 50 mL plastic cup containing distilled water for three days to the rootlets can emerge. After this period, the bulbs were transferred to other clean and dry containers including the samples (treatments). They were used five groups of bulbs of *Allium cepa* for each treatment, one being a negative

control in distilled water and another for the positive control in glyphosate 2 and 15%.

The rootlets were submitted for 24 hours of the individual treatments. They were collected and immediately fixed in ethanol:acetic acid (3:1), also for 24 hours. Afterwards, the rootlets were removed from the fixing solution and transferred to ethanol 70%, where they were kept under refrigeration (4°C) until used. The rootlets were hydrolyzed in hydrochloric acid for five minutes and rinsed in distilled water just before the slides preparation.

They were analyzed 1000 cells per bulb, totaling 5000 cells per treatment (Tedesco and Laughinghouse IV, 2012). The slides were prepared for squashing technique (Guerra and Souza, 2002) and stained acetic orcein 2%, and then analyzed in a Leica microscope (Leica Microsystems, Germany).

Mitotic index (M), prophase (Pro), metaphase (Me), anaphase (Ana) and telophase (Tel) indexes were the cytological parameters studied, as well as chromosomes abnormalities (AN%), production of micronuclei (MN) and binucleated cells (BN) at interphase. The mitotic index (MI) were measured as the following equation:

$$MI = \frac{[\text{total number of cells observed} \\ (\text{cells in interphase} + \text{cells in division}) / \\ \text{number of cells in interphase}] \times 100.$$

### Statistical analysis

The obtained values were statistically analyzed by means of the chi-square ( $\chi^2$ ) test, with a level of probability of  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Oxalic acid quantification in the infusions of *U. baccifera* leaves and roots are presented in the ensuing table (Table 1).

**Table 1.** Quantification of oxalic acid in the leaves and roots of *Urera baccifera*.

	Leaves	Roots
Oxalic acid (mg/g)	0.263 ± 0.098	0.154 ± 0.109

The values are mean ± standard deviation. The quantification was made in triplicate.

<http://jppres.com/jppres>

As observed in the oxalic acid quantification, the leaves presented a value almost two times bigger than the roots. In a previous study, *U. baccifera* crude extract presented oxalic acid in leaves (0.44 ± 0.05 mg/g) and roots (1.79 ± 0.22 mg/g) in a higher concentration (Gindri et al., 2014b), probably due the different extraction method performed – the prior study used maceration. Usually, the infusion is used to plant parts of the soft structure while decoction is used to rigid and woody plants (Tedesco and Laughinghouse IV, 2012). In this study, the infusion was used to leaves and roots to reproduce the popular use of *U. baccifera* in Brazil.

Oxalic acid and tartaric acid were already proposed as the possible persistent pain-inducing agents in the stinging hairs of *Urtica thunbergiana*, from Urticaceae (Fu et al., 2006). The presence of oxalic acid in the infusions of *U. baccifera* confirm the stinging and pain caused by this nettle.

The *Allium cepa* cell cycle can be taken into consideration after 24 hours, and is divided into interphase and dividing cells, comprehending the prophase, metaphase, anaphase and telophase phases (Tedesco and Laughinghouse IV, 2012). The cells observed in the different phases of cell division are exposed in the next table (Table 2) and can be observed in the ensuing figures (Figs. 1-3).

The observation of cells in interphase and division cells, as well as the mitotic index, are used as indicators of an adequate proliferation of the cells (Tedesco and Laughinghouse IV, 2012). In this study, the negative control distilled water presented a value of 3.38% of mitotic index (MI) and do not differ statistically from the negative control, glyphosate 2% (MI: 3.66%), leaves 75 g/L (MI: 4.00%) and roots 1 g/L (MI: 3.72%), all treatments allowing the regular mitosis in the *A. cepa* cells.

The major concentration of glyphosate 15% was capable of inhibit the mitosis in the test plant (MI: 0.16%), being not possible to observe division of the cells. The same occurs to the roots 75 g/L (MI: 0.34%) and leaves 1 g/L (MI: 1.40%) and 30 g/L (MI: 1.84%) with significant differences ( $p < 0.05$ ) in those treatments. Studying the aqueous extracts of *U. baccifera* roots in 75 g/L at the same

method, Amat et al. (2002) observed no significant reductions in the mitotic index of *A. cepa*.

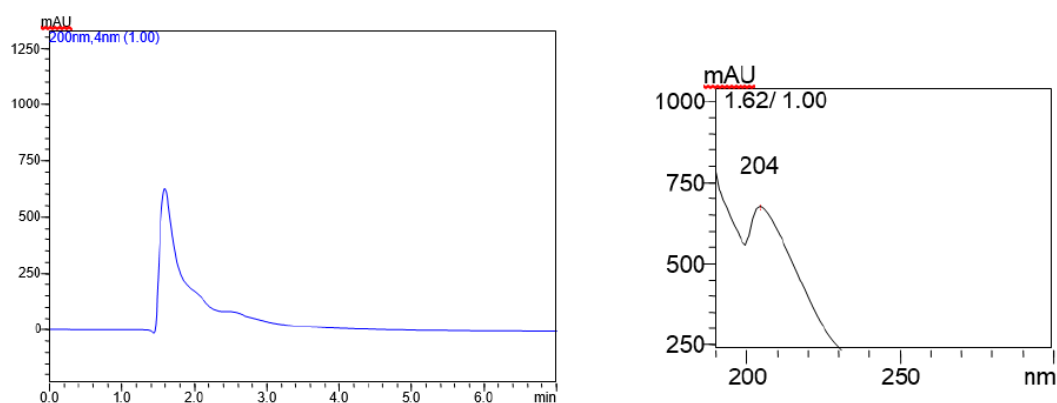
**Table 2.** Meristematic cells of *Allium cepa* in different steps of the cellular cycle, submitted to different treatments of *Urera baccifera* leaves and roots.

Treatment	Concentration	I	Pro	Me	Ana	Tel	MI
Negative Control - Water	-	4831	82	41	26	20	3.38 <sup>a</sup>
Positive Control - Glyphosate (%)	2	4917	103	30	18	32	3.66 <sup>a,b</sup>
	15	4992	5	3	-	-	0.16 <sup>c</sup>
Oxalic acid (mg/mL)	1	4740	184	27	10	39	5.20 <sup>d</sup>
Roots (g/L)	1	4814	117	26	24	19	3.72 <sup>b,f</sup>
	30	4735	168	33	35	29	5.30 <sup>d</sup>
	75	4983	14	-	3	-	0.34 <sup>e</sup>
Leaves (g/L)	1	4930	53	3	-	14	1.40 <sup>g</sup>
	30	2908	40	14	3	35	1.84 <sup>h</sup>
	75	4800	114	34	21	31	4.00 <sup>f</sup>

I: Interphase; Pro: Prophase; Me: Metaphase; Ana: Anaphase; Tel: Telophase; MI: Mitotic index.

Different letters represent statistically different results.

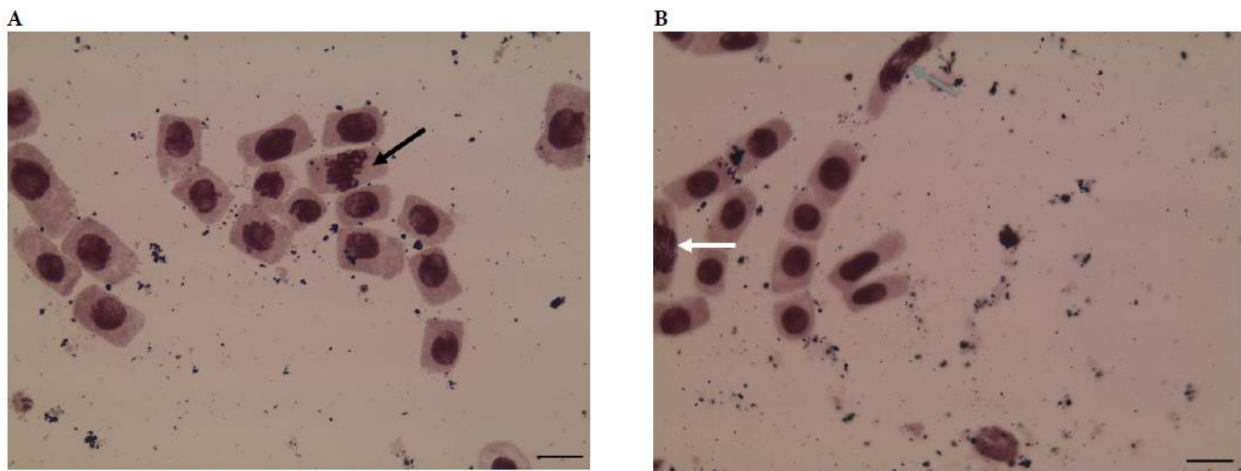
In this experiments were analyzed 1000 cells per bulb, totaling 5000 cells per treatment.



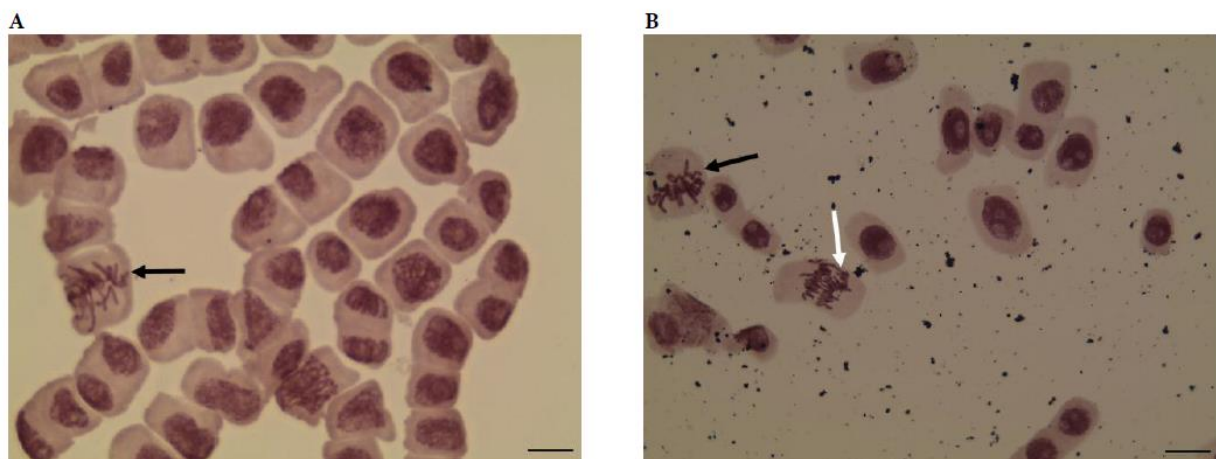
**Figure 1:** Chromatogram and DAD of the standard oxalic acid in 4 mg/mL.

The calibration curve with the standard and the samples were analyzed in triplicate.





**Figure 2.** A and B: *Allium cepa* meristematic cells showing the alterations due to the action of oxalic acid. Black arrow: disorganization of the metaphase White arrow: lost chromosome; Gray arrow: anaphasic bridges. 40X. Scale: 10  $\mu$ m.



**Figure 3.** *Allium cepa* meristematic cells showing the alterations due to the action of *U. baccifera* infusions. A: roots infusion (1 g/L). B: leaves infusion (75 g/L). Black arrow: breaks and lost chromosomes during metaphase. White arrow: anaphasic bridges and lost chromosomes in anaphase. 40X. Scale: 10  $\mu$ m.

The antiproliferative activity of plants was also observed to *Pluchea sagittalis* (Rossato et al., 2010), *Achirocline satureioides* (Fachinetto et al, 2007) and in high concentrations of *Bauhinia candicans* (Camparoto et al., 2002).

On the other hand, oxalic acid and roots 30 g/L induced mitosis in *A. cepa* cells, which was observed by the increase of division cells (PI, MeI, AI and TI) and the high value of MI (5.20 and 5.30%, respectively), being statistically different ( $p < 0.05$ ) when compared to distilled water MI value (3.38%).

<http://jppres.com/jppres>

Aqueous extracts of “boldo” species’ *Vernonia condensata*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus amboinicus* also evoke an increase in the mitotic index when evaluated by the same method (Iganci et al., 2006).

Genotoxicity is the capacity of clastogenic agents to cause lesions in the genetic material. The evaluations of genotoxicity include, mainly, damage in the DNA, mutations and chromosomal alterations (Tedesco and Laughinghouse IV, 2012). The irregular cells observed (Figs. 1-3) among the

division cells are detailed in the ensuing table (Table 3).

During interphase, no irregularities were found. The major concentration of glyphosate 15% inhibit the mitosis in *Allium cepa* (MI: 0.16%), being not possible to observe division cells and cell abnormalities. The same occurs to the roots 75 g/L (MI: 0.34%), with significant differences. It is important to highlight that in the activity of the roots in 75 g/L was very similar to the glyphosate 15%, a non-selective systemic herbicide, what indicate that a tea of *U. baccifera* at this concentration can be dangerous to human health.

Taken into consideration the abnormalities observed (AN), the negative control (AN: 1.78%), with few cells presenting chromosomal abnormalities, presented no statistical differences from leaves 1 g/L (AN: 1.43%). In other words, the infusion of the leaves in low concentration caused no damage in *A. cepa* cells. Differently from oxalic acid (AN: 4.62%) and roots 30 g/L (AN: 5.56%), that have a perceptual of abnormalities almost three times higher, being observed breaks and lost chromosomes and disorganized chromosomes.

**Table 3.** Dividing cells, cellular aberration and chromosome abnormalities caused by *U. baccifera* extracts in *A. cepa* cells.

Treatment	Division cells	Cellular aberrations					Total of irregularities	AN%
		AB	BLC	BN	MN	DC		
<b>Negative control - Water</b>	169	1	2	-	-	-	3	1.78
<b>Positive control - Glyphosate (%)</b>								
2	183	15	13	-	2	17	45	24.6
15	8	-	-	-	-	-	0	0
<b>Oxalic acid (1 mg/mL)</b>	260	1	1	-	-	10	12	4.62
<b>Roots (g/L)</b>								
1	186	3	3	-	-	11	17	9.14
30	265	2	6	-	1	6	15	5.66
75	17	-	-	-	-	-	0	0
<b>Leaves (g/L)</b>								
1	70	-	-	-	1	-	1	1.43
30	92	-	2	-	-	6	7	7.61
75	200	1	7	-	-	14	22	11.0

AB: Anaphasic bridges; BLC: Breaks and lost chromosomes; MN: micronuclei; BN: binucleated cells; DC: Disorganized chromosomes; AN%: Chromosomes abnormalities percentage.

In this experiment were analyzed 1000 cells per bulb, totaling 5000 cells per treatment.

The biggest percentage of chromosomes abnormalities was observed in the roots 1 g/L and the leaves 30 g/L and 75 g/L (9.14, 7.61 and 11.0%, respectively), as demonstrated in the Fig. 3. In this study, all concentrations of roots infusions induced damage in the cellular cycle, except for the highest (75 g/L), that caused a substantial inhibition of the mitosis. In the infusions of leaves, only the two higher concentrations caused the highest values of chromosomes abnormalities. Significant production of chromosome abnormalities were recorded in *U. baccifera* roots previously (Amat et al., 2002). It is important to highlight that Amat et al. (2002) use only the roots of *U. baccifera*, and in a concentration of 75 g/L. In this study was made a comparison between the roots and the leaves of the stinging nettle, since the leaves were tested and popularly used as an anti-inflammatory remedy (Badilla et al., 1999a; 1999b; 2006). The *U. baccifera* aqueous extracts caused events that demonstrate the anti-proliferative ability (roots 75 g/L and leaves 1 and 30 g/L) and genotoxic potential (roots 30 g/L and leaves 30 and 75 g/L) on the *A. cepa* cell cycle. These conditions may result from various interactions of different chemical components present in the plant, which probably causes inhibitory effects on the cell cycle. Phenolics, flavonoids, alkaloids and condensed tannins were already quantified in this nettle, beyond the oxalic acid (Gindri et al., 2014b). To the flavonoid quercetin was attributed the anti-proliferative effect (De Souza et al., 2010). Rossato et al. (2010) reported that the anti-proliferative capacity obtained in their study by the same test can be attributed to the smallest concentration or type of bioactive substances. The low concentration of metabolites of *U. baccifera* were previously described (Gindri et al., 2014b).

Oxalic acid was responsible for 4.62% of chromosomes abnormalities (Fig. 2A-B), what could explain part of the cellular aberrations observed in the infusions. In plants, calcium oxalate deposition is common and their proposed functions include calcium regulation, ion balance (e.g. sodium and potassium), plant protection, tissue support (plant rigidity), detoxification (e.g. heavy metals or oxalic acid), and light gathering

and reflection (Nakata, 2003). Oxalic acid in *U. baccifera* confirm the stinging and pain caused by this nettle, besides justified the genotoxicity caused by the infusions of *A. cepa* meristematic cells.

---

## CONCLUSIONS

The results demonstrated that infusions at different concentrations of *U. baccifera* have genotoxic activity. Oxalic acid can be responsible in part of the chromosomal abnormalities caused by *U. baccifera*, although, an even broader question raised by this study concerns that there must have more metabolites that evoke the same effect, and act synergically, promoting the genotoxic effect of this nettle.

---

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

---

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Federal University of Santa Maria (Brazil).

---

## REFERENCES

- Amat AG, Yajia ME, Gonzalez CF, Lorca GL, Sanchez Gonzalez F, Riglos AG, Veron JR (2002) Evaluation of cytological parameters induced by aqueous extracts of seven plants used as antihypertensive agents in Argentine folk medicine. *Lat Am J Pharm* 21: 34-42.
- Badilla B, Chaves F, Mora G, Poveda JL (2006) Edema induced by *Bothrops aspes* (Squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rican plant extracts. *Rev Biol Trop* 54: 245-252.
- Badilla B, Mora G, Lapa AJ, Emim JAS (1999a) Anti-inflammatory activity of *Ureia baccifera* (Urticaceae) in Sprague-Dawley rats. *Rev Biol Trop* 47: 365-371.
- Badilla B, Mora G, Poveda LJ (1999b) Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of five Costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats. *Rev Biol Trop* 47: 723-727.
- Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS, Vicentini VEP (2002) Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genet Mol Biol* 25: 85-89.
- De Souza LFB, Laughinghouse IV HD, Pastori T, Tedesco M, Kuhn AW, Do Canto-Dorow TS, Tedesco SB (2010) Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. *Int J Environ Stud* 67: 871-877.
- Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB (2007) Efeito anti-proliferativo das infusões



- de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacogn* 17: 49-54.
- Fu HY, Chen SJ, Chen RF, Ding WH, Kuo-Huang LL, Huang RN (2006) Identification of oxalic acid and tartaric acid as major persistent pain-inducing toxins in the stinging hairs of the nettle, *Urtica thunbergiana*. *Ann Bot* 98: 57-65.
- Gindri AL, de Souza LB, Cruz RC, Boligon AA, Machado MM, Athayde ML (2014b) Genotoxic evaluation, secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Ureia baccifera* Gaudich (Urticaceae). *Nat Prod Res* 28: 37-41.
- Gindri AL, Kubiça TF, Mario DN, Oliveira SM, Silva CR, Cabreira TN, Boligon AA, Ferreira J, Lovato LT, Weiblen R, Alves SH, Athayde ML (2014a) Antiviral, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Ureia baccifera*. *Afr J Pharm Pharmacol* 8: 284-291.
- Guerra M, Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: Funpec, 131 p.
- Iganci JRV, Bobrowski VL, Heiden G, Stein VC, Rocha, BHG (2006) Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. *Arq Inst Biol* 73: 79-82.
- Martins FO, Gomes MMR, Nogueira FLP, Martins GR, Romanos MTV, Kaplan MAC, Menezes FS (2009) *In vitro* inhibitory effect of *Ureia baccifera* (L.) Gaudich. extracts against herpes simplex. *Afr J Pharm Pharmacol* 3: 581-584.
- Nakata PA (2003) Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sci* 164: 901-909.
- Onofre SB, Herkert PF (2012) Antimicrobial activity of extracts obtained from *Ureia baccifera* (L.) Gaudich. *Adv Life Sci* 2: 139-143.
- Rossato LV, Tedesco SB, Laughinghouse IV HD, Farias JG, Nicoloso FT (2010) Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems. *An Acad Bras Cienc* 82: 857-860.
- Tedesco SB, Laughinghouse IV HD (2012) Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test, Chapter 8, In: Environmental Contamination, Srivastava JK (Ed.): InTech, Croatia.

#### 4.3 MANUSCRITO 1 – *Uretra baccifera*: A POTENT GENOTOXIC AND CYTOTOXIC NETTLE ACTIVE AGAINST PROSTATIC TUMORAL CELLS WITH ISOFLAVONE CONTENT

O manuscrito apresentado a seguir está intitulado “*Uretra baccifera*: a potent genotoxic and cytotoxic nettle active against prostatic tumoral cells with isoflavone content”. Este trabalho contém os ensaios de toxicidade: Teste de Capacidade Genomodificadora (Teste de Quebra de DNA Dupla fita) e Ensaio Clonogênico, bem como apresenta os resultados de atividade antitumoral da planta contra células humanas de adenocarcinoma de próstata e a quantificação das amostras por HPLC-DAD-MS. Este trabalho foi redigido na língua inglesa e será submetido em breve a periódico internacional.



***Urera baccifera*: a potent genotoxic and cytotoxic nettle active against prostatic tumoral cells with isoflavone content**

Amanda Leitão Gindri<sup>a, b\*</sup>; Fernanda Barbisan<sup>c</sup>, Cristiano Trindade<sup>d</sup>, Lenise de Lima Silva<sup>b</sup>; João Antonio Pêgas Henriques<sup>d</sup>; Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>c</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>a</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>e</sup>

a Phytochemical Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

b Department of Health Sciences, Integrate Regional University of High Uruguay and Missions, Santiago Campus, Santiago, Rio Grande do Sul, Brazil.

c Biogenomic Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

d Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre - RS, Brazil.

e Mycological Research Laboratory, Federal University of Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Correspondence to: Benjamin Constant street, n°930/114. CEP: 97.050-020. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail address: [amandagindri@gmail.com.br](mailto:amandagindri@gmail.com.br)

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** The specie *Urera baccifera* is known as red nettle or stinging nettle and is popularly used to treat rheumatic pains, arthritis, ringworm and prostatic hyperplasia in southern Brazil. However, there is no study concerning its action in prostatic cells and are few studies about this shrub toxicity.

**Aim of the study:** To evaluate the action of *U. baccifera* roots and leaves crude extracts and fractions in calf thymus DNA (genotoxic or genoprotective action), DU 145 human prostate adenocarcinoma cell line (antitumor action) and colony-forming ability (cytotoxic action). Oxalic acid, substance already quantified in this plant, was also tested. Additionally, it was analyzed the chemical composition of this plant extracts and fractions in HPLC-DAD-MS.

**Materials and Methods:** The roots and leaves were macerated (ethanol 70%) and fractioned with chloroform, ethyl acetate and butanol. The genomodified capacity test used pure dsDNA (calf thymus DNA) and a specific dsDNA dye (PicoGreen®). Antitumor evaluation against prostate carcinoma cells used DU 145 human prostate adenocarcinoma cell line. Colony-forming ability used exponentially growing V79 cells. The quantification of secondary metabolites was made in HPLC-DAD-MS, after the samples hydrolysis.

**Results:** The fractions and crude extract of roots along with crude extracts of the leaves presented an elevated genotoxicity in dsDNA. The antitumor action in prostate cells was preeminent in the leaves and fractions of the roots. Leaf presented a higher cytotoxic action than the roots in the colony-forming ability assay. The isoflavon daidzein was quantified in all the samples, and the crude extracts of the leaves presented also genistein and glycitin.

**Conclusions:** The leaves' crude extract showed major genotoxic and cytotoxic activity and the most antitumor action. Additionally, this extract contained a much larger quantity of daidzein than the roots' crude extract, as well as the presence of genistein and glycitin.

**Key words:** clonogenic assay; GEMO test; daidzein; oxalic acid; stinging nettle; Urticaceae.

**Glossary:**

ANOVA: analysis of variance; BuOH: *n*-butanol; CE: crude extract; CHCl<sub>3</sub>: chloroform; dsDNA: calf thymus DNA; EtOAc: ethyl acetate; HPLC-DAD-MS: High performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometry detector; IGF-1: insulin-like growth factor-1; MTT: 3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; OA: Oxalic acid; PC-3: prostate cancer cells TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand.

### 4.3.1 Introduction

The shrub *Urera baccifera* (L.) Gaudich ex. Wedd is known as red nettle or stinging nettle due the presence of stinging hairs that irritate human skin. This plant is popularly used to treat rheumatic pains and arthritis (Badilla et al., 1999), as well as ringworm and prostatic hyperplasia in southern Brazil (Gindri et al., 2013).

The anti-inflammatory and analgesic properties of *U. baccifera* leaves were confirmed in intraperitoneal studies in mice (Badilla et al., 1999, Badilla, Mora and Poveda, 1999; Badilla et al., 2006), but not with oral administration of their roots and leaves (Badilla et al., 1999, Gindri et al., 2014b). Studies also showed evidence for the *in vitro* antimicrobial properties of the nettle's roots and leaves against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Onofre and Herkert, 2012), *Klebsiella pneumoniae*, *Prototheca zopfii*, and *Saccharomyces cerevisiae* (Gindri et al., 2014b). Additionally, the leaves and roots were also confirmed to fight Herpes virus type 1 *in vitro* (Gindri et al., 2014b, Martins et al., 2009).

However, there are limited studies concerning the toxicity of this nettle (Amat et al., 2002, Gindri et al., 2014a, Gindri et al., 2015). Genotoxic effects were observed in the leukocytes of the butanolic parts of roots and leaves, and this damage was linked to the presence of oxalic acid (Gindri et al., 2014a). Chromosome abnormalities and inhibition of mitosis were attributed to infusions made from the roots and leaves in the *A. cepa* test (Amat et al., 2002, Gindri et al., 2015).

Taking into consideration the pharmacological properties of this species and the small number of studies concerning its toxic potential, the present work intends to evaluate the genotoxic and cytotoxic action of different parts of the plant *U. baccifera*. Crude extracts and fractions obtained from the leaves and roots were tested in calf thymus DNA (dsDNA) in order to verify the possible genomodifier effect of this plant.

Then, an experiment to verify the possibility of the plant's action against the DU 145 human prostate adenocarcinoma cell line was carried out to confirm the folk use of this plant in the south of Brazil. In order to evaluate the cytotoxic properties of this species, the researchers studied the colony-forming ability of the plant's crude extracts and butanolic fractions. Finally, the chemical composition of *U. baccifera* extracts and fractions were evaluated using high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and mass spectrometry to explain the effects observed in the other tests.

### **4.3.2 Methods and materials**

#### *4.3.2.1 Preparation of the sample extracts and fractions*

The leaves and the roots of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. ex Wedd. (checked with [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org) at June, 11<sup>th</sup>. English name: stinging nettle or red nettle. Local name: urtiga-brava) were collected in São Francisco de Assis, RS, Brazil (29°37.115' S, 054°53.970'W; height 150m) in May of 2010. The plant was identified by Dr. Renato Zachia of the Federal University of Santa Maria, and a voucher has been deposited at the University Herbarium's Biology Department with the specimen number, 13.070. The material (1000 grams of roots and 400 grams of leaves) were reduced, dried, milled and taken to maceration with 70% ethanol for 28 days with daily agitation. Once every week, each extract was filtered, giving the respective ethanol extract, and fresh extraction solvents were added. The extracts were combined, and the ethanol was eliminated by a rotary evaporator, thereby producing the aqueous extracts (roots and leaves separated). Parts of the aqueous extracts were completely dried, creating crude extracts (CE), and parts were fractioned with the crescent polarity solvents chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc), and *n*-butanol (BuOH). The fractions were dried in the same manner.

#### *4.3.2.2 Genomodified capacity test (DNA double-strand breaks test)*

The genomodified capacity test used pure dsDNA (calf thymus DNA) and a specific dsDNA dye (PicoGreen<sup>®</sup>) as defined by Cadoná et al. (2014). The assessment was performed in a black 96-well plate where the dsDNA (Invitrogen,

Eugene, OR, EUA) was diluted in a TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and exposed to the CE, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, and BuOH of the leaves and roots. Oxalic acid standard (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 400, 1000 and 1800 µg.mL<sup>-1</sup> underwent the same process. These concentrations of oxalic acid were chosen according to descriptions in previous studies that quantified this compound in the same samples of *U. baccifera* (Gindri et al., 2014a). The extracts (1, 10, 100 and 1000 µg.mL<sup>-1</sup>), fractions (1, 10, 100 and 1000 µg.mL<sup>-1</sup>), and oxalic acid standard (400, 1000 e 1800 µg.mL<sup>-1</sup>) were diluted in distilled water before the tests.

After 30 minutes, PicoGreen<sup>®</sup> was added, and the fluorescence was read at room temperature in a SpectraMax M2/M2e multi-mode plate reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) at an excitation of 480nm and an emission of 520 nm. To avoid the oxidative effects of light on the reaction, the experiment was conducted in darkness.

The fluorescence of the treatments was compared with a non-treated dsDNA sample (negative control), using the following equation to determine the mean percentage of the control sample: control sample = (fluorescence of each treatment X 100)/fluorescence of the non-treated sample. The results are presented as mean ± standard deviation (SD).

#### 4.3.2.3 Antitumor evaluation against prostate carcinoma cells

##### 4.3.2.3.1 Cell culture conditions

The DU 145 human prostate adenocarcinoma cell line was purchased from the American Type Culture Collection (Bethesda, MD). Cells were grown as monolayers in DMEM with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B. The cells were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. The confluence was 1x10<sup>5</sup> cells/mL and the passages from 16 to 18. Culture plates for each subject were prepared at a final concentration of 1 x 10<sup>5</sup> cells.mL<sup>-1</sup>. After cell attachment, the cultures were treated with crude extract and fractions of *U. baccifera* roots and leaves (1, 10, 100 and 1000 µg.mL<sup>-1</sup>). The cells were then incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 72 h for the assessments.

#### 4.3.2.3.2 Cell proliferation assay

After 72 hours of exposure, cell proliferation was analyzed by the MTT (3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assessment as described by Mosmann (1983). Treated cells were incubated for one hour with a MTT reagent at 37°C. After dissolving the formazan salt in DMSO (dimethyl sulfoxide), the absorbance was measured at 560 nm. The MTT assessment was performed using a 96-well plate in three independent replications. The results were expressed as a percentage of the untreated control values.

#### 4.3.2.4 Colony-forming ability (clonal survival)

Exponentially growing V79 cells were treated according to the experimental protocol of Mirabelli et al. (1988). After treatment, the cultures were trypsinized, and 200 cells were seeded to determine their colony-forming ability. Cells were treated with crude extracts and butanolic fractions from the leaves and roots (1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in an FBS-free medium for three hours at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. These samples were chosen for this test due to the results of this study and the previous reports of the plant's high concentration of oxalic acid (Gindri et al., 2014a) and antiviral activity (Gindri et al., 2014b, Martins et al., 2009). After seven days of incubation, the colonies were fixed with methanol and acetic acid (3:1), stained with crystal violet (0.1%) and counted. Survival was calculated as a percentage relative to the survival of the control cells. The data were obtained from at least three independent experiments in duplicate, and the results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

#### 4.3.2.5 Identifying and quantifying secondary metabolites by HPLC-DAD-MS

The samples were hydrolyzed according the César et al. (2006) methodology. Thereby, 50 mg of each sample were added to 100 mL volumetric flask with 80 mL of 3 M HCl ethanolic solution. After sonication for 5 min, the solution was submitted to steam bath during 40 min. After cooling, the flask was filled up and 5mL were transferred to a volumetric flask of 25 mL and the volume was adjusted to 25 mL with mobile phase B (methanol: acetic acid: distilled water at 18:1:1).

The identification and quantification of the metabolites in the hydrolyzed crude extract and fractions of *U. baccifera* leaves and roots in the present study follow the Vieira et al. (2001) methodology with minor modifications. High performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometry detector (HPLC-DAD-MS) corresponded to a Shimadzu Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an Auto-Sampler (SIL-20AHT), two Shimadzu LC-20ADT reciprocating pumps connected to the degasser DGU20A3R, integrator CBM20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A, and oven CTO-20A.

The HPLC system was coupled to the compact quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass analyzer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), which was controlled using OtofControl Software. The parameters for analysis were set using negative ion modes with spectra acquired over a large range from 50 to 1200 m/z. The optimum values of the ESI-MS parameters were a capillary voltage of 4500V, drying gas temperature of 215°C, drying gas flow of 10.0 L/min, nebulizing gas pressure of 5.0 Bar, collision RF of 150 Vpp, transfer time of 70 ls, and a pre-pulse storage of 5 ls. Additionally, automatic MS/MS experiments were performed using nitrogen as collision gas and by adjusting the collision energy values as follows: m/z 100, 20 eV; m/z 500, 30 eV; and m/z 1000, 35 eV. The MS data was analyzed using Data Analysis 4.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Analyses were carried out within the C-18 column (4.6 mm x 250 mm, Merck, Germany) packed with 5 µm diameter particles and within the C-18 pre-column (RP 18 5µm, Merck, Alemanha). The first mobile phase, phase A, was two percent acetic acid at a pH of 4.2. The second mobile phase, phase B, used methanol, acetic acid, and distilled water at a ratio of 18:1:1, respectively. The gradient elution was 0 min: 20% of B, 0-25 min: 50% of B, 25 min: 20% of B, 30 min: 20% of B (end of run), at the flow rate of 0.8 mL/min. The peaks were identified by comparing the present results with the retention times and mass spectrums from the software library and external standards. The external standards included a 40% isoflavone pool (Daidzin: 3.1%, Glycitin: 1.56%, Genistin: 0.98%, Daidzein: 35.49%, Glycitein: 0.1%, and Genistein: 0.03% - Dongming Hui ren Biological Products, Shandong, China) between 0.156–2.34 mg/mL of glycitin, 3.5-53.2 mg/mL of daidzein, 3–4.5 µg/mL of genistein, and levels of caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid, catequin, luteolin, cumarin, quercetin and rutin (all standards by Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) between 1.5 and 24 µg/mL. All samples (CE, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, and BuOH of the leaves and roots)

and standards were tested in triplicate. The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

#### 4.3.2.6 Statistical analysis

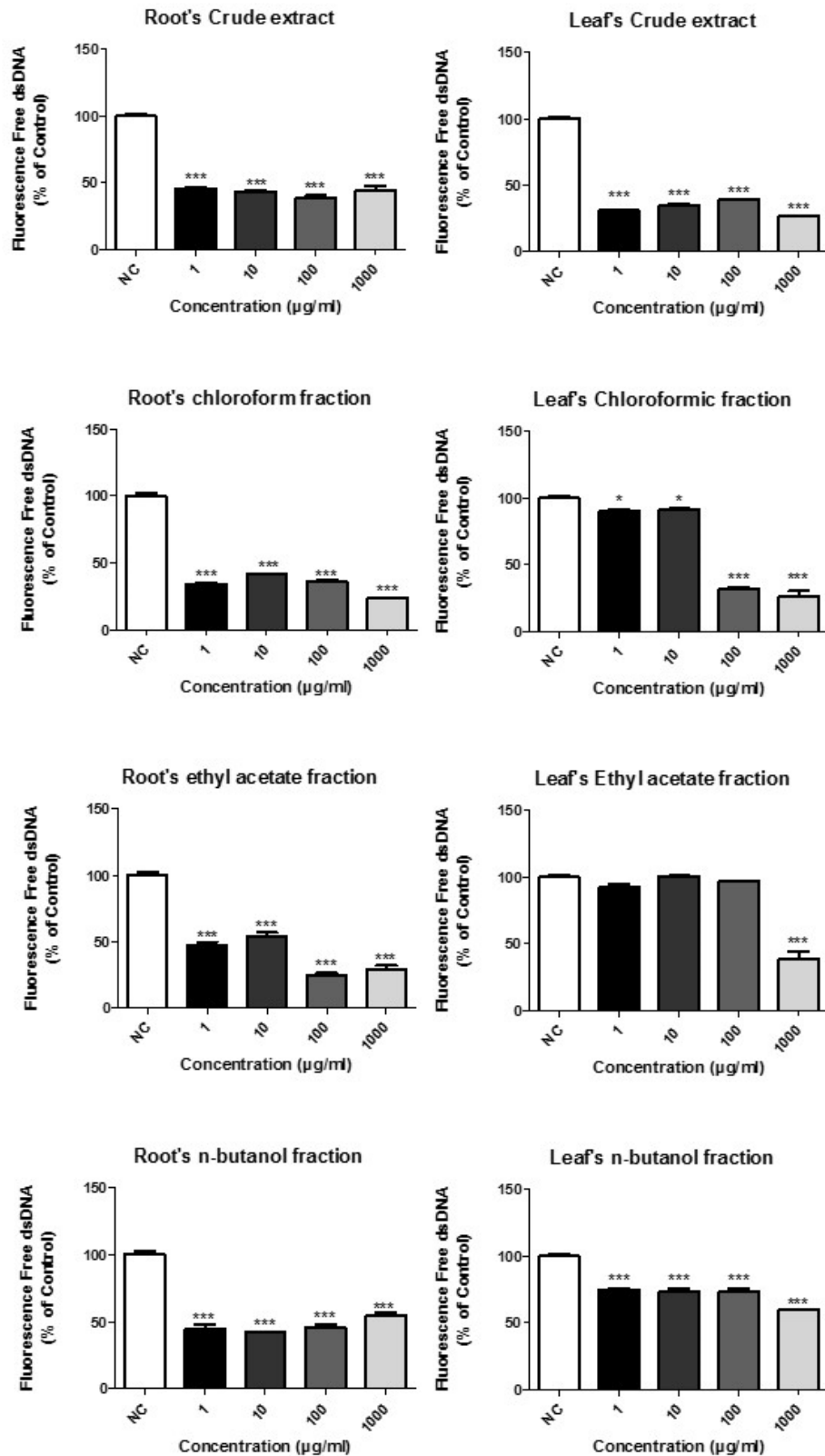
Comparisons to the negative control were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) tests followed by the Dunnett test with only p values of less than 0.05 being considered statistically significant. In the secondary metabolites quantification, the differences among experimental data were analyzed with one-way ANOVA tests followed by the Tukey test, again with p values of less than 0.05 being considered statistically significant. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) and Statistica version 7.0 (Starsoft) software.

### 4.3.3 Results and discussion

#### 4.3.3.1 Genomodified capacity test (DNA double-strand breaks test)

The DNA double-strand breaks assessment is a non-cell method that identifies chemicals or plant extracts with genomodifier (genotoxic or genoprotective) capacities. The genotoxic effect in dsDNA may be evaluated using PicoGreen<sup>®</sup> reagent, a specific dsDNA dye that emits fluorescence when it binds with dsDNA, forming a highly luminescent complex (Dragan et al., 2010). In this assessment, when chemicals or plant extracts cause a break in dsDNA, this damage is evidenced by a decrease in fluorescence when compared to that observed in the control group (untreated dsDNA). Thus, a fluorescence decrease indicates genotoxic activity (Cadoná et al., 2014), which was observed in almost all samples of *U. baccifera*, suggesting the plant's genotoxic capacity (Fig. 1).

According to Cadoná et al. (2014), samples that present dsDNA fluorescence between 50.1 and 100% are considered moderately genotoxic. Thus, the leaves' BuOH (1000 – 1  $\mu$ g/mL) and EtOAc (100 and 1  $\mu$ g/mL) fractions (Fig. 1) can be classified as moderately genotoxic.



**Figure 1** – Percentage of fluorescence free dsDNA of the negative control (non-treated dsDNA sample) and *Ureia baccifera* roots and leaves extracts and fractions. NC: negative control (non-treated dsDNA sample). \*\*\*Statistically different from the negative control (non-treated dsDNA sample), analyzed by Dunnett post test at  $p < 0.05$ .



However, samples with values lower than 50% demonstrate high genotoxicity (Cadoná et al., 2014). In this case, the root samples in all concentrations (Fig. 1), in the CE (1000 – 1 µg/mL) and CHCl<sub>3</sub> (1000 and 100 µg/mL) samples from the leaves (Fig. 1), and in the oxalic acid samples (3.71 to 3.94% fluorescence-free dsDNA) fall into this classification. Even though the BuOH 1000 µg/mL from the roots exhibited a dsDNA fluorescence of 54% (Fig. 1), that value was not statistically different from the other concentrations tested to the same fraction (100, 10 and 1 µg/mL), so this sample was also classified as highly genotoxic. The EtOAc at 10 µg/mL (53% dsDNA fluorescence) sample from the roots was ranked as being highly genotoxic due the fact that this sample is not statistically different from the EtOAc at 1 µg/mL from the roots (Fig. 1).

The leaves' samples, CHCl<sub>3</sub> at 10 and 1 µg/mL and EtOAc 10 µg/mL (Fig. 1), are statistically similar to the negative control (non-treated dsDNA sample), presenting no genomodification capacity (Cadoná et al., 2014).

The present study's results agree with previous studies (Gindri et al., 2014a) that showed reduction in proliferation, decreases in mitotic index, and DNA damage in leucocytes with butanolic fractions from *U. baccifera*'s leaves and roots. Therefore, use of the plant's butanolic fractions should be discouraged. The DNA damage has been attributed to the presence of oxalic acid (OA) in this plant (Gindri et al., 2014a), an attribution that was also confirmed in this study. A strong reduction in the dsDNA fluorescence was demonstrated in OA samples between 3.5 – 3.9% in concentration, doses that were quantified in previous studies (Gindri et al., 2014). Additionally, the roots exhibit a higher concentration of OA than the leaves (Gindri et al., 2014), and the roots' fractions and crude extract (CE) presented a higher genotoxic potential.

Oxalic acid (OA) is a soluble salt that can be found in vegetable tissues. This substance can induce intoxication by oxalating in living beings, causing clotting of the blood (Noonan and Savage, 1999). Although a dose of about five grams is needed before this dose is considered lethal to adults, this constituent is considered a toxic compound of plants that may cause centrolobular hepatic necrosis and birefringent crystals in the liver and kidneys (Guil, Rodríguez-García and Torija, 1997). However, OA was not evidenced in CHCl<sub>3</sub>, and this fraction of the roots exhibits a very high genotoxicity in all concentrations (from 23.7 to 41.1%) and in the two higher concentrations in which it is found in the leaves, 1000 and 100 µg.mL<sup>-1</sup> or 26.9 and 31.8%, respectively. This high toxicity is evidence that more constituents of the nettle

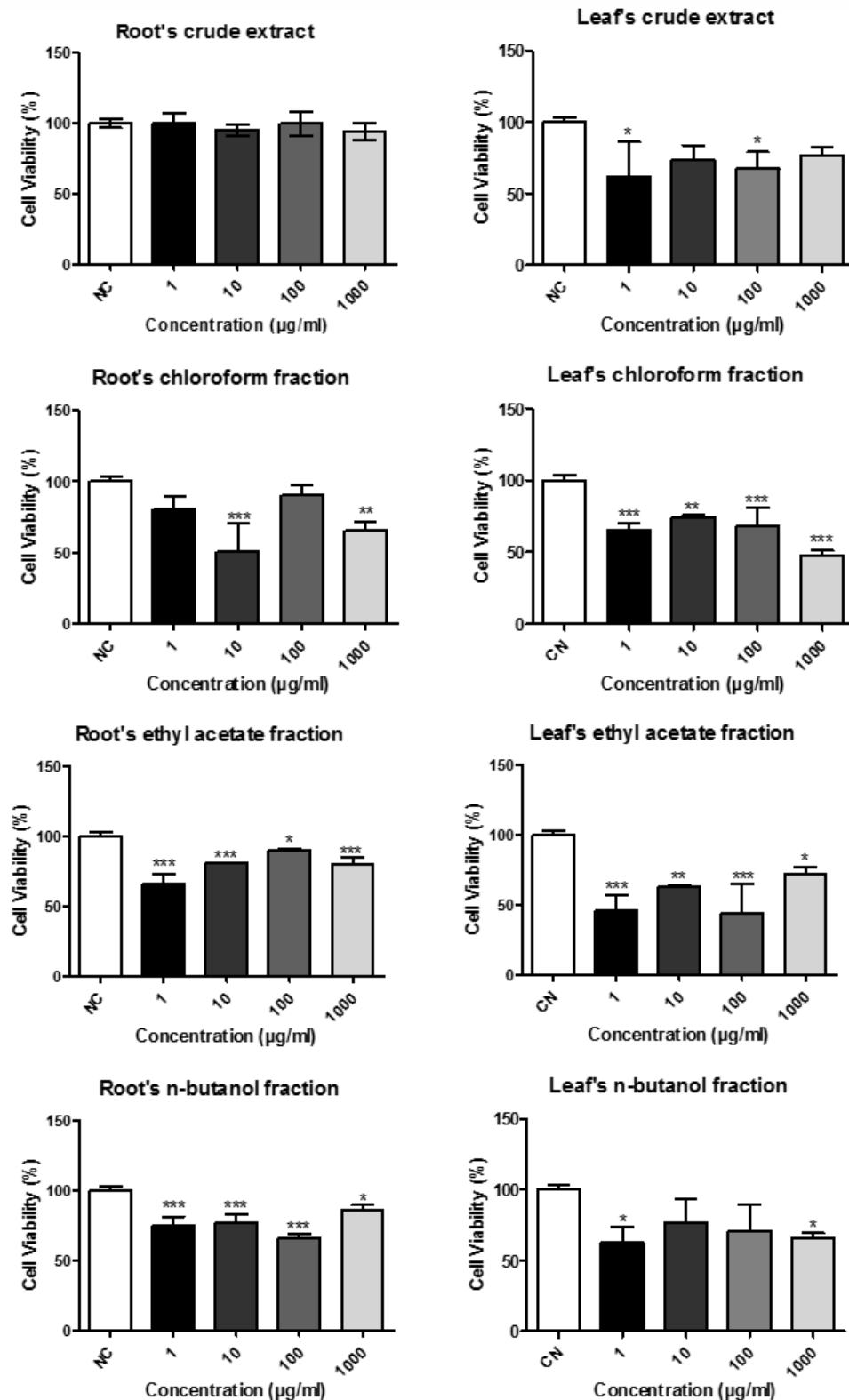
are likely toxic. At the same time, however, the present results demonstrate the possible existence of other substances that can antagonize the genotoxic effects of some metabolites, because no similar effect could be observed between oxalic acid alone and the butanolic fractions.

The cytogenetic effects induced in *A. cepa* by the aqueous extracts of the *U. baccifera* roots show a statistically insignificant reduction in the mitotic index and significant chromosome alterations during the cellular division (Amat et al., 2002). Using the same methodology, the root infusions induced chromosomal abnormalities, except for the highest concentration ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ), which caused a substantial inhibition in mitosis, precluding the observed abnormalities. The leaf infusions in the two highest concentrations ( $75$  and  $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) caused the highest values of damage in the cellular cycle. The oxalic acid also caused abnormalities in mitosis and may therefore be considered responsible for part of the genotoxicity of *U. baccifera* (Gindri et al., 2015).

It is widely known that genotoxic agents can cause genetic change by directly attacking DNA and inducing mutations or temporary modulation of the gene activity. Genotoxic agents can bond covalently to DNA and increase the number of mutations, thereby causing significant errors in DNA replication (Fukushima et al., 2005). Considering this concept, the genotoxic action exhibited by *U. baccifera* can be indicative of antitumor activity.

#### 4.3.3.2 Effect of *U. Baccifera* in Cell proliferation cells DU-145

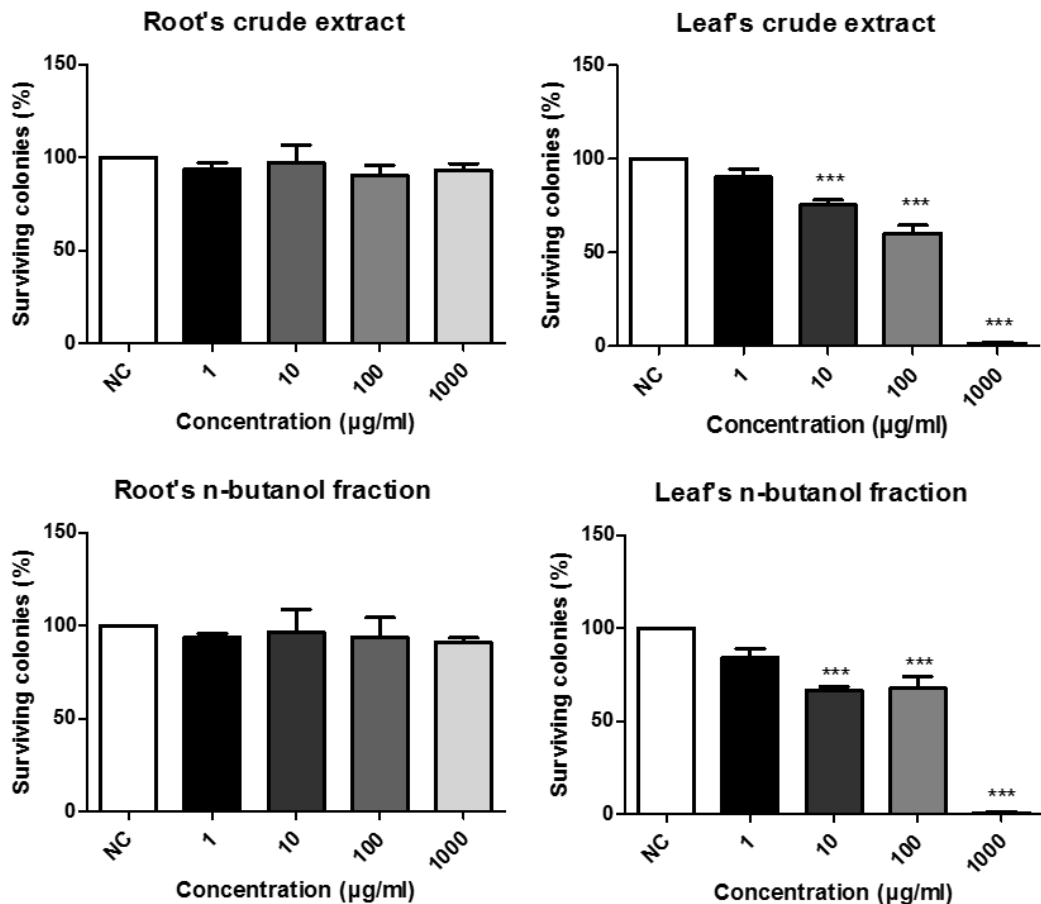
The best antitumor activity (Fig. 2) was observed in leaf samples  $\text{CHCl}_3$  ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ :  $47.14 \pm 4.14\%$ ) and EtOAc ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ :  $44.50 \pm 20.71\%$  and  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ :  $46.59 \pm 10.49\%$ ) and the root samples  $\text{CHCl}_3$  ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ :  $50.81 \pm 20.09$ ), along with oxalic acid (from 13.95 to 16.05% - statistically different from negative control). The other crude extracts and fractions presented a moderate reduction on the viability of the tumoral cells (with death rates between 50 and 90%). Furthermore, some slight activity of the roots' crude extract was observed (from 94.11 to 100% of cell viability – Fig. 2).



**Figure 2** – Percentage of cell viability of the control (non-treated cells - NC) and *Ureia baccifera* root and leaf extracts and fractions 72 hours after the treatment. \*\*\*Statistically different from the control (non-treated cells), analyzed by Dunnett test at  $p < 0.05$ .

#### 4.3.3.3 Colony-forming ability assay

The cytotoxicity of the crude leaf and root extracts and butanolic fractions of *U. baccifera* were evaluated by the colony forming ability assessment, and the results are presented in Fig. 3.



**Figure 3** – Percentage of surviving colonies of the negative control (NC), *Urera baccifera* crude root and leaf extract and butanolic fraction. \*\*\*Statistically different from the negative control, analyzed by Dunnet test at  $p < 0.05$ .

The roots samples did not decrease the viability of the V79 cells (Fig. 3). On the other hand, significant differences were observed in the leaves' crude extract and butanolic fraction (Fig. 3) at concentrations of 10, 100, and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . These samples significantly reduced the viability of the cells.

The majority of the *U. baccifera* leaf samples were able to inhibit the growth of prostate carcinoma cells (Fig. 2), which can be explained by the high level of cytotoxicity in the colony-forming ability assessment (Fig. 3) and moderate

genotoxicity that these extracts and fractions presented (Fig. 1). It should be highlighted that the concentration of  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of the leaves' CE and BuOH components reduced almost 100% of the tumoral cell viability in the clonogenic assay. However, the roots presented a very significant genotoxicity in the genomodified capacity test and no cytotoxicity in the colony-forming ability assay, demonstrating that the roots act directly in the DNA but have some difficulty penetrating the cell. Thus, the root sample was shown to be a promising source of studies concerning its antiviral and antimicrobial activities in order to deepen the preliminary pharmacological properties that have already been established (Gindri et al., 2014b).

The clonogenic assay is generally used to evaluate a cell's survival capacity to determine the cytotoxicity of the sample. This test detects all cells with a reduced capacity to produce progenitors through exposure to a chemical agent that causes death in cells through chromosome damage and future apoptosis (Fraken et al., 2006).

Several mechanisms of cell death have already been described in the literature. The most common features are loss of reproductive integrity and the inability to proliferate indefinitely. Additionally, a cell that retains its ability to synthesize proteins and DNA and go through one or two mitoses but is unable to divide and produce a large number of progeny is considered dead (Munshi, Hobbs and Meyn, 2005).

Based on these definitions, the higher concentration ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of the *U. baccifera* leaves was more effective to killing prostate carcinoma cell line than its roots (Fig. 2), which goes against the folk use of this species. This could be explained by the native population using a higher concentration of the plant in their infusions, promoting a stronger effect. Another explanation is that the root extract does not present an immediate action, but a long-term effect. More studies concerning the mechanism of action of *U. baccifera* roots are necessary.

It is also possible that the population can confuse the *U. baccifera* with a very similar nettle, *Urtica dioica* (Urticaceae), the roots of which are also popularly used to treat prostatic hyperplasia. Several studies have confirmed the effectiveness of *U. dioica* against prostatic tumoral cells (Durak et al., 2004, Konrad et al., 2000, Wagner et al., 1995) and prostatic hyperplasia (Bondarenko et al., 2005, Nahata and Dixit, 2012), although this is the first study concerning the activity of *U. baccifera* against

prostate cancer cell line. Beyond the compounds responsible for this effect, the mechanism of action remains to be clarified.

#### 4.3.3.4 Identifying and quantifying secondary metabolites by HPLC-DAD-MS

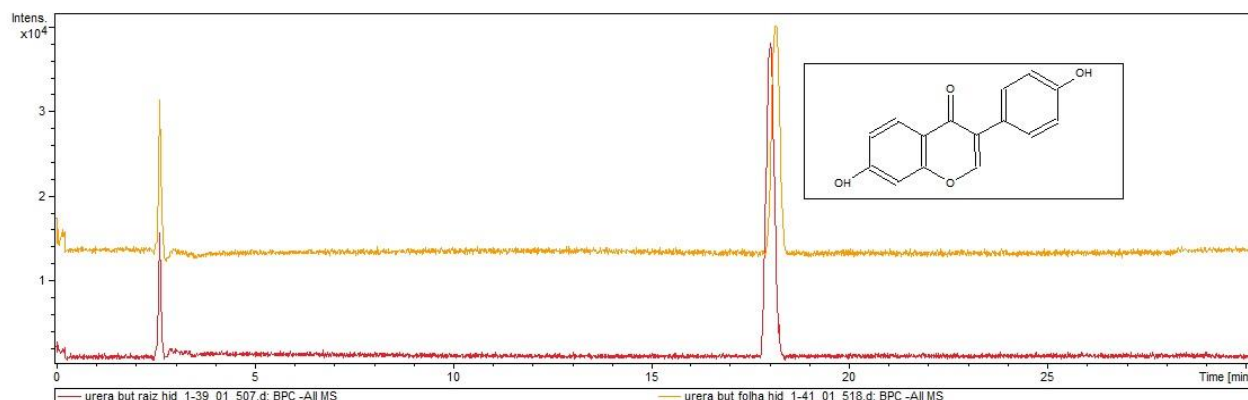
Without hydrolysis, none of the phenolic compounds that had been used as external standards could be identified in the samples. However, after this process, the major constituent found in *U. baccifera*'s extracts and fractions was isoflavone daidzein (Table 1). Additionally, genistein and glycitin were identified and quantified in the leaves' crude extract at concentrations of  $2.53 \pm 0.20$  and  $53.12 \pm 4.77$  mg/g of extract, respectively. The mass spectral chromatogram are shown in Fig. 4.

**Table 1** – Daidzein quantification in *U. baccifera* leaves and roots crude extract and fractions. The results are expressed in mg of standard/g of extract/fraction  $\pm$  standard deviation (SD).

Samples		$\mu\text{g/g ext.} \pm \text{SD}$
Roots	CE	$431.04 \pm 11.58^e$
	CHCl <sub>3</sub>	$417.13 \pm 8.12^e$
	EtOAc	$590.77 \pm 10.99^c$
	BuOH	$896.26 \pm 5.39^a$
Leaves	CE	$497.50 \pm 17.77^d$
	CHCl <sub>3</sub>	$691.71 \pm 5.43^b$
	EtOAc	$688.06 \pm 16.47^b$
	BuOH	$674.07 \pm 13.35^b$

CE: crude extract; CHCl<sub>3</sub>: chloroform fraction; EtOAc: ethyl acetate fraction; BuOH: *n*-butanol fraction. Different letters in each treatment represent significant differences according to the Tukey test.

The BuOH from roots presented the higher value of daidzein ( $896.26 \pm 5.39$  mg/g ext.), followed by CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and BuOH from leaves (691.71 to 674.07 mg/g ext, with no significant differences).



**Figure 4** – BPC chromatograms of the butanolic fractions of *U. baccifera* leaves and roots. Highlighted the metabolite identified in this samples, daidzein.

In addition to the isoflavonoids quantified in this work, the presence of polyphenols was previously found in *U. baccifera* (Gindri et al., 2014a, Mannion and Menezes, 2010). Several natural polyphenols and some vitamins found in an everyday Western diet and classified as antioxidants were described as having a potent anticancer effect (Cadoná et al., 2014). The phenolic compounds have been thought to block the carcinogenesis initiation by inactivating the exogenous or endogenous genotoxic molecules, including the reactive oxygen species (ROS) (Gerhauser, 2013).

The hormesis concept (Birringer, 2011, Fukushima et al., 2005) is used to describe that the same compound can cause opposite effects in different concentrations, and this concept can describe the mechanism of action of some phenolic compounds in carcinogenesis. Some plants with antioxidant effects present antioxidant action only in low doses, but when it is administered in high doses the action is cytotoxic. Therefore, even if the plant showed antioxidant capacity, it might also present carcinogenic or genotoxic effects (Birringer, 2011, Cadoná et al., 2014, Fukushima et al., 2005).

Many flavonoids have been known to be active against prostate cancer (Chang et al., 2008, Haddad et al., 2006, 2010, Mak et al., 2006, Awale et al., 2011, Seito et al., 2011, Liu et al., 2013). Polyphenols and flavonoids were quantified in *U. baccifera* leaves and roots (Gindri et al., 2014a, Mannion and Menezes, 2010) and can be correlated with the genotoxic effects observed in this study.

Aside from the Leguminosae family, many plant families have several species with estrogenic activity (Agradi et al., 2006). Additionally, Mackova, Koblovská and Lapčík (2006) described the presence of isoflavonoids in several dozen other families, including the *U. baccifera* family.

As was mentioned earlier, the folk use of *U. baccifera*'s roots is quite similar to that of *U. dioica*, which is also from the Urticaceae family. The *U. dioica* is popularly used and studies already confirmed its roots' effectiveness against benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic tumors (Bondarenko et al., 2005, Durak et al., 2004, Konrad et al., 2000, Nahata and Dixit, 2012, Wagner et al., 1995). Despite the anti-androgenic activity attributed to this species, the chemical constitution of the compounds responsible are not yet clear (Azimi et al., 2012). However, Hirano, Homma, and Oka (1994) found that the suppression of the prostate-cell metabolism and growth provided by *U. dioica* roots in their experiments was due the steroidal components of this nettle, such as stigmast-4-en-3-one, stigmasterol, and campesterol.

Genistein was already quantified in the methanolic leaf extract of *Laportea aestuans* (sin. *Urtica aestuans* - Urticaceae) in a concentration of 5.487 mg/100 g (Okereke, Elekwa and Nmaju, 2014) in addition to being identified in the species *Boehmeria macrophylla* Hornem (Urticaceae) (Min et al., 2012). Moreover, an isoflavone, 5-methoxy-4-hydroxy-2, 2"-dimethylpyrano (3"-3"-7.8), was identified in the chloroform extract of *Pouzolzia indica* (Urticaceae) (Sayeed et al., 2003), reinforcing the presence of isoflavones in Urticaceae.

The antitumor action presented by *U. baccifera* can be explained by its considerable concentration of isoflavones (Table 1). The major chemopreventive isoflavones are genistein, daidzein and glycitein. These substances have been found to inhibit cancer growth *in vivo* and *in vitro* (Lazarevic et al., 2011, Messina et al., 1994, Onozawa et al., 1998). It was demonstrated that soy isoflavones (genistein, daidzein, and equol) can induce apoptosis in prostate cancer by stimulating the tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), an endogenous anticancer agent that induces apoptosis selectively in tumor cells. These metabolites did not modify the death receptor expression but did increase the TRAIL-mediated apoptosis (Szliszka and Krol, 2011).

Many action mechanisms of genistein are being hypothesized (Geller et al., 1998, Lazarevic et al., 2011, Lee et al., 2012, Radzikowski et al., 2004, Szliszka and



Krol, 2011, Zhang et al., 2012). Genistein has displayed antitumor, antimetastatic, and antiangiogenic properties in various experimental *in vitro* and *in vivo* models (Radzikowski et al., 2004) and anti-proliferative activity against Benign Prostatic Hyperplasia (Geller et al., 1998). Additionally, genistein may improve the proliferation of some estrogen-positive human breast cancer cells *in vivo*, in addition to improving the growth of mammary gland and mammary cancer cells, in athymic mice (Radzikowski et al., 2004).

Lazarevic et al. (2011) observed that, in patients with localized prostate cancer, 30 mg of synthetic genistein reduced the level of prostate specific antigen (PSA). The genistein did not have any negative effects on hormone levels, was well tolerated, and increased individuals' total cholesterol.

Lee et al. (2012) found that genistein inhibited cell growth in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-stimulated prostate cancer cells (PC-3), possibly by inhibiting the downstream of IGF-1R activation. The insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is associated with an increased risk of several different cancers, including prostate cancer (Lee et al., 2012).

Moreover, it has also been shown that genistein suppresses the tumorsphere and colony formation of prostate cancer cells. The pretreatment of prostate cancer tumorsphere cells with this substance even suppressed tumorigenicity *in vivo*. Furthermore, genistein treatment inhibited the growth of prostate cancer tumorsphere cells (Zhang et al., 2012).

#### **4.3.4 Conclusion**

This study was the first to demonstrate the genotoxic action of *Urera baccifera* in DNA double-strands. An extremely high genotoxicity was observed in the extracts and fractions of the leaves and roots of this plant, partially due to oxalic acid, a substance present in this nettle.

The colony-forming ability assessment revealed the low cytotoxicity of the roots' crude extract and butanolic fraction and a high cytotoxicity of the leaves' crude extract and butanolic fraction.

The antitumor activity evidenced to *U. baccifera* can be linked to the quantification of the isoflavones daidzein, genistein, and genistin, well-known antitumor metabolites with excellent action against prostatic cancer. The leaves'

crude extract showed major genotoxic and cytotoxic activity and the most antitumor action. Additionally, this extract contained a much larger quantity of daidzein than the roots' crude extract, as well as the presence of genistein and glycitin. This is why the antitumor activity of leaves' crude extract is important and must be thoroughly investigated.

Despite that the anticancer activity of *U. baccifera* is promising and worthy of further study, the cytotoxic action of this plant in healthy cells must be confirmed in other cell lines in order to ensure the safe use of this plant as an anticancer agent.

#### 4.3.5 References

Agradi, E., Vegeto, E., Sozzi, A., Fico, G., Regondi, S., Tomè, F., 2006. Traditional Healthy Mediterranean Diet: Estrogenic Activity of Plants used as Food and Flavoring Agents. *Phytother. Res.* 20, 670–675.

Amat, A.G., Yajia, M.E., Gonzalez, C.F., Lorca, G.L., Sanchez Gonzalez, F., Riglos, A.G., Veron, J.R., 2002. Evaluation of Cytopatological Parameters Induced by Aqueous Extracts of Seven Plants Used as Antihypertensive Agents in Argentine Folk Medicine. *Acta Farm. Bonaer.* 21, 37-42.

Awale, S., Linn, T.Z., Li, F., Tezuka, Y., Myint, A., Tomida, A., Yamori, T., Esumi, H., Kadota, A., 2011. Identification of Chrysplenetin from *Vitex negundo* as a Potential Cytotoxic Agent against PANC-1 and a Panel of 39 Human Cancer Cell Lines (JFCR-39). *Phytother. Res.* 25, 1770–1775.

Azimi, H., Khakshur, A., Aghdasi, I., Fallah-Tafti, M., Abdollahi, M., 2012. A Review of Animal and Human Studies for Management of Benign Prostatic Hyperplasia with Natural Products: Perspective of New Pharmacological Agents. *Inflam. Allergy Drug Targets* 11, 207-221.

Badilla, B., Mora, G., Lapa, A.J., Ernim, J.A.S., 1999. Anti-inflammatory activity of *Ureia baccifera* (Urticaceae) in Sprague-Dawley rats. *Rev. Biol. Trop.* 47, 365-371.

Badilla, B., Chaves, F., Mora, G., Poveda, L.J., 2006. Edema induced by *Bothrops asper* (Squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rican plants extracts. *Rev. Biol. Trop.* 54, 245-252.

Badilla, B., Mora, G., Poveda, L.J., 1999. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of five Costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats. *Rev. Biol. Trop.* 47, 723-727.

Birringer, M., 2011. Hormetics: Dietary Triggers of an Adaptive Stress Response. *Pharmaceut. Res.* 28, 2680–2694.

Bondarenko, B., Walther, C., Funk, P., Schlafke, S., Engelmann, U., 2005. Long-term efficacy and safety of PRO 160/120 (a combination of sabal and urtica extract) in patients with lower urinary tract symptoms (LUTS). *Phytomedicine*. 10, 53-55.

Cadoná, F.C., Manica-Cattani, M.F., Machado, A.K., Oliveira, R.M., Flôres, E.R.S., Assmann, C., Algarve, T.D., Cruz, I.B.M., 2014. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Anal. Methods*. 6, 8559-8568.

César, I. C., Braga, F. C., Soares, C.D.V., Nunan, E. A., Pianetti, G.A., Condessa, F.A., Barbosa, T.A., Campos, L.M.M., 2006. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *J. Chromatogr. B*. 836, 74–78.

Chang, H.L., Wu, Y.C., Su, J.H., Yeh, Y.T., Yuan, S.S.F., 2008. Protoapigenone. a Novel Flavonoid. Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells through Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun NH2-Terminal Kinase 1/2. *J. Pharm. Exp. Ther.* 325, 841–849.

Dragan, A.I., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R.J., Schenerman, M.A., Geddes, C.D., 2010. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophys. J.* 99, 3010-3019.

Durak, I., Biri, H., Devrim, E., Sözen, S., Avci, A., 2004. Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* 3, 855-857.

Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Bree, C.V., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* 1, 2315 - 2319.

Fukushima, S., Kinoshita, A., Puatanachokchai, R., Kushida, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., 2005. Hormesis and dose–response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 26, 1835–1845.

Gerhauser, C., 2013. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. *Top. Curr. Chem.* 329, 73–132.

Gindri, A.L., Coelho, A.P.D., Tedesco, S.B., Athayde, M.L., 2015. Genotoxic evaluation of infusions of *Urera baccifera* leaves and roots in *Allium cepa* cells. *J. P. P. Res.*, 3, 51-58.

Gindri, A.L., De Souza, L.B, Cruz, R.C., Boligon, A.A., Machado, M.M., Athayde, M.L., 2014a. Genotoxic evaluation. secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Urera baccifera* Gaudich (Urticaceae). *Nat. Prod. Res.* 28, 2214–2216.

Gindri, A.L., De Souza, L.B., Athayde, M.L., 2013. Botanic characterization of nettle: pharmacological and chemical studies. *Disciplinarum Scientia* 14, 135-146.

Gindri, A.L., Kubiça, T.F., Mario, D.N., Oliveira, S.M., Silva, C.R., Cabreira, T.N., Boligon, A.A., Ferreira, J., Lovato, L.T., Weiblen, R., Alves, S.H., Athayde, M.L., 2014b. Antiviral, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 8, 284-291.

Geller, J., Sionit, L., Partido, C., Li, L., Tan, X., Youngkin, T., Nachtsheim, D., Hoffman, R.M., 1998. Genistein inhibits the growth of human-patient BPH and prostate cancer in histoculture. Prostate. 34, 75-79.

Guil, J.L., Rodríguez-García, I, Torija, E., 1997. Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants. Plant. Food. Hum. Nutr. 51, 99-107.

Haddad, A.Q., Fleshner, N., Nelson, C., Saour, B., Musquera, M., Venkateswaran, V., Klotz, L., 2010. Antiproliferative mechanisms of the flavonoids 2,2'-dihydroxychalcone and fisetin in human prostate cancer cells. Nutr. Cancer. 62, 668-681.

Haddad, A.Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S.J., Fleshner, N.E., Klotz, L.H., 2006. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. Prostate Cancer Prostat. Dis. 9, 68-76.

Hirano, T., Homma, M., Oka, K., 1994. Effects of Stinging Nettle Root Extracts and Their Steroidal Components on the Nat. K-ATPase of the Benign Prostatic Hyperplasia. Planta Med. 60, 30-33.

Konrad, L., Müller, H.H., Lenz, C., Laubinger, H., Aumüller, G., Lichius, J.J., 2000. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a Stinging Nettle root (*Urtica dioica*) Extract. Planta Med. 66, 44-47.

Lazarevic, B., Boezelijn, G., Diep, L.M., Kvernrod, K., Ogren, O., Ramberg, H., Moen, A., Wessel, N., Berg, R.E., Egge-Jacobsen, W., Hammarstrom, C., Svindland, A., Kucuk, O., Saatcioglu, F., Taskèn, K.A., Karlsen, S.J., 2011. Efficacy and Safety of Short-Term Genistein Intervention in Patients with Localized Prostate Cancer Prior to Radical Prostatectomy: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Phase 2 Clinical Trial. Nutr. Cancer. 63, 889–898.

Lee, J., Ju, J., Park, S., Hong, S.J., Yoon, S., 2012. Inhibition of IGF-1 Signaling by Genistein: Modulation of E-Cadherin Expression and Downregulation of  $\beta$ -Catenin Signaling in Hormone Refractory PC-3 Prostate Cancer Cells. Nutr. Cancer. 64, 153–162.

Liu, G., Ge, Z., Zhao, M., Zhou, Y., 2013. Design, Synthesis and Cytotoxic Activities of Novel Aliphatic Amino-Substituted Flavonoids. Molecules. 18, 14070-14084.

Mackova, Z., Koblowska, R., Lapcik, O., 2006. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – An update. Phytochemistry, 67, 849–855.

Mak, P., Leung, Y.K., Tang, W.Y., Harwood, C., Ho, S.M., 2006. Apigenin Suppresses Cancer Cell Growth through ER $\beta$ . Neoplasia. 8, 896-904.

- Mannion, F., Menezes, F.S., 2010. Antioxidant activity of *Urera baccifera* Gaud extracts. T.C.D.J.P.P.S., 2, 8-9.
- Martins, F.O., Gomes, M.M.R., Nogueira, F.L.P., Martins, G.R., Romanos, M.T.V., Kaplan, M.A.C., Menezes, F.S., 2009. In vitro inhibitory effect of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. extracts against herpes simplex. Afri. J. Pharm. Pharmacol. 1, 581-584.
- Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D., Barnes, S., 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. Nutr. Cancer. 21, 113-131.
- Min, Y., Yang, J., Ping, Y., Liu, W., 2012. Chemical constituents of *Bohemeria macrophylla* Hornem. Adv. Mat. Res. 550-553, 1378-1380.
- Mirabelli, C.K., Sung, C.M., McCabe, F.L., Faucette, L.F., Crooke, S.T., Johnson, R.K., 1988. A murine model to evaluate the ability of *in vitro* clonogenic assays to predict the response to tumors *in vivo*. Can. Res. 48, 5447-5454.
- Mosmann. T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65, 55-63.
- Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E., 2005. Clonogenic Cell Survival Assay *in vitro* Chemosensitivity. v. 1: *In Vitro* Assays. Edited by: R. D. Blumenthal. Humana Press Inc.: Totowa, NJ. p.21-28.
- Nahata, A., Dixit, V.K., 2012. Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. Andrologia 44, 396-409.
- Noonan, S.C., Savage, G.P., 1999. Oxalate content of foods and its effect on humans. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 8, 64-74.
- Okereke, S.C., Elekwa, I., Nmaju, A.U., 2014. Gas Chromatographic FID. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects Of Leaves Of *Laportea aestuans* In Alloxan Induced Diabetes In Male Albino Rats. IOSR-JESTFT. 8, 42-46.
- Onofre, S.B., Herkert, P.F., 2012. Antimicrobial activity of extracts obtained from *Urera baccifera* (L.) Gaudich. Adv. Life Sci. 2, 139-143.
- Onozawa, M., Fukuda, K., Ohtani, M., Akaza, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K., 1998. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. Jpn. J. Clin. Oncol. 28, 360-363.
- Radzikowski, C., Wietrzyk, J., Gryniewicz, G., Opolski, A., 2004. Genistein: a soy isoflavone revealing a pleiotropic mechanism of action - clinical implications in the treatment and prevention of cancer. Postepy. Hig. Med. Dosw. (Online) 27, 128-139.
- Sayeed, A., Sattar, M.A., Akteruzzaman, M., Islam, A., Sadik, G., Bhuiyan, M., Shah, A., 2003. A prenylated isoflavone from *Pouzolzia indica*: its in vitro antimicrobial activity and cytotoxic evaluation. Orient. J. Chem. 19, 35-40.

Seito, L.N., Ruiz, A.L.T.G., Vendramini-Costa, D., Tinti, S.V., Carvalho, J.E., Bastos, J.K., Di Stasi, A.C., 2011. Antiproliferative Activity of Three Methoxylated Flavonoids Isolated from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) Leaves. *Phytother. Res.* 25, 1447–1450.

Szliszka, E., Krol, W., 2011. Soy isoflavones augment the effect of TRAIL-mediated apoptotic death in prostate cancer cells. *Oncol. Rep.* 26, 533-541.

Vieira, R.F., Grayer, R.J., Paton, A., Simon, J.E., 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD Markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 287-304.

Wagner, H., Geiger, W.N., Boos, G., Samtleben, R., 1995. Studies on the binding of *Urtica dioica* agglutinin (UDA) and other lectins in an in vitro epidermal growth factor receptor test. *Phytomedicine.* 4, 287-290.

Zhang, L., Li, L., Jiao, M., Wua, D., Wua, K., Li, X., Zhu, G., Yang, L., Wang, X., Hsieh, J., He, D., 2012. Genistein inhibits the stemness properties of prostate cancer cells through targeting Hedgehog–Gli1 pathway. *Cancer Lett.* 323, 48–57.

## 5. DISCUSSÃO

Esta tese de doutorado propôs estudar comparativamente as atividades farmacológicas e a toxicidade das folhas e raízes da planta *Urera baccifera* (L.) Gaudich ex. Wedd, usualmente conhecida como Urtiga-brava ou Urtigão-do-mato, com suas raízes utilizadas popularmente no sul do Brasil para hiperplasia prostática e micoses de pele.

Para facilitar e aprofundar os estudos, foram coletadas as folhas e raízes do vegetal, a fim de realizar um estudo comparativo das atividades farmacológicas e toxicidade. Este trabalho foi assim delineado pois em muitos lugares do mundo o uso popular da planta *U. baccifera* se faz com suas folhas (BADILLA et al., 1999; VALADEAU et al., 2009, 2010; LINDENMAIER; PUTZKE, 2011). No entanto, as descrições de uso pela comunidade da região central do estado foram das raízes desta planta.

Inicialmente é importante considerar a excelente atividade antiviral demonstrada pelos extratos e frações das duas partes da planta frente à Herpes Vírus tipo 1 (Capítulo 1, Artigo 1, Tabela 1). Apesar de todas as amostras demonstrarem atividade, é destacada a atividade do extrato bruto e fração acetato de etila das raízes (Índice de seletividade – SI = 39,55 e 35,09, respectivamente) e a fração butanol das folhas (SI = 29,55). Martins et al. (2009) também observaram uma alta atividade antiviral das partes aéreas da planta, com a maior atividade para a fração butanol, seguida por acetato de etila e extrato etanólico. Estes autores destacaram que o mecanismo de ação antiviral da fração butanol é ação virucida, também prevenindo levemente a ação do receptor celular. A fração acetato de etila age na atividade do receptor e na penetração viral, já o extrato etanol age na penetração viral e com leve atividade virucida (MARTINS et al., 2009). O mecanismo de ação no qual os extratos das folhas e raízes agem não foi elucidado neste trabalho.

Uma importante atividade antimicrobiana foi verificada para as frações das folhas de *U. baccifera* contra *Klebsiella pneumoniae*: frações clorofórmio e acetato de etila CIM (Concentração inibitória mínima) de 312 µg/mL, fração n-butanol CIM de 156 µg/mL (Artigo 1, Tabela 2). Estes resultados são importantes pois *K. pneumoniae*, um bacilo Gram-negativo, importante patógeno de infecções hospitalares, que pode causar surtos em unidades de internação de pacientes



críticos (CASSETTARI et al., 2006). As frações acetato de etila e n-butanol das raízes (CIM 500 e 250 µg/mL, respectivamente) e folhas (CIM 250 µg/mL para as duas frações), bem como o extrato bruto das folhas (CIM 500 µg/mL) apresentaram ação contra *Prototheca zopfii* (Artigo 1, Tabela 2), uma alga unicelular, incolor e aclorofilada, importante por causa infecções intramamárias em vacas, infecções sistêmicas em diversas espécies animais e infecções cutâneas no homem (SUDMAN, 1974 apud BRITO; VEIGA, 1997). Adicionalmente, a fração acetato de etila das raízes apresentou ação contra *Saccharomyces cerevisiae* (CIM 500 µg/mL), um microrganismo usado como probiótico em humanos, mas que pode causar infecções invasivas singulares em humanos após ingestão (SIDRIM et al., 2003). Assim, se faz importante aprofundar os estudos das frações acetato de etila e n-butanol das folhas da planta, pois estas apresentaram promissoras atividades contra *K. pneumoniae* e *P. zopfii* (Artigo 1, Tabela 2).

Importante destacar que neste trabalho não foram evidenciadas ações contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Artigo 1). Estes resultados condizem com os apresentados por Melendez e Capriles (2006), que não evidenciaram atividade do extrato metanólico das folhas de *U. baccifera* contra *E. coli* e *S. aureus*. Entretanto, Onofre e Herkert (2012) evidenciaram ação dos extratos metanólicos das folhas e raízes da planta contra *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que seus MIC's variaram entre: 6,25 e 0,19 mg/L (6,25 e 0,19X10<sup>-6</sup> µg/mL) para *E. coli*, e para *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi observada a variação de 3,12 e 0,19 mg/L (3,12 e 0,19 .10<sup>-6</sup> µg/mL). Os autores consideraram que o extrato metanólico das folhas e raízes desta urtiga é ativo contra os microrganismos testados (ONOFRE; HERKERT, 2012). Entretanto, se levarmos em consideração os parâmetros definidos no Artigo 1, se considerou uma boa atividade antimicrobiana os extratos vegetais que apresentassem um CIM inferior a 1000 µg/mL (RIOS; RECHIO, 2005), as atividades evidenciadas por Onofre e Herkert (2012) não foram consideradas satisfatórias, o que condiz com os resultados deste trabalho.

Não foram evidenciadas atividades anti-inflamatórias e analgésicas dos extratos brutos das folhas e raízes de *U. baccifera* nas doses testadas por administração via oral (Artigo 1, Figuras 1, 2, 3). Este estudo diverge dos estudos realizados pelo grupo de Badilla e colaboradores (BADILLA et al., 1999; 2006, BADILLA; MORA; POVEDA, 1999), provavelmente pois este grupo utilizou os

extratos etanólico das folhas de *U. baccifera*, administrados por via parenteral nos animais e em doses superiores às utilizadas no artigo 1 desta tese.

Neste estudo, preferiu-se a administração por via oral (gavagem) nos animais, a fim de mimetizar o uso popular da planta pela população. Adicionalmente, não se tem estudos de toxicidade da planta em animais e poucos são os estudos *in vitro*, desta forma o uso de doses elevadas é desaconselhado.

Através dos estudos de atividade farmacológica realizados, que deram origem ao primeiro artigo desta tese, foi possível evidenciar que as raízes e folhas da planta apresenta ação antiviral contra Herpes vírus tipo 1 e antimicrobiana contra *K. pneumoniae*, *P. zopfii* e *S. cerevisiae* (Artigo 1). A partir destas atividades farmacológicas comprovadas, iniciou-se os ensaios de toxicidade a fim de verificar a segurança do uso desta planta como medicinal.

No segundo artigo desta tese (Capítulo 2) realizou-se o ensaio de toxicidade em radículas de *A. cepa*, teste *in vivo* que avalia a genotoxicidade e potencial mutagênico das amostras na planta teste. Para este estudo foram obtidas infusões das folhas e raízes de *U. baccifera*, nas concentrações de 75, 30 e 1 g/L.

Observou-se uma redução do índice mitótico da planta teste nas infusões das raízes 75 g/L (índice mitótico - IM: 0,34%) e folhas 1g/L (IM: 1,40%) e 30 g/L (IM: 1,84%). Estes resultados estão em concordância com os estudos de AMAT et al. (2002), que avaliou a infusão das raízes da mesma planta com o mesmo método, na concentração de 75 g/L. O índice mitótico observado neste trabalho para as raízes em 75 g/L foi bastante similar ao do controle positivo, glifosato 15% (IM: 0,16%). Importante destacar que o glifosato é um herbicida sistêmico não-seletivo, e a ação apresentada pela amostra de *U. baccifera* indica que o uso da mesma nesta concentração pode ser perigoso para humanos.

Efeito proliferativo foi observado através da indução do índice mitótico das células de *A. cepa* tratadas com as amostras de ácido oxálico padrão e infusão das raízes 30 g/L (IM: 5.20 e 5.30%, respectivamente). O ácido oxálico foi testado pois este metabólito foi quantificado nas folhas e raízes da planta em estudos anteriores (GINDRI et al., 2014).

As folhas na concentração de 1 g/L (1mg/mL) não promoveram anormalidades cromossômicas na planta teste. Diferentemente das infusões de raízes 1 e 30 g/L, folhas 30 e 75 g/L e ácido oxálico. Nesse sentido, considerou-se segura para uso medicinal somente a infusão das folhas na concentração de 1 g/L

(1000 µg/mL), pois as outras concentrações das folhas e todas as concentrações das raízes demonstraram atividade genotóxica (Artigo 2).

Nos ensaios de atividade antiviral (Artigo 1) foram utilizadas as concentrações consideradas não citotóxicas (MNCC – concentração máxima não citotóxica) obtidas através do ensaio com MTT. As concentrações citotóxicas obtidas para as raízes foram maiores que as das folhas, demonstrando que esta parte vegetal parece ser mais segura que as folhas. Destaca-se a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) do extrato bruto das raízes, 1083,32±102,35 µg/mL e do extrato bruto das folhas, 162,04±6,79 µg/mL, quase sete vezes menor.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade (Artigo 1, Tabela 1) contrastam com os de genotoxicidade (Artigo 2, Tabelas 2 e 3) obtidos no ensaio com *A. cepa*. No primeiro, consegue-se considerar mais promissor o estudo do extrato bruto das raízes e, no segundo, as folhas em baixas concentrações parecem ser mais seguras, não promovendo redução do índice mitótico da planta teste e nem anormalidades cromossômicas.

Importante destacar que o ensaio com *A. cepa* traz informações importantes acerca da genotoxicidade de amostras, evitando o uso de animais (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE IV, 2012). Pesquisadores como Vicentini et al. (2001) e Teixeira et al. (2003), demonstraram através de experimentos com animais realizados paralelamente com o ensaio de *A. cepa* que estes apresentam resultados similares.

Dessa forma, decidiu-se realizar um terceiro experimento visando a ampliar os conhecimentos acerca da genotoxicidade e citotoxicidade dos extratos e frações das raízes e folhas de *U. baccifera*. Como o objetivo principal deste trabalho é comparar as atividades farmacológicas desta planta e sua toxicidade, e os resultados de atividade farmacológica foram obtidos em concentrações abaixo de 1000 µg/mL (Artigo 1, Tabelas 1 e 2), o manuscrito 1 (Capítulo 3) compreendeu ensaios de genotoxicidade e citotoxicidade com as concentrações 1, 10, 100 e 1000 µg/mL dos extratos brutos e frações das folhas e raízes de *U. baccifera*. Adicionalmente, tendo em vista a aparente genotoxicidade já apresentada pela espécie vegetal, juntamente com o uso popular da planta como preventiva/curativa do câncer de próstata, decidiu-se também avaliar a ação dos extratos e frações da planta frente a células de adenocarcinoma de próstata humano.

O ensaio de capacidade genomodificadora (teste de quebra de fita dupla de DNA) foi realizado em DNA. Além do extrato bruto e das frações das folhas e raízes

foi também testada a capacidade genomodificadora do padrão ácido oxálico, previamente quantificado nos extratos brutos e frações das folhas e raízes (GINDRI et al., 2014) e testado nas concentrações encontradas na planta.

De acordo com os parâmetros propostos por Cadoná et al. (2014), todas as amostras (frações e extrato bruto) das raízes em todas as concentrações (1-1000 µg/mL) apresentaram alta toxicidade, pois a porcentagem de dsDNA viável, quando comparado ao controle não tratado, foi menor que 50% (Manuscrito 1, Figura 1).

Dessa forma, o extrato bruto das raízes, considerado o mais promissor para testes de atividade antiviral (Artigo 1, Tabela 1) com ação inibitória contra *P. zopfii* (CIM: 500 µg/mL - Artigo 1, Tabela 2), apesar de possuir a concentração citotóxica 50% mais segura (1083,32 ± 102,35 µg/mL, Artigo 1, Tabela 1), apresentou alto percentual de anormalidades cromossômicas que este promoveu em radículas de *A. cepa* (9,14% - Artigo 2, Tabela 3) e também pela alta genotoxicidade que a mesma amostra promoveu em dsDNA (entre 38,640 e 45,833% de dsDNA viável, quando comparado ao controle não tratado – Manuscrito 1, Figura 1).

O ensaio clonogênico descrito no manuscrito 1 demonstrou que o extrato bruto e a fração butanólica das raízes de *U. baccifera* não demonstraram citotoxicidade nas células utilizadas (V-79, células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês) nas concentrações de 1 a 1000 µg/mL, apresentando resultados de viabilidade células estatisticamente iguais ao do controle negativo (Manuscrito 1, Figura 3), o que indica que os constituintes químicos presentes nestas amostras promovem dano diretamente no DNA das células. Estes resultados incentivaram o ensaio de atividade antitumoral com a planta.

Adicionalmente, a fração acetato de etila das raízes, que promoveu o segundo melhor resultado de atividade antiviral para herpes vírus tipo 1 (Índice de seletividade – SI: 35,09 – Artigo 1, Tabela 1) e inibição do crescimento de *S. cerevisiae* (MIC: 250 µg/mL – Artigo 1, Tabela 2) e *P. zopfii* (MIC: 500 µg/mL - Artigo 1, Tabela 2), além de apresentar uma CC<sub>50</sub> de 283,54 ± 10,93 µg/mL (Artigo 1, Tabela 1), quase 4 vezes menor que o do extrato bruto das raízes, apresentou também alta genotoxicidade ao dsDNA, dando origem a uma porcentagem de fluorescência livre do dsDNA de 28,953% para 1000 µg/mL e 24,921% para 100 µg/mL, a segunda maior genotoxicidade de todas as amostras da planta testadas neste ensaio (Manuscrito 1, Figura 1).

A fração butanol das folhas foi a terceira amostra com grande potencial para atividade antiviral (Artigo 1, Tabela 1), além de atuar contra o crescimento de *P. zopfi* (MIC: 250 µg/mL – Artigo 1, Tabela 2) e *K. pneumoniae* (MIC: 156 µg/mL – Artigo 1, Tabela 2). Essa fração apresentou um baixo valor de CC<sub>50</sub> (181,63 ± 6,81 µg/mL – Artigo 1, Tabela 1) e sua genotoxicidade em dsDNA foi considerada moderada (CADONÁ et al., 2014), variando entre 59,853 e 75,180% (Manuscrito 1, Figura 1). A fração butanol e o extrato bruto obtidos das folhas desta espécie apresentaram alta citotoxicidade no ensaio clonogênico, reduzindo enormemente a viabilidade celular (Manuscrito 1, Figura 3), demonstrando que as folhas apresentam uma ação diferente das raízes, que não apresentaram citotoxicidade neste ensaio.

Quando avaliada a genotoxicidade em leucócitos (GINDRI et al., 2014), os mesmos extratos e frações avaliados nesta tese não apresentaram toxicidade a estas células, com exceção das frações butanólicas das folhas e raízes. As duas frações butanólicas causaram efeitos similares aos promovidos pelo padrão ácido oxálico, sendo esses: diminuição no número total de leucócitos, aumento no percentual de células mortas, diminuição no índice mitótico e aumento no dano do DNA. O ácido oxálico também promoveu um aumento significativo da produção de micronúcleos nestas células. As frações butanólicas das folhas e raízes também aumentaram a produção destas células, porém não significativamente como o padrão (GINDRI et al., 2014).

Ao compilar os dados de citotoxicidade obtidos nesta tese com os dados ensaios de genotoxicidade em leucócitos realizados com as mesmas amostras pode-se considerar a planta promissora para mais estudos de atividade antitumoral. No entanto, a fração butanólica das folhas necessita de estudos de isolamento de metabólitos secundários a fim de determinar os compostos responsáveis pelos excelentes resultados de atividade antiviral (Artigo 1, Tabela 1) e antimicrobiana (Artigo 1, Tabela 1), pois com a citotoxicidade e genotoxicidade apresentada por esta fração, o uso terapêutico da mesma se torna inviável.

Uma atividade importante contra *K. pneumoniae* foi evidenciada pelas frações clorofórmio e acetato de etila das folhas da planta MIC: 312 µg/mL – Artigo 1, Tabela 2). As duas frações apresentaram também moderada atividade antiviral contra HSV-1 (SI: 9,32 e 6,96, respectivamente – Artigo 1, Tabela 1). Entretanto, a CC<sub>50</sub> da fração clorofórmio é bastante reduzida (98,72±6,58 µg/mL, Artigo 1, Tabela 1) e sua genotoxicidade em dsDNA nas concentrações de 1000 e 100 µg/mL foi bastante

elevada (26,886 e 31,777 %, respectivamente – Manuscrito 1, Figura 1). Entretanto, a fração acetato de etila, que apresentou a menor atividade antiviral (SI: 6,96 – Artigo 1, Tabela 1), demonstrou um  $CC_{50}$  de  $176,04 \pm 8,54 \mu\text{g/mL}$ , maior que o controle positivo aciclovir ( $138,23 \mu\text{g/mL}$  – Artigo 1, Tabela 1) e proporcionou dano ao dsDNA somente na concentração mais elevada,  $1000 \mu\text{g/mL}$  (39,117% - Manuscrito 1, Figura 1). As outras concentrações testadas da fração acetato de etila das folhas (100, 10 e  $1 \mu\text{g/mL}$ ) apresentaram valores estatisticamente iguais ao controle (ds DNA não tratado), não demonstrando atividade genomodificadora (Manuscrito 1, Figura 1).

O ácido oxálico testado frente aos mesmos ensaios de genotoxicidade (Artigo 2: Tabelas 2 e 3; Manuscrito 1) aos quais a espécie vegetal foi submetida, demonstrou ser causador de parte da atividade genotóxica causada pela planta. Entretanto, é possível que mais substâncias estejam envolvidas na ação genotóxica desta espécie vegetal, pois este metabólito foi quantificado em maior concentração no extrato bruto, fração butanol e acetato de etila das raízes (1,79, 1,82 e  $1,38 \text{ mg/g}$ , respectivamente), amostras que nem sempre apresentaram a maior genotoxicidade. Ou seja, pode-se supor que outros compostos genotóxicos estejam presentes na planta ou existam outros metabólitos que amenizem a ação tóxica desta substância no extrato bruto e frações das raízes.

A partir dos dados de citotoxicidade (Artigo 1, Manuscrito 1) e genotoxicidade (Artigo 2, Manuscrito 1) obtidos neste estudo, verificou-se a importância da realização de estudos para verificar sua atividade antitumoral em células de adenocarcinoma de próstata e assim, tentar confirmar seu uso popular. Dessa forma, o extrato bruto das folhas e raízes bem como suas respectivas frações foram testadas frente a células Du-145 (Manuscrito 1). Neste ensaio foram verificadas uma ação bastante pronunciada das amostras obtidas das folhas da espécie, com destaque a fração clorofórmio ( $1000 \mu\text{g/mL}$ ) e acetato de etila ( $1$  e  $10 \mu\text{g/mL}$ ), que diminuíram a viabilidade celular em mais de 50% (Manuscrito 1, Figura 2). Entretanto, diminuições significativas na viabilidade celular também foram observadas nas outras concentrações, na fração butanol e extrato bruto (Manuscrito 1, Figura 2).

Uma atividade antitumoral não tão pronunciada foi observada nas frações obtidas das raízes da planta, com destaque a fração clorofórmio ( $10$  e  $1000 \mu\text{g/mL}$ ) (Manuscrito 1, Figura 2). A fração acetato de etila e butanol diminuíram a viabilidade

celular de forma significativa, quando comparada ao controle negativo (células não tratadas), entretanto essa redução não foi tão pronunciada quanto a das folhas (Manuscrito 1, Figura 2). O extrato bruto das raízes não apresentou ação neste ensaio.

Como já foi mencionado, há a possibilidade de que os constituintes químicos presentes nas amostras provenientes das raízes promovam dano diretamente no DNA das células, devido à alta genotoxicidade evidenciada (Artigo 2; Manuscrito 1, Figura 1) e baixa citotoxicidade (Artigo 1, Tabela 1; Manuscrito 1). Entretanto, a ação das folhas parece ser diferente, pois esta apresenta uma menor genotoxicidade (Artigo 2; Manuscrito 1, Figura 1) que as raízes, mas uma elevada citotoxicidade (Artigo 1, Tabela 1; Manuscrito 1). Mais estudos são necessários a fim de esclarecer o mecanismo de ação antitumoral dos dois órgãos vegetais desta espécie.

Ao levar em considerações os resultados de atividade farmacológica e citotoxicidade abordados no Artigo 1, os resultados de genotoxicidade descritos no Artigo 2 e manuscrito 1 bem como os resultados de citotoxicidade e atividade antitumoral apresentados no manuscrito 1, observou-se a grande importância de serem aprofundados os estudos acerca da composição química desta espécie. Assim, foi realizada a quantificação dos extratos brutos e frações através da técnica de HPLC-DAD-MS (Manuscrito 1). Neste ensaio, verificou-se a presença da isoflavona daidzeína em todas as amostras, porém em maior concentração na fração butanol das raízes (896,26 mg/g, Manuscrito 1, Tabela 1) e nas 3 frações das folhas (clorofórmio: 691,71; acetato de etila: 688,06, butanol: 674,07 mg/g, Manuscrito 1, Tabela 1). Adicionalmente, foi verificada a presença das isoflavonas glicitina (53,12 mg/g) e genisteína (2,53 mg/g) no extrato bruto das folhas (Manuscrito 1, Tabela 1).

A quantificação destas substâncias esclarece algumas atividades apresentadas pela planta. Já são muito comentadas na literatura as atividades farmacológicas das isoflavonas, sendo que as principais são os benefícios no controle de doenças crônicas tais como câncer, diabetes mellitus, osteoporose e doenças cardiovasculares. Estudos experimentais e epidemiológicos comprovam uma maior incidência de alguns tipos de câncer, como mama, próstata e cólon, além de doenças cardiovasculares, em populações ocidentais expostas a limitadas quantidades de isoflavonas de soja na dieta, reforçando a ideia dos benefícios destas substâncias (ESTEVEZ; MONTEIRO, 2001). Dessa forma, a atividade



antitumoral evidenciada neste trabalho (Manuscrito 1, Figura 2) pode ser explicada pela presença desta classe de compostos em *U. baccifera*.

Genisteína, daidzeína e gliciteína são isoflavonas consideradas quimiopreventivas, pois diversos estudos comprovaram que estas substâncias conseguem inibir o crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro* (LAZAREVIC et al., 2011, MESSINA et al., 1994, ONOZAWA et al., 1998), podendo induzir apoptose nas células tumorais prostáticas (SZLISZKA; KROL, 2011). A apoptose pode ser o mecanismo de ação antitumoral do extrato bruto das folhas de *U. baccifera*, pois nesta amostra estavam presentes as isoflavonas genisteína, daidzeína e gliciteína (Manuscrito 1, Tabela 1) e a mesma apresentou elevada citotoxicidade no ensaio clonogênico (Manuscrito 1, Figura 3), alta genotoxicidade em dsDNA (Manuscrito 1, Figura 1) e ação antitumoral em células de adenocarcinoma prostático (Manuscrito 1, Figura 2). Entretanto maiores estudos são essenciais para esclarecer a ação das folhas de *U. baccifera* nas células.

As propriedades estrogênicas das isoflavonas auxiliam na manutenção da densidade óssea de mulheres na fase de pré-menopausa (SIMÕES et al., 2010). Adicionalmente, isoflavonas são descritas como detentoras de atividade antioxidante. Tal capacidade antioxidante foi relacionada ao número de grupos hidroxila presente na sua estrutura química (BARBOSA et al., 2006). A atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas e raízes de *U. baccifera* foram determinados e considerados moderados (GINDRI et al., 2014; MANNION; MENEZES, 2010). Dessa forma, estas atividades podem ser correlacionadas com o teor de isoflavonas quantificadas neste trabalho.

A atividade antiviral de algumas isoflavonas já foram estudadas. Genisteína, a substância mais estudada desta classe de metabólitos secundários, demonstrou inibir a infecção de vírus envelopados e não envelopados, bem como inibiu vírus de RNA ou DNA de fita dupla ou fita simples. Estudos já foram realizados com adenovírus, herpes simples vírus, vírus da imunodeficiência humana e rotavírus. As isoflavonas podem afetar vários processos de sinalização das células hospedeiras, incluindo indução dos fatores de transcrição dos genes e secreção de citocinas (ANDRES; DONOVAN; KUHLENSCHMIDT, 2009)

A atividade antiviral de *U. baccifera* (Artigo 1, Tabela 1) pode ser explicada pelo teor de isoflavonas quantificado na planta (Manuscrito 1, Tabela 1). Yura, Yoshida e Sato (1993) demonstraram a ação da isoflavona genisteína inibindo o

Herpes simplex vírus Tipo 1, em concentrações maiores de 25 mM. Orhan et al., (2007) avaliaram atividades farmacológicas de óleo de soja rico em genisteína e daidzeína e observaram uma excelente atividade antiviral contra Herpes simplex e atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

A ação antimicrobiana (Artigo 1, Tabela 2) da espécie *U. baccifera* também pode ser explicada pela presença de isoflavonas na planta (Manuscrito 1, Tabela1). Os isoflavonóides coumestrol, genisteína e daidzeína, isolados do extrato de *Erythrina crista galli* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus brevis* (REDKO et al., 2007). Genisteína também apresentou ação contra *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis* (MIC 19,53 µg/mL) (KUETE et al., 2008). Adicionalmente, daidzeína apresentou ação contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ZHONG et al., 2006).

Algumas atividades farmacológicas de *U. baccifera* foram evidenciadas neste estudo, bem como a toxicidade dos extratos foram avaliados. O próximo passo deste estudo é realizar o isolamento e elucidação estrutural dos constituintes das frações da planta, tendo em vista que o uso destas amostras pela população é inviável e ainda não pode ser considerado seguro. Os constituintes isolados que apresentarem atividades biológicas (antitumoral, antibacteriano ou antiviral) podem ser fontes de novos fármacos.

Apesar da ação antitumoral evidenciada principalmente nas folhas da planta, esta ainda não pode ser considerada segura para uso popular, pois ensaios de citotoxicidade mais aprofundados devem ser realizados, incluindo linhagens celulares humanas saudáveis e tumorais, visando a confirmação da segurança e eficácia do uso das raízes desta planta como quimioterápico, determinando também seu mecanismo de ação antitumoral. Por fim, pode ser necessário realizar ensaios de toxicidade cutânea, a fim de verificar segurança dos extratos da planta na possibilidade de utilizar os mesmos para uma formulação antiviral/antibacteriana tópica.

## 6. CONCLUSÕES

As raízes e folhas do extrato bruto da planta *U. baccifera* não apresentaram ação analgésica e anti-inflamatória por via oral nas doses testadas.

As frações clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol das folhas apresentaram atividade inibitória para a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. A fração *n*-butanol e acetato de etila das folhas e raízes bem como o extrato bruto das raízes inibiu o crescimento de *Prototheca zopfii*. A fração acetato de etila das raízes impediu o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. A ação antimicrobiana da planta somente pode ser evidenciada através do fracionamento dos extratos brutos.

Uma excelente atividade antiviral foi evidenciada por todos os extratos e frações das raízes e folhas de *U. baccifera* frente a Herpes vírus tipo 1, com destaque ao extrato bruto e fração acetato de etila das raízes e fração *n*-butanol das folhas.

As infusões das raízes e folhas da planta promoveram redução do índice mitótico ou danos no ciclo celular das células das radículas de *Allium cepa*, indicando alta genotoxicidade.

A elevada genotoxicidade de *U. baccifera* foi confirmada através do ensaio de capacidade genomodificadora em DNA dupla fita de timo de bezerro. Os extratos brutos das folhas e raízes, bem como as frações das raízes apresentaram elevada toxicidade ao DNA.

O ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular realizado em células V-79 (fibroblastos do pulmão de hamster chinês) demonstrou que as raízes da planta não promovem alteração na viabilidade celular, diferentemente das folhas desta espécie, que reduzem significativamente a viabilidade das células testadas, indicando que as raízes atuam diretamente no DNA da célula, diferentemente das folhas, que apresentaram elevada citotoxicidade neste ensaio agindo induzindo a apoptose celular.

Uma elevada atividade contra células de adenocarcinoma prostático foi evidenciada principalmente para o extrato e frações das folhas da planta. Uma atividade menor foi observada nas frações obtidas das raízes, não sendo observada ação para o extrato bruto das raízes nas concentrações testadas.

A isoflavona daidzeína foi quantificada nos extratos e frações das raízes e folhas da planta, estando mais concentradas nas frações das folhas e na fração

butanol e acetato de etila das raízes. No extrato bruto das folhas também foram quantificadas genisteína e glicitina. Estas substâncias podem justificar a ação antiviral, antibacteriana e antitumoral da planta *U. baccifera*.

Ao compilar os dados de atividade farmacológica e toxicidade obtidos neste estudo percebe-se que as folhas e raízes da planta obtiveram atividades promissoras, porém necessitam de maiores estudos, preferencialmente em linhagens celulares humanas, antes de seu uso ser considerado seguro e eficaz como planta medicinal. Além disso, são necessários estudos de toxicidade aguda e crônica *in vivo*, a fim de confirmar a segurança de sua utilização. O mecanismo de ação antitumoral, antiviral e antibacteriano necessita ser elucidado, bem como o isolamento dos constituintes ativos das frações da planta devem ser isolados e identificados, a fim de se obter novos fármacos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICE, C. B. **Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico**. Canoas: Ulbra, 2004, 205 p.
- ALVES, N. M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincann Mart.*)**. 2007, 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde. Brasília.
- AMARAL, E. A.; SILVA, E. M. G. Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Perquirere - Revista eletrônica da pesquisa**. Ed. 5, ano 5, junho/2008. Não paginado.
- AMAT, A. G. et al. Evaluation of Cytopatological Parameters Induced by Aqueous Extracts of Seven Plants Used as Antihypertensive Agents in Argentine Folk Medicine. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 37-42, nov. 2002.
- ANDRES, A.; DONOVAN, S. M.; KUHLENSCHMIDT, M. S. Soy isoflavones and virus infections. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.563-569, aug. 2009.
- ARAUCO, R.; GUÉZOU, A. Morphological phylogenetic analysis of *Urera* (Urticaceae) in Costa Rica. **Tropical Plants Systematics**, OTS 06-9, p.109-114, jun./jul., 2006.
- BADILLA, B. et al, Anti-inflammatory activity of *Urera baccifera* (Urticaceae) in Sprague-Dawley rats. **Revista de Biologia Tropical**, v.47, n.3, p.365-371, set. 1999.
- BADILLA, B. et al, Edema induced by *Bothrops asper* (Squamata: Viperidae) snake venom and its inhibition by Costa Rican plants extracts. **Revista de Biologia Tropical**, v.54, n.2, p.245-252, jun. 2006.
- BADILLA, B.; MORA, G.; POVEDA, L.J. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of five costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats. **Revista de Biologia Tropical**, v.47, n.4, p.723-727, dez. 1999.
- BARBOSA, A. C. L. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.921-926, out./dez. 2006.
- BERMÚDEZ, A. et al. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. **NCI, Caracas**, v.30, n.8, ago. 2005.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e

notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União – D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de junho de 2014, nº 116, Seção 1, pág. 86.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União – D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de dezembro de 2008.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 1.102, de 12 de maio de 2010. Constitui Comissão Técnica e Multidisciplinar de Elaboração e Atualização da Relação Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos-COMAFITO. **Diário Oficial da União – D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de maio de 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". **Diário Oficial da União – D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 18 de março de 2004.

CÁCERES, A. et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n.2, p. 85-88, oct. 1995.

CADONÁ, F.C. et al. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. **Analytical Methods**. v.6, p.8559-8568, aug. 2014.

CAAMAL-FUENTES, E. et al. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, n.3, p. 719–724, jun. 2011.

CASSETTARI, V. C. et al. Surto em berçário por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido atribuído à colonização de profissional de saúde portador de onicomiose. **Jornal Brasileiro de Pediatria**. v. 82, n. 4, p. 313-316, jul./aug 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p.99-105, 1998.

CHAVEZ, A. S.; ZANIN, E. M. Etnobotânica em comunidades rurais de origem italiana e polonesa do município de Erechim/RS. **Perspectiva**, v.36, n.133, p.95-113, Mar./2012.

CLARKE, J. H. R.; RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v.19, n.1/2, p.41-8, 2007.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, v. 6, Rio de Janeiro: Editora Gráfica Brasileira LTDA, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento florestal,1984. 777 p.

DUTRA, H. P.; OLIVEIRA, P. S. M. C. A função ecológica dos frutos de *Urera Baccifera* (Urticaceae): Interações entre *Smyrna blomfidia* (Lep., Nymphalidae) e formigas. In: **Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp**, Instituto de Biologia, 2004.

DUTRA, H.P.; FREITAS, A.V.L.; OLIVEIRA, P.S. Dual attraction in the Neotropical shrub *Urera baccifera* (Urticaceae): the role of ant visitation to pearl bodies and fruits in herbivore deterrence and leaf longevity. **Functional Ecology**, v.20, p. 252-260, apr. 2006.

ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, n.1, p.43-52, Apr./2001.

GALILEU. Um mercado incipiente. In: **Revista Galileu**, São Paulo: Editora Globo, 2010. Disponível em: <<http://galileu.globo.com/edic/129/rdossie5.htm>>. Acesso em 02 mai. 2011.

GALLO, M.; KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on *Echinacea*. **Canadian Family Physician**, v.47, p.1727-8, sept. 2001.

GINDRÍ, A. L. et al. Análise fitoquímica qualitativa das cascas e do miolo da raiz de *Urera baccifera* (L.) Gaudich (Urticaceae). **Saúde (Santa Maria)**, v.36, n.2, p. 63-70 jul.-dez. 2010.

GINDRÍ, A.L. et al. Genotoxic evaluation, secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Urera baccifera* Gaudich (Urticaceae). **Natural Product Research**, v. 28, n. 23, p. 2214–2216, jun. 2014.

GOMES, E. C. et al. Plantas medicinais com características tóxicas usadas pela população de Morretes, PR. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, vol. 2. n. 2, p. 77-80, Jul-Dez 2001.

HERNÁNDEZ, A. Q. Plantas al **Servicio de la Salud**. Mariño: San José, Costa rica, 2008, 61 p.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução a Taxonomia Vegetal. 12º edição, Companhia São Paulo: Nacional, 1998. 777 p.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846-857, out.-dez, 2008.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.1, p.17-24, out. 2008

LAZAREVIC, B. et al. Efficacy and Safety of Short-Term Genistein Intervention in Patients with Localized Prostate Cancer Prior to Radical Prostatectomy: A Randomized. Placebo-Controlled. Double-Blind Phase 2 Clinical Trial. **Nutrition and Cancer**, v.63, n.6, p.889–898, jun. 2011.



- LEITE, S. N. **Além da medicação: a contribuição da fitoterapia para a saúde pública**. 2000, 114 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo (SP): Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Saúde Pública.
- LIMA, N. G. P. B. et al. *Urtica dióica*: uma revisão dos estudos das suas propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.3, p.199-206, 2008.
- LINDENMAIER, D. S.; PUTZKE, J. Estudo etnobotânico em três comunidades Mbya/Guaraní na Região Central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Pesquisa**, Série Biologia, v.23, n.3, p.6-18, 2011.
- LONGHI, S.J., et al. Aspectos fitossociológicos de fragmento de floresta estacional decidual, Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, v.10, n.2, p.52-74, 2000.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MANNION, F.; MENEZES, F.S. Antioxidant activity of *Urera baccifera* Gaud extracts. **The Trinity College Dublin Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p.8-9, may. 2010.
- MARTINS, F. O. et al. *In vitro* inhibitory effect of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. extracts against herpes simplex. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.1, n.11, p.581-584, oct. 2009.
- MARTINS, G.R., et al. Atividade Antioxidante do Extrato Etanólico e Suas Partições Obtidos dos Galhos de *Urera baccifera* Gaudich. Através do ensaio com DPPH. 29<sup>a</sup> **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006
- MELENDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v.13, p.272–276, mar. 2006.
- MELO, A. M. **Estudo Fitoquímico e biológico de *Hyptis mutabilis***. 2003, 130p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE.
- MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 1, p. 21-35, 2001.
- MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL, E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul notas sobre a obra literária de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n.1, p.25–47, 1997.
- MESSINA, M. J. et al. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. **Nutrition and Cancer**, v.21, p.113-131, 1994.

- MONRO, A. K.; RODRIGUEZ, A. Three new species and a nomenclatural synopsis of *Urera* (Urticaceae) from Mesoamérica. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.96, n.2, p.268-285, jul. 2009.
- NOONAN, S. C.; SAVAGE, G. P. Oxalate content of foods and its effect on humans. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, n.1, p.64-74, mar. 1999.
- ORHAN, I. et al. Quantification of daidzein, genistein and fatty acids in soybeans and soy sprouts, and some bioactivity studies. **Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica**, v.49, n.2, p. 61–68, nov. 2007.
- ONOFRE, S. B.; HERKERT, P. F. Antimicrobial activity of extracts obtained from *Urera baccifera* (L.) Gaudich. **Advances in Life Sciences**, v. 2, n. 5, p. 139-143, 2012.
- ONOZAWA, M. et al. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v.28, v.6, p.360-363, jun. 1998.
- REDKO, A. et al. Antimicrobial Isoflavonoids from *Erythrina crista galli* Infected with *Phomopsis* sp. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.62, n.3-4, p.164-168, Mar.abr/ 2007.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n.1-2, p. 80-84, aug. 2005.
- RITTER, M. R. et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12, n. 2, p. 51-62, jul./dec. 2002.
- RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.3, jan. 2011
- ROMANIUC NETO, S.; GAGLIOTI, A. L.; GUIDO, B. M. O. Urticaceae Juss. do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v.36, n.1, p.193-205, jan./mar. 2009.
- SHÄFER, P. Ein brennhaartoxin der *Urera baccifera* (Urticaceae) als auslöser einer ekzematoiden langzeitreaktion. **Dermatologie in Beruf und Umwelt**, v.49, n.5, p.238-242, 2001.
- SIDRIM, J. J. C. et al. Onycholysis caused by a mixed infection of *Prototheca zopfii* and *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 25, p. 69-71, 2003.
- SIMÕES, M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. 6 ed, 1 reimp, 2010. 1102 p.
- STEINMANN, V. W. Urticaceae. Flora Del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 134, 80p., jul. 2005

SUDMAN, M.S. Protothecosis a critical review. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 1, p. 10-19, 1974. apud BRITO, M. A. V.; VEIGA, V. M. O. Mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*: relato de um caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.4, p. 681-684, Dez./1997.

SYTSMA, K. J.; MORAWETZ, J.; PIRES, J. C.; NEPOKROEFF, M.; CONTI, E.; ZJHRA, M.; HALL, J. C.; CHASE, M. W. Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on rbcL, trnL-F, and ndhF sequences. **American Journal of Botany**, v.89, p.1531-1546, 2002. apud ROMANIUC NETO, S.; GAGLIOTI, A. L.; GUIDO, B. M. O. Urticaceae Juss. do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v.36, n.1, p.193-205, jan./mar. 2009.

SZLISZKA, E.; KROL, W. Soy isoflavones augment the effect of TRAIL-mediated apoptotic death in prostate cancer cells. **Oncology Reports**, v.26, n.3, p.533-541, sept. 2011.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. **Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test**, Environmental Contamination, Dr. Jatin Srivastava (Ed.). 2012.

TEIXEIRA, K. Plantas medicinais que podem causar alteração na Pressão arterial e interação com anti-hipertensivos. **Trabalho de conclusão de Curso**, 2011, 33p. Curso de Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

TEIXEIRA, R.O. et al. Assesment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p. 551-555, dec. 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.289-306, apr./jun. 2006.

VALADEAU, C. et al. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.413–422, 2009.

VALADEAU, C. et al. The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.175–192, jun. 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, may./jun. 2005.

VICENTINI, V. E. P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p. 593-598, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v.24, n.1, p.147-152, jan./feb. 2001.

YURA, Y; YOSHIDA, H.; SATO, M. Inhibition of herpes simplex virus replication by genistein, an inhibitor of protein-tyrosine kinase. **Archives of Virology**, v.132, n.3-4, p.451-461, 1993.

ZHONG, X. et al. Preliminary Study on Antimicrobial Activity of Daidzein. **Journal of Gannan Medical University**, v.2, 2006.