

ANÁLISE FITOQUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE POTHOMORPHE UMBELLATA

Ana Carolina de Souza Toesca Arruda¹,
Carlos Rocha Oliveira²,
Dalia Kassem Baalbaki³,
Gabriella Ribeiro de Freitas⁴,
Lucas Santos Zamarioli⁵,
Soraya Pinheiro Martins⁶

¹Universidade Anhembi Morumbi. Acadêmica em Farmácia.
E-mail: carolsouza.arruda@gmail.com

²Orientador, professor da Universidade Anhembi Morumbi.
Farmacêutico-Bioquímico.
E-mail: pharmacologia@hotmail.com

³Universidade Anhembi Morumbi. Acadêmica em Farmácia.
E-mail: daliabaalbaki@outlook.com

⁴Universidade Anhembi Morumbi. Acadêmica em Farmácia.
E-mail: gabriella-freitas@hotmail.com

⁵Universidade Federal de São Paulo. Biólogo.
E-mail: lucaszamarioli@gmail.com

⁶Universidade Anhembi Morumbi. Acadêmica em Farmácia.
E-mail: sorayapmartins36@gmail.com

Recebido em outubro de 2018.

Aprovado em janeiro de 2019.

Resumo

O trabalho demonstra os resultados obtidos de análises de toxicidade aguda e análises fitoquímicas da planta *Pothomorphe umbellata*, também conhecida como pariparoba, sendo este natural da mata Atlântica indo da Amazônia até a região do estado de São Paulo e Paraná, usada popularmente para fins terapêuticos pela população. Os testes foram respectivamente o DPPH, HPLC flavonoides e fenóis totais. Estudos apontam que a *Pothomorphe umbellata* possui atividade antioxidante e antienvhecimento devido a presença da fenilpropanóide 4-nerolidilcatecol. A toxicologia estuda o efeito de determinadas substâncias em organismos vivos. Portanto, realizou-se o teste

agudo-letal em *Artemia salina*, que consiste na análise da exposição do bioindicador ao composto durante um intervalo de 24 horas. Entretanto, diversos fatores ambientais como luz, umidade e concentração das substâncias influenciam na eficiência dos resultados. *Pothomorphe Umbellata* é composta quimicamente por nerolidilcatechol, pigmentos, flavonóides, lactonas diterpênicas, saponinas, fitosteróis, polifenóis taninos e óleos essenciais. Os resultados sugerem boa margem de segurança em relação ao uso da planta analisada, em virtude da presença de alto nível de intoxicação provocada por esta, ou seja, o propósito deste artigo é contribuir para a análise do impacto da intoxicação por *Pothomorphe Umbellata*. O estudo acima foi conduzido na Universidade Anhembi Morumbi, campus Mooca, durante o período de agosto de 2017 a setembro de 2018.

Palavras-chave: *Pothomorphe umbellata*; *Piper umbellatum*; *Artemia salina*;

Introdução

A cultura de utilização de plantas medicinais no Brasil vem sendo cada vez mais estudada e aprimorada, levando em consideração as influências indígenas, africanas e europeias. A espécie *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., da família Piperaceae é nativa da Mata Atlântica, estando presente desde a Amazônia até os estados de São Paulo e Paraná. Conhecida popularmente como pariparoba ou capeba, é encontrada em bordas de mata e áreas perturbadas, sendo ambientes que obtiveram distúrbios naturais ou antrópicos, mas foram capazes de manter o mínimo de resiliência^{1, 2, 3}.

A proliferação da *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. apresenta-se predominantemente, nos sub-bosques e orlas da mata, sendo considerada uma espécie esciófita. Morfologicamente, é classificada como um subarbusto multi caule, ereto, perene, chegando a medir quando adulto um metro a um metro e meio de

altura. Seus ramos são angulosos, nodosos e as folhas são membranáceas¹.

As comprovações de ações antioxidantes e fotoprotetoras por meio da utilização de extrato de folhas, promoveu a comercialização por empresas de cosméticos na forma de composições dermocosméticas tópicas para antienvhecimento. Foram comprovadas cientificamente que esta espécie, é atribuída ao fenilpropanóide 4-nerolidilcatecol por isso é capaz das atividades farmacológicas anteriormente relatadas⁴. Esta espécie é atribuída à outras atividades, tais como tratamento de epilepsia, atuam também na disfunção hepática, bronquite asmática, cicatrizante e anti-inflamatório, febrífugo, sedativa e analgésica, repelente de insetos, anti-malária^{5, 6, 7, 8}.

As raízes e folhas são amplamente utilizadas para o tratamento de doenças hepáticas e distúrbios inflamatórios na América do Sul tropical⁹. Por esta razão as raízes de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. foram incluídas na primeira edição da farmacopeia brasileira¹⁰. Os principais metabólitos secundários que compõem quimicamente *P. umbellata*, são os terpenos provenientes do óleo essencial, sendo que os sesquiterpenos ocorrem em maior proporção¹¹; também os fenilpropanóides, flavonóides e esteróides⁸.

As raízes e folhas da espécie, foram isoladas resultando no isolamento da mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol além do peltatol A e do 4-nerolidilcatecol, estando este presente em todos os órgãos. Também foi constatada a presença de componentes sesquiterpênicos de peso molecular 204, inclusive nerolidol, no óleo essencial das folhas.

Membros da família Piperaceae são ricos em substâncias como fenóis, ésteres fenólicos, terpenóides e éteres^{12, 9}. Propriedades antioxidantes e antienvhecimento cutâneo são atribuídas ao fenilpropanóide 4-nerolidilcatecol, essa substância também é responsável, pela atividade anti-inflamatória e analgésica.

Estudos fitoquímicos de *P. umbellata* levaram ao isolamento de alguns princípios ativos, como o alcalóide N-benzoilmesalina, substância com atividade contra úlcera gástrica induzida por *Helicobacter pylori*¹³ e o fenilpropanóide 4-nerolidilcatecol¹⁴ que possui atividade anti-envhecimento, devido ao seu alto potencial antioxidante comprovado cientificamente.

Testes *in vitro*⁹ e *in vivo*⁴, demonstraram atividade antioxidante 2,5 vezes superior ao alfa-tocoferol (vitamina E), indicando-a como fármaco potencial para condições patológicas onde ocorra participação de estresse oxidativo^{9, 15} e no uso de formulações cosméticas, com o objetivo de combater os efeitos nocivos causados por radicais livres⁴. O 4-nerolidilcatecol possui também atividade anti-inflamatória e analgésica.

Outras propriedades farmacológicas têm sido conferidas a esta substância: anti-malária¹⁶ inibitória da replicação do HIV¹⁷, analgésica¹⁸ e antimicrobiana^{19, 20}.

Há um elevado grau de preocupação em relação ao uso de segurança dos extratos de plantas, assim com o objetivo de assegurar a qualidade e a segurança de fitomedicamentos, a Agência Nacional de vigilância sanitária do Brasil (ANVISA) publicou em 24 de fevereiro de 2000, a resolução n^o 17 que estabelece que os fitomedicamentos devem ser submetidos a análises pré-clínica e ensaios clínicos toxicológicos e farmacológicos²¹.

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações das substâncias químicas com o organismo, com a finalidade de prevenir, diagnosticar e tratar intoxicações²².

O estudo realizado por Perazzo et al. (2005), que visa avaliar a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da *Piper umbellatum*, apontou uma diminuição da formação de tecido granulomatoso em ratos e camundongos, comprovando a ação anti-inflamatória. Além disso foi possível determinar a dose efetiva 50, sendo 555,0 mg/Kg e a dose letal 50, sendo superior à 2,0 g/Kg²³.

O primeiro teste realizado com o extrato de *Piper umbellatum* foi o bioensaio de *Artemia salina*. Este microcrustáceo de água salgada é muito utilizado como bioindicador em ensaios de toxicidade-aguda de extratos de plantas, por apresentar um baixo custo financeiro e rápida execução²⁴.

O estudo tem o propósito de analisar a planta *P. umbellata* ou capeba através da toxicologia, avaliando a capacidade da mesma em produzir algum efeito tóxico (maior ou menor) em condições de uso, além de levantar informações sobre os benefícios que a planta nos traz em relação à saúde do indivíduo estimulando

o seu uso.

Material e Métodos

Tintura Mãe

A planta da espécie *Piper umbellata*, foi adquirida no comércio de São Paulo, já com suas folhas e caule rasuradas e desidratadas.

Primeiramente, a planta passou por um moinho de facas, na Universidade Anhembi Morumbi, e logo após esteve em um processador para ficar na forma pulverizada. Em seguida, tamisou-se para a separação das partes maiores da mesma.

A tintura foi preparada a 20% da droga vegetal em álcool 60%, através do processo de maceração, protegida da luz durante sete dias, com agitações diárias.

Procedeu-se a filtração em gazes para a obtenção do extrato final.

Artemia salina

O processo de incubação foi realizado em um frasco de vidro transparente, com capacidade volumétrica de aproximadamente de 500 ml, possuindo uma abertura rosqueada que permitiu a oxigenação da água por meio de agitação alternada. Para a solução salina adicionou-se 19g de sal marinho não iodado a 500 ml de água filtrada, onde foram adicionados 40 mg de cistos de *Artemia salina* e 3 mg de fermento biológico.

O recipiente passou pelo processo de ciclo claro/escuro durante um período de 48 horas para a eclosão dos cistos.

Após a eclosão dos ovos, foram contadas cerca de dez *Artemia salina* aproximadamente, onde foram transferidas com o auxílio de uma micro pipeta Pasteur para uma placa de cultura de células com seis poços disponíveis, realizando a contagem através do microscópio estereoscópio. Todo material para realização do teste foi previamente lavado e descontaminado com álcool 70%.

Cada concentração testada foi realizada em triplicata. As concentrações utilizadas do extrato de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. foram 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml, 3000 µg/ml e 6000 µg/ml, além da amostra em branco, na qual foi utilizada apenas água salina.

A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 horas. A morte dos microcrustáceos é comprovada a partir da sua sedimentação, devido ele ser um crustáceo com constante atividade em água salina, estando sempre em movimento. A alteração dos aspectos normais do microcrustáceo, como a falta de movimentos, e sua sedimentação são os indicadores de morte do mesmo, sendo contabilizada a quantidade de espécimes vivas e mortas em cada poço das concentrações.

Fenóis Totais

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo.

A quantificação de fenólicos totais foi obtida a partir da leitura de absorbância à 760nm utilizando o espectrofotômetro.

A quantidade total de fenóis (em mg/mL) é dada usando a equação linear do ácido gálico, sendo esta a curva de calibração padrão. O procedimento foi realizado em triplicata.

Nesta análise utilizamos o extrato de diluição 1:10 em água da tintura obtida anteriormente. Em um recipiente de 3mL foi adicionado 200 µL desta solução diluída em 1400 µL de água.

Foi adicionado 160 µL da solução de Sódio Carbonato-Tartarato e em seguida 240 µL de Folin-Ciocalteu (Merck®), a amostra foi agitada por alguns segundos e incubada na ausência de luz por 2 horas em temperatura ambiente.

A amostra foi agitada por alguns segundos e foi medida novamente em espectrofotômetro Cary-50.

Flavonoides

O extrato foi usado com uma diluição de 1:5 em metanol. No mesmo recipiente de 3 mL foi adicionado 100 µL do extrato diluído em 1500 µL de Metanol.

Em seguida foi adicionado 400 µL de Cloreto de Alumínio em uma concentração de 5% e agitada por alguns segundos. A solução foi incubada por 30 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente.

A amostra foi agitada, novamente, por alguns segundos e foi medida a absorbância em um comprimento de onda de 425 nm no espectrofotômetro Cary-50.

A quantidade de flavonoides (em mg/mL) foi determinada usando a equação linear da quercetina. O procedimento foi realizado em triplicata.

Atividades Antioxidantes (DPPH)

A atividade do extrato de *Pothomorphe umbellata* contra os radicais livres foi realizada usando o DPPH (1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl radical). A atividade de captura dos radicais livres do DPPH pelos compostos fenólicos foi avaliada seguindo os métodos de Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações.

O extrato foi diluído para que a concentração de sólidos e solúveis se igualasse a 0,1%. Com o extrato na concentração ideal, foi feita uma curva de decaimento dos radicais livres, em que a Abs inicial = 0,7300 (aproximadamente).

A curva foi feita com onze recipientes de 3mL com o aumento gradativo de 40 µL de extrato a 0,1%, ou seja, o primeiro recipiente possuía 1000 uL de etanol e 0uL de extrato, o segundo, 960 µL de etanol e 40 µL de extrato, e assim sucessivamente.

Após o preparo dos recipientes, foi adicionado 1000 µL de DPPH em cada um deles com a diferença de 1 minuto por recipiente, e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz.

O Decaimento da absorbância foi medido em 517nm, e a CE50 (Metade da Concentração Inibitória Máxima) foi calculada com uma regressão não linear por plotagem de Log (concentração) versus a porcentagem de inibição com GraphPad Prism 6.

Cromatografias (HPLC)

Para a purificação cromatográfica, foi utilizada o HPLC LaChrom série L7100 com detector de rede diodos série L7455 da Merk e Hitachi (Alemanha). Utilizou-se a coluna C18 Lichrocart 125-4mm, 5 micrômetros, com o solvente A, água acidificada com ac. Fórmico a 5%, e solvente B, metanol.

O volume de injeção foi de 120 µl, detecção em 320nm, consistindo de um gradiente iniciando-se com 100% de A, 5 minutos 80% de A, 21 minutos 70%

de A e 34 minutos 100% de A, o fluxo é 0,8 ml/minuto, tempo de corrida 45 minutos.

Resultados e Discussão

Artemias

O potencial de toxicidade do extrato foi determinado pelo ensaio de *Artemia salina*, onde o monitoramento foi dinâmico, sendo em triplicata cada concentração. Foram utilizadas as seguintes concentrações 0 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml, 3000 µg/ml e 6000 µg/ml, sendo avaliada a quantidade de mortos e vivos pela exposição do extrato de *Piper umbellatum* durante 24 horas.

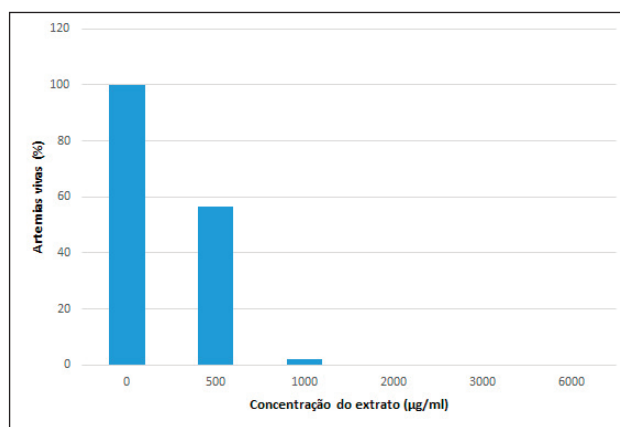
Para uma substância ser considerada tóxica, depende muito da dosagem e do indivíduo que será exposto.

Segundo Dolabela (1997), há um intervalo de toxicidade em relação a CL_{50} variando entre alta toxicidade (CL_{50} menor que 80 µg/ml), moderada toxicidade (CL_{50} entre 80 e 250 µg/ml) e baixa toxicidade (CL_{50} acima de 250 µg/ml)²⁵.

Em *Artemia salina* o extrato considerado tóxico possui uma $CL_{50} < 200$ µg/mL, apresentam alto potencial para morte dos mesmos²⁶.

No gráfico abaixo pode-se observar que não foi possível determinar o CL_{50} a partir das doses utilizadas, nesse caso seria necessário realizar mais análises utilizando doses inferiores a 500 µg/ml.

Gráfico 1: Teste de exposição de *Artemia salina* em extrato de *Pothomorphe umbellata* seguindo o método do item 2.3.



Fonte: Autores

Fenóis totais

Os resultados representados na tabela 1 apresentam a quantificação de fenólicos totais em equivalência do ácido gálico, quantificação padrão, por g/100g. O gráfico 2 também representa a relação entre a ab-

sorbância a 760 nm e concentração real dos compostos fenólicos no extrato em porcentagem.

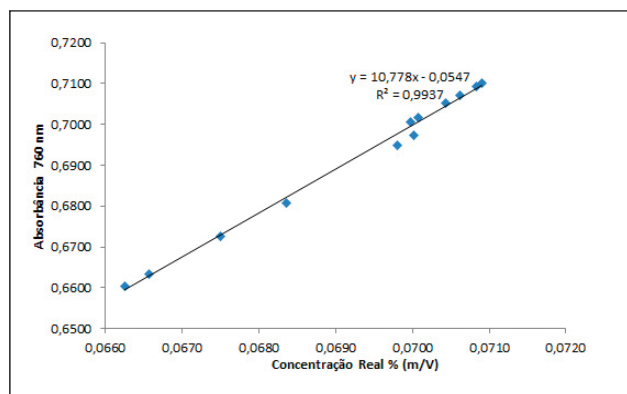
A média obtida a partir do teor de fenóis foi de 0,4484 g/100g, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos pelo teste de absorvância a 760 nm em espectrofotômetro Cary-50 seguindo o método relatado no item 2.4.

	<i>Média (m/V)</i>	<i>Média (g/100g)</i>	<i>Desvio</i>	<i>CV</i>
<i>No extrato</i>	0.01108	-	0.00031	2.7613
<i>Na droga vegetal</i>	-	0.4484	0.0124	2.7613

Fonte: Autores

Gráfico 2: Curva de compostos fenólicos com os resultados obtidos da absorvância a 760 nm pela concentração real encontrada segundo o teste realizado como no item 2.4 da metodologia no espectrofotômetro Cary-50.



Fonte: Autores

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo²⁷.

Flavonoides totais

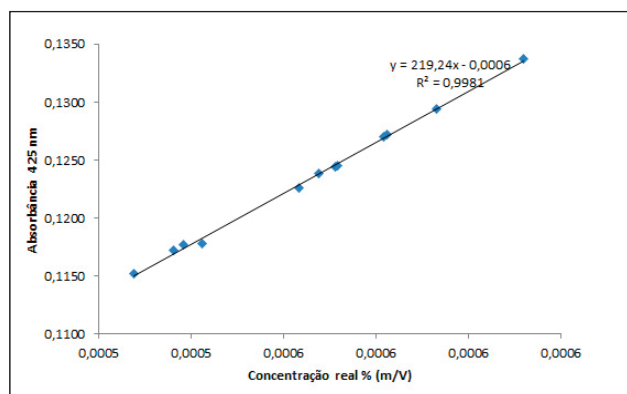
A quantificação de flavonóides totais está demonstrado na tabela 2, onde foi utilizado o padrão de quercetina.

Tabela 2: Resultados referente ao teste de flavonóides totais sob absorvância 425 nm em espectrofotômetro Cary-50, como descrito no item 2.5.

	<i>Média (m/V)</i>	<i>Média (g/100g)</i>	<i>Desvio</i>	<i>CV</i>
<i>No extrato</i>	0.00057	-	0.00003	4.4928
<i>Na droga vegetal</i>	-	0.1678	0.0075	4.4928

Fonte: Autores

Gráfico 3: Parâmetro de resultados encontrados da absorvância a 425 nm por concentração real % do testes realizados de flavonóides totais segundo o método descrito no item 2.5.

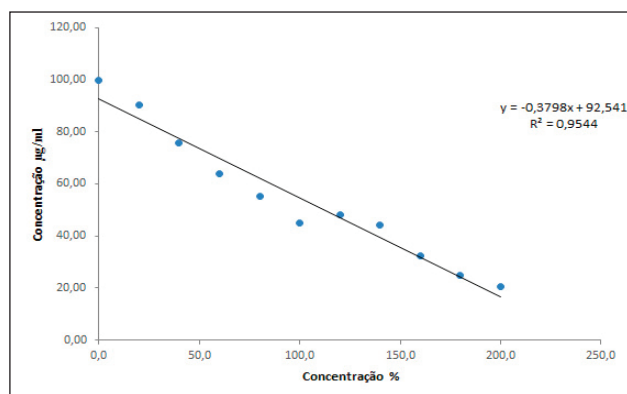


Fonte: Autores

DPPH

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua atividade antioxidante. Sendo o valor encontrado de CE50 igual à 112,01 µg/ml.

Gráfico 4: Concentração obtida no teste de DPPH segundo o método do item 2.6 com o parâmetro comparativo de µg/ml por porcentagem.



Fonte: Autores

HPLC

O 4-NC é um composto muito bem descrito na literatura por suas atividades biológicas, como no estudo de Gustafson et al.²⁸, que detectou atividade anti-HIV por dímeros do 4-NC, extraídos de uma das espécies do gênero *Pothomorphe*. Este composto também se mostrou eficaz na atividade antimalárica⁵ e antioxidante⁹ extraídos de *P.umbellata*.

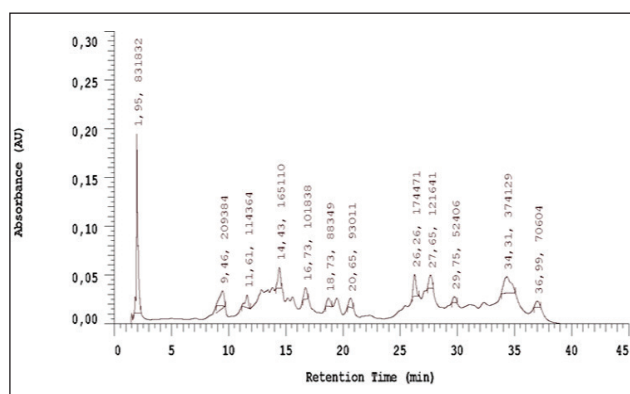
Em estudo, Felzenszwalb et al.²⁹ mostrou que há ausência de toxicidade genética para as espécies: *P.umbellata* e *P.peltata*.

Apesar de ser bem descrito em *P.umbellata*, não foi possível a detecção do 4-nerolidilcatecol pela cromatografia líquida.

Podemos sugerir a presença do sitosterol no tempo de retenção de 28 (±29) minutos, de acordo com Rocha & Silva³⁰. Este composto tem característica esteroidal, extraído de plantas, encontrado em *P.umbellata*¹⁴. Assim como o colesterol, os fitosteróis são suscetíveis à oxidação e são caracterizados por propriedades anti-carcinogênicas e anti-aterogênicas³¹. Porém, o mecanismo de ação exato do sitosterol ainda não é conhecido, porém pode estar relacionado com o metabolismo do colesterol ou atividade anti-inflamatória (interferindo no metabolismo da prostaglandina). Estudos mostram que o sitosterol pode ser um biomarcador para prevenção do câncer^{32, 33}, e ainda que induz a apoptose e a ativação de caspases em células de câncer de mama³⁴.

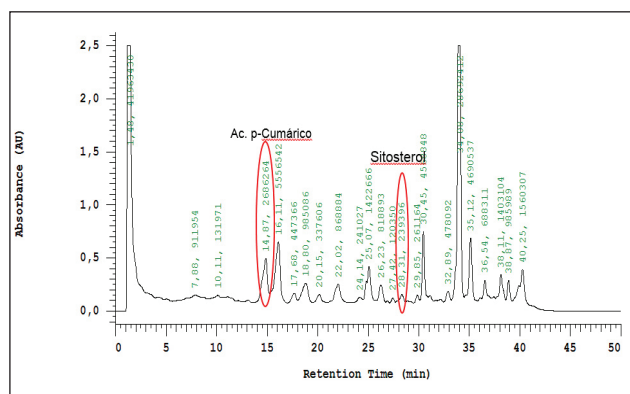
Além do sitosterol, o ácido p-cumárico também pode ser sugerido como presente no tempo de retenção de 14 (±15) minutos, segundo o trabalho de Deschamps & Ramos³⁵, do extrato de *P.umbellata*. O ácido p-cumárico é um ácido hidrocinâmico, macronutriente presente em grande variedade de plantas, incluindo cereais, frutas e vegetais³⁶. Este composto foi testado em ensaios *in vitro*, e mostrou atividade anti-inflamatória e antioxidante^{37,38}. Foi reportado proteção contra estresse oxidativo e genotoxicidade, sugerindo que este ácido hidrocinâmico reduz risco de câncer em humanos e animais³⁹.

Gráfico 5: Resultados obtidos pelo cromatograma realizados pelo HPLC, conforme descrito no item 2.7.



Fonte: Autores

Gráfico 6: Resultados obtidos pelo cromatograma realizados pelo HPLC, conforme descrito no item 2.7.



Fonte: Autores

Considerações Finais

A toxicologia identifica e quantifica substâncias químicas presentes em plantas, desta forma, com os ensaios realizados não foi possível de terminar o grau de toxicidade da planta *Pothomorphe umbellata*, seriam necessários mais estudos para comprovar a segurança no consumo de espécime. Além das propriedades terapêuticas variáveis presentes na mesma.

Este estudo identifica possíveis substâncias nocivas ou não aos usuários. Os resultados encontrados apontam a presença de compostos que podem ser explorados em futuras pesquisas para finalidades terapêuticas.

Referências

- MORAES, M.S. et al. **Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga pariparoba - *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.** Revista de Ciências Farmacêuticas de São Paulo [Internet] 1986/1987 [acesso em 02 set 2018] n. 8/9, p.77-90.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos** [Internet]. 2009. 135p.
- VALLE, J.S. et al. **Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD** [Internet] 2013.
- ROPKE, C.D. et al. ***Pothomorphe umbellata* extract prevents alfa-tocopherol depletion after UV-irradiation. Photochemistry and Photobiology** [Internet] 2003 [acesso em 02 set 2018] v.78, n.5, p.436-9.
- AMORIM, C.Z. et al. **Screening for antimalarial activity in the genus *Potomorphe***. Journal of Ethnopharmacology [Internet]. 1988 [acesso em 02 set 2018]; v.24, p.101-6, 1988.
- DE FEO, V. **Uso di piante ad azione antinfiammatoria nell'Alto Ucayali, Perù orientale**. Fitoterapia [Internet] 1991 [acesso em 02 set 2018] v.67, p.48194.
- DI STASI, L.C. et al. **Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon**. Fitoterapia [Internet] 1993.
- HAMMER, M.L.A.; JOHNS, E.A. **tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of marajó Island, Pará (Brazil)**. Journal of Ethnopharmacology [Internet] 1993.
- BARROS, S. B. M. et al. **Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba)**. Ciênc. Cult. [Internet] 1996.
- SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: 1º Ed. Nacional, p.444, 649 e 946; 1929.
- MATTANA, R.S.; et al. **Propagação vegetativa de plantas de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] em diferentes substratos e número de nós das estacas** [Internet] 2009 [acesso em 09 ago 2018] p.325.
- CALLE, A. J. **Contribución al estudio de al-**

gunas espécies de la familia Piperaceae. Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm. [Internet].1983 [acesso em 02 set 2018] v.4, p.47-57.

13 ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. **Anti-bacterial constituents against Helicobacter pylori of brazilian medicinal plant, pariparoba.** Yaku-gaku Zasshi, v.122, n.4, p.291-294, 2002.

14. KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A.M.; AKISUE, M.K.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. **4-Nerolidylcatechol from Pothomorphe umbellata.** Planta Medica, v.39, p.85-87, 1980.

15. DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L.R.; KATO, M.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. **4-Nerolidylcatechol from Pothomorphe spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe (II)-dependent DNA damage.** Planta Médica, v.63, n.6, p.561-563, 1997.

16. FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; ADAMI, Y.L.; ESPINOLA-MENDES, E.C.; FIGUEIREDO, M.R.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. **The intraperitoneal plasmodium berghei-Pasteur infection of Swiss mice is not a System that is able to detect the antiplasmodial activity in the Pothomorphe plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas.** Exp. Parasitol, v.94, n.4, p.243-247, 2000.

17. GUSTAFSON K.R., et al. **The peltatols, novel hiv-inhibitory catechol derivatives from Pothomorphe peltata.** The Journal of Organic Chemistry [Internet] 1992 [acesso em 28 out 2018] 57: 2809– 2811

18. BIOKA, D.; ABENA, A. **Psychopharmacologic profile of an aqueous extract of Piper umbellatum.** L'Encephale, v.16, n.3, p.205-208, 1990.

19. MONGELLI, E. et al. **Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from Pothomorphe peltata inhibits topoisomerase I activity.** Planta Medica, v.65, n.4, p. 376-378,1999a.

20. MONGELLI, E. et al. **Antioxidant compound 4-nerolidylcatechol inhibits in vitro KB cells growth and topoisomerase I activity. Special Publication - Royal Society of Chemistry (Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease), v.40, p.404-406, 1999b.**

21. BRASIL. **Resolução RDC nº17 de 24 fev. 2000.Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos** [Internet]. Diário Oficial da União. 25 fev. 2000.

22. CHASIN, A. A. M.; LIMA, I. V. **Toxicologia para químicos. Minicursos CRQ-IV** [Internet]. 2010 [acesso em 18 ago. 2018].

23. PERAZZO, F.F. et al. **Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from Pothomorphe umbellata (Piperaceae) aerial parts.** Journal of Ethnopharmacology [Internet] 2005 [acesso em 02 set 2018].

24. MEYER, B. N.; et al. **Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents.** Journal of Medicinal Plant Research [Internet] 1982.

25. DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti Trypanosoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1997.

26. ELIENE, S. S. et al. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmodica e toxicidade em Artemia salina de extrato etanólico de folhas de Montrichardia linifera (Arruda) Schott, Araceae.** Revista Brasileira de Farmacognosia [Internet] 2008 [acesso em 24 out 2018].

27. Sousa, C. M. M., et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Artigo online. 2007 [acesso em 24 out 2018] volume 30:2.

28. GUSTAFSON, K. R. et al. **The peltatols, novel T-ITV-inhibitory catechol derivatives from Pothomorphe peltata.** Journal of Organic Chemistry. 1992.

29. FELZENSZWALB, J.O.; VALSA, J.O.; ARAÚJO, A.C.; ALCÂNTARA-GOMES, R. **Absence of mutagenicity of Potomorphe umbellata and Potomorphe peltata in the Salmonella marrirnaliamicrosome mutagenicity assay.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.20, p.403-405, 1987.

30. SILVA, H. R. et al. **Chemical constituents from bark of Cenostigma macrophyllum: cholesterol occurrence.** Quím. Nova. 2007. São Paulo; vol.30 no.8

31. MAGUIRE, L. et al. **Comparison of the cytotoxic effects of β -sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7 β -hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells.** British Journal of Nutrition. 2003. 90(04), 767.

32. LI, J.-H. et al. **Measurement variability of plasma β -sitosterol and campesterol, two new biomarkers for cancer prevention.** European Journal of Cancer Prevention. 2001. 10(3), 245–249.

33. WILT, M. I. **β -sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia:** BJU International. 2001. 83(9), 976–983.

34. AWAD, A.; ROY, R.; FINK, C. **β -sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells.** Oncology Reports. 2003.

35. DESCHAMPS F.C.; RAMOS L.P. **Method for Phenolic Acid Determination in Forage Cell Wall.** [Internet] R. Bras. Zootec., v.31, n.4, p.1634-1639, 2002 [acesso em 28 out 2018]. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbz/v31n4/13724.pdf>

36. CLIFFORD, M. N. **Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism.** J. Sci. Food Agric. 2000. 80, 1033–1043.

37. GUGLIELMI, F. et al., **Effect of 4-coumaric and 3, 4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa.** Br. J. Nutr. 2003. 89, 581–587.

38. LUCERI, C., et al. **Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats.** Scand. J. Gastroenterol. 2004. 39, 1128–1133.

39. FERGUSON, L. R., SHUO-TUN, Z., HARRIS, P. J., **Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29.** Mol. Nutr. Food Res. 2005. 49, 585– 693.