



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-RENORBIO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PONTO FOCAL

ALESSANDRA MARIA BRAGA RIBEIRO

**PERFIL QUÍMICO, TOXICIDADE, EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PARTES AÉREAS DE *Phyllanthus
amarus* Schumach. & Thonn. (QUEBRA-PEDRA) ASSOCIADAS AO
CLORETO DE MAGNÉSIO**

TERESINA-PI

2019

ALESSANDRA MARIA BRAGA RIBEIRO

PERFIL QUÍMICO, TOXICIDADE, EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PARTES AÉREAS DE *Phyllanthus*
amarus Schumach. & Thonn. (QUEBRA-PEDRA) ASSOCIADAS AO
CLORETO DE MAGNÉSIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia - RENORBIO - como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira

TERESINA-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Processos Técnicos

R484p Ribeiro, Alessandra Maria Braga.

Perfil químico, toxicidade, efeito anti-hipertensivo e atividade antimicrobiana das partes aéreas de *Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn. (quebra-pedra) associadas ao cloreto de magnésio. / Alessandra Maria Braga Ribeiro – 2019.

195 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

“Orientadora: Profa. Dra. “ Aldeídia Pereira de Oliveira ”

1. Anti-hipertensivo. 2. *Phyllanthus amarus*. 3. Cloreto de Magnésio. I. Título.

CDD 616.132

ALESSANDRA MARIA BRAGA RIBEIRO

PERFIL QUÍMICO, TOXICIDADE, EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PARTES AÉREAS DE *Phyllanthus*
amarus Schumach. & Thonn. (QUEBRA-PEDRA) ASSOCIADAS AO
CLORETO DE MAGNÉSIO

Exame de defesa de doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
da Rede Nordeste em Biotecnologia -
RENORBIO como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aldeídia Pereira
de Oliveira

Aprovada em: 20/11/19

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira
Orientadora

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira
Departamento de Biofísica e Fisiologia/Examinador interno (UFPI)

Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto
Departamento de Parasitologia e Microbiologia/Examinador externo (UFPI)

Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior
Departamento de Química/Examinador interno (UFPI)

Prof. Dra. Rosimeire Ferreira da Silva
Departamento de Bioquímica e Farmacologia/Examinador externo (UFPI)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todos os hipertensos do planeta!!

A bondade sublime é como a água
A água, na sua bondade, beneficia os dez mil seres sem preferência,
Permanece nos lugares desprezados pelos outros,
Por isso assemelha-se ao Caminho.

Viva com bondade na Terra
Pense com bondade, como um lago
Conviva com bondade, como irmão
Fale com a bondade de quem tem palavra,
Governe com a bondade de quem tem ordem
Realize com a bondade de quem é capaz
Aja com bondade todo o tempo.

Não dispute, assim não haverá rivalidade.

Lao Tsé – TAO TE CHING (Cap. 8)

AGRADECIMENTOS

O doutorado foi uma experiência ímpar em minha vida. Foi quando tive a oportunidade de utilizar meus traços fortes e também de enfrentar meus traços fracos. Foi onde encontrei o cenário perfeito para aprender, na prática, a focar na solução e não no problema.

Agradeço aos meus amparadores, por me auxiliarem com intuições construtivas e por todo o aporte oportunizado durante este período tão importante em minha vida. Não tenho dúvida de que vocês existem.

À Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. **Dr. José Arimatéia Dantas Lopes**, pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal da Universidade Federal do Piauí.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, do ponto focal da Universidade Federal do Piauí, na pessoa da Prof^a. **Dra. Carla Eiras**, pela doação, compromisso e competência na gestão deste Programa. Agradeço também, ao atual Coordenador, Prof. **Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo**, pela sabedoria e ética em administrar as atividades da Coordenação.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, na pessoa do Magnífico Prof. **Reitor Paulo Henrique Gomes de Lima**, por ter possibilitado minha liberação das atividades docentes para realizar a execução desta pesquisa. Aproveito para agradecer também aos Diretores do Campus Angical, Prof. **Rogério Azevedo** e Prof^a. **Samara Viana**, pela amizade e respeito.

No âmbito da UFPI, (re) encontrei pessoas com intenção sincera em dar sua contribuição científica à sociedade, a começar por minha orientadora, Prof^a. **Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira**, que para mim é um exemplo de determinação, dedicação, otimismo e sensibilidade. Agradeço por ter me acolhido, desde a primeira vez quando propus meu projeto, e sou eternamente grata por ter proporcionado todo o conhecimento durante esses anos de trabalho em seu laboratório. Com isso, a seu exemplo, tenho a feliz satisfação de ter contribuído com uma alternativa útil de

tratamento à população hipertensa. Agradeço pela amizade, respeito e atenção carinhosa sempre demonstrada. Espero que possamos manter, por tempo indeterminado, estes laços sinceros que nasceram a partir desta tese.

À Professora **Dra. Rita de Cássia Meneses**, pelo acolhimento, orientação, paciência e carinho em momentos importantes do desenvolvimento desta tese.

À Banca examinadora deste trabalho, pela disponibilidade e gentileza em fazer as correções e questionamentos essenciais à melhoria da proposta apresentada.

Aos meus animais, pela companhia, colaboração durante os experimentos e pela contribuição indispensável à execução desta pesquisa. Agradeço por terem sido tão dóceis, fortes e persistentes. “Saibam” que os procedimentos foram realizados com muita ética e respeito.

Ao **Sr. Carlos**, bioterista do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM), pela amizade, apoio nos momentos mais difíceis e por ter me ajudado a cuidar tão bem dos meus animais, o que foi essencial ao bom andamento dos protocolos.

Ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UFPI, na pessoa da Prof^a. **Dra. Aldeídia Pereira Oliveira**, por oportunizar a estrutura necessária à execução esta pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Parasitologia e Microbiologia da UFPI, na pessoa do Prof. **Dr. Humberto Medeiros Barreto**, por gentilmente ter aceito a parceria, pela amizade, disponibilidade, paciência e criatividade na condução dos experimentos. Aproveito para agradecer ao aluno de iniciação científica **Jonas Sousa**, pela dedicação, amizade, respeito e disponibilidade durante a execução dos experimentos no laboratório de microbiologia.

Aos Professores da Renorbio: **Francisco Lima, Ana Amélia Cavalcante, Paulo Michel, Maria Rita Santos, Aldeídia Oliveira, Rita de Cássia, Geovany**

Pinto, pelos conhecimentos compartilhados durante as disciplinas ministradas durante o doutorado.

Ao **Sr. Gildevan**, pela atenção, simplicidade e auxílio na coleta das plantas na cidade de Angical do Piauí.

Ao **Carlos**, Técnico do Herbário Graziela Barroso da UFPI, pela atenção e eficiência no encaminhamento das amostras de plantas para identificação botânica.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, campus Zona Sul, na pessoa do **Dr. Jurandy do Nascimento Silva**, pela parceria durante a preparação do extrato.

Ao **Dr. Wanderson Silva** e **Dr. Paulo Cordeiro**, parceiros do laboratório de química da USP/São Carlos, pelo auxílio na identificação de alguns compostos presentes no meu extrato.

Ao **Ms. Felipe Oliveira**, pelo auxílio com os ensaios de docagem molecular da Filantina e pelos esclarecimentos sobre os métodos e resultados obtidos.

Agradeço ao Laboratório de Leishmania do NPPM, na pessoa do Prof. **Dr. Fernando Aécio** e aos seus alunos **Valéria, Ingrid e Michel Muálem**, pela parceria nos protocolos de MTT.

À FAPEPI e ao PPSUS, pelo fomento oportunizado ao Laboratório em Farmacologia Cardiovascular.

Aos colegas do Laboratório em Farmacologia Cardiovascular: **Pedro Simão, Lorranya Éveli, Gabriela Dantas, Carla Kelly, Julianne Portela, Kalynca Viana, Fabiana Moura, Márcio Edivandro e João Vitor**, pelos momentos de conversas, trocas de experiência, companhia e amizade! Em especial, ao meu amigo **Dr. Marcelo Bezerra**, por ter me ensinado os protocolos e cirurgias; por ter me socorrido nos momentos mais críticos dos experimentos e por ter enchido nossos corações de alegria e bem-estar, apenas com sua presença. Agradeço também, especialmente à querida **Ms. Aline Nunes**, pela parceria, por saber ser resiliente após momentos de dificuldades de convivência (porque ela fala alto e é muito inquieta, atrapalhando o sossego dos meus animais, rsrs) e por ter sido companheira durante os

experimentos em laboratório e fora do laboratório também. Certo dia, bati o carro. Adivinha quem foi me dar aquele apoio? Ela....Aline, rsrs.

Agradeço aos alunos de iniciação científica do Laboratório em Farmacologia Cardiovascular: **Talysson, Márcia, Bruno** e em especial ao **Emerson Portela**, pela amizade, colaboração durante os protocolos e por tratar meus animais com respeito e carinho.

Agradeço aos amigos que conquistei em outros laboratórios do NPPM: **Benedito, Flaviano, Rodrigo, Ian, Ana Karolinne, Polyanna Negueiros, Bryan, Valéria, Ingrid, Michel Muálen, Boris, Micael, Carlos, Everton, Oscar, Teresa e Celyane!** Obrigada pela amizade e apoio, seja durante algum experimento ou na hora de segurar o rato para eu anestesiá-lo (rsrs). Agradeço, especialmente, ao **Benedito**, que sempre me ajudou com as análises bioquímicas.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer durante as disciplinas do doutorado: **Kátia Carvalho, Kátia Machado, Marcus Alencar, Claucenira, Carol, Rafael**, em especial à **Dra. Gilmara Péres** e **Dra. Josiane Neves**, pois elas encheram meu coração de alegria e paz!

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia **Dra. Rosimeire dos Santos, Dra. Fernanda Almeida, Dra. Elisângela de Oliveira e Dr. Moisés Tolentino** pelos conhecimentos compartilhados, amizade e respeito.

Ao professor **Dr. Luciano Ribeiro**, da UNIVASF, pela amizade, paciência, parceria e pelos cursos ministrados, de alto nível, com teoria e prática aplicadas a partir de dados estatísticos na área de farmacologia.

Ao Josi, pelas conversas, ajudas, lanchinhos e risadas nos intervalos dos experimentos.

Aos meus pais e em especial à minha mãe, **Eliete Braga**, pelo amor, companhia e apoio, seja nos momentos bons ou difíceis.

Ao meu esposo, **Saul Coêlho**, por ter me ensinado a focar na solução dos problemas, pelo apoio em tudo, companhia, amor e cuidados a mim dedicados.

Ao meu sogro **João Coêlho**, uma das pessoas mais assistenciais que já conheci. Agradeço pelo carinho e cuidados a mim sempre direcionados.

Aos meus sobrinhos **Vítor Lucas** e **Marcelinho**, pelos momentos de carinho e ternura, que me fizeram relaxar em vários momentos de tensão.

Ao amigo, médico e conscienciólogo, **Hernande Leite**, por ter me ensinado a aproveitar as experiências com o doutorado para fazer autopesquisa, com autoenfrentamento e discernimento, rumo ao melhoramento pessoal.

Ao Dr. **Jonas Moura**, pela amizade e por ter me ajudado, com suas terapias de alto nível, durante momentos de esgotamento físico e mental.

À minha professora de pilates **Daniela Costa**, por me tratar com muito carinho e por ter me ajudado durante as crises de tensão muscular.

Agradeço aos acupunturistas e terapeutas **Isabele Santiago, Micaele Nascimento, Alexandre Barros, Clécio, Alecxandro Anacleto, Luiz Fernandes e João Coêlho** pelos inúmeros reequilíbrios energéticos e por fazerem meu coração acalmar durante os momentos de estresse.

Aos amigos intrafísicos e extrafísicos da “Casa do Caminho” pelo apoio energético nos momentos mais difíceis desta caminhada.

RIBEIRO, A. M.B. **Perfil químico, toxicidade, efeito anti-hipertensivo e atividade antimicrobiana das partes aéreas de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. (quebra-pedra) associadas ao cloreto de magnésio.** Orientadora: Aldeídia Pereira de Oliveira. 2019, Tese – Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

RESUMO

A espécie *Phyllanthus amarus*, popularmente conhecida como quebra-pedra, tem sido pesquisada devido aos benefícios encontrados em substâncias bioativas presentes nesta espécie, como atividade antioxidante, anti-hiperglicêmica, hepatoprotetora, cardioprotetora e antimicrobiana. O magnésio desempenha importantes funções intracelulares, além de regular o tônus vascular e a função endotelial. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil químico, citotoxicidade, toxicidade aguda, atividade hipotensora, anti-hipertensiva e antimicrobiana do extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Phyllanthus amarus* (PAE), cloreto de magnésio ($MgCl_2$) ou de um composto formado a partir de PAE e $MgCl_2$, na forma de extrato (PAE+ $MgCl_2$) ou Chá (PAE+ $MgCl_2$ 3%). O perfil químico do PAE foi analisado por cromatografia gasosa com espectrometria de massas. No estudo de toxicidade aguda os ratos foram tratados com dose oral única de 2000 mg/kg/animal e a citotoxicidade foi avaliada pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2-5-difeniltetrazolio (MTT). Para avaliar os parâmetros cardiovasculares, foram utilizados modelos de ratos normotensos e hipertensos L-NAME (N^G -nitro-L-arginina-metil éster) a partir da técnica da medida direta da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos acordados. Além disso, investigou-se os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta anti-hipertensiva do extrato etanólico de *P. amarus* associado ao cloreto de magnésio (PAE+ $MgCl_2$). Testes de microdiluição foram realizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do PAE ou Filantina para diferentes espécies de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). Para avaliar se o PAE ou Filantina foram capazes de agir como moduladores da resistência às fluoroquinolonas, a CIM para Norfloxacin e brometo de etídio foram determinados na presença ou ausência de PAE ou Filantina contra *S. aureus* SA1199-B, em concentrações subinibitórias. A análise química do PAE apresentou em sua composição as lignanas: Nirantina, Hipofilantina, Nirtetralina, Filantina, Filtetralina, Lignana D e Lignana 370. Nos estudos de viabilidade celular a porcentagem de células viáveis diminuiu a partir de 400 e 100 $\mu g/mL$ para o PAE e PAE+ $MgCl_2$, respectivamente, apresentando CC_{50} iguais 196 e 50 $\mu g/mL$, para as respectivas substâncias. Os testes farmacológicos com dose única de 2000 mg/kg de PAE, $MgCl_2$ ou PAE+ $MgCl_2$ não causou morte nos animais e não produziu alterações bioquímicas em parâmetros hepáticos ou renais. Em relação à resposta sobre o sistema cardiovascular, o PAE+ $MgCl_2$ administrado por via endovenosa nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, promoveu efeito hipotensor dose-dependente em ratos normotensos ($\Delta PAM = -15,57 \pm 2,84^*$; $-40,03 \pm 5,97^*$ e $-85,49 \pm 4,26^*$ mmHg, respectivamente) e efeito anti-hipertensivo dose-dependente, em animais hipertensos ($\Delta PAM = -31,65 \pm 4,57^*$; $-68,19 \pm 7,12^*$ e $-97,26 \pm 8,42^*$ mmHg, respectivamente), ambos associados à bradicardia. Após tratamento agudo com atropina, hexametônio, ioimbina e propranolol, os efeitos anti-hipertensivo e bradicárdico de PAE+ $MgCl_2$ foram significativamente atenuados, sugerindo o envolvimento de receptores muscarínicos, α_2 e β -adrenérgicos na resposta anti-hipertensiva. O tratamento por via oral com PAE+ $MgCl_2$, por 7 dias na dose de 300

mg/kg/dia em animais L-NAME, promoveu diminuição significativa na pressão arterial média (PAM), a partir de 180 minutos após a administração da dose (Δ PAM= $-21,40 \pm 4,89^*$ mmHg), permanecendo reduzida até 270 minutos (Δ PAM= $-24,17 \pm 5,36^*$ mmHg). O Chá PAE+MgCl₂ (3%) promoveu efeito anti-hipertensivo, quando administrado por via oral durante 7 dias (Δ PAM= $-32,28 \pm 7,52^*$ mmHg) ou quando administrado agudamente (Δ PAM= $-29,81 \pm 5,35^*$ mmHg), apresentando uma diminuição na PAM 240 ou 180 minutos após a gavagem do Chá PAE+MgCl₂ (3%), respectivamente, sem alterações na frequência cardíaca. O PAE mostrou atividade antimicrobiana contra cepas Gram-negativas, enquanto a Filantina foi inativa contra todas as cepas testadas. O PAE ou a Filantina, em concentrações subinibitórias, aumentou a atividade da norfloxacin contra linhagem de *S. aureus* que superexpressa o gene NorA, sugerindo que os produtos naturais testados podem potencializar a ação deste antibiótico. Este estudo sugere que o PAE associado ao cloreto de magnésio induz efeito hipotensor e anti-hipertensivo, provavelmente por atuação em receptores muscarínicos inespecíficos, receptores nicotínicos ganglionares e receptores α_2 -adrenérgicos. Além disso, a filantina e o PAE podem ser utilizados como um agente potencializador da atividade da norfloxacin no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistente a fluoroquinolonas.

Palavras-chave: *Phyllanthus amarus*; filantina; cloreto de magnésio; atividade anti-hipertensiva; *S. aureus*; atividade antimicrobiana.

RIBEIRO, A. M.B. **Chemical profile, toxicity, antihypertensive effect and antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* aerial parts Schumach. & Thonn. (rock breaker) associated with magnesium chloride.** Advisor: Aldeida Pereira de Oliveira. 2019, Thesis - Post-Graduation in Biotechnology, Northeast Network of Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí.

ABSTRACT

Phyllanthus amarus, popularly known as rock breaker, has been researched due to the benefits found in bioactive substances present in this species, such as antioxidant, antihyperglycemic, hepatoprotective, cardioprotective and antimicrobial activity. Magnesium performs important intracellular functions in addition to regulating vascular tone and endothelial function. The aim of this research was to evaluate the chemical profile, cytotoxicity, acute toxicity, hypotensive, antihypertensive, and antimicrobial activity of the ethanolic extract obtained from *Phyllanthus amarus* (PAE), magnesium chloride ($MgCl_2$) or a compound formed from PAE and $MgCl_2$ as extract (PAE+ $MgCl_2$) or Tea (PAE+ $MgCl_2$ 3%). The PAE chemical profile was analyzed by gas chromatography with mass spectrometry. In the acute toxicity study rats were treated with a single oral dose of 2000 mg/kg/animal and cytotoxicity was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. To evaluate cardiovascular parameters, we used normotensive and hypertensive rat models L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester) using the technique of direct measurement of blood pressure and heart rate in awake rats. Furthermore, we investigated the possible mechanisms of action involved in the antihypertensive response of *P. amarus* ethanolic extract associated with magnesium chloride (PA+ $MgCl_2$). Microdilution tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of PAE or Phyllanthin for different species of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). To assess whether PAE or Phyllanthin were able to act as fluoroquinolone resistance modulators, the MIC for Norfloxacin and ethidium bromide were determined in the presence or absence of PAE or Phyllanthin against *S. aureus* SA1199-B at subinhibitory concentrations. The chemical analysis of PAE presented in its composition the lignans: Niranthine, Hypophyllanthin, Nirtetraline, Phyllanthin, Filtetraline, Lignana D and Lignana 370. In the cell viability studies the percentage of viable cells decreased from 400 and 100 $\mu g/mL$ for the PAE and PAE+ $MgCl_2$, respectively, with CC_{50} equal to 196 and 50 $\mu g/mL$, for the respective substances. Pharmacological tests with a single dose of 2000 mg/kg PAE, $MgCl_2$ or PAE+ $MgCl_2$ did not cause death in animals and did not produce biochemical changes in hepatic or renal parameters. Regarding the response on the cardiovascular system, intravenously administered PAE+ $MgCl_2$ at doses of 25, 50 and 100 mg/kg promoted a dose-dependent hypotensive effect in normotensive rats ($\Delta PAM = -15.57 \pm 2.84^*$, $-40.03 \pm 5.97^*$ and $-85.49 \pm 4.26^*$ mmHg, respectively) and dose-dependent antihypertensive effect in hypertensive animals ($\Delta PAM = -31.65 \pm 4.57^*$; $-68.19 \pm 7.12^*$ and $-97.26 \pm 8.42^*$ mmHg, respectively), both associated with bradycardia. After acute treatment with atropine, hexamethonium, yohimbine and propranolol, the antihypertensive and bradycardic effects of PAE+ $MgCl_2$ were significantly attenuated, suggesting the involvement of muscarinic, α_2 and β -adrenergic receptors in the antihypertensive response. Oral treatment with PAE+ $MgCl_2$ for 7 days at a dose of 300 mg/kg/day in L-NAME animals led to a significant decrease in mean arterial pressure (MAP) from 180 minutes after dosing ($\Delta PAM = -21.40 \pm 4.89^*$ mmHg),

remaining reduced up to 270 minutes ($\Delta\text{PAM} = -24.17 \pm 5.36^*$ mmHg). PAE + MgCl_2 Tea (3%) promoted antihypertensive effect when administered orally for 7 days ($\Delta\text{PAM} = -32.28 \pm 7.52^*$ mmHg) or when acutely administered ($\Delta\text{PAM} = -29.81 \pm 5, 35^*$ mmHg), showing a decrease in MAP 240 or 180 minutes after the storage of PAE+ MgCl_2 tea (3%), respectively, without changes in heart rate. PAE showed antimicrobial activity against Gram-negative strains, while Phyllanthin was inactive against all strains tested. PAE or Phyllanthin, at subinhibitory concentrations, increased norfloxacin activity against *S. aureus* strain that overexpresses the NorA gene, suggesting that the natural products tested may potentiate the action of this antibiotic. This study suggests that magnesium chloride-associated PAE induces hypotensive and antihypertensive effects, probably by acting on non-specific muscarinic receptors, ganglionic nicotinic receptors and α_2 -adrenergic receptors. In addition, Phyllanthin and PAE may be used as a potentiating agent of norfloxacin activity in the treatment of infections caused by fluoroquinolone resistant *S. aureus*.

Keywords: *Phyllanthus amarus*; Phyllanthin; magnesium chloride; antihypertensive activity; *S. aureus*; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1 - Uso tradicional do gênero <i>Phyllanthus</i> em diferentes países	38
Figura 2 - <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn	40
Figura 3 - Estrutura da parede arterial	45
Figura 4 - Regulação do tônus vascular pelo óxido nítrico	46
Figura 5 - Sinalização dos receptores β -adrenérgicos	51
Figura 6 - Patogenia da deficiência de magnésio na disfunção endotelial	53
Figura 7 - Função do magnésio na fisiopatologia da pressão arterial	54

Capítulo 1

Resumo gráfico	73
Figura 1 - <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn.	77
Figura 2 - Preparação do extrato de <i>P. amarus</i> . (A) Partes aéreas de <i>P. amarus</i> desidratadas	78
Figura 3 - Protocolo de citotoxicidade em macrófagos peritoneais de murinos pelo teste do MTT	81
Figura 4 - Cromatograma obtido por GC-MS do extrato das partes aéreas de <i>P. amarus</i>	85
Figura 5 - Efeito do PAE sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos	86
Figura 6 - Efeito do $MgCl_2$ sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos	87
Figura 7 - Efeito do PAE+ $MgCl_2$ sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7	88
Figura 8 - Avaliação ponderal de ratas tratadas com 2000 mg/kg de PAE, $MgCl_2$ e PAE+ $MgCl_2$ durante 14 dias	92
Figura 9 - Consumo de ração de ratas tratadas com 2000 mg/kg de PAE, $MgCl_2$ e PAE+ $MgCl_2$ durante 14 dias	93
Figura 10 - Avaliação de estômagos de ratas tratadas com dose única de 2000 mg/kg	95

Capítulo 2

Resumo gráfico	104
Figura 1 - Obtenção do extrato de <i>P. amarus</i>	110
Figura 2 - Preparação do infuso com folhas de <i>P. amarus</i> e cloreto de magnésio a 3% na proporção de 1:1 (Chá PAE+MgCl ₂ 3%)	111
Figura 3 - Representação ilustrativa do procedimento cirúrgico e implantação de cateter em ratos	113
Figura 4 - Imagem ilustrativa do sistema computadorizado de aquisição e registro dos parâmetros cardiovasculares	114
Figura 5 - Ilustração dos protocolos realizados com animais normotensos e hipertensos	117
Figura 6 - Cromatograma obtido por GC-MS do extrato das partes aéreas de <i>P. amarus</i>	118
Figura 7 - Cromatograma obtido por GC-MS do extrato das partes aéreas de <i>P. amarus</i>	120
Figura 8 - Cromatograma obtido por GC-MS do extrato das partes aéreas de <i>P. amarus</i>	121
Figura 9 - Efeito hipotensor e bradicárdico de MgCl ₂ sobre a PA e FC em ratos normotensos	123
Figura 10 - Registro original mostrando a resposta de PAE+MgCl ₂ sobre a PA em ratos normotensos	124
Figura 11 - Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzidos pela administração aguda de PAE+MgCl ₂ em ratos normotensos	126
Figura 12 - Efeito hipotensor e bradicárdico de 200 mg/kg de PAE+MgCl ₂ , administrado por via oral, sobre a PA de ratos normotensos	127
Figura 13 - Registro original mostrando a resposta de PAE+MgCl ₂ sobre a PA em ratos hipertensos modelo L-NAME	128
Figura 14 - Efeito anti-hipertensivo (A) e bradicárdico (B) induzidos pela administração aguda de PAE+MgCl ₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME	129
Figura 15 - Registro original mostrando a resposta de PAE+MgCl ₂ sobre a PA após inibição aguda dos receptores muscarínicos em ratos hipertensos modelo L-NAME	130

Figura 16 - Participação dos receptores muscarínicos sobre as respostas anti-hipertensiva e bradicárdica induzidas pela administração aguda de PAE+MgCl ₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME	132
Figura 17 - Registro original mostrando a resposta de PAE+MgCl ₂ sobre a PA após inibição aguda dos receptores ganglionares em ratos hipertensos modelo L-NAME	133
Figura 18 - Participação ganglionar sobre a resposta anti-hipertensiva (A) e bradicárdica (B) induzidos pela administração aguda de PAE+MgCl ₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME	134
Figura 19 - Registro original mostrando a resposta de PAE+MgCl ₂ sobre a PA após inibição aguda dos receptores α_2 adrenérgicos em ratos hipertensos modelo L-NAME	135
Figura 20 - Participação dos receptores α_2 -adrenérgicos sobre a resposta anti-hipertensiva (A) e bradicárdica (B) induzidos pela administração aguda de PAE+MgCl ₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME	136
Figura 21 - Participação dos receptores β -adrenérgicos sobre a resposta anti-hipertensiva (A) e bradicárdica (B) induzidos pela administração aguda de PAE+MgCl ₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME	138
Figura 22 - Influência do tratamento crônico de PAE+MgCl ₂ (300 mg/kg), sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, administrado por 7 dias em ratos modelo L-NAME	140
Figura 23 - Influência do tratamento crônico do Chá PAE+MgCl ₂ (3%), sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, administrado por 7 dias em ratos modelo L-NAME	142
Figura 24 - Influência do tratamento agudo do Chá PAE+MgCl ₂ (3%), sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos modelo L-NAME	144

Capítulo 3

Resumo gráfico	163
Figura 1 - Mecanismos de resistência bacteriana	167
Figura 2 - Estrutura química da filantina	168
Figura 3 - Partes aéreas de <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn	168
Figura 4 - MICs da Norfloxacina (Nor) (A) e Brometo de Etídio (EtBr) (B) na ausência ou presença de extrato etanólico de <i>Phyllanthus amarus</i> (PAEE), Phyllantin (PHY) ou Chlorpromazine (CPZ) contra SA1199-B	175
Figura 5 - Interação da filantina no local de ligação do NorA mostrando ligações H formação entre Filantina e GLN51 ou ASN340 que proporciona estabilidade ao complexo proteína/ligando	178

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Desenho experimental do ensaio de toxicidade aguda realizado com ratos Wistar	83
Tabela 2 - Sinais clínicos e comportamentais após administração de PAE na dose de 2000 mg/kg por via oral	89
Tabela 3 - Sinais clínicos e comportamentais após administração de MgCl ₂ na dose de 2000 mg/kg por via oral	90
Tabela 4 - Sinais clínicos e comportamentais após administração de PAE+MgCl ₂ na dose de 2000 mg/kg por via oral	91
Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos obtido do soro de ratas normotensas tratadas por via oral com dose única de PAE, MgCl ₂ e PAE+MgCl ₂ a 2000 mg/kg, sob avaliação de 14 dias, durante ensaio de toxicidade aguda	94

Capítulo 2

Tabela 1 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos L-NAME tratados com veículo, PAE+MgCl ₂ e Chá PAE+MgCl ₂ (3%), por via oral durante 7 dias	146
--	-----

Capítulo 3

Tabela 1 - Constituintes do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Phyllanthus amarus</i> (PAE)	172
Tabela 2 - Médias geométricas da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do Extrato Etanólico de <i>Phyllanthus amarus</i> (PAE) contra diferentes cepas	173

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ALT	Alanina aminotransferase
AMPC	3',5' adenosina monofosfato cíclico
ANG I	Receptores da angiotensina I
ANG II	Receptores da angiotensina II
ARBs	Bloqueadores de receptores da ANG II
AST	Aspartato aminotransferase
AT₁R	Receptor da angiotensina tipo 1
AT₂R	Receptor da angiotensina tipo 2
CC₅₀	Concentração citotóxica média
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de medicina Veterinária
Chá PAE+MgCl₂ 3%	Chá (infuso) preparado a partir das partes aéreas de <i>Phyllanthus amarus</i> associado ao cloreto de magnésio
CIM	Concentração inibitória mínima
CMM	Concentração microbicida mínima
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CPZ	Clorpromazina
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
DCVs	Doenças cardiovasculares
ECA	Enzima conversora da angiotensina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPI	Inibidor de bomba de efluxo

FC	Frequência cardíaca
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GDP	Guanosina difosfato
GGT	Gama glutamil transpeptidase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GR	Enzima glutationa redutase
GTP	Guanosina trifosfato
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil éster
mAChR	Receptores muscarínicos de acetilcolina
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes à metilicina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NO	Óxido nítrico
NorA	Proteína transmembrana que expulsa fluoroquinolonas da célula
NPS	Nitroprussiato de sódio
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PA	Pressão arterial
PAE	Extrato das partes aéreas de <i>Phyllanthus amarus</i>
PAE+MgCl₂	Extrato das partes aéreas de <i>P. amarus</i> associado ao cloreto de magnésio
PAM	Pressão arterial média

PHY	Filantina
PLC	Fosfolipase C
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RVPT	Resistência vascular periférica total
SA1199-B	Cepa multirresistente de <i>S. aureus</i> que suprerexpressa o gene NorA.
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SISGEN	Sistema de Gestão do Patrimônio Genético
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Enzima superóxido dismutase
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Sumário

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	7
RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	21
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	22
Sumário	25
1. Introdução	31
2. Objetivos	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. Referencial teórico	36
3.1 Plantas medicinais	36
3.2 Propriedades farmacológicas de espécies da família Phyllanthaceae	37
3.3 Atividade biológica de <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn.	39
3.4 Hipertensão arterial sistêmica	41
3.5 Regulação da pressão arterial	43
3.6 Magnésio e doenças cardiovasculares	51
3.7 Microrganismos multirresistentes e produtos naturais	55
Referências bibliográficas	57
4. CAPÍTULO 1: Avaliação da citotoxicidade e toxicidade aguda de <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn. (Quebra-pedra) associado ao cloreto de magnésio.	72
Resumo Gráfico	73
Resumo	74
Abstract	75
1. Introdução	76
2. Material e métodos	77
2.1 Coleta e identificação botânica de <i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn	77
2.2 Preparação do extrato das partes aéreas de <i>P. amarus</i> Schumach. &	

Thonn	77
2.3 Preparação do composto formado por PAE e MgCl ₂	78
2.4 Análise dos constituintes químicos do extrato etanólico das partes aéreas de <i>P. amarus</i> por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (GC-MS)	78
2.5 Drogas e reagentes	79
2.6 Estudos com animais	79
2.7 Protocolos experimentais <i>in vitro</i>	80
2.7.1 Cultivo de células	80
2.7.2 Avaliação da citotoxicidade do PAE e MgCl ₂ em macrófagos peritoneais de murinos pelo teste do MTT	80
2.7.3 Avaliação da citotoxicidade do PAE+MgCl ₂ em células da linhagem RAW 264.7 pelo método do MTT	81
2.8 Determinação da toxicidade aguda em ratos	82
2.9 Avaliação dos efeitos farmacológicos gerais (Screening Hipocrático)	83
2.10 Avaliação ponderal, consumo de ração e análise dos parâmetros bioquímicos	84
3. Análises estatística	84
4. Resultados	85
4.1 Constituintes químicos do extrato etanólico de <i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn	85
4.2 Avaliação da citotoxicidade do PAE e MgCl ₂ em macrófagos peritoneais de murinos pelo teste do MTT.	86
4.3 Avaliação da citotoxicidade do PAE+MgCl ₂ em macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelo teste do MTT	87
4.4 Avaliação da toxicidade aguda em ratos	88
4.5 Avaliação ponderal de ratas tratadas com 2000 mg/kg de PAE, MgCl ₂ e PAE+MgCl ₂	92
4.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com dose única (2000 mg/kg) do PAE, MgCl ₂ ou PAE+MgCl ₂ , durante ensaio de toxicidade aguda	93
4.7 Avaliação de estômagos de ratas tratadas com dose única de 2000 mg/kg	95

5. Discussão	96
5.1 Citotoxicidade do PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ contra células peritoneais de murinos e células Raw	96
5.2 Ensaio de toxicidade aguda em ratos	97
6. Conclusões	98
Referências	99
5. CAPÍTULO 2: Efeito hipotensor e anti-hipertensivo de <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn. (Quebra-pedra), associado ao cloreto de magnésio em ratos.	103
Resumo Gráfico	104
Resumo	105
Abstract	107
1. Introdução	108
2. Material e métodos	109
2.1 Material vegetal e obtenção do extrato etanólico de <i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn.	109
2.2 Obtenção do composto a partir do extrato de <i>P. amarus</i> associado ao cloreto de magnésio e vias de administração	110
2.3 Preparação do Chá a partir das partes aéreas de <i>P. amarus</i> associadas ao cloreto de magnésio	110
2.4 Análise química do extrato de <i>P. amarus</i> por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (GC-MS)	111
2.5 Experimentos com animais	112
2.6 Drogas e reagentes	112
2.7 Ensaio farmacológico <i>in vivo</i>	112
2.7.1 Indução da hipertensão em ratos com L-NAME	112
2.7.2 Implantação dos cateteres vasculares	113
2.7.3 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos e hipertensos L-NAME	114
2.8 Grupos experimentais	115
2.9 Estatística	117
3. Resultados	118
3.1 Obtenção do extrato etanólico de <i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn.	118

3.2	Constituintes químicos do extrato de <i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn.	118
3.3	Respostas pressóricas obtidas por medida direta de pressão antes do início dos protocolos	119
3.4	Efeito de PAE sobre a PAM (mmHg) e FC (bpm) em ratos normotensos	120
3.5	Efeito de MgCl₂ sobre a PAM (mmHg) e FC (bpm) em ratos normotensos	122
3.6	Efeito hipotensor e bradicárdico de PAE+MgCl₂ sobre a PA e FC em ratos normotensos	124
3.7	Efeito de 200 mg/kg de PAE+MgCl₂ administrado por via oral sobre PAM e FC em ratos normotensos	127
3.8	Efeitos de PAE+MgCl₂ sobre a PA e FC em ratos hipertensos modelo L-NAME	128
3.9	Verificação da participação dos receptores muscarínicos na resposta cardiovascular induzida por PAE+MgCl₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME	130
3.10	Envolvimento do bloqueio ganglionar autonômico na resposta anti-hipertensiva e bradicárdica induzida pelo PAE+MgCl₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME	133
3.11	Envolvimento do bloqueio dos receptores α_2-adrenérgico na resposta anti-hipertensiva e bradicárdica induzida pelo PAE+MgCl₂ em ratos hipertensos acordados	135
3.12	Envolvimento da participação dos receptores β-adrenérgico na resposta hipotensora e bradicárdica induzida pelo PAE+MgCl₂ em ratos hipertensos modelo L-NAME não anestesiados	137
3.13	Efeitos de 300 mg/kg de PAE+MgCl₂ administrado por via oral durante 7 dias sobre PAM e FC em ratos hipertensos L-NAME	139
3.14	Efeitos do Chá PAE+MgCl₂ (3%) administrado cronicamente, por via oral, durante 7 dias sobre PAM em ratos hipertensos L-NAME	141
3.15	Efeitos do Chá PAE+MgCl₂ 3% administrado por via oral (aguda) sobre PAM e FC em ratos hipertensos L-NAME	143
3.16	Avaliação de parâmetros bioquímicos dos grupos de animais hipertensos tratados com PAE+MgCl₂ e Chá PAE+MgCl₂ (3%) durante 7	

dias.	145
4. Discussão	147
5. Conclusões	153
Referências	155
6. CAPÍTULO 3: Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn e a atuação da Filantina na inibição de bombas de efluxo em <i>Staphylococcus aureus</i>.	162
Resumo Gráfico	163
Resumo	164
Abstract	165
1. Introdução	166
2. Material e métodos	168
2.1 Material vegetal e e obtenção do extrato etanólico de <i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn	168
2.2 Filantina	169
2.3. Análise química do etanólico de <i>P. amarus</i> Schumach. & Thonn	169
2.4 Cepas microbianas e drogas	169
2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca	170
2.6 Modulação dos ensaios de resistência à fluoroquinolona	171
2.7 Previsão de estrutura de NorA e análise de docking molecular	171
2.8 Análise estatística	171
3. Resultados e discussão	172
3.1 Atividade antibacteriana intrínseca	172
3.2 Modulação da atividade antibiótica	174
4. Conclusão	178
Referências	179
7. Considerações finais	185
Anexo 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética	188
Anexo 2: Comprovante de submissão na Revista Phytomedicine	189
Anexo 3: Artigo publicado Qualis B1	190

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O uso de plantas medicinais tem sido uma prática comum no tratamento de doenças (DUTRA et al., 2016), pois possuem diferentes constituintes fitoquímicos que podem atuar em múltiplos alvos importantes (KOON et al., 2014). Assim, na presente pesquisa, analisou-se a espécie *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn., uma erva conhecida como quebra-pedra, que possui diferentes metabólitos secundários de importância medicinal, incluindo os alcalóides, flavonóides, triterpenos, taninos e as lignanas (MACIEL et al., 2007; LONDHE et al., 2008; MORONKOLA et al., 2009). Além disso, pesquisamos sobre os benefícios do magnésio (Mg^{2+}) no tratamento de doenças cardiovasculares.

O uso popular de *P. amarus* pode ser feito a partir do consumo de chás obtidos por infusão ou decocção das folhas, comumente usados para tratar icterícia, distúrbios urinários, infecções intestinais, cálculos renais e da vesícula biliar. Além disso, estudos destacam a importância farmacológica de *P. amarus* por apresentar atividade antioxidante, anti-diabética, diurética, anti-hepatotóxica, analgésica, anti-inflamatória, antimutagênica, anticancerígena, antimicrobiana e hipotensora (INCHOO et al., 2011; CARTAXO et al., 2010; KASSUYA et al., 2006; PATEL et al., 2011).

Em relação às doenças cardiovasculares (DCVs), estas são consideradas a primeira causa de mortes no mundo, dentre as quais destaca-se a hipertensão arterial sistêmica (HAS), caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), iguais ou acima de 140 mmHg para a PA sistólica e iguais ou acima de 90 mmHg para a PA diastólica. Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram por DCVs em 2016 e que existem cerca de 1.13 bilhões de pessoas hipertensas no mundo (WHO, 2017). A combinação de vários fatores, como obesidade, uso de tabaco, dieta não saudável, inatividade física e hipertensão geralmente aumentam o risco de desenvolvimento de DCVs (PIERDOMENICO et al., 2009)

Sabe-se que a redução e o controle da HAS em indivíduos com hipertensão previnem ou atenuam as complicações (FOROUZANFAR et al., 2016; FREEDMAN; COHEN, 2016; KJELDSEN, 2017). Desta forma, destacamos a importância da suplementação com magnésio (Mg^{2+}), o qual é capaz de regular cerca de 600 reações enzimáticas e modular a função do sistema cardiovascular (OTSUKA et al., 2012; KUPETSKY-RINCON; UITTO, et al., 2012; LIMAYE et al., 2011; SPASOV et

al., 2008). O Mg^{2+} intracelular participa da síntese de DNA, regula canais de cálcio e potássio em miócitos cardíacos e inibe a liberação de cálcio dos estoques sarcoplasmáticos. Ressalta-se que anormalidades na homeostase celular do Mg^{2+} podem causar doenças cardiovasculares, como arritmias, insuficiência cardíaca e hipertensão (BRUNET; SCHEUER; CATTERALL et al., 2009; WANG; GUSEV; NIGGLI et al., 2008).

Portanto, considerando as propriedades farmacológicas de *P. amarus*, esta tese avaliou, além dos efeitos hipotensores e anti-hipertensivos, a modulação da resistência bacteriana da referida espécie, a partir de abordagens inéditas. Desta forma, é importante enfatizar que a resistência antimicrobiana é um dos principais problemas de saúde pública, pois o uso indiscriminado de antibióticos tem favorecido a seleção de bactérias multirresistentes, como *Staphylococcus aureus*, responsável por infecções de difícil tratamento (LI et al., 2018).

Esta tese está organizada em três capítulos, sendo o primeiro intitulado “Avaliação da citotoxicidade e toxicidade aguda do extrato de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. associado ao cloreto de magnésio” que será submetida à revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, com fator de impacto 2,659 (ISI 2017) e qualis A2 em Biotecnologia. O segundo capítulo intitulado “Efeito hipotensor e anti-hipertensivo de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn (Quebra-pedra), associado ao cloreto de magnésio em ratos” foi submetido à revista *Phytomedicine*, que possui qualis A2 em Biotecnologia. Por fim, o terceiro capítulo, intitulado “Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn e a atuação da Filantina na inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*” foi publicado na revista *Microbial Pathogenesis* com Fator de Impacto 2,58, com Qualis B1 na área de biotecnologia da CAPES no quadriênio 2013-2016.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade biológica do extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn (PAE), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), associação entre o PAE e $MgCl_2$ (PAE+ $MgCl_2$) e/ou do Chá preparado a partir das partes aéreas de *P. amarus* e $MgCl_2$ (PAE+ $MgCl_2$ 3%), quanto às propriedades toxicológica, citotóxicas, hipotensora, anti-hipertensiva e antimicrobiana em protocolos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do PAE, $MgCl_2$ e PAE+ $MgCl_2$;
- ✓ Avaliar o potencial citotóxico do PAE, $MgCl_2$ e PAE+ $MgCl_2$ em macrófagos peritoneais de murinos e células Raw 264.7;
- ✓ Verificar a composição química do PAE para a identificação dos constituintes químicos principais;
- ✓ Investigar os efeitos do PAE, $MgCl_2$, PAE+ $MgCl_2$ e Chá PAE+ $MgCl_2$ 3%, sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos;
- ✓ Caracterizar a ação anti-hipertensiva do PAE+ $MgCl_2$ e Chá PAE+ $MgCl_2$ 3% em modelo de hipertensão L-NAME em ratos;
- ✓ Avaliar a participação dos receptores muscarínicos, ganglionares, α_2 e β -adrenérgicos sobre o efeito do PAE+ $MgCl_2$ na PAM e FC em modelo de hipertensão L-NAME em ratos;
- ✓ Investigar a atividade antimicrobiana intrínseca do PAE e da filantina em diferentes espécies de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*);
- ✓ Avaliar a modulação do PAE e do seu componente principal filantina frente a resistência à fluoroquinolona em *S. aureus* SA1199-B, que superexpressa a bomba de efluxo NorA;

REFERENCIAL TEÓRICO

3 Referencial teórico

3.1 Plantas medicinais

O Brasil possui uma grande biodiversidade e a população tem um conhecimento tradicional sobre o uso de plantas medicinais no tratamento de doenças (DUTRA et al., 2016). Cerca de 30% dos medicamentos disponíveis são derivados de plantas e microrganismos (NEWMAN; CRAGG, 2012) e pesquisas sobre o desenvolvimento de novas drogas têm sido validadas a partir da caracterização do potencial medicinal de extratos (PUTAKALA et al., 2017) e substâncias isoladas (HARVEY, 2008; LI et al., 2019), como os flavonóides, compostos fenólicos, cumarinas, terpenos, terpenóides e lignanas (AL DISI et al., 2016).

Estudos têm dado credibilidade às propriedades farmacológicas de produtos naturais utilizados na prevenção ou tratamento de patologias, incluindo as doenças causadas por microrganismos (DOMINGUES et al., 2015; COSTA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019) e as doenças cardiovasculares (DCVs), em especial a hipertensão (ARAÚJO et al., 2014; RAWAT; SINGH; KUMAR, 2016; NEAMSUVAN; KOMONHIRAN; BOONMING, 2018). Além de identificar as potencialidades terapêuticas das plantas medicinais, é importante avaliar o uso seguro a partir de estudos de toxicidade dessas espécies (RAMULONDI; WET; VUUREN, 2018; CHUKWUMA et al., 2019).

Pesquisas sobre plantas da caatinga, usadas como medicamentos, identificou 119 espécies utilizadas no tratamento de 92 tipos de problemas de saúde, dentre os quais foram citados as infecções em geral, problemas intestinais, diarreia, infecção urinária, diabetes, hipercolesterolemia, trombose, problemas circulatórios, acidente vascular cerebral e hipertensão (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). Pesquisas sobre outras espécies, como a *Curcuma longa* L., reduziu a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos normotensos, comprovando o uso de *C. longa* em diferentes desordens, como inflamação, palpitação e hipertensão (ADARAMOYE et al., 2009). Um estudo anterior sobre o efeito anti-hipertensivo da *C. longa* identificou sua propriedade vasodilatadora mediada pela liberação de óxido nítrico, ativação de receptores muscarínicos e de canais de potássio, com antagonismo ao cálcio (KHANA; KHANA; SHAHA, 2018).

O potencial anti-hipertensivo e diurético do extrato metanólico de *Solanum capsicoides* All. foi avaliado, *in vitro* e *in vivo*, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e observou-se um efeito anti-hipertensivo significativo quando o extrato foi administrado por via oral durante 21 dias, resultando também na inibição de hipertrofia cardíaca (SIMÕES et al., 2016). Estudos sobre substâncias isoladas de plantas, como a yangambina, induziu hipotensão devido à inibição do influxo de cálcio por canais de cálcio dependentes de voltagem, levando à redução da concentração intracelular de cálcio nas células do músculo liso vascular e consequente vasodilatação (ARAÚJO et al., 2014).

Pesquisas realizadas com o extrato aquoso de *E. senegalensis* identificou propriedades anti-hipertensivas, hipoglicêmicas, hipolipidêmicas, cardiomoduladoras e antioxidantes envolvidas na melhora dos distúrbios metabólicos encontrados em animais diabéticos e hipertensos, provavelmente devido à presença de substâncias como a erysenegalensein, warangalona, senegalensina e 6,8-diprenilgenisteína identificados no extrato (BILANDA et al., 2020). Em outro estudo, foram identificadas 33 espécies tradicionalmente usadas no tratamento de diabetes e/ou hipertensão, em que 70% dos pacientes investigados utilizavam plantas medicinais preparadas a partir de decocção, maceração ou infusão, incluindo espécies do gênero *Phyllanthus* (TSABANG et al., 2015).

Diante do exposto, muitas substâncias obtidas a partir de produtos naturais têm sido investigadas como forma de propor terapias alternativas no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. Mais estudos são necessários para confirmar a eficácia geral de fitoterápicos e suas propriedades, para melhorar a saúde, aliviando os sintomas de doenças crônicas e diminuindo os efeitos colaterais em comparação com os tratamentos convencionais.

3.2 Propriedades farmacológicas de espécies da família Phyllanthaceae

A família Phyllanthaceae possui cerca de 60 gêneros e 2000 espécies. O maior e mais diversificado gênero desta família é o *Phyllanthus*, que inclui mais de 1000 espécies, distribuídas nas zonas tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália e América do Sul, onde é popularmente usado para tratar doenças do sistema digestivo, urinário e para combater a malária e ferimentos, respectivamente (**Figura**

1) (KATHRIARACHCHI et al., 2005; SILVA; SALES, 2007; MAO et al., 2016; ONGCHAI, 2019).

Figura 1: Uso tradicional do gênero *Phyllanthus* em diferentes países.



Fonte: MAO et al., 2016.

Legenda: A cor diferente representa o número de plantas tradicionalmente usadas em diferentes países: vermelho, laranja, amarelo, verde, azul e roxo representam, respectivamente, quinze, oito, cinco, três, dois e um tipos de espécies do gênero *Phyllanthus* em uso.

O gênero *Phyllanthus* spp. (*P. amarus* Schumach. & Thonn, *P. niruri* L., *P. tenellus* Roxb. e *P. urinaria* L.) faz parte da “Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS” (RENISUS), uma lista de plantas medicinais criada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde. A finalidade da lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia (BRASIL, 2009). Desta forma, espécies do gênero *Phyllanthus* têm demonstrado eficácia terapêutica no tratamento de diferentes doenças humanas (SEYED, 2019).

As espécies *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. emblica* L. e *P. watsonii* Airy Shaw, têm sido comumente utilizadas na medicina popular e têm sido validadas por pesquisas pré-clínicas e clínicas. Mais de 500 compostos bioativos já foram isolados de espécies do gênero *Phyllanthus*, sendo que os mais estudados são os flavonóides, triterpenóides, taninos e as lignanas (MAO et al., 2016). A nirtetralina B, isolada de *P. niruri*, possui uma atividade significativa contra a replicação do vírus da hepatite B e melhora a patologia hepática *in vitro* e *in vivo* (LIU et al., 2014). Em outro estudo, o uso do extrato etanólico das partes aéreas de *P. niruri* (500 mg/kg) em ratos diabéticos e obesos, resultou em diminuição dos níveis glicêmicos,

melhorando a sensibilidade à insulina e perfil lipídico destes animais (MEDIANI et al., 2016). Este efeito foi atribuído aos biocompostos epicatequina, ácido elágico, filantina, hipofilantina, catequina e quercetina. A atividade antimetastática e antiangiogênica do extrato aquoso e metanólico de 4 espécies do gênero *Phyllanthus* (*P. amarus*, *P. niruri*, *P. urinaria* e *P. watsonii*) foi investigada contra células cancerosas de melanoma (MeWo), próstata (PC-3) e células endoteliais da veia umbilical humana. Os extratos estudados inibiram significativamente a metástase tumoral e a angiogênese de células cancerosas (MeWo e PC-3) de maneira dose-dependente, a partir de alterações na atividade da metaloproteinase de matriz (TANG et al., 2015).

Em relação ao sistema cardiovascular, a substância brevifolincarboxilato de metil, extraída das partes aéreas de *P. niruri* exibiu efeito vasorrelaxante em aorta de ratos a partir do envolvimento dos canais de cálcio (IIZUKA; MORIYAMA; NAGAI, 2006). Em outra pesquisa, o efeito hipotensor e bradicárdico do extrato n-butanol de folhas de *Phyllanthus acidus* L. (Skeels), nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg, e de cinco substâncias isoladas (adenosina, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido hipogálico e kaempferol) obtidas do mesmo extrato (LEEYA et al., 2010). Assim, observou-se que a atividade hipotensora estava envolvida com o efeito sinérgico dos componentes isolados, fornecendo suporte científico para o uso tradicional da decocção das folhas de *P. acidus* no tratamento da hipertensão. Estudos prévios verificaram que a substância geranina, extraída e purificada a partir de *P. urinaria* (5 mg/kg, administrada por via oral) apresentou atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) no entanto, os mecanismos envolvidos neste efeito não foram investigados (LIN et al., 2008).

3.3 Atividade biológica de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.

A espécie *P. amarus* Schumach. & Thonn., popularmente conhecida como quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva-pombinha (**Figura 2**), é amplamente distribuída em áreas tropicais e subtropicais (KHATOON et al., 2006).

Figura 2 - *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.



Fonte: ONGCHAI, S., 2019.

P. amarus tem sido estudada com fins farmacológicos e clínicos e os benefícios atribuídos aos extratos aquosos, hexânicos e etanólicos, obtidos das partes aéreas, são citados em vários estudos, os quais enfatizam atividade diurética (YAO et al., 2016; YAO et al., 2018), antioxidante (PUTAKALA et al., 2015), gastroprotetora (SHOKUNBI; ODETOLA, 2008), antimicrobiana (GBADAMOSI, 2015), anti-infertilidade (OJEZELE; IGBE; OKHUAROBO, 2018), anti-hiperglicêmica e controle da resistência à insulina (ADENEYE, 2012), antiesquistossomal (DE OLIVEIRA et al., 2017), hepatoprotetora (KRITHIKA et al., 2011) e cardioprotetora, sendo indicados na prevenção de doenças cardiovasculares (PUTAKALA et al., 2017).

Estudos prévios sobre a constituição fitoquímica das partes aéreas de *P. amarus* têm identificado a existência de várias classes de compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides, flavonóis, taninos hidrolisáveis, triterpenos, esteroides, derivados de ácido elágico e lignanas (KUMAR et al., 2015; PEREIRA et al., 2017). Ressalta-se que as lignanas apresentam importantes atividades biológicas, incluindo propriedades anticâncer (PARVATHANENI et al., 2014), neuroprotetoras e antioxidantes (BAI et al., 2017), hepatoprotetora (OOI et al., 2015), modulação da resistência antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2019) e vasorrelaxante (INCHOO et al., 2011).

O efeito hepatoprotetor da filantina, um dos constituintes majoritários de *P. amarus*, foi estudado em lesões de células hepáticas de ratos induzida por etanol, e verificou-se que este fitoquímico proporcionou aumento da atividade antioxidante em

hepatócitos de ratos, incluindo a glutathiona total, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona redutase (GR), comprovando o efeito da filantina contra o estresse oxidativo induzido pelo etanol (CHIRDCHUPUNSEREE; PRAMYOTHIN, 2010). Em seres humanos, estudos anteriores demonstram que a suplementação aguda com cápsulas preparadas a partir das partes aéreas de *P. amarus* aumentou os níveis plasmáticos de vitamina C ao longo de dois dias após exercício de intensidade moderada (ROENGRIT et al., 2015).

3.4 Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada por pressão arterial (PA) persistentemente alta nas artérias. A PA é comumente expressa como a razão entre a PA sistólica, isto é, a pressão que o sangue exerce nas paredes arteriais quando o coração se contrai e a PA diastólica, que consiste na pressão quando o coração relaxa (LUFT, 2001). A HAS é uma das doenças crônicas não transmissíveis mais comuns na população humana, sendo um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (DCVs), predispondo o indivíduo a disfunções metabólicas.

A HAS está associada a um risco aumentado de DCVs (KIZHAKEKUTTU; WIDLANSKY, 2010; OPARIL et al., 2018), incluindo acidente vascular cerebral, doença cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, doença arterial periférica, doença renal crônica, cegueira e comprometimento cognitivo (FOROUZANFAR et al., 2016; FREEDMAN; COHEN, 2016; KJELDSEN, 2017). Pacientes que precisam de 3 ou mais medicamentos para o controle da PA possuem hipertensão resistente (HR) (DE LA SIERRA et al., 2011), os quais permanecem com a PA alta mesmo depois da intervenção medicamentosa, podendo aumentar o risco de efeitos colaterais (PERSELL, 2011; ACHELROD et al., 2015).

A hipertensão não controlada pode ser classificada como pressão arterial sistólica média igual ou superior a 130 mmHg e PA diastólica média igual ou maior a 80 mm Hg, sendo ou não tratada a partir de prescrição medicamentosa anti-hipertensiva (WHELTON et al., 2017). Cerca de 30% da população mundial foi diagnosticada com formas controladas, descontroladas ou resistentes de hipertensão (UNMUESSIG et al., 2016). As DCVs foram as principais causas de morte em 2015, com 17,7 milhões de óbitos, o que representa 31% de todas as mortes em todo o mundo (BENJAMIN et al., 2017). Estima-se que a população de

peças que sofre com hipertensão é de 1 bilhão, resultando em uma mortalidade anual de 9,4 milhões de pessoas em todo o mundo (GÓMEZ-OLIVÉ et al., 2017).

Embora os principais determinantes da PA sejam o débito cardíaco e a resistência vascular sistêmica, a homeostase da PA exige uma regulação adequada da função do coração e da vasculatura pelo sistema nervoso autônomo, rins e órgãos endócrinos. Além disso, vários genes são expressos em células musculares lisas e endoteliais, destacando a importância da vasculatura como um regulador principal da pressão sanguínea e como um alvo para terapias potenciais (EHRET et al., 2011; PADMANABHAN; CAULFIELD; DOMINICZAK, 2015).

A prevenção e o tratamento da hipertensão são fundamentais para promover a longevidade na população mundial. Estudos demonstraram que a redução em 10 mmHg da PA sistólica é acompanhada por uma diminuição significativa no risco de DCVs (ETTEHAD et al., 2016). Desta forma, a partir de cuidados preventivos, como eliminação do tabagismo, alimentação saudável, redução no consumo de sódio, prática de atividade física e medidas terapêuticas adequadas, os efeitos da PA elevada podem ser minimizados (CHAAR et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Várias terapias de primeira linha estão disponíveis para tratar a hipertensão, incluindo diuréticos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueadores dos receptores da angiotensina II (ARBs), bloqueadores dos canais de cálcio e os beta bloqueadores. Contudo, essas drogas geralmente são prescritas empiricamente e muitas vezes são ineficazes, uma vez que, mais de 50% dos adultos tratados não estão com sua PA sob controle (YOON et al., 2015).

Devido ao impacto global da hipertensão, a investigação de novas alternativas terapêuticas, incluindo o uso de plantas medicinais, torna-se relevante. Pesquisas sobre o potencial anti-hipertensivo de produtos naturais têm sido comumente avaliadas com o modelo de animal tratados com N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) (AEKTHAMMARAT et al., 2019; BUNBUPHA et al., 2019). Ratos tratados com L-NAME têm expressão negativa da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em vasos sanguíneos (NAKMAREONG et al., 2011; SILAMBARASAN et al., 2014) e depleção dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO), o que leva à vasoconstrição sistêmica e aumento da resistência vascular, favorecendo a instalação da hipertensão arterial (BERKBAN et al., 2015; NISHIJIMA et al., 2014).

3.5 Regulação da pressão arterial

A pressão sanguínea é a pressão pulsátil exercida nos vasos sistêmicos, fundamental para a manutenção do fornecimento de oxigênio aos tecidos do corpo. É determinada pelas ações de bombeamento do coração, a partir do débito cardíaco (DC) e pelo estado de contração do músculo liso, ambos governados pelo sistema nervoso autônomo. A pressão arterial (PA) corresponde ao produto do DC pela resistência vascular periférica total (RVPT) e pode ser influenciada por diversos fatores (MACEFIELD; HENDERSON, 2019). Em humanos não há inervação parassimpática dos vasos sistêmicos que inervam o coração, portanto o diâmetro das arteríolas e, conseqüentemente, o grau de resistência periférica total é amplamente controlado por aumentos ou diminuições no impulso vasoconstritor simpático (MACEFIELD; HENDERSON, 2019).

A regulação da PA é uma das mais complexas funções fisiológicas, pois envolve uma ação integrada dos sistemas cardiovascular, neural, renal e endócrino, a partir de mecanismos regulatórios que se processam a curto e a longo prazo. A curto prazo, o controle da PA é exercido, momento a momento, por mecanismos neurais, que envolve a ativação de barorreceptores e quimiorreceptores, os quais são sensíveis a mudanças na PA. Esses barorreceptores agem como um mecanismo de feedback negativo, de modo que, quando a pressão arterial aumenta, sua atividade aumenta, resultando em uma diminuição da pressão arterial (MACEFIELD; HENDERSON, 2019).

Os barorreceptores estão situados nos seios carotídeos e arco aórtico e são estimulados por deformações das paredes desses vasos, influenciando o coração e os vasos sanguíneos para ajustar o débito cardíaco e a resistência periférica total. Uma vez ativados, os barorreceptores controlam o tônus simpático e parassimpático para o coração e vasos, que resulta em redução da atividade simpática e aumento da atividade vagal, gerando uma vasodilatação periférica, bradicardia e redução da contratilidade miocárdica e da PA (LOHMEIER; ILIESCU, 2015).

O controle da PA, a longo prazo, está ligado à homeostasia do volume do líquido corporal, determinado pelo balanço entre ingestão e a eliminação de líquidos (HARRISON et al., 2013). O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) tem amplos efeitos sobre a regulação da PA, atuando a longo prazo, pois gera hormônios importantes para a regulação cardiovascular. A enzima conversora de

angiotensina (ECA), indiretamente, aumenta a pressão sanguínea e é conhecida por causar constrição nos vasos sanguíneos a partir da conversão de angiotensina I em angiotensina II (ANG II), que tem a capacidade de contrair os vasos sanguíneos. A renina e seu precursor, a pró-renina, são sintetizados e armazenados nas células juxtaglomerulares do rim e são liberados em resposta a vários estímulos. A principal função da renina é metabolizar o seu substrato, o angiotensinogênio, para formar Angiotensina I (ANG I). A ECA, presente principalmente nas células endoteliais, cliva ANG I para formar ANG II (BADER, 2010).

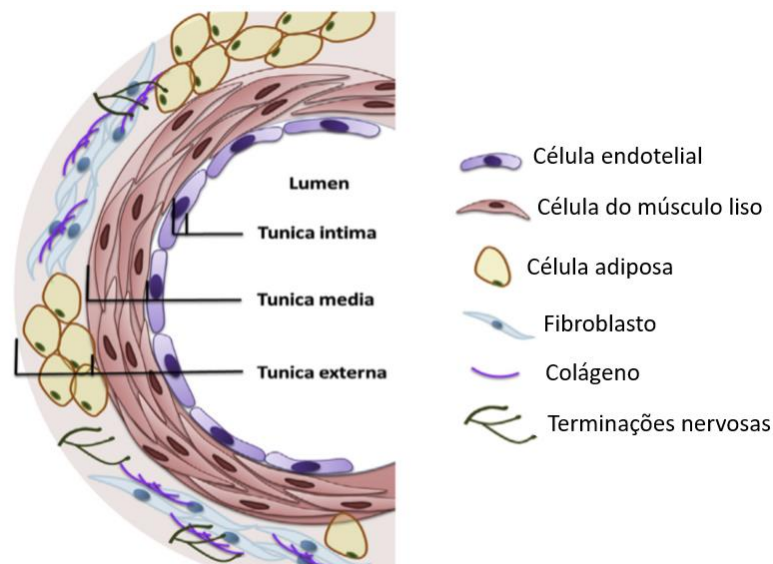
Para exercer suas funções, ANG II ativa dois subtipos de receptores, o receptor da angiotensina tipo 1 (AT₁R), que ativa cascatas oxidativas e inflamatórias e o receptor da angiotensina tipo 2 (AT₂R), que ao ser estimulado, produz resposta vasodilatadora (PAUL; POYAN; KREUTZ, 2006; CHEN; COFFMAN, 2015; HAMMER; STEGBAUER; LINKER, 2017; LEENEN; BLAUSTEIN; HAMLIN, 2017). Na hipertensão, a sinalização AT₁R é excessiva. Desta forma, antagonistas de AT₁R têm sido amplamente utilizados para o tratamento da hipertensão.

Drogas como os bloqueadores de receptores da ANG II (ARBs) se ligam especificamente a todas as formas do receptor, impedindo a sinalização. Atualmente, os ARBs são prescritos como tratamento de primeira linha para redução dos níveis sustentados de PA elevada em pacientes. Além disso, os inibidores da ECA bloqueiam a enzima conversora de angiotensina, resultando em relaxamento dos vasos e redução da pressão sanguínea (KARNIK et al., 2015; FORRESTER et al., 2018).

Uma característica fundamental de muitas DCVs é o aumento da atividade nervosa simpática, geralmente mais ativado em pessoas com obesidade, doença renal avançada ou hipertensão (GRASSI et al.; 2007; AUGUSTYNIAK et al., 2010; MANCIA; GRASSI, 2014). Muitos pacientes hipertensos estão em desequilíbrio autonômico, com aumento da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática, onde a hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS) é relevante para a geração e manutenção da hipertensão (DIBONA, 2013; MANCIA; GRASSI, 2014). Além disso, o aumento da atividade do SNS pode resultar em disfunção endotelial mediada por vasoconstrição, proliferação do músculo liso vascular e aumento da rigidez arterial, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão (FUJITA, 2014).

Sabe-se que o endotélio é um importante regulador do tônus vascular e um dos principais contribuintes para o controle da PA. As células endoteliais (**Figura 3**) estão localizadas na camada mais interna (túnica íntima) dos vasos sanguíneos e desempenha um papel modulador na regulação basal e dinâmica do diâmetro dos vasos sanguíneos, liberando substâncias vasoconstritoras, como a endotelina 1, prostaglandinas e ANG II, além de substâncias vasoativas, como as prostaciclina e o NO (BAUER; SOTNIKOVA, 2010). O NO desempenha um papel fundamental na regulação fisiológica do sistema cardiovascular, uma vez que anormalidades em sua produção e/ou biodisponibilidade acompanham ou precedem doenças como a hipertensão (VANHOUTTE et al., 2009).

Figura 3 - Estrutura da parede arterial.

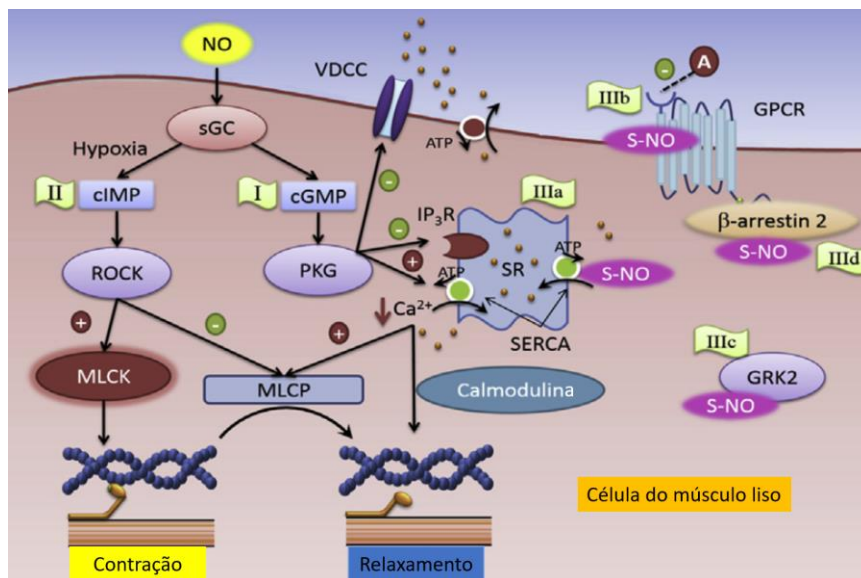


Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2015.

O NO é um importante mediador no sistema cardiovascular, sendo sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e L-citrulina, catalisada pela eNOS. O NO é continuamente liberado pelas células endoteliais para atuar nas células musculares lisas vasculares, induzindo relaxamento a partir da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e geração da guanosina monofosfato cíclico (GMPc) intracelular (SANDOO et al., 2010; KHADDAJ et al., 2017). A GMPc ativa proteína quinase G, que promove a captação de cálcio citosólico intracelular para o retículo sarcoplasmático, efluxo do cálcio para fora da célula e abertura dos canais de

potássio ativados pelo cálcio (LEDOUX et al., 2006). Desta forma, a concentração intracelular de cálcio diminui e a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) não pode mais fosforilar a miosina, ocorrendo o relaxamento das células musculares lisas. Além disso, o NO pode afetar a atividade celular independentemente da ativação da GCs. Assim, o NO estimula a cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), reduzindo a concentração de cálcio intracelular e causando relaxamento do músculo liso (**Figura 4**) (MIZUNO et al., 2008).

Figura 4 – Regulação do tônus vascular pelo óxido nítrico.



Legendas: NO: óxido nítrico; VDCC: canal de cálcio dependente de voltagem; sGC: guanilil ciclase solúvel; cGMP: monofosfato de guanosina cíclico; PKG: proteína quinase G; IP₃R: receptor inositol 1,4,5-trifosfato; SR: retículo sarcoplasmático; MLCK: cadeia leve de miosina kinase; SERCA: cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático.

Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2015.

O modelo animal de hipertensão induzida por L-NAME atua principalmente por causar deficiência de NO e estresse oxidativo. A inibição da síntese de NO pelo L-NAME exibe muitas características que espelham a hipertensão humana, tais como distúrbios cardiovasculares induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS), inflamação, ativação dos sistemas nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina (SILAMBARASAN et al., 2014; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2015).

Outro mecanismo de regulação da PA ocorre a partir dos efeitos diretos dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) na vasoconstrição e relaxamento

através da geração de segundos mensageiros, que alteram a resistência dos vasos ao fluxo sanguíneo. A superfamília dos GPCRs possui sete segmentos transmembrana, essenciais no controle e manutenção das funções normais do sistema cardiovascular. A ativação inadequada de GPCRs pode resultar em hipertensão e disfunção vascular (KARNIK et al., 2015). Os GPCRs são essenciais na maioria dos processos fisiológicos sendo alvos viáveis para a intervenção terapêutica em inúmeras doenças.

A proteína G consiste em três subunidades (α , β , γ), que ficam ancoradas à membrana através de uma cadeia de ácidos graxos, sendo responsáveis pelas cascatas de sinalização, quando ativadas. No estado não estimulado, a subunidade α possui uma guanosina difosfato (GDP) ligado e a proteína G permanece inativa. Quando a subunidade α é acoplada a um receptor ocupado por um agonista, a proteína G é ativada pela perda da afinidade da subunidade α por GDP, que é trocado por uma molécula de guanosina trifosfato (GTP). As subunidades $\beta\gamma$ permanecem unidas na forma de um complexo. O complexo α -GTP se dissocia do receptor e do complexo $\beta\gamma$, podendo interagir com enzimas e proteínas, causando a ativação ou inibição do alvo (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013).

Enfatiza-se a existência de três classes de proteína G, farmacologicamente importantes: G_s , G_i e G_q , em que G_s e G_i produzem estimulação e inibição da enzima adenilil ciclase, enquanto a G_q ativa a fosfolipase C (PLC) (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013). As proteínas G da família $G_{q/11}$ acopladas a AT_1R medeiam a ativação da PLC para produzir dois segundos mensageiros intracelulares: IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato) e DAG (diacilglicerol). O IP_3 promove a liberação intracelular de cálcio das reservas do retículo endoplasmático, enquanto o DAG e o cálcio regulam a ativação de proteínas quinases (CHEN; COFFMAN, 2015; LEENEN; BLAUSTEIN; HAMLIN, 2017).

A sinalização via GPCRs desempenha um papel crítico na manutenção da pressão arterial normal e na fisiopatologia da hipertensão e doenças cardiovasculares e renais associadas. Os GPCRs atuam como transdutores de sinal para substâncias vasoativas, como angiotensina II, norepinefrina, endotelina-1 e vasopressina, regulando a pressão arterial em grande parte por dois mecanismos principais: modulação do controle renal do volume de líquido extracelular e, conseqüentemente, débito cardíaco e modulação da resistência periférica total, regulando o equilíbrio entre constrição e dilatação da vascularização de resistência

(HALL et al., 2012). Os GPCRs continuam sendo alvos para o desenvolvimento de medicamentos com mais de 40% dos medicamentos comercializados visando os GPCRs. Estes receptores de membrana plasmática regulam virtualmente todos os processos fisiológicos incluindo visão, paladar, olfato, neurotransmissão, metabolismo, coagulação sanguínea, débito cardíaco, pressão arterial e crescimento celular e desenvolvimento (ZALEWSKA; SIARA; SAJEWICZ, 2014).

Dentro da superfamília dos GPCRs, os receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) têm sido alvo de descobertas de drogas devido à sua distribuição sistêmica e envolvimento em várias cascatas de sinalização, fornecendo benefícios terapêuticos para muitas doenças, incluindo o controle e função de várias atividades cardiovasculares (LEWARTOWSKI; MACKIEWICZ, 2015). A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor sintetizado, armazenado e liberado pelos neurônios colinérgicos, e as principais moléculas que transduzem a mensagem da ACh são os mAChR e os receptores ionotrópicos nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012).

A acetilcolina liga-se a dois receptores endógenos, muscarínicos e nicotínicos. Apesar de terem o mesmo ligante, seus mecanismos de ação são muito diferentes. O efeito da ACh nas sinapses parassimpáticas pós-sinápticas é mediado por receptores muscarínicos, que são GPCRs e utiliza segundos mensageiros para facilitar a transdução de sinal. Os mAChR podem ainda ser estratificados em cinco subtipos, M_1 a M_5 , e são codificados pelos genes mAChR1-5, respectivamente. Os efeitos podem variar de acordo com os subtipos de receptores e a distribuição tecidual (EGLIN, 2012).

Embora os tecidos possam expressar mais de um subtipo, o subtipo M_1 é abundante nos gânglios cerebrais do sistema autonômico e nas terminações pré-sinápticas do neurônio; M_2 no coração, M_3 e M_4 no músculo liso, no endotélio e também no tecido glandular; e M_5 é encontrado no sistema nervoso central. Eles podem afetar diferentes vias de sinalização, incluindo proteínas quinases, fatores de transcrição e canais iônicos. Os receptores M_2 e M_4 são acoplados a G_i/G_o (inibição da adenililciclase), enquanto M_1 , M_3 e M_5 são acoplados a $G_{q/11}$, proporcionando estimulação da fosfolipase C e aumento de IP_3 e DAG (EGLIN, 2012). Os cinco receptores compartilham muitas semelhanças, mas apresentam distribuições que prevalecem em determinadas regiões do corpo, levando a uma diversidade de respostas fisiológicas (KRUSE et al., 2014).

Os nAChR são uma família heterogênea de canais iônicos ubiquamente expressos no sistema nervoso central (SNC) que, respondendo ao neurotransmissor endógeno acetilcolina (ACh) e nicotina, estão envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos. O sistema vascular contém várias subunidades nicotínicas nas células endoteliais (α_3 , α_5 , α_7 , α_{10} , β_2 , β e β_4) e músculo liso vascular (α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_7 , α_{10}) (HURST; ROLLEMA; BERTRAND, 2013). As subunidades nAChR têm uma porção amino terminal extracelular relativamente hidrofílica que transporta o sítio de ligação da ACh e enfrenta a fenda sináptica, seguida por três domínios transmembrana hidrofóbicos e um quarto domínio hidrofílico transmembrana. As subunidades são organizadas em torno de um poro central (Figura 6) (ALBUQUERQUE et al., 2009).

As catecolaminas exercem sua função através da ativação de receptores adrenérgicos, que pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G e representam importantes alvos de farmacoterapia. Os dois tipos principais de receptores adrenérgicos são os receptores α e β , que são divididos em diferentes subtipos: os receptores α_1 estão classificados nos subtipos α_1A , α_1B e α_1D ; os receptores α_2 podem ser do tipo α_2A , α_2B ou α_2D e os receptores β estão divididos nos tipos β_1 , β_2 ou β_3 (LYMPEROPOULOS; RENGU; KOCH, 2013).

Sob condições normais, o coração humano expressa principalmente receptores β (com uma proporção de 80:20% comparados com os receptores α) e, destes, os receptores β_1 são os mais representados (75% dos receptores β). As células musculares, pelo contrário, expressam principalmente receptores α_1 e β_2 , que medeiam vasoconstrição e vasodilatação, respectivamente (BRODDE, 1993). Cada subtipo de receptor desencadeia uma cascata de transdução de sinal diferente e desempenha uma função celular específica. A distribuição desses receptores nos principais sistemas, e em especial no sistema cardiovascular, mostra os importantes efeitos que eles podem desempenhar diante de diferentes agonistas ou antagonistas adrenérgicos (STROSBERG, 1993; GUIMARÃES; MOURA, 2001; OVERGAARD; DZAVÍK, 2008; LYMPEROPOULOS; RENGU; KOCH, 2013).

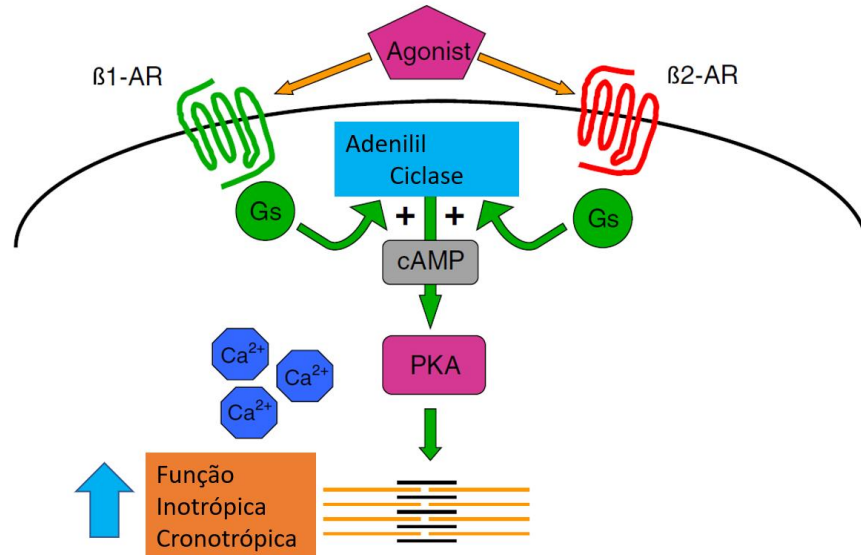
Os receptores α_2 estão localizados principalmente em terminais nervosos pré-sinápticos e no sistema nervoso central, exercendo uma função regulatória do sistema nervoso simpático (SNS) (BANGASH; KONG; PEARSE, 2012). Além disso, estão envolvidos com a fisiologia das doenças cardiovasculares (GYIRES et al., 2009) e são amplamente utilizados no tratamento da hipertensão. A ativação dos

receptores α_2 -adrenérgicos, na região do sistema nervoso central, gera uma resposta hipotensora, tornando esse receptor um importante alvo para o desenvolvimento de anti-hipertensivos (NIKOLIC et al., 2008). A clonidina é um medicamento não seletivo clássico agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, atuando nos três subtipos de receptores (GIOVANNITTI et al., 2015).

Os receptores β -adrenérgicos pertencem à família dos receptores acoplados às proteínas G, como anteriormente explicitado, e desempenham um papel central na regulação da função cardiovascular. No coração, existem três subtipos destes receptores (β_1A , β_2A ou β_3A) e, embora todos estejam presentes, seus níveis de expressão variam significativamente. Os mais abundantes são β_1A e representam aproximadamente 75% do total de receptores adrenérgicos cardíacos seguidos por β_2A (aproximadamente 25% do total), enquanto β_3A são minimamente expressados no coração de mamíferos adultos (DESSY; BALLIGAND, 2010; MADAMANCHI, 2007). A sinalização é iniciada ligando um hormônio (principalmente adrenalina e noradrenalina) (BRODDE; BRUCK. LEINEWEBER, 2006) que induz a acoplamento do receptor a proteínas G heterotriméricas (MADAMANCHI, 2007).

Os receptores β -adrenérgicos medeiam principalmente a função cardíaca (inotropia, cronotropia, lusitropia) através da ativação da proteína Gs, que estimula a produção de segundos mensageiros guanilil ciclase, adenilil ciclase e 3',5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Os níveis aumentados de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que fosforila vários alvos, incluindo fosfolambano (inibidor de SERCA) e a cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA), importantes para a dinâmica intracelular do cálcio (BERNSTEIN; FAJARDO; ZHAO, 2010). O AMPc é um importante regulador da função cardíaca e pode ser produzido rapidamente em resposta aos hormônios liberados pelo sistema nervoso simpático. A tarefa de transduzir o fluxo de sinais das catecolaminas para o AMPc é tomado principalmente por receptores beta-adrenérgicos, uma classe de proteínas que faz parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (SAUCERMAN; MCCULLOCH, 2006; BERTHOUZE et al., 2011 (**Figura 5**). Estudos anteriores mostraram que agonistas do receptor β_2 -adrenérgicos exibem efeitos protetores contra as complicações cardiovasculares provocadas por diabetes em modelos de animais (NOH et al. 2017).

Figura 5 – Sinalização dos receptores β -adrenérgicos.



Fonte: Adaptado de BERNSTEIN; FAJARDO; ZHAO, 2010.

3.6 Magnésio e doenças cardiovasculares

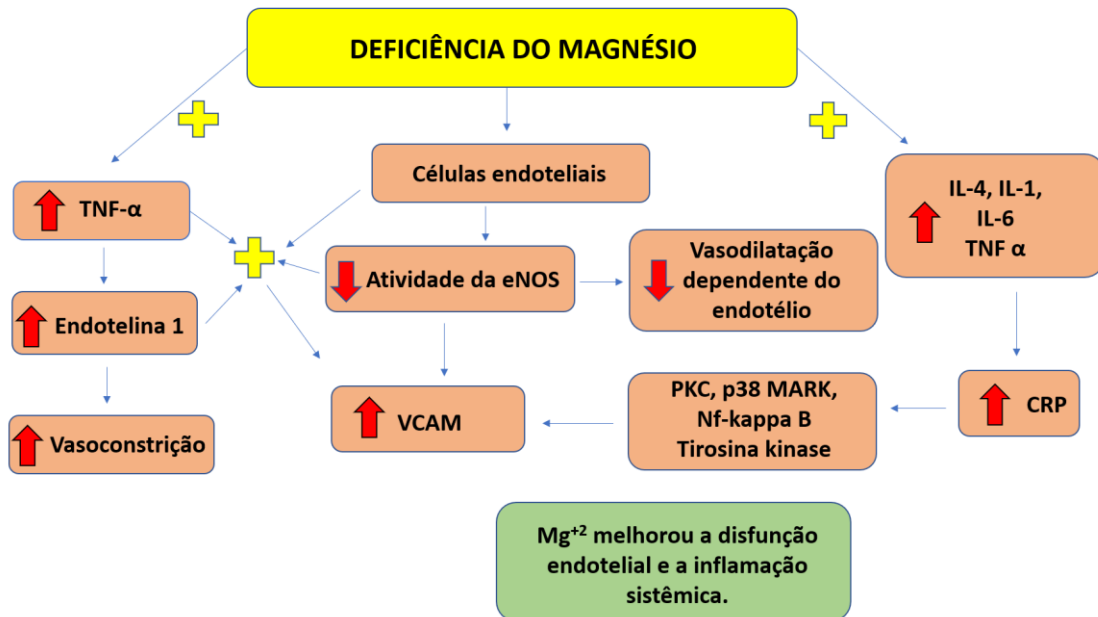
O magnésio (Mg^{2+}) é o cátion divalente intracelular mais abundante e essencial para a manutenção da fisiologia e metabolismo celular normais, pois tem propriedades anti-inflamatórias e é considerado um antagonista dos canais de Ca^{+2} (BASRALI et al., 2015). Atua como co-fator em cerca de 600 reações enzimáticas vitais (CASPI et al., 2012; DE BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015), incluindo o metabolismo energético, a síntese proteica, regulação dos canais iônicos e sinalização celular (MUBAGWA et al., 2007; JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012; KUPETSKY-RINCON; VORMANN, 2016). Além disso, o Mg^{2+} tem um papel importante na regulação do ritmo cardíaco, influenciando o tônus vascular, a resistência vascular periférica e a função endotelial (DE BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015). Desta forma, os níveis reduzidos de Mg^{2+} podem ter uma importante relação com as doenças cardiovasculares.

Evidências experimentais demonstram o efeito redutor da pressão arterial (PA) a partir do tratamento com magnésio, por via oral, em modelo animal de hipertensão L-NAME, que resultou em aumento da resposta vasorrelaxante

dependente do endotélio. Estudos realizados por Al Alawi, Majoni e Falhammar (2018) mencionam que o baixo teor de Mg^{2+} na dieta e a hipomagnesemia pode contribuir com a fisiopatologia da hipertensão. O Mg^{2+} reduz o tônus vascular e resistência, aumentando o efeito vasodilatador do óxido nítrico, antagonizando o efeito vasoconstritor do cálcio, bradicinina, angiotensina II e prostaglandina, protegendo o endotélio vascular através do seu efeito antioxidante (PARAVICINI et al., 2009).

Produzida pelo endotélio e liberada na circulação, a endotelina-1 induz inúmeros efeitos nos vasos sanguíneos, incluindo vasoconstrição, ações pró-inflamatórias, efeitos mitogênicos e proliferativos e estimulação da formação de radicais livres (KHARITONOVA et al., 2015). Portanto, o Mg^{2+} atua na função celular endotelial, promovendo a diminuição da expressão da endotelina-1 e aumento na produção de prostaciclina, contribuindo para a promoção da vasodilatação e modulação da excitabilidade miocárdica (MAIER, 2012). Assim, a deficiência de Mg^{2+} pode aumentar a produção de endotelina-1, reduzir a produção de endotélio e induzir inflamação sistêmica, onde os níveis de marcadores inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α), moléculas de adesão em célula vascular (VCAM-1) e proteína C reativa (PCR) podem ficar alterados (**Figura 6**).

Figura 6 - Patogenia da deficiência de magnésio na disfunção endotelial.



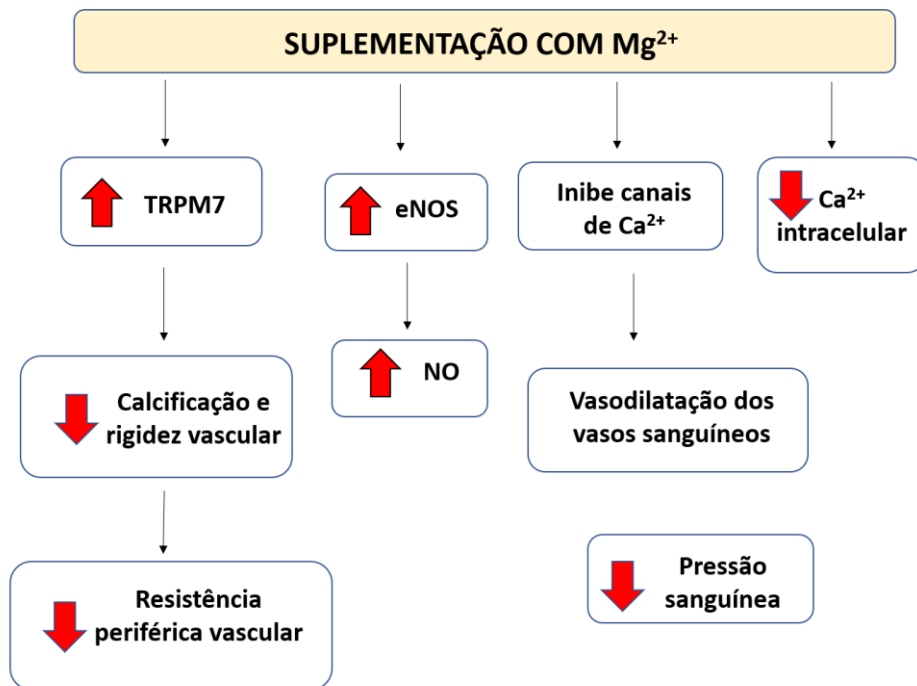
Fonte: Adaptado de KHARITONOVA *et al.*, 2015.

O Mg^{2+} desempenha um papel importante na hipertensão, indicando que há redução significativa da pressão sanguínea a partir da suplementação com Mg^{2+} , uma vez que este importante elemento participa de vias relacionadas à rigidez vascular e resistência vascular (VAN LAECKE *et al.*, 2012; SCHUTTEN *et al.*, 2018). O efeito do Mg^{2+} sobre a PA e resistência vascular, pode contribuir para a redução dos níveis pressóricos (VAN LAECKE *et al.*, 2012). A rigidez vascular é um pré-requisito para as doenças cardiovasculares, especialmente em pacientes com hipertensão (LAURANT; TOUYZ, 2000). Portanto, o Mg^{2+} desempenha importante função em vários distúrbios cardiovasculares, promovendo vasodilatação e redução da resistência vascular (SICA; FRISHMAN, 2011). Desta forma, a suplementação com Mg^{2+} pode ser uma alternativa importante no tratamento de DCVs, uma vez que, a suplementação está associada com risco reduzido de acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e diabetes (FANG *et al.*, 2016).

A concentração sérica de Mg^{2+} tem sido inversamente associada a um aumento de 66% e 36% do risco de morte por insuficiência cardíaca (<0,7 mmol/L) e doença cardíaca coronária (<0,8 mmol/L), respectivamente (LUTSEY *et al.*, 2014; KIEBOOM *et al.*, 2016). Resultados de uma meta-análise sugerem que a suplementação com Mg^{2+} diminuiu significativamente a PA em indivíduos com

resistência à insulina, pré-diabetes ou outras doenças crônicas não transmissíveis, que comumente predis põem os indivíduos à hipertensão (DIBABA et al., 2017), fornecendo evidências que apoiam o efeito benéfico da suplementação com Mg^{2+} para a redução da PA (**Figura 7**). Além disso, o Mg^{2+} pode ter efeitos sinérgicos com medicamentos anti-hipertensivos (ROSANOFF, 2010).

Figura 7 - Função do magnésio na fisiopatologia da pressão arterial.



Fonte: Adaptado de SCHUTTEN *et al.*, 2018 e VAN LAECKE *et al.*, 2011.

Van Laecke et al., (2011) estudaram a associação entre os níveis séricos de Mg^{2+} e a rigidez vascular em 512 receptores de transplante renal. Baixos níveis de Mg^{2+} nos pacientes foram associados com aumento da rigidez vascular. É importante ressaltar que ocorreu uma melhora significativa da referida patologia após a suplementação com magnésio (JORIS et al., 2016). Estudos epidemiológicos e prospectivos de metanálise têm associado a ingestão de Mg^{2+} com um risco diminuído de DCVs (SONG et al., 2012; LARSSON, 2013; QU et al., 2013). Em estudos realizados por Diaz-Tocados et al (2017) observou-se que o aumento do Mg^{2+} dietético em animais preveniu e reverteu a calcificação vascular e de outros tecidos moles, tendo efeitos positivos nos parâmetros do metabolismo mineral, função renal, mortalidade e pressão arterial.

Um estudo realizado por Annapurna et al., (2015) com humanos hipertensos e não hipertensos mostrou que 600 mg/dia de Mg^{2+} durante um período de 8 semanas resultou em diminuição significativa na PA no grupo dos hipertensos. Além disso, esse estudo confirmou que há níveis significativamente mais baixos de Mg^{2+} nos pacientes com hipertensão essencial quando comparados ao grupo controle saudável. A partir da importância da suplementação com Mg^{2+} para o controle da hipertensão, decidiu-se associar este importante mineral ao extrato etanólico preparado a partir das partes aéreas da espécie *Phyllanthus amarus* e administrado por via oral e endovenosa em animais com hipertensão induzida por L-NAME.

3.7 Microrganismos multirresistentes e produtos naturais

A resistência bacteriana tem aumentado devido ao uso inadequado de antibióticos, favorecendo a seleção de bactérias multirresistentes, que torna o tratamento menos eficaz e com altos custos (COUTINHO et al., 2015). Os microrganismos possuem vários mecanismos pelos quais podem resistir aos efeitos dos antimicrobianos, dentre eles: alteração da estrutura molecular dos antibióticos, produção de enzimas que inativam a droga, alteração das proteínas ligadoras da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações que afetam a permeabilidade do antibiótico na célula e modificações ribossômicas (REDGRAVE et al., 2014).

Dentre as espécies de bactérias multirresistentes, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, que é uma bactéria Gram-positiva capaz de causar infecções graves ou fatais. Atualmente, mais de 60% dos isolados de *S. aureus* são resistentes à metilina (MRSA) e cerca de 2% dos indivíduos possuem em sua flora microbiana o MRSA (DROUGKA et al., 2014). MRSA é responsável por várias infecções de difícil tratamento no ser humano, incluindo infecções da pele e dos tecidos moles, septicemia, endocardite, pneumonia, enterite, meningite, osteomielite, bem como a síndrome do choque tóxico, representando uma significativa ameaça à saúde, pois contribui para o aumento da morbidade e mortalidade (LI et al., 2018). Em *S. aureus*, NorA é uma proteína de 388 aminoácidos com 12 segmentos transmembrana, que pode expulsar compostos químicos como as fluoroquinolonas hidrofílicas norfloxacin e ciprofloxacina, além de corantes como o brometo de etídio. O aumento da resistência às fluoroquinolonas, biocidas e corantes têm sido

associados ao efluxo mediado por NorA, através da superexpressão do gene NorA (KAATZ; SEO, 2004).

Tendo em vista a prevalência de infecções promovidas por microrganismos multirresistentes aos antibióticos convencionais, os produtos naturais podem apresentar atividade antimicrobiana ou melhorar a eficiência dos antibióticos, potencializando seu mecanismo de ação e dificultando a adaptação do microrganismo (COSTA et al., 2018; ZHANG et al., 2018). Pesquisas com extratos de plantas ou seus constituintes químicos têm contribuído como fontes alternativas na diminuição da resistência microbiana aos antibióticos (CALIXTO JÚNIOR et al., 2015; COSTA et al., 2017; COSTA et al., 2018).

Dentre as plantas com potencial efeito antimicrobiano, podemos enfatizar as espécies do gênero *Phyllanthus*. Gbadamosi (2015) utilizou o método de difusão em ágar e analisou o extrato das partes aéreas e raiz de *Phyllanthus amarus* e *Phyllanthus niruri*, as quais foram testadas contra cinco isolados clínicos de *Escherichia coli*. Os resultados indicaram que *P. amarus* e *P. niruri* apresentaram atividade antibacteriana significativa contra *Escherichia coli*, sendo consideradas eficaz no tratamento de infecções do trato urinário relacionada a *E. coli*. Em estudo realizado por Oluwafemi e Debiri (2008), o extrato aquoso e etanólico de *P. amarus* foram investigados quanto à atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhi*. Os resultados indicam atividade significativa de *P. amarus* contra *Salmonella typhi*.

Estudos recentes, realizados por Ribeiro et al., (2019), concluem que o extrato de *P. amarus* mostrou atividade antimicrobiana contra as cepas Gram-negativas *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o extrato e um de seus componentes majoritários, a Filantina, foram capazes de aumentar a atividade da Norfloxacin, bem como, do Brometo de Etídio, contra *S. aureus* SA1199-B, considerada uma cepa resistente às fluoroquinolonas e que superexpressa a bomba de efluxo NorA. Os resultados obtidos por Ribeiro et al., (2019) também sugerem que a filantina é um inibidor da bomba de efluxo NorA, a qual poderia ser usada em combinação com a norfloxacin no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* que superexpressam NorA.

Referências bibliográficas

- ACHELROD, D.; WENZEL, U.; & FREY, S. Systematic review and meta analysis of the prevalence of resistant hypertension in treated hypertensive populations. **American Journal of Hypertension**, v. 28, p. 355-361, 2015.
- ADARAMOYE, O. A.; ANJOS, R. M.; ALMEIDA, M. M.; VERAS, R. C.; SILVIA, D. F.; OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, I. A. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa L.* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, n.3, p. 457-462, 2009. doi:10.1016/j.jep.2009.05.021.
- ADENEYE, A. A. The leaf and seed aqueous extract of *Phyllanthus amarus* improves insulin resistance diabetes in experimental animal studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, n. 3, p. 705-711, 2012. doi:10.1016/j.jep.2012.10.017
- AEKTHAMMARAT, D.; PANNANGPETCH, P.; TANGSUCHARIT, P. *Moringa oleifera* leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. **Phytomedicine**, v. 54, p. 9-16, 2019. doi:10.1016/j.phymed.2018.10.023.
- AL ALAWI, A. M.; MAJONI, S. W.; FALHAMMAR, H. Magnesium and human health: perspectives and research directions. **International Journal of Endocrinology**, p. 1-17, 2018. doi:10.1155/2018/9041694
- AL DISI, S. S.; ANWAR, M.A.; EID, A.H. Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part I. **Front. Pharmacol.**, v. 6, n. 323, 2016. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00323>.
- ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F.; ALKONDON, M.; ROGERS, S.W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. **Physiol. Ver.**, v. 89, p. 73-120, 2009.
- ANNAPURNA, D.; SUJATHA, P.; SUDHA, J. A study of oral magnesium supplementation in patients with essential hypertension. **Hypertension**, v. 4, n. 10, p. 1591-1597, 2015.
- ARAÚJO, I.; SILVA, D.; DO CARMO DE ALUSTAU, M.; DIAS, K.; CAVALCANTE, K.; VERAS, R.; MEDEIROS, I. A. Calcium influx inhibition is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by yangambin. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6863-6876, 2014. doi:10.3390/molecules19056863.
- BADER, M. Tissue renin-angiotensin–aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, p. 439-465, 2010.
- BAI, M.; YAO, G. D.; LIU, S. F.; WANG, D.; LIU, Q. B.; HUANG, X. X.; SONG, S. J. Lignans from a wild vegetable (*Patrinia villosa*) able to combat Alzheimer's disease. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 106-113, 2017. doi:10.1016/j.jff.2016.10.024.
- BANGASH, M. N.; KONG, M. L.; PEARSE, R. M. Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients. **Br. J. Pharmacol.**, v. 165, p. 2015-33, 2012.

- BASRALI, F.; NASIRCILAR, U. S.; KOCER, G; KARADAMA, U. R. P.; ÖZYURT, D.; KEMAL, S.; ENTÜRK, Ü. Effect of magnesium on vascular reactivity in NOS inhibition-induced hypertension. **Magnes. Res.**, v. 28, n. 2, p. 64-74, 2015. DOI:10.1684/mrh.2015.0383
- BAUER, V.; SOTNIKOVA, R. Nitric oxide the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. **General Physiology and Biophysics**, v. 29, n. 4, p. 319-340, 2010. doi:10.4149/gpb_2010_04_319
- BENJAMIN, E. J. M. J.; BLAHA, S. E.; CHIUVE, M.; CUSHMAN, S. R.; DAS, R.; DEO, J.; FLOYD, M.; FORNAGE, C.; GILLESPIE, ISASI, C. Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association, **Circulation**, v. 135, n.10, 2017.
- BERKBAN, T.; BOONPROM, P.; BUNBUPHA, S.; WELBAT, J.U.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; PAKDEECHOTE, P.; PRACHANEY, P. Ellagic Acid Prevents L-NAME-induced hypertension via restoration of eNOS and p47phox expression in rats. **Nutrients**, v. 7, p. 5265-5280, 2015.
- BERNSTEIN, D.; FAJARDO, G.; ZHAO, M. The role of β -adrenergic receptors in heart failure: Differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. **Progress in Pediatric Cardiology**, v.31, n.1, p.35 38,2011. doi:10.1016/j.ppedcard.2010.11.007.
- BERTHOUCHE, M., LAURENT, A.C., BRECKLER, M., LEZOUALC'H, F. New perspectives in cAMP-signaling modulation. **Curr. Heart Fail. Rep.** v. 8, p. 159-167, 2011. [https://doi.org/ 10.1007/s11897-011-0062-8](https://doi.org/10.1007/s11897-011-0062-8).
- BILANDA, D. C.; BIDDINGHA, R. À G.; DJOMENI DZEUFLET, P. D.; FOUUDA, Y. B.; NGAPOUT, R. F.; TCHEUTCHOUA, Y.; KAMTCHOUING, P. Antihypertensive and antidiabetic activities of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) stem bark aqueous extract on diabetic hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 112200, 2019 doi:10.1016/j.jep.2019.112200
- BRASIL. Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 25/06/19.
- BRODDE, O. E. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. **Pharmacol Ther**, v. 60, p.405-30, 1993.
- BRUNET, S.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Cooperative regulation of Cav1.2 channels by intracellular Mg^{2+} , the proximal C-terminal EF-hand, and the distal C-terminal domain. **J Gen Physiol** 134: 81-94, 2009.
- BUNBUPHA, S.; PAKDEECHOTE, P.; MANEESAI, P.; PRACHANEY, P.; BOONPROM, P. *Carthamus Tinctorius* L. extract attenuates cardiac remodeling in L-NAME-induced hypertensive rats by inhibiting the NADPH oxidase-mediated TGF- β 1 and MMP-9 pathway. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 222, p. 120-128, 2019.doi:10.1016/j.aanat.2018.12.006.

CALIXTO JÚNIOR, J. T.; MORAIS, S. M.; MARTINS, C. G.; VIEIRA, L. G.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CARNEIRO, J. N. P.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical analysis and modulation of antibiotic activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in multiresistant clinical isolates of *Candida* spp. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2015. doi:10.1155/2015/807670

CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.07.003

CASPI, R.; ALTMAN, T.; DREHER, K.; FULCHER, C. A.; SUBHRAVETI, P.; KESELER, I. M.; KOTHARI, A.; KRUMMENACKER, M.; LATENDRESSE, M.; MUELLER, L. A.; ONG, Q.; PALEY, S.; PUJAR, A.; SHEARER, A. G.; TRAVERS, M.; WEERASINGHE, D.; ZHANG, P.; KARP, P. D. The meta cyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 742-753, 2012.

CHAAR, L. J.; ALVES, T. P.; BATISTA JUNIOR, A. M.; MICHELINI, L. C.; early training-induced reduction of angiotensinogen in autonomic areas-the main effect of exercise on brain renin-angiotensin system in hypertensive rats. **PLoS ONE**, v.10, n. 9, 2015. e0137395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137395>.

CHEN, D.; COFFMAN, T. M. AT1 angiotensin receptors-vascular and renal epithelial pathways for blood pressure regulation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 21, p. 122-126, 2015.

CHIRDCHUPUNSEREE, H.; PRAMYOTHIN, p. protective activity of phyllanthin in ethanol-treated primary culture of rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p.172–176, 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.01.003.

CHUKWUMA, C. I.; MATSABISA, M. G.; IBRAHIM, M. A.; ERUKAINURE, O. L.; CHABALALA, M. H.; ISLAM, M. S. Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, 2019. doi:10.1016/j.jep.2019.02.024

COSTA, A. R.; DE LIMA SILVA, J.; LIMA, K. R. R.; ROCHA, M. I.; BARROS, L. M.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 280-286, 2017. doi:10.1016/j.micpath.2017.04.001.

COSTA, M. D. S.; ROCHA, J. E.; CAMPINA, F. F.; SILVA, A. R. P.; DA CRUZ, R. P.; PEREIRA, R. L. S.; COUTINHO, H. D. M. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018. doi:10.1016/j.ejps.2018.11.036

- COUTINHO, H.D.M. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de geraniol e cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015.
- DE BAAIJ, J. H. F.; HOENDEROP, J. G. J.; BINDELS, R. J. M. Magnesium in man: implications for health and disease. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 1, p.1-46, 2015. doi:10.1152/physrev.00012.2014
- DE LA SIERRA, A; SEGURA, J.; BANEGAS, J. R.; GOROSTIDI, M.; DE LA CRUZ, J. J.; ARMARIO, P. et al. Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring. **Hypertension**, v. 57, n. 5, p. 898-902, 2011.
- DE OLIVEIRA, C. N. F.; FREZZA, T. F.; GARCIA, V. L.; FIGUEIRA, G. M.; MENDES, T. M. F.; ALLEGRETTI, S. M. *Schistosoma mansoni*: In vivo evaluation of *Phyllanthus amarus* hexanic and ethanolic extracts. **Experimental Parasitology**, v. 183, p. 56-63, 2017. doi:10.1016/j.exppara.2017.10.008
- DESSY, C.; BALLIGAND, J. L. Beta3-Adrenergic receptors in cardiac and vascular tissues. **Advances in Pharmacology**, p. 135-163, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)59005-7](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)59005-7).
- DIAZ-TOCADOS, J. M.; PERALTA-RAMIREZ, A.; RODRÍGUEZ-ORTIZ, M. E.; RAYA, A. I.; LOPEZ, I.; PINEDA, C.; MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R. Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. **Kidney International**, v. 92, n. 5, p. 1084-1099, 2017. doi:10.1016/j.kint.2017.04.011.
- DIBABA, D. T.; XUN, P.; SONG, Y.; ROSANOFF, A.; SHECHTER, M.; HE, K. The effect of magnesium supplementation on blood pressure in individuals with insulin resistance, prediabetes, or noncommunicable chronic diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, ajcn155291, 2017. doi:10.3945/ajcn.117.155291
- DOMINGUES, K.; GONÇALVES, A.; OLIVEIRA, C. P.; PERIM, C. M.; GONÇALVES, F. B. Avaliação de extratos de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp) frente à patógenos causadores de infecções no trato urinário. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 427-435, 2015. doi:10.1590/1983-084x/11_189.
- DROUGKA, E.; FOKA, A.; LIAKPOULOS, A.; DOUDOULAKAKIS, A.; JELASTOPULI, E.; CHINI, V.; SPILIOPOULOU, A.; LEVIDIOTOU, S.; PANAGEA, T.; VOGIATZI, A.; LEBESSI, E.; PETINAKI, E.; SPILIOPOULOU, I. A 12-Year Survey of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Greece: ST80-IV Epidemic? **Clin. Microbial. Infect.**, v. 20, n. 0796-0803, 2014.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.021.
- EGLLEN, R. M. Overview of muscarinic receptor subtypes. **Handb Exp Pharmacol.**, 208: 3-28, 2012. https://doi.org/10.1007/978-3-64223274-9_1.

EHRET, G. B.; MUNROE, P. B.; RICE, K. M.; BOCHUD, M.; JOHNSON, A. D.; CHASMAN, D. I., et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. **Nature**, v. 478, p. 103-109, 2011.

ETTEHAD, D.; EMDIN, C. A.; KIRAN, A.; ANDERSON, S. G.; CALLENDER, T.; EMBERSON, J.; et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 387, p. 957-967, 2016.

FANG, X.; LIANG, C.; LI, M.; MONTGOMERY, S.; FALL, K.; AASETH, J.; CAO, Y. Dose-response relationship between dietary magnesium intake and cardiovascular mortality: A systematic review and dose-based meta-regression analysis of prospective studies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 38, p. 64-73, 2016. doi:10.1016/j.jtemb.2016.03.014

FOROUZANFAR, M. H. et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, p.1659-1724, 2016.

FORRESTER, S. J.; BOOZ, G. W.; SIGMUND, C. D.; COFFMAN, T. M.; KAWAI, T.; RIZZO, V., et al. Angiotensin II signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1627-1738, 2018.

FREEDMAN, B.I.; COHEN, A.H. Hypertension attributed nephropathy: what's in a name? **Nat. Rev. Nephrol.** v. 12, p. 27-36, 2016.

FUJITA, T. Mechanism of salt-sensitive hypertension: focus on adrenal and sympathetic nervous systems. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 25, p. 1148-1155, 2014.

GBADAMOSI, I. T. Antibacterial attributes of extracts of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus niruri* on *Escherichia coli* the causal organism of urinary tract infection. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 7, p. 80-86, 2015. <https://doi.org/10.5897/JPP20>.

GIOVANNITTI, J. A. JR.; THOMS, S. M.; CRAWFORD, J. J. Alpha-2 adrenergic receptor agonists: a review of current clinical applications. **Anesth. Prog.** v. 62, p. 31-39, 2015. <https://doi.org/10.2344/0003-3006-62.1.31>

GÓMEZ-OLIVÉ, F. X.; ALI, S. A.; MADE, F.; KYOBUTUNGI, C.; NONTERAH, E.; MICKLESFIELD, L.; RAMSAY, M. regional and sex differences in the prevalence and awareness of hypertension. **Global Heart**, v. 12, n. 2, p. 81-90, 2017. doi:10.1016/j.gheart.2017.01.007.

GRASSI, G. et al. Excessive sympathetic activation in heart failure with obesity and metabolic syndrome: characteristics and mechanisms. **Hypertension**, v. 49, p. 535-541 2007.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacol Rev.**, v. 53, 319-56, 2001.

GUSEV, K.; NIGGLI, E. Modulation of the local SR Ca²⁺ release by intracellular Mg²⁺ in cardiac myocytes. **J. Gen Physiol**, v.132, p. 721-730, (2008).

GYIRES, K.; ZÁDORI, Z. S.; TÖRÖK, T.; MÁTYUS, P. α 2-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 7, p. 447-453, 2009. doi:10.1016/j.neuint.2009.05.014

HAMMER, A.; STEGBAUER, J.; LINKER, R. A. Macrophages in neuroinflammation: role of the renin- angiotensin-system. **Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.**, v. 469, p. 431-444, 2017.

HARRISON, D. G. The Mosaic Theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. **J. Am. Soc. Hypertens.** v. 7, p. 68-74, 2013.

HARVEY A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HURST, R.; ROLLEMA, H.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. **Pharmacol Ther**, v. 137, p. 22-54, 2013.

IIZUKA, T.; MORIYAMA, H.; NAGAI, M. Vasorelaxant effects of methyl brevilofincarboxylate from the leaves of *Phyllanthus niruri*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n.1, p. 177-179, 2006. DOI:10.1248/bpb.29.177

INCHOO, M. *et al.*; Endothelium-independent effects of phyllanthin and hypophyllanthin on vascular tension. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1231-1236, 2011.

JAHNEN-DECHENT W, KETTELER M. Magnesium basics. **Clin Kidney J.**, v. 5, p. i3-i14, 2012.

JORIS, P. J.; PLAT, J.; BAKKER, S. J.; MENSINK, R. P. Long-term magnesium supplementation improves arterial stiffness in overweight and obese adults: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled intervention trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 103, n. 5, p. 1260-1266, 2016. doi:10.3945/ajcn.116.131466

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Effect of substrate exposure and other growth condition manipulations on norA expression. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, p. 364-9, 2004.

KARNIK, S. S.; UNAL, H.; KEMP, J. R.; TIRUPULA, K. C.; EGUCHI, S.; VANDERHEYDEN, P. M. *et al.* International union of basic and clinical pharmacology. angiotensin receptors: Interpreters of pathophysiological angiotensinergic stimuli. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 754-819, 2015.

KASSUYA, C.A.; SILVESTRE, A.; MENEZES-DE-LIMA JR.; MAROTTA, D.M.; REHDER, V.L.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and antiallodynamic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 546, p. 182-188, 2006.

- KATHRIARACHCHI, H.; HOFFMANN, P.; SAMUEL, R.; WURDACK, K. J.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae inferred from five genes (plastid *atpB*, *matK*, *3'ndhF*, *rbcl*, and nuclear *PHYC*). **Mol Phylogenet Evol.**, v. 36, n. 1, p.112-134, 2005.
- KATRITCH, V.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor 559 superfamily. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 53, p. 531-556, 2013.
- KHADDAJ, M. R.; MATHEW JOHN, C.; KENDRICK, D. J.; BRAUN, A. P. The vascular endothelium: a regulator of arterial tone and interface for the immune system. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 54, p. 458-470, 2017.
- KHANA, S.; KHANA, T.; SHAHA, A. J. Total phenolic and flavonoid contents and antihypertensive effect of the crude extract and fractions of *Calamintha vulgaris*. **Phytomedicine**, v. 47, p. 174-183, 2018. doi:10.1016/j.phymed.2018.04.046.
- KHARITONOVA, M.; IEZHITSA, I.; ZHELTOVA, A.; OZEROV, A.; SPASOV, A.; SKALNY, A. Comparative angioprotective effects of magnesium compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 227-234. 2015. doi:10.1016/j.jtemb.2014.06.026
- KHATOON, S.; RAI, V.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, p. 79-86, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.048>.
- KIEBOOM, B. C. T; NIEMEIJER, M. N.; LEENING, M. J. G.; VAN DEN BERG, M. E.; FRANCO, O. H.; DECKERS, J. W; HOORN, E. J. Serum Magnesium and the Risk of Death From Coronary Heart Disease and Sudden Cardiac Death. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 1, e002707, 2016. doi:10.1161/jaha.115.002707
- KIZHAKEKUTTU, T. J.; WIDLANSKY, M. E. Natural Antioxidants and Hypertension: Promise and Challenges. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, e20–e32, 2010. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00137.x
- KJELDEN, S. E. Hypertension and cardiovascular risk: general aspects. **Pharm. Res.** v. 129, p. 95–99, 2017. doi: 10.1016/j.phrs.2017.11.003.
- KOON, C. M.; FONG, S.; WAT, E.; WANG, Y.P.; CHEUNG, D. W. S.; LAU, C. B. S; LEUNG, P.C.; SUN, H.D.; ZHAO, Q. S.; FUNG, K. F. Mechanisms of the dilator action of the *Erigerontis Herba* on rat aorta. **J. Ethnopharmacol.**, v. 155, p. 1561-1567, 2014.
- KRITHIKA, R.; VERMA, R. J.; SHRIVASTAV, P. S.; SUGUNA, L. Phyllanthin of standardized *Phyllanthus amarus* extract attenuates liver oxidative stress in mice and exerts cytoprotective activity on human hepatoma cell line. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v.1, n. 2, p. 57-67, 2011. doi:10.1016/s0973-6883(11)60123-0.

- KRUSE, A. C.; KOBILKA, B. K.; GAUTAM, D.; SEXTON, P. M.; CHRISTOPOULOS, A.; WESS, J. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, p. 549- 560, 2014.
- KUKONGVIRIYAPAN, U.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; PANNANGPETCH, P.; DONPUNHA, W.; SRIPUI, J.; SAEAW, A.; BOONLA, O. *Mamao pomace* extract alleviates hypertension and oxidative stress in nitric oxide deficient rats. **Nutrients** v. 7, p. 6179-6194, 2015.
- KUMAR, S.; CHANDRA, P.; BAJPAI, V.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, D. K.; KUMAR, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 143-152, 2015. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.02.012.
- KUPETSKY-RINCON, E. A.; UITTO, J. Magnesium: Novel applications in cardiovascular disease-a review of the literature. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 102-110, 2012. doi:10.1159/000339380
- LARSSON SC. Urinary magnesium excretion as a marker of heart disease risk. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 97, p. 1159-1160, 2013.
- LAURANT P, TOUYZ RM. Physiological and pathophysiological role of magnesium in the cardiovascular system: implications in hypertension. **J, Hypertens.**, v. 18, n. 9, p.1177-1191, 2000.
- LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; Nelson, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.
- LEENEN, F. H. H.; BLAUSTEIN, M. P.; HAMLIN, J. M. Update on angiotensin II: New endocrine connections between the brain, adrenal glands and the cardiovascular system. **Endocrine Connections**, v. 6, n. 7, p. R131-R145, 2017.
- LEEYA, Y.; MULVANY, M. J.; QUEIROZ, E. F.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; JANSAKUL, C. Hypotensive activity of an n-butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, v. 1-3, p. 301-313, 2010. DOI:10.1016/j.ejphar.2010.09.038
- LEWARTOWSKI, B. e MACKIEWICZ, U. The non-neuronal heart's acetylcholine in health and disease. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 773-778, 2015.
- LI, B. L.; NI, S. S.; MAO, F.; CHEN, F. F.; LIU, Y. F.; WEI, H. W.; CHEN, W. H.; ZHU, J.; LAN, L. F.; LI, J. Novel Terminal Biphenyl-Based Diapophytoene Desaturases (CrtN) inhibitors as Anti-MRSA/VISA/LRSA Agents with Reduced hERG Activity. **J. Med. Chem**, v. 61, p. 224-250, 2018.
- LI, C.; WEI, Q.; ZOU, Z. H.; SUN, C.Z.; WANG, Q.; ZHAO, G.; GAN, C. L. A lignan and a lignan derivative from the fruit of *forsythia suspensa*. **Phytochemistry Letters**, v. 32, p. 115-118, 2019. doi:10.1016/j.phytol.2019.05.009

- LIMAYE, C. S.; LONDHEY, V. A.; NADKART, M. Y.; BORGES, N. E. Hypomagnesemia in critically ill medical patients. **J. Assoc. Physicians India**, v. 59, p.19-22, 2011.
- LIN, S. Y.; WANG, C. C.; LU, Y. L.; WU, W. C.; HOU, W. C. Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolated from *Phyllanthus urinaria*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2485–2492, 2008. DOI:10.1016/j.fct.2008.04.007
- LIU, S.; WEI, W.; LI, Y.; LIN, X.; SHI, K.; CAO, X.; ZHOU, M. In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of the lignan nirtetralin B isolated from *Phyllanthus niruri* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 62-68, 2014. doi:10.1016/j.jep.2014.09.019.
- LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The baroreflex as a long-term controller of arterial pressure. **Physiology**, v. 30, n. 2, p. 148–158, 2015. doi:10.1152/physiol.00035.2014
- LONDHE, J. S., DEVASAGAYAM, T. P.; FOO, L. Y.; GHASKADBI, S. S. Antioxidant activity of some polyphenol constituents of the medicinal plant *Phyllanthus amarus* Linn. **Redox Report**, v. 13, p. 199-207, 2008.
- LUTSEY, P. L.; ALONSO, A.; MICHOS, E. D.; LOEHR, L. R.; ASTOR, B. C.; CORESH, J.; FOLSOM, A. R. Serum magnesium, phosphorus, and calcium are associated with risk of incident heart failure: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 756-764, 2014. doi:10.3945/ajcn.114.085167.
- LYMPEROPOULOS, A.; RENGO, G.; KOCH, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. **Circ. Res.**, v. 113, p. 739-53.
- MACEFIELD, V. G.; HENDERSON, L. A. Identification of the human sympathetic connectome involved in blood pressure regulation. **NeuroImage**, v. 116119, 2019. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.116119
- MACIEL, M. A. M.; CUNHA, A.; DANTAS, F. T. N. C.; KAISER, C. R. Characterization of bioactive lignans from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. **Journal of Magnetic Resonance Imaging** v. 6, p. 76-82, 2007.
- MADAMANCHI, A. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. **McGill J. Med.** v. 10, p. 99-104, 2007.
- MAIER, J. A. M. Endothelial cells and magnesium: implications in atherosclerosis. **Clinical Science**, v. 122, n. 9, p. 397-407, 2012. doi:10.1042/cs20110506.
- MAO, X.; WU, L.F.; GUO, H.L.; CHEN, W.J.; CUI, Y.P.; QI, Q.; LI, S.; LIANG, W.Y.; YANG, G.H.; SHAO, Y.Y.; ZHU, D.; SHE, G.M.; YOU, Y.; ZHANG, L.Z. The genus *Phyllanthus*: an ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review. *Evid. Based Complement. Alterna. Med.*, P. 1-36, 7584952, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7584952>.

- MEDIANI, A.; ABAS, F.; MAULIDIANI, M.; KHATIB, A.; TAN, C. P.; ISMAIL, I. S.; LAJIS, N. H. Metabolic and biochemical changes in streptozotocin induced obese-diabetic rats treated with *Phyllanthus niruri* extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 302-312, 2016. doi:10.1016/j.jpba.2016.06.003
- MIZUNO, Y.; ISOTANI, E.; HUANG, J.; DING, H.; STULL, J. T.; KAMM, K. E. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 2, p. C358-C364, 2008. doi:10.1152/ajpcell.90645.2007
- MORONKOLA, D. O.; OGUNWANDE, I. A.; OYEWOLE, I. O.; BASER, K. H. C.; OZEK, T.; OZEK, G. Studies on the volatile oils of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) and *Phyllanthus amarus* Schum. e Thonn (Euphorbiaceae). **Journal of Essential Oil Research** v. 21, p. 393–399, 2009.
- MUBAGWA K, GWANYANYA A, ZAKHAROV S, *et al.* Regulation of cation channels in cardiac and smooth muscle cells by intracellular magnesium. **Arch Biochem Biophys.** v. 458, p. 73-89, 2007.
- NAKMAREONG, S., KUKONGVIRIYAPAN, U., PAKDEECHOTE, P., KUKONGVIRIYAPAN, V., KONGYINGYONES, B., DONPUNHA, W., PHISALAPHONG, C. Tetrahydrocurcumin alleviates hypertension, aortic stiffening and oxidative stress in rats with nitric oxide deficiency. **Hypertension Research**, v. 35, n. 4, p. 418-425, 2011. doi:10.1038/hr.2011.180
- NEAMSUVAN, O.; KOMONHIRAN, P.; BOONMING, K. Medicinal plants used for hypertension treatment by folk healers in Songkhla province, Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 214, p. 58-70, 2018. doi:10.1016/j.jep.2017.11.032
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012. doi:10.1021/np200906s
- NIKOLIC, K.; FILIPIC, S.; AGBABA, D. QSAR study on imidazoline antihypertensive drugs. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 7134-7140, 2008.
- NISHIJIMA, Y.; ZHENG, X.; LUND, H.; SUZUKI, M.; MATTSON, D. L.; ZHANG, D. X. Characterization of blood pressure and endothelial function in TRPV4-deficient mice with L-NAME- and angiotensin II-induced hypertension. **Physiol. Rep.**, v. 2, 2014.
- NOH, H.; YU, M. R.; KIM, H. J. *et al.* Beta 2-adrenergic receptor agonists are novel regulators of macrophage activation in diabetic renal and cardiovascular complications. **Kidney Int.** v. 92, p. 101-113, 2017.
- ONGCHAI, S. *Phyllanthus* spp. as a Potential Alternative Treatment for Arthritic Conditions. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases**, p. 523-533, 2019. doi:10.1016/b978-0-12-813820-5.00030-1.
- ONGCHAI, S. *Phyllanthus* spp. as a Potential Alternative Treatment for Arthritic Conditions. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related**

Inflammatory Diseases, p. 523-533, 2019. doi:10.1016/b978-0-12-813820-5.00030-1

OOI, K. L.; LOH, S. I.; SATTAR, M. A.; MUHAMMAD, T. S. T.; SULAIMAN, S. F. Cytotoxic, caspase-3 induction and in vivo hepatoprotective effects of phyllanthin, a major constituent of *Phyllanthus niruri*. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 236-243, 2015. doi:10.1016/j.jff.2015.01.032

OPARIL, S., ACELAJADO, M. C., BAKRIS, G. L., BERLOWITZ, D. R., CÍFKOVÁ, R., DOMINICZAK, A. F.; WHELTON, P. K. Hypertension. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 18014, 2018. doi:10.1038/nrdp.2018.14

Otsuka F, Fuster V, Narula J, Virmani R. Omnipresent atherosclerotic disease: time to depart from analysis of individual vascular beds. **Mt Sinai J Med.**, v. 79, n. 6, p.641-53.

OVERGAARD, C. B.; DZAVÍK, V. Inotropes and vasopressors: review of physiology and clinical use in cardiovascular disease. **Circulation**, v.118, p.1047-56, 2008.

PADMANABHAN, S.; CAULFIELD, M.; DOMINICZAK, A. F. Genetic and molecular aspects of hypertension. **Circ Res**, v.116, p. 937-959, 2015.

PARAVICINI, T. M.; YOGI, A.; MAZUR, A. E TOUYZ, R. M. "Dysregulation of vascular TRPM7 and annexin-1 is associated International Journal of Endocrinology 15 with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia," **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 423-429, 2009

PARVATHANENI, M.; BATTU, G. R.; GRAY, A. I.; GUMMALLA, P. Investigation of anticancer potential of hypophyllanthin and phyllanthin against breast cancer by in vitro and in vivo methods. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S71–S76, 2014. doi:10.1016/s2222-1808(14)60417-5

PATEL, J. R.; TRIPATHI, P.; SHARMA, V.; CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. *Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 286–313, 2011. doi:10.1016/j.jep.2011.09.040

PAUL, M.; POYAN, M. A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin–angiotensin systems. **Physiol Rev**. V. 86, p. 747-803, 2006.

PEREIRA, R. G. et al. Supercritical fluid extraction of phyllanthin and niranthin from *Phyllanthus amarus* Schum.&Thonn. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 23–32, 2017.

PERSELL, S. D. Prevalence of Resistant Hypertension in the United States, 2003–2008. **Hypertension**, v. 57, p. 1076-1080, 2011.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**. v. 76, p.116-129, 2012.

Pierdomenico, S.D., Di Nicola, M., Esposito, A.L., Di Mascio, R., Ballone, E., Lapenna, D., Cuccurullo, F., 2009. Prognostic value of different indices of blood

pressure variability in hypertensive patients. **American Journal of Hypertension**. 22, 842-847.

PUTAKALA, M.; GUJJALA, S.; NUKALA, S.; BONGU, S. B. R.; CHINTAKUNTA, N.; DESIREDDY, S. Cardioprotective effect of *Phyllanthus amarus* against high fructose diet induced myocardial and aortic stress in rat model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1359-1368, 2017. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.054

PUTAKALA, M.; SUDHAKARA, G, SRINIVASULU, N.; BONGU, S. B. R.; CHINTAKUNTA, N.; DESIREDDY, S. Assessment of in vitro antioxidant potential and quantification of total phenols and flavonoids of aqueous extract of *Phyllanthus amarus*, **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** v. 7, p. 439–445, 2015.

QU, X.; JIN, F.; HAO, Y. et al. Magnesium and the risk of cardiovascular events: a meta-analysis of prospective cohort studies. **PLoS One**. v. 8, e57720, 2013.

RAMULONDI, M.; DE WET, H.; VAN VUUREN, S. Toxicology of medicinal plants and combinations used in rural northern KwaZulu-Natal (South Africa) for the treatment of hypertension. **Journal of Herbal Medicine**, 2018. doi:10.1016/j.hermed.2018.12.001.

RAWAT, P.; SINGH, P. K.; KUMAR, V. Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. **Journal of Herbal Medicine**, v. 6, n. 3, p. 107-118, 2016. doi:10.1016/j.hermed.2016.06.001.

REDGRAVE LS, SUTTON SB, WEBBER MA, PIDDOCK LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends Microbiol.**, v. 22, p. 438-445, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.

RIBEIRO, A. M. B.; SOUSA, J. N.; DA COSTA, L. M.; OLIVEIRA, F. A. A.; DOS SANTOS, R. C.; NUNES, A. S.; OLIVEIRA, A. P. Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 242-246, 2019. doi:10.1016/j.micpath.2019.03.012.

ROENGRIT, T., WANNANON, P., PRASERTSRI, P., KANPETTA, Y., SRIPANIDKULCHAI, B., WATTANATHORN, J., & LEELAYUWAT, N. Antioxidant effect of *Phyllanthus amarus* after moderate-intensity exercise in sedentary males: a randomized crossover (double-blind) study. *Journal of Physical Therapy Science*, v. 27, n. 4, p.1181-1186, 2015. doi:10.1589/jpts.27.1181

ROSANOFF, A. Magnesium supplements may enhance the effect of antihypertensive medications in stage 1 hypertensive subjects. **Magnesium Research**, v. 23, n. 1, p. 27-40, 2010.

SANDOO, A.; VAN ZANTEN, J. J. C. S. V.; METSIOS, G. S.; CARROLL, D. KITAS, G. D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **Open Cardiovasc. Med. J.**, v. 4, p. 302-312, 2010.

SAUCERMAN, J. J.; MCCULLOCH, A. D. Cardiac α -adrenergic signaling: from subcellular microdomains to heart failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1080, p. 348-361, 2006. <https://doi.org/10.1196/annals.1380.026>.

SCHUTTEN, J. C.; JOOSTEN, M. M.; DE BORST, M. H.; BAKKER, S. J. L. Magnesium and Blood Pressure: A Physiology-Based Approach. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 25, n. 3, p. 244-250, 2018. doi:10.1053/j.ackd.2017.12.003

SEYED, M. A. A comprehensive review on *Phyllanthus* derived natural products as potential chemotherapeutic and immunomodulators for a wide range of human diseases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 529–537, 2019. doi:10.1016/j.bcab.2019.01.008.

SHOKUNBI, O. S.; ODETOLA, A. A. Gastroprotective and antioxidant activities of *Phyllanthus amarus* extracts on absolute ethanolinduced ulcer in albino rats. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 2, n. 10, p. 261-267.

SICA D. A.; FRISHMAN W. H. Magnesium, potassium, and calcium as cardiovascular disease therapies. In: Frishman WH, Sica DA, eds. **Cardiovascular Pharmacotherapeutics**. 3rd ed. Minneapolis: Cardiotext Publishing, p.177-182, 2011.

SILAMBARASAN, T.; MANIVANNAN, J.; KRISHNA PRIYA, M.; SUGANYA, N.; CHATTERJEE, S.; RAJA, B. Sinapic acid prevents hypertension and cardiovascular remodeling in pharmacological model of nitric oxide inhibited rats. **PLoS ONE**, v. 9, e115682, 2014.

SILVA, M. J.; SALES, M. F. *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 79-98, 2007.

SILVA, S. D.; ZAMPIERI, T. T.; RUGGERI, A.; CERONI, A.; ARAGÃO, D. S.; FERNANDES, F. B. et al. Downregulation of the vascular renin-angiotensin system by aerobic training-focus on the balance between vasoconstrictor and vasodilator axes -. **Circ J.** v. 79, p. 1372–1380, 2015. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-1179> PMID: 25808225.

SIMÕES, L.O.; CONCEIÇÃO-FILHO, G.; RIBEIRO, T. S.; JESUS, A.M.; FREGONEZE, J.B.; SILVA, A.Q.G.; PETREANU, M.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R.; NIERO, H.; TAMANAHA, M.S.; SILVA, D.F. Evidences of antihypertensive potential of extract from *Solanum capsicoides* All. in spontaneously hypertensive rats, **Phytomedicine**, 2016. doi:10.1016/j.phymed.2016.02.020.

SONG, Y.; LIU, S. Magnesium for cardiovascular health: time for intervention. **Am J Clin Nutr.**, v. 95, p. 269-270, 2012.

SPASOV, A. A.; IEZHITSA, I. N.; KHARITONOVA, M. V.; GUROVA, N. A. Arrhythmogenic threshold of the myocardium under conditions of magnesium deficiency. **Bull Exp Biol Med** v. 146, n. 1, p. 63-5, 2008.

STROSBERG, A. D. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. **Protein Sci.**, v. 2, p.1198-209, 1993.

TANG, Y. Q.; JAGANATH, I. B.; MANIKAM, R.; SEKARAN, S. D. *Phyllanthus spp.* Exerts Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Effects Through Inhibition on Matrix Metalloproteinase Enzymes. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 5, p. 783-795, 2015. doi:10.1080/01635581.2015.1040518

TSABANG, et al. Treatment of diabetes and/or hypertension using medicinal plants in Cameroon. **Medicinal & Aromatic Plants**, s2, 2015. doi:10.4172/2167-0412.s2-003.

UNMUESSIG, V.; FISHMAN, P. A.; VRIJHOEF, H. J. M.; ELISSEN, A. M. J.; GROSSMAN, D.C. Association of controlled and uncontrolled hypertension with workplace productivity. **Journal of clinical hypertension**, v. 18, p. 217-222, 2016. doi:10.1111/jch.12648.

VAN LAECKE, S.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Hypomagnesaemia, the kidney and the vessels. *Nephrol. Dial. Transpl.* V. 27 p. 4003-4010, 2012.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E. H.; FELETOU, M. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol.**, v. 196, p.193-222, 2009.

VORMANN, J. Magnesium: nutrition and homeostasis. **AIMS Public Health.**, v. 3, n. 2, p. 329-340, 2016.

WANG, M.; BERLIN, J. R. Voltage-dependent modulation of L-type calcium currents by intracellular magnesium in rat ventricular myocytes. **Arch Biochem Biophys**, v. 458, p. 65-72, 2007.

WHELTON, P. K.; CAREY, R. M.; ARONOW, W. S.; CASEY, D. E.; COLLINS, K. J.; DENNISON H., C.; WRIGHT, J. T. ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: executive summary: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines. **Hypertension**, v. 71, n. 6, p. 1269–1324, 2017. doi:10.1161/hyp.0000000000000066

YAO NG, KAMAGATÉ M, AMONKAN AK, KOFFI C, KPAHE F, KOUAMÉ MN, DIÉKACOU H. Comparative effects of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* and its fractions on urinary excretion in rat. **J. Phytopharmacol**, v. 5, n. 5, p.182-184, 2016.

YAO, A. N.; KAMAGATÉ, M.; AMONKAN, A. K.; CHABERT, P.; KPAHÉ, F.; KOFFI, C.; DIE-KAKOU, H. The acute diuretic effect of an ethanolic fraction of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) in rats involves prostaglandins. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 2018.doi:10.1186/s12906-018-2158-0

YOON, S.; FRYAR, C.; CARROLL, M. Hypertension prevalence and control among adults: United States, 2011-2014. In NCHS data brief Hyattsville, MD: National Center for Health Statistic., 2015.

ZALEWSKA, M.; SIARA, M.; SAJEWICZ, W. G protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy. **Acta Pol. Pharm.** v. 71, p. 229-243, 2014.

ZHANG, G. F.; ZHANG, S.; PAN, B. F.; LIU, X. F.; FENG, L. S. 4-Quinolone Derivatives and Their Activities against Gram Positive Pathogens. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 144, p. 710-723, 2018.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015. doi:10.1016/j.jphs.2015.09.002.

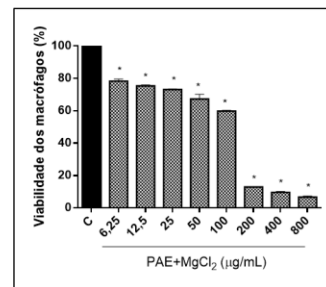
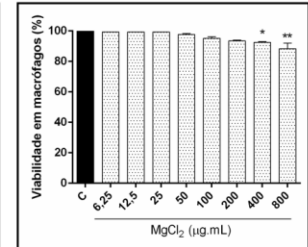
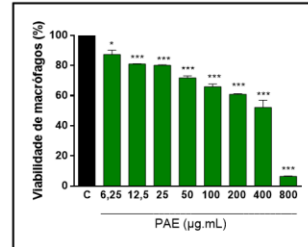
CAPÍTULO 1

Avaliação da citotoxicidade e toxicidade aguda do extrato de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. associado ao cloreto de magnésio

Resumo Gráfico



PAE
2000 mg/kg
+
MgCl₂



Avaliação da citotoxicidade e toxicidade aguda do extrato etanólico das partes aéreas de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. associado ao cloreto de magnésio

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e toxicidade aguda do extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus* (PAE), cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e de um composto formado a partir da associação entre PAE e $MgCl_2$ (PAE+ $MgCl_2$). O MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular, a partir do uso de macrófagos peritoneais de murinos e células Raw 264.7, as quais foram expostas a concentrações crescentes dos produtos-teste (6,25 a 800 $\mu g/mL$) por 48h. Nos ensaios de toxicidade aguda, ratas Wistar foram divididas aleatoriamente em quatro grupos. Um grupo serviu como controle e os demais foram tratados com 2000 mg/kg de $MgCl_2$, PAE e PAE+ $MgCl_2$, sendo avaliados quanto a sinais de toxicidade e mortalidade por 14 dias, conforme diretrizes do teste de toxicidade aguda por via oral da OCDE 423. Após o período de observação dos animais tratados, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, e submetidas a análises bioquímicas (triglicerídeos, colesterol total, HDL, glicose, creatinina, ureia, ácido úrico, AST, ALT, proteínas totais e albumina). Os órgãos vitais dos animais foram preservados para posterior exame histopatológico. Os dados revelaram que nas maiores concentrações testadas de PAE e PAE+ $MgCl_2$ observou-se maior redução na viabilidade celular de linhagens de células de macrófagos, enquanto o $MgCl_2$ não causou citotoxicidade e apresentou $CC_{50} > 800 \mu g/mL$. Na toxicidade aguda de PAE, $MgCl_2$ ou PAE+ $MgCl_2$ não se observou letalidade e nem alterações comportamentais nas ratas tratadas com dose única de 2000mg/kg. Em comparação com o grupo controle, observou-se redução significativa nos níveis de HDL e ácido úrico nos grupos tratados com PAE+ $MgCl_2$ e redução nos níveis de uréia no grupo tratado com $MgCl_2$. A partir dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que são necessários estudos mais específicos para averiguar possíveis danos a órgãos vitais a partir de análises histopatológicas.

Palavras-chave: *Phyllanthus amarus*; cloreto de magnésio; toxicidade aguda; citotoxicidade; MTT.

Evaluation of cytotoxicity and acute toxicity of the ethanolic extract of aerial parts of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. associated with magnesium chloride

Abstract

The objective of this work was to evaluate the cytotoxicity and acute toxicity of the ethanolic extract of the aerial parts of *P. amarus* (PAE), magnesium chloride (MgCl_2) and a compound formed from the association between PAE and MgCl_2 (PAE+ MgCl_2). MTT was used to evaluate cytotoxicity and cell viability, using murine peritoneal macrophages and Raw 264.7 cells, which were exposed to increasing concentrations of the test products (6.25 to 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 hours. In acute toxicity trials, Wistar rats were randomly divided into four groups. One group served as a control and the others were treated with 2000 mg/kg of MgCl_2 , PAE and PAE+ MgCl_2 , being evaluated for signs of toxicity and mortality for 14 days, according to OECD oral toxicity test guidelines 423. After the observation period of the treated animals, blood samples were collected by cardiac puncture and submitted to biochemical analyzes (triglycerides, total cholesterol, HDL, glucose, creatinine, urea, uric acid, AST, ALT, total proteins and albumin). The animals vital organs were preserved for later histopathological examination. The data revealed that in the highest tested concentrations of PAE and PAE+ MgCl_2 , a greater reduction in cell viability of macrophage cell lines was observed, while MgCl_2 did not cause cytotoxicity and presented $\text{CC}_{50} > 800 \mu\text{g}/\text{mL}$. In acute toxicity of PAE, MgCl_2 or PAE+ MgCl_2 , lethality and behavioral changes were not observed in rats treated with a single dose of 2000 mg/kg. In comparison with the control group, there was a significant reduction in HDL and uric acid levels in the groups treated with PAE+ MgCl_2 and a reduction in urea levels in the group treated with MgCl_2 . From the data obtained in this study, it can be concluded that more specific studies are needed to ascertain possible damage to vital organs from histopathological analyzes.

Keywords: *Phyllanthus amarus*; magnesium chloride; acute toxicity; cytotoxicity; MTT.

1. Introdução

Apesar do aumento do uso de medicamentos sintéticos nos últimos anos, as plantas medicinais têm sido comumente utilizadas pela população, até mesmo como única fonte de tratamento de enfermidades (HALBERSTEIN, 2005). A espécie *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. é uma planta medicinal conhecida como quebra-pedra, tradicionalmente usada para tratar muitas doenças e por possuir atividade diurética (YAO et al., 2016; YAO et al., 2018), antioxidante (PUTAKALA et al., 2015), gastroprotetora (SHOKUNBI; ODETOLA, 2008), antimicrobiana (GBADAMOSI, 2015), anti-hiperglicêmica (ADENEYE, 2012), hepatoprotetora (KRITHIKA et al., 2011) e cardioprotetora, sendo indicada na prevenção de doenças cardiovasculares (PUTAKALA et al., 2017).

P. amarus é constituída por importantes componentes bioativos como compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides, flavonóis, taninos hidrolisáveis, triterpenos, esteroides, derivados de ácido elágico e lignanas (KUMAR et al., 2015; PEREIRA et al., 2017). Os efeitos benéficos da filantina, um dos componentes principais de *P. amarus*, têm sido relatados em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (SETHIYA et al. 2015; KHENG et al. 2015; JIA et al. 2016), sendo referenciada também como hepatoprotetora e antioxidante (CHIRDCHUPUNSEREE; PRAMYOTHIN, 2010; LONDHE et al., 2008). Quanto ao magnésio, trata-se de um importante íon que participa como co-fator em cerca de 600 reações enzimáticas vitais (CASPI et al., 2012; DE BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015), cuja deficiência no organismo pode contribuir com a fisiopatologia de doenças como a hipertensão (VAN LAECKE et al., 2011; SCHUTTEN et al., 2018).

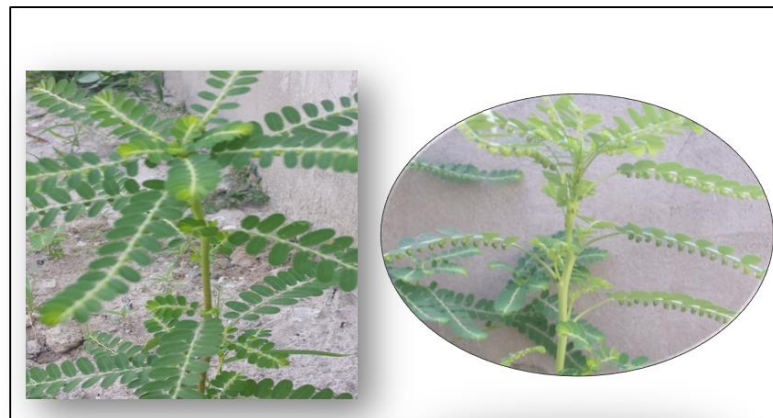
O estudo de plantas medicinais fornece importantes contribuições para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Desta forma, estudos toxicológicos devem ser realizados para preparações à base de plantas para validar sua segurança (BECKER et al., 2007). Assim, identificar a toxicidade de plantas é importante para minimizar o equívoco da população em acreditar que produtos naturais são desprovidos de efeitos tóxicos ou adversos. Desta forma, este artigo objetivou realizar uma investigação preliminar da citotoxicidade em células peritoneais de murinos e células RAW, além de avaliar a toxicidade aguda pré-clínica do extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus* (PAE), cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e de um composto preparado a partir de PAE e $MgCl_2$, denominado neste estudo por PAE+ $MgCl_2$.

2. Material e métodos

2.1 Coleta e identificação botânica de *P. amarus* Schumach. & Thonn

Amostras de *P. amarus* (**Figura 1**) foram colhidas durante a estação chuvosa, entre os meses de fevereiro a abril de 2017, na cidade de Angical do Piauí (latitude 06°05'09 "sul e longitude 42°44'20" oeste), Piauí, Brasil, para a confecção de exsicatas, depósito no Herbário Graziela Barroso, da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e preparação do extrato. A espécie foi analisada pelo Dr. Marcos José da Silva, pesquisador da Universidade Federal do Goiás e identificada sob registro nº 30821. A espécie foi registrada no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), sob número A0ABD12.

Figura 1 - *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.

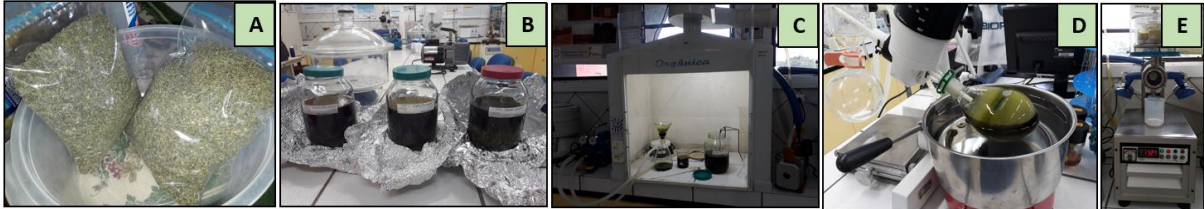


Fonte: Dados da pesquisa.

2.2 Preparação do extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus* Schumach. & Thonn

O extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus* (PAE) foi preparado no laboratório de alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI), no campus Teresina Zona Sul. O material vegetal foi seco em temperatura ambiente (**Figura 2A**), triturado em moinho de faca e macerado em etanol a 99% por 3 semanas, com filtragem e troca do reagente a cada 7 dias (**Figura 2B e 2C**). Em seguida, o filtrado foi submetido ao rotaevaporador a 45 °C para a remoção do solvente (**Figura 2D**) e liofilizador para a obtenção final do PAE (**Figura 2E**) (QUELEMES et al., 2015).

Figura 2 - Preparação do extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus*. **(A)** Partes aéreas de *P. amarus* desidratadas. **(B)** Maceração das folhas de *P. amarus* em etanol. **(C)** Processo de filtragem. **(D)** Remoção do solvente em rotaevaporador. **(E)** Liofilização.



Fonte: Dados da pesquisa.

2.3 Preparação do composto formado por PAE e $MgCl_2$

O composto foi obtido a partir da mistura entre o PAE e o $MgCl_2$ (Labsynth produtos para laboratório, Brasil), na proporção de 1:1, denominado neste estudo por PAE+ $MgCl_2$. O PAE foi diluído em Tween 80 (Dinâmica, São Paulo, Brasil) (0,5% v/v) e o $MgCl_2$ foi diluído apenas em solução de água desmineralizada.

2.4 Análise dos constituintes químicos do extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus* por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (GC-MS)

Aproximadamente 2 mg de PAE foram colocados em frascos de fundo redondo e selados com um septo de borracha. O sistema de reação foi purgado com nitrogênio e adicionadas duas gotas de piridina, recentemente destilada. A mistura reacional foi agitada até completa dissolução. Em seguida, 100 μ L de N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) + trimetilclorosilano 1% (TMCS) foram adicionados. O sistema foi aquecido para 85 °C sob agitação e atmosfera inerte durante 1 h. Os constituintes foram analisados com o equipamento SHIMADZU GC-17A acoplado a espectrometria de massas GCMS-QP5050A, equipado com uma coluna capilar MS5 (30 mm x 0,2 mm x 0,2 μ m espessura do filme) e a fonte de íons foi operada no modo de impacto de elétrons (EI) a 70 eV.

Um μ L da mistura dos produtos foi injetado em modo split (1:30) e em uma temperatura de 300 °C e temperatura de interface de 300 °C. O programa de temperatura do forno foi a partir de temperatura inicial de 120 °C, com tempo inicial

de 2 min, que foi aumentando para 300 °C a 10 °C min⁻¹. O gás hélio (99,9999%) foi utilizado como gás carreador a um fluxo de 1 mL min⁻¹. O quadrupolo do espectrômetro de massa foi operado em modo de varredura completa na faixa de massa de 40 a 650 Da. O tempo total de varredura para uma corrida cromatográfica foi de 40 minutos. A identificação de constituintes foi feita por comparação de espectros de massa com bibliotecas computacionais Wiley 229 e NIST.

2.5 Drogas e reagentes

Durante o desenvolvimento dos experimentos foram utilizados os anestésicos: tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil; 40 mg/kg), xilazina (Ceva[®], São Paulo, Brasil; 20 mg/kg), quetamina (Ceva[®], São Paulo, Brasil; 80 mg/kg). Para a obtenção do extrato, utilizou-se etanol 99% (Dinâmica, São Paulo, Brasil). Foram utilizados Tween 80 (Dinâmica, São Paulo, Brasil, na proporção de 0,05 mg/kg) e cloreto de magnésio P.A. (Labsynth produtos para laboratório, Brasil).

2.6 Estudos com animais

Para o desenvolvimento dos ensaios de viabilidade celular, foram utilizados 10 camundongos BALB/c machos e fêmeas de 4-5 semanas de vida e com 20-30 g de peso vivo. Uma sobredose de anestésico por injeção intraperitoneal de uma mistura de tiopental (150 mg/kg) e lidocaína (10 mg/kg) foi usada para a eutanásia dos camundongos. Para os protocolos de toxicidade aguda foram utilizadas 14 ratas da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, pesando entre 223-312 g.

Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da UFPI e mantidos no Biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais - NPPM/UFPI, sob condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as normas éticas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e com a provação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/UFPI) sob o número 223/2016 (Anexo 1).

Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estavam em conformidade com a resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de medicina Veterinária – CFMV, atualizada pela resolução normativa do CONCEA nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

2.7 Protocolos experimentais *in vitro*

2.7.1 Cultivo de células

Os macrófagos utilizados para as amostras PAE e MgCl₂ foram elicitados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, anteriormente mantidos em álcool 70% após a eutanásia. A retirada dos macrófagos foi feita em capela de fluxo laminar onde o animal, após eutanásia, foi fixado em placa na posição de decúbito dorsal, administrando-se 8 mL de salina tamponada com fosfato (PBS- NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,4), pH 7,4, estéril, a 4 °C, na cavidade abdominal. Em seguida foi feita uma massagem suave na região abdominal e realizada a aspiração do PBS injetado utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo cônico de poliestireno com capacidade de 50 mL, centrifugado a 3000 rpm, durante 10 min. Em seguida, foi lavado três vezes com PBS estéril na temperatura de 4 °C. Para averiguação da viabilidade celular, foi contado em Câmara de Neubauer, diluído em corante vital azul de Trypan (Sigma, EUA).

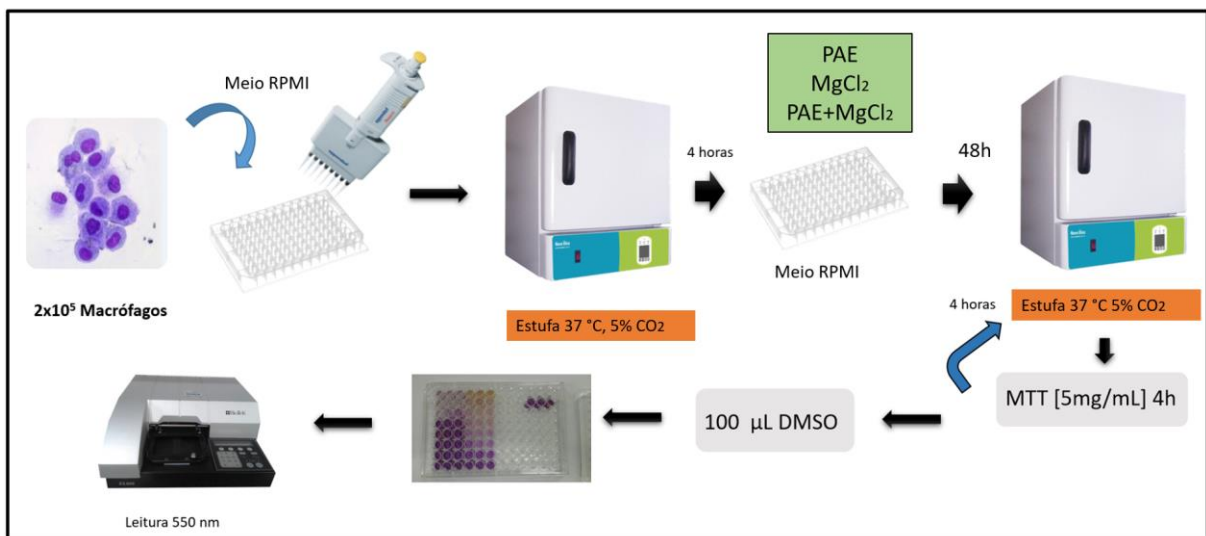
2.7.2 Avaliação da citotoxicidade do PAE e MgCl₂ em macrófagos peritoneais de murinos pelo teste do MTT

A fim de determinar a viabilidade celular e possíveis efeitos citotóxicos das amostras testadas, o ensaio colorimétrico com base no metabolismo mitocondrial do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) foi utilizado (MOSMANN, 1983). Este é um método que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula. O MTT é um sal de coloração amarela que é acumulado pelas células por endocitose. A redução do anel tetrazólico deste sal pelas mitocôndrias de células viáveis resulta na formação de cristais de formazan de cor violeta, a partir de enzimas mitocondriais presente somente em células metabolicamente ativas. A mudança de coloração do meio de reação encontra-se associada à atividade metabólica celular e pode ser medida registrando-se os valores de absorvância deste.

Em placas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado, contendo 10% de soro fetal bovino, 10.000 UI de penicilina, 1000 UI de estreptomicina e cerca de 2×10^5 macrófagos por poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 4 h para adesão celular. Após este tempo, foram realizadas duas lavagens com meio RPMI 1640 suplementado, para a retirada

das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100 μL do meio RPMI suplementado juntamente com as amostras diluídas, de forma seriada, nas concentrações de 800 a 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida, as amostras foram incubadas por 48 h e, ao final da incubação, foi adicionado 10 μL de MTT diluído em meio RPMI a 5 mg/mL . Foram incubadas por mais 4 h em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ com 5% de CO_2 , e em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de DMSO em todos os poços. A placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), à temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm, utilizando-se um leitor de placas Biotek (ELx800) (**Figura 3**) Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica média (CC_{50}) sendo o grupo controle considerado como 100% de viabilidade (OLIVEIRA, 2017).

Figura 3 - Protocolo de citotoxicidade em macrófagos peritoneais de murinos pelo teste do MTT.



2.7.3 Avaliação da citotoxicidade do PAE+MgCl₂ em células da linhagem RAW 264.7 pelo método do MTT

Os macrófagos utilizados para a amostra PAE+MgCl₂ foram provenientes da linhagem RAW 264.7 cultivados em meio DMEM (Sigma, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma, EUA) e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg (Sigma, EUA) a 37 $^{\circ}\text{C}$ em estufa a 5% de CO_2 . Em placas de 96 poços,

foram adicionados 100µL de meio DMEM suplementado e cerca de 2×10^5 macrófagos por poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 4 h para adesão celular. Após este tempo, foram realizadas duas lavagens com meio DMEM suplementado, para a retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100µL do meio DMEM suplementado juntamente com a amostra diluída, de forma seriada, nas concentrações de 800 a 6,25 µg/mL.

Em seguida, a amostra foi incubada por 48 h e, ao final da incubação, foi adicionado 10µL de MTT diluído a 5 mg/mL em meio DMEM. Foram incubadas por mais 4 h em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂, e posteriormente o sobrenadante foi descartado e adicionado 100µL de DMSO em todos os poços. A placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), à temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm, utilizando-se um leitor de placas Biotek (ELx800). Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica média (CC₅₀) sendo o grupo controle considerado como 100% viável (OLIVEIRA, 2017).

2.8 Determinação da toxicidade aguda em ratos

A avaliação toxicológica de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ foi realizada pelo método de dose fixa recomendado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), n° 423 (OECD, 2001). Antes dos tratamentos, os animais foram deixados em jejum prévio de 8h e posteriormente foram pesados e as substâncias foram administradas. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: o grupo controle foi tratado com água desmineralizada/Tween 80 (0,5% volume/volume) e os demais grupos receberam a dose de 2000 mg/kg, por via oral (V.O.) (0,1 mL/100g) de PAE, MgCl₂ ou PAE+MgCl₂ (**Tabela 1**). Os animais ficaram sob observação durante as primeiras 4 horas após as gavagens. Além disso, fez-se observações diárias dos animais para avaliação do peso, consumo de ração, atividade autônoma, atividade motora e sobre a ocorrência de morte em cada grupo tratado.

Tabela 1 - Desenho experimental do ensaio de toxicidade aguda realizado com ratos Wistar tratados com PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂.

GRUPOS	Nº de animais
Grupo 1: Controle	3
Grupo 2: PAE	4
Grupo 3: MgCl ₂	3
Grupo 4: PAE+MgCl ₂	4

2.9 Avaliação dos efeitos farmacológicos gerais (Screening Hipocrático)

Após administração das substâncias, foram observados os efeitos gerais apresentados pelos grupos experimentais nos intervalos: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, nos 14 dias seguintes, com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou no Sistema Nervoso Autônomo (SNA), utilizando-se protocolo experimental (OECD 2003).

Os parâmetros observados, relacionados às ações estimulantes, foram: hiperatividade, tremores, convulsão e piloereção. Os parâmetros considerados para avaliar a ação depressora foram: alienação do meio, analgesia (ausência de sensibilidade a dor quando a cauda do animal é comprimida por pressão manual), anestesia (ausência de sensibilidade a dor quando o animal tem seu pêlo puxado por suspensão), ataxia, diminuição da apreensão da pata, catatonia, dispneia, ptose palpebral e sedação.

Ainda foram observados parâmetros como: agressividade (resposta ao toque), contorção, coloração da urina, diâmetro da pupila, presença de diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhidos, aumento ou diminuição da micção, midríase, aspectos colorimétrico da orelha (cianótica, hiperemiada ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorréia (salivação excessiva), tremor da cauda, lacrimejamento, sudorese, coma e morte.

2.10 Avaliação ponderal, consumo de ração e análise dos parâmetros bioquímicos

Avaliou-se o peso e o consumo de água e ração, diariamente por 14 dias, após dose única de 2000 mg/kg de veículo, PAE, MgCl₂ ou PAE+MgCl₂. Diariamente colocava-se 250 g de ração e mamadeiras com 500mL de água nas gaiolas. No dia seguinte, registrou-se a quantidade de água e ração consumida pelo animal e o seu peso.

Decorridos 14 dias de administração de dose única das substâncias testes, os animais foram submetidos a 8 horas de jejum e anestesiados com uma solução de xilazina e cetamina de no máximo 0,10 mL/100 g de massa corpórea, na proporção de 8,75 mL de cetamina e 1,25 mL de xilazina, por via intraperitoneal (I. P.). Amostras de 4mL de sangue foram coletadas, a partir da aorta abdominal, e acondicionados em tubos com gel separador. Estes foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm (rotações por minuto) para obtenção do soro, o qual foi separado em tubos tipo *ependorf* para posterior análise bioquímica.

O material foi analisado no Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM utilizando o Analisador Bioquímico Automático Labmax pleno modelo Standard, nº de série 1208.06 (Labtest, Brasil). Os exames foram realizados seguindo os protocolos do fabricante do equipamento e dos kits reagentes padronizados (Labtest®, Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa – MG) com metodologias cinéticas, enzimáticas ou colorimétricas, em temperatura de 37 °C, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro semiautomático UV/Vis, T80 Pg instruments. Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), triglicerídeos, glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (GGT), uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais e albumina.

3. Análises estatística

Os ensaios de MTT foram realizados em triplicata e três experimentos independentes. A concentração citotóxica CC₅₀ com limite de confiança de 95%, foi calculada utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni do

programa Graph Pad Prism[®] 6.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística (SOKAL; ROHLF, 1996).

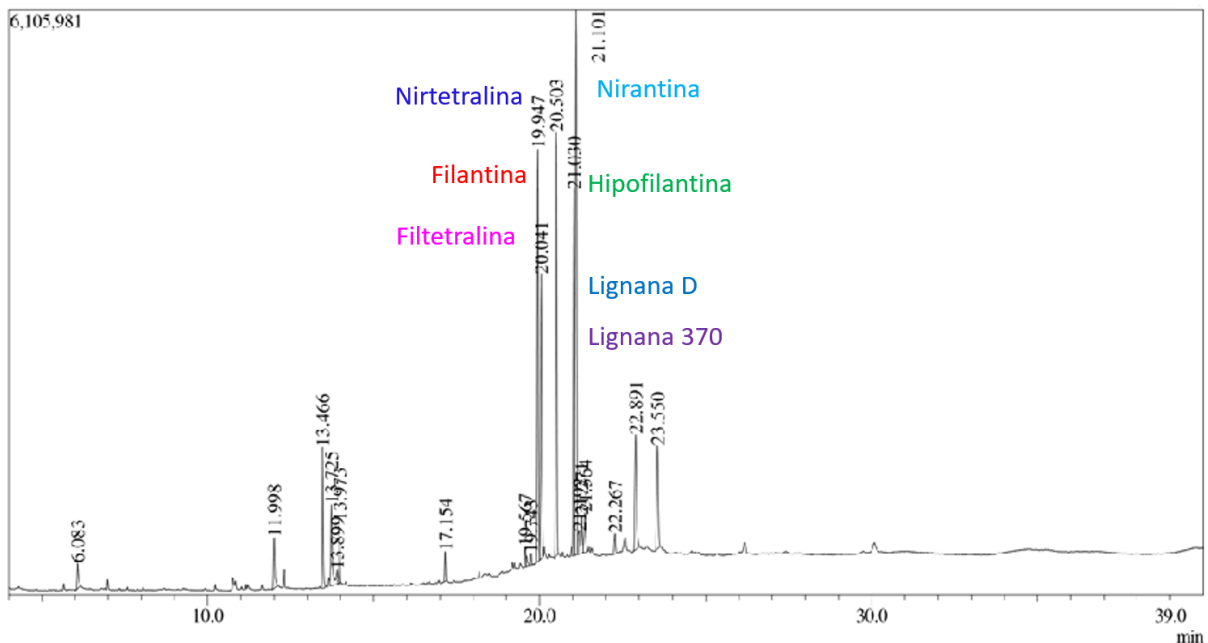
Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados dos parâmetros bioquímicos, avaliação ponderal e de consumo de ração foram submetidos ao teste t. Em todos os testes a probabilidade foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no Graph Pad Prism[®] 6.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

4. Resultados

4.1 Constituintes químicos do extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus*

Na **Figura 4**, os resultados da análise da composição química do PAE por GC-MS indicaram a presença das lignanas nirantina, hipofilantina, nirtetralina, filantina e filtetralina como compostos principais, seguidos por lignana D e lignana 370.

Figura 4 - Cromatograma obtido por GC-MS do extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus*

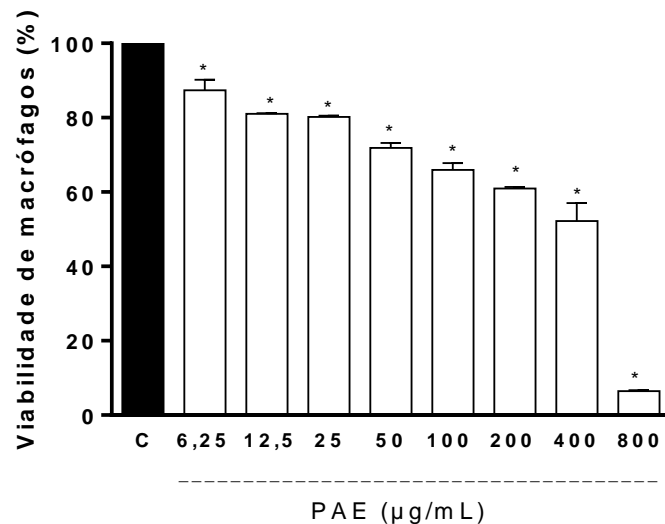


Nota: Os picos referentes aos números 19.947, 20.041, 20.503, 21.030, 21.100, 21.192 e 21.367 correspondem à Filantina, Filtetralina, Nirtetralina, Hipofilantina, Nirantina, Lignana D e Lignana 370, respectivamente.

4.2 Avaliação da citotoxicidade do PAE e MgCl₂ em macrófagos peritoneais de murinos pelo teste do MTT

Após 48 horas de incubação com PAE observou-se que todas as concentrações testadas reduziram a viabilidade celular de forma dependente da concentração, apresentando valores de viabilidade iguais a $81,55 \pm 2,89^*$; $80,60 \pm 0,21^*$; $79,89 \pm 1,29^*$; $63,06 \pm 1,82$ e $60,30 \pm 0,37^*$, $42,66 \pm 4,80\%$, para as doses 6,25; 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ observou-se uma redução na viabilidade em 93,99% (**Figura 5**). O PAE apresentou concentração citotóxica média (CC_{50}) igual a 193,96 $\mu\text{g/mL}$.

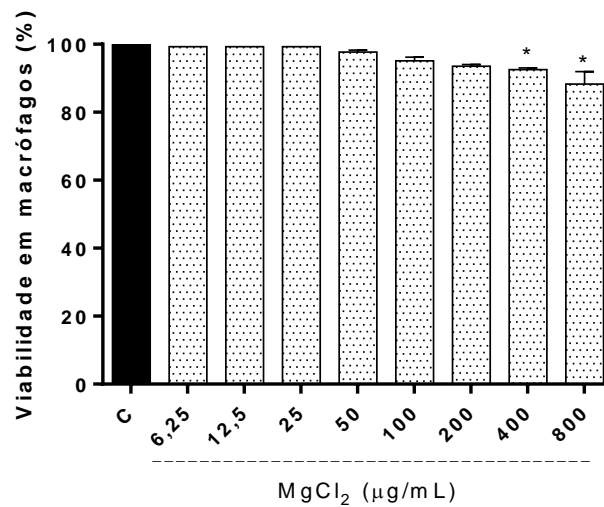
Figura 5 – Efeito do PAE sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos.



Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média de experimentos realizados em triplicata. ANOVA one-way; PAE: Extrato das partes aéreas de *P. amarus*. *Diferença significativa em relação ao controle, com $p < 0,05$.

Após 48h de incubação com MgCl₂, as concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 $\mu\text{g/mL}$ não causaram citotoxicidade aos macrófagos. Nas concentrações de 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular foi reduzida em apenas 8,01 e 15,33%, respectivamente (**Figura 6**). O MgCl₂ apresentou CC_{50} maior que a 800 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 6 – Efeito do $MgCl_2$ sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos.

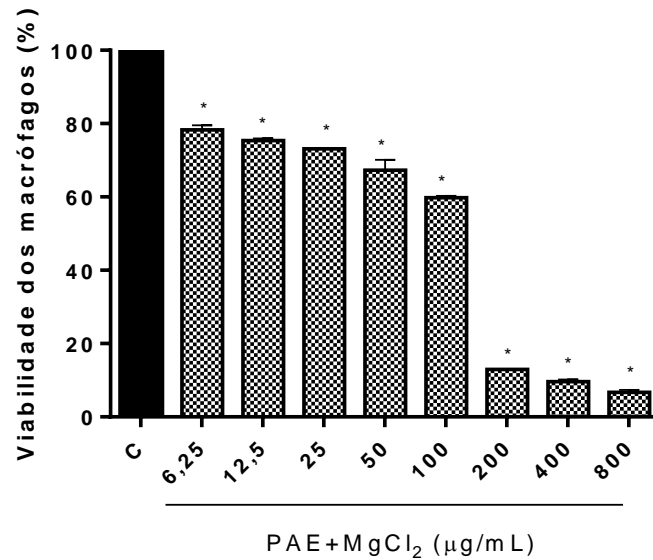


Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média de experimentos realizados em triplicata. ANOVA one-way, *Diferença significativa em relação ao controle, com $p < 0,05$.

4.3 Avaliação da citotoxicidade do PAE+ $MgCl_2$ em macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelo teste do MTT

Após 48 horas de incubação com PAE+ $MgCl_2$ observou-se que todas as concentrações testadas reduziram a viabilidade celular de forma dependente da concentração, apresentando percentuais de viabilidade iguais a $76,25 \pm 1,2^*$; $74,29 \pm 0,56^*$; $72,62 \pm 0,25^*$; $62,30 \pm 2,84$ e $58,91 \pm 0,49^*$, para as concentrações 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Nas concentrações de 200, 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$ observou-se uma redução na viabilidade em $87,09 \pm 0,03^*$, $90,36 \pm 0,53^*$ e $94,02 \pm 0,84^*$ %, respectivamente (**Figura 7**). O PAE+ $MgCl_2$ apresentou concentração CC_{50} igual a 50 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 7 – Efeito do PAE+MgCl₂ sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7.



Nota: Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média de experimentos realizados em triplicata. ANOVA one-way, *Diferença significativa em relação ao controle, com $p < 0,05$.

4.4 Avaliação da toxicidade aguda em ratos

Após a administração de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ na dose de 2000 mg/kg (V.O.) em ratos, não foram observadas mortes durante os 14 dias de observação ou alterações comportamentais como: efeito sedativo, bem como influência sobre o sistema nervoso autônomo durante o tempo de observação de 14 dias. Contudo, no grupo PAE+MgCl₂ observou-se sinais de auto-limpeza, reflexo de endireitamento, reflexo corneal e auricular, nos 30 minutos iniciais, após a gavagem como apresentado na **Tabela 4**. No dia seguinte, essas alterações foram normalizadas e não foram observados sinais clínicos de toxicidade.

Tabela 2 - Sinais clínicos e comportamentais após administração de PAE na dose de 2000 mg/kg por via oral.

Atividades	Tempo (minutos)				
	30	60	120	180	240
ESTIMULANTE					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSOR					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO					
Diarréia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
Diâmetro da pupila	0	0	0	0	0
OUTROS COMPORTAMENTOS					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	+	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
MORTE	0	0	0	0	0

Legenda: (0) Sem efeito; (-) efeito diminuído; (+) efeito aumentado.

Tabela 3 - Sinais clínicos e comportamentais após administração de MgCl₂ na dose de 2000 mg/kg por via oral.

Atividades	Tempo (minutos)				
	30	60	120	180	240
ESTIMULANTE					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSOR					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO					
Diarréia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
Diâmetro da pupila	+	+	0	0	0
OUTROS COMPORTAMENTOS					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	-	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
MORTE					
	0	0	0	0	0

Legenda: (0) Sem efeito; (-) efeito diminuído; (+) efeito aumentado.

Tabela 4 - Sinais clínicos e comportamentais após administração de PAE+MgCl₂ na dose de 2000 mg/kg por via oral.

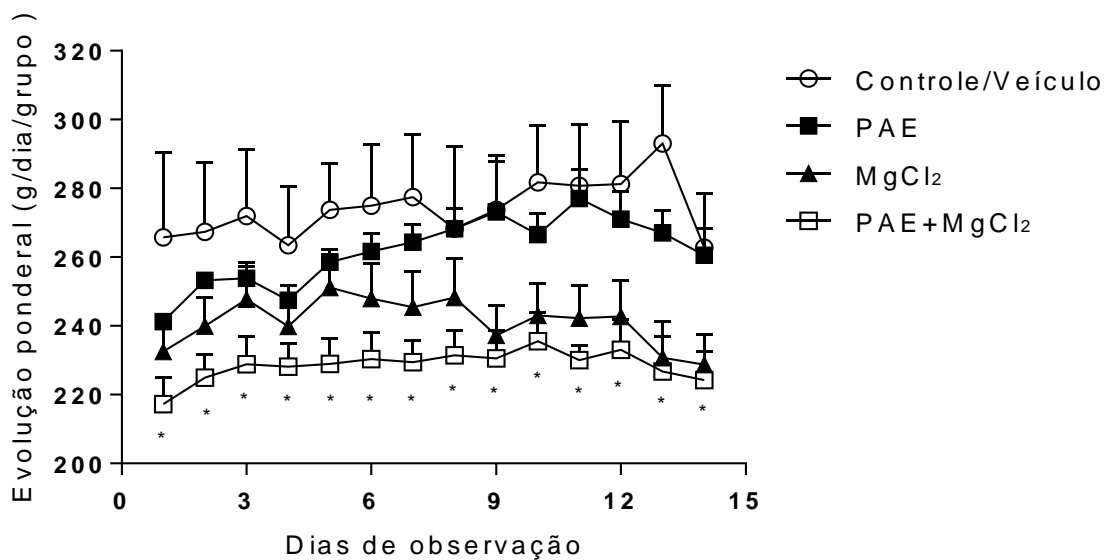
Atividades	Tempo (minutos)				
	30	60	120	180	240
ESTIMULANTE					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSOR					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	+	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	+	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	+	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO					
Diarréia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
Diâmetro da pupila	+	+			
OUTROS COMPORTAMENTOS					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	+	+	+	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
MORTE	0	0	0	0	0

Legenda: (0) Sem efeito; (-) efeito diminuído; (+) efeito aumentado.

4.5 Avaliação ponderal de ratas tratadas com 2000 mg/kg de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂

O peso inicial dos animais do grupo tratado com PAE+MgCl₂ foi menor do que a média de peso dos demais grupos e desta forma, após tratamento estatístico observou-se uma diferença significativa, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura 8**).

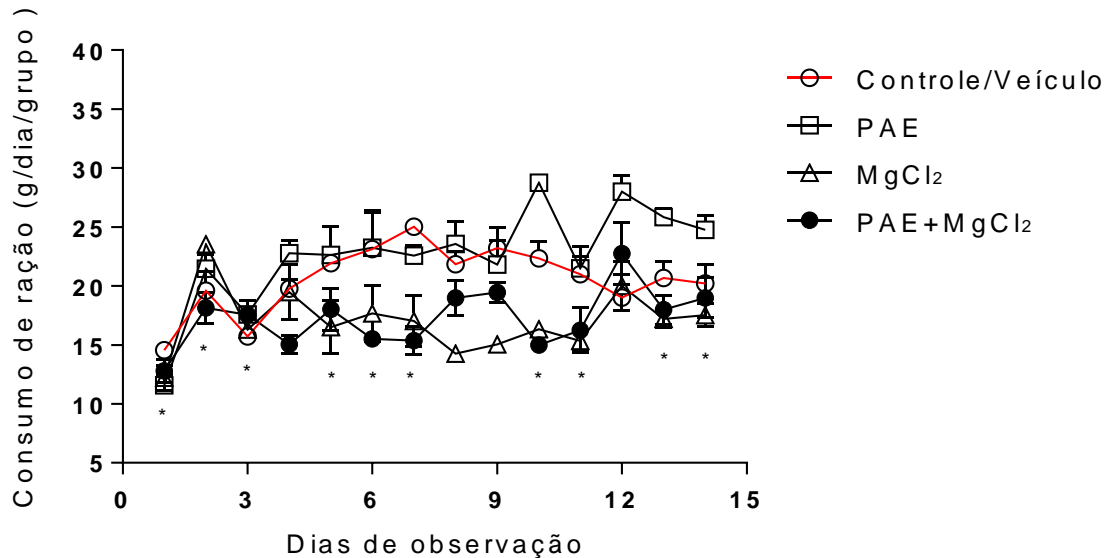
Figura 8 – Avaliação ponderal de ratas tratadas com 2000 mg/kg de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ durante 14 dias.



Nota: Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. Teste t, com significância de 5. * $p < 0,05$ vs Controle. Veículo: água desmineralizada em Tween 80 0,05 mg/kg. PAE: extrato de *P. amarus*; MgCl₂: Cloreto de magnésio P.A. PAE+MgCl₂: extrato de *P. amarus* + cloreto de magnésio

Em relação ao consumo de ração observou-se uma diminuição no consumo no grupo tratado com PAE+MgCl₂ de modo significativo, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura 9**).

Figura 9 – Consumo de ração de ratas tratadas com 2000 mg/kg de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ durante 14 dias.



Nota: Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. Análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Sidak's, com significância de 5%. * $p < 0,05$ vs Controle. Veículo: água desmineralizada em Tween 80 0,05 mg/kg. PAE: extrato de *P. amarus*; MgCl₂: Cloreto de magnésio P.A. PAE+MgCl₂: extrato de *P. amarus* + cloreto de magnésio.

4.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com dose única (2000 mg/kg) do PAE, MgCl₂ ou PAE+MgCl₂, durante ensaio de toxicidade aguda.

A **Tabela 5** apresenta os resultados da análise bioquímica dos grupos controle e tratados com dose única de PAE, MgCl₂ ou PAE+MgCl₂ (2000 mg/kg) em protocolo de toxicidade aguda. Os dados demonstram que não houve alterações significativas nos triglicerídeos e colesterol total. Contudo, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de HDL nos grupos tratados MgCl₂ e PAE+MgCl₂ ($28,00 \pm 3,46^*$ e $30,67 \pm 1,25^*$ mg/dL, respectivamente), quando comparado ao grupo veículo ($51,00 \pm 7,32^*$ mg/dL).

Os parâmetros renais, como creatinina, uréia e ácido úrico, após o tratamento com dose única de MgCl₂ resultou em redução significativa na uréia ($25,67 \pm 0,67^*$ mg/dL) em relação ao grupo controle ($40,33 \pm 0,67^*$ mg/dL). Neste estudo, os marcadores de danos hepáticos como a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e o parâmetro proteínas totais não apresentaram alterações

significativas após os tratamentos. Contudo, estudos adicionais, tal como a análise histopatológica do fígado seria necessário, visando esclarecer melhor a existência ou não de lesão hepática.

Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratas normotensas tratadas por via oral com dose única de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ a 2000 mg/kg, sob avaliação de 14 dias, durante ensaio de toxicidade aguda.

Parâmetros bioquímicos	Veículo 0,05 mg/kg	PAE	MgCl ₂	PAE+MgCl ₂
Triglicerídeos	62,33 ± 7,96	66,5 ± 3,52	62,50 ± 8,37	71 ± 7,56
Colesterol total (mg/dL)	84,00 ± 9,71	103,00 ± 5,12	100,3 ± 13,30	89,25 ± 9,58
HDL (mg/dL)	51,00 ± 5,2	51,50 ± 7,32	28 ± 3,46*	30,67 ± 1,25*
Glicose (mg/dL)	121 ± 5,85	137 ± 6,24	137 ± 3,84	139,25 ± 8,89
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,05	0,32 ± 0,08	0,37 ± 0,02	0,47 ± 0,23
Uréia (mg/dL)	40,33 ± 0,67	46,25 ± 2,5	25,67 ± 0,67*	40 ± 3,19
Ácido úrico (mg/dL)	5,33 ± 0,53	7,15 ± 2,87	4,75 ± 0,09	3,98 ± 0,10*
ALT (U/L)	59,00 ± 7,00	50,00 ± 5,78	48,50 ± 3,18	72,50 ± 5,33
AST (U/L)	152,66 ± 27,67	102,75 ± 6,13	130,00 ± 10,68	137,25 ± 8,93
Proteínas totais (g/dL)	6,95 ± 0,97	7,12 ± 0,10	7,44 ± 0,23	7,41 ± 0,16
Albumina (g/dL)	2,27 ± 0,12	2,42 ± 0,09*	2,23 ± 0,04	2,47 ± 0,08

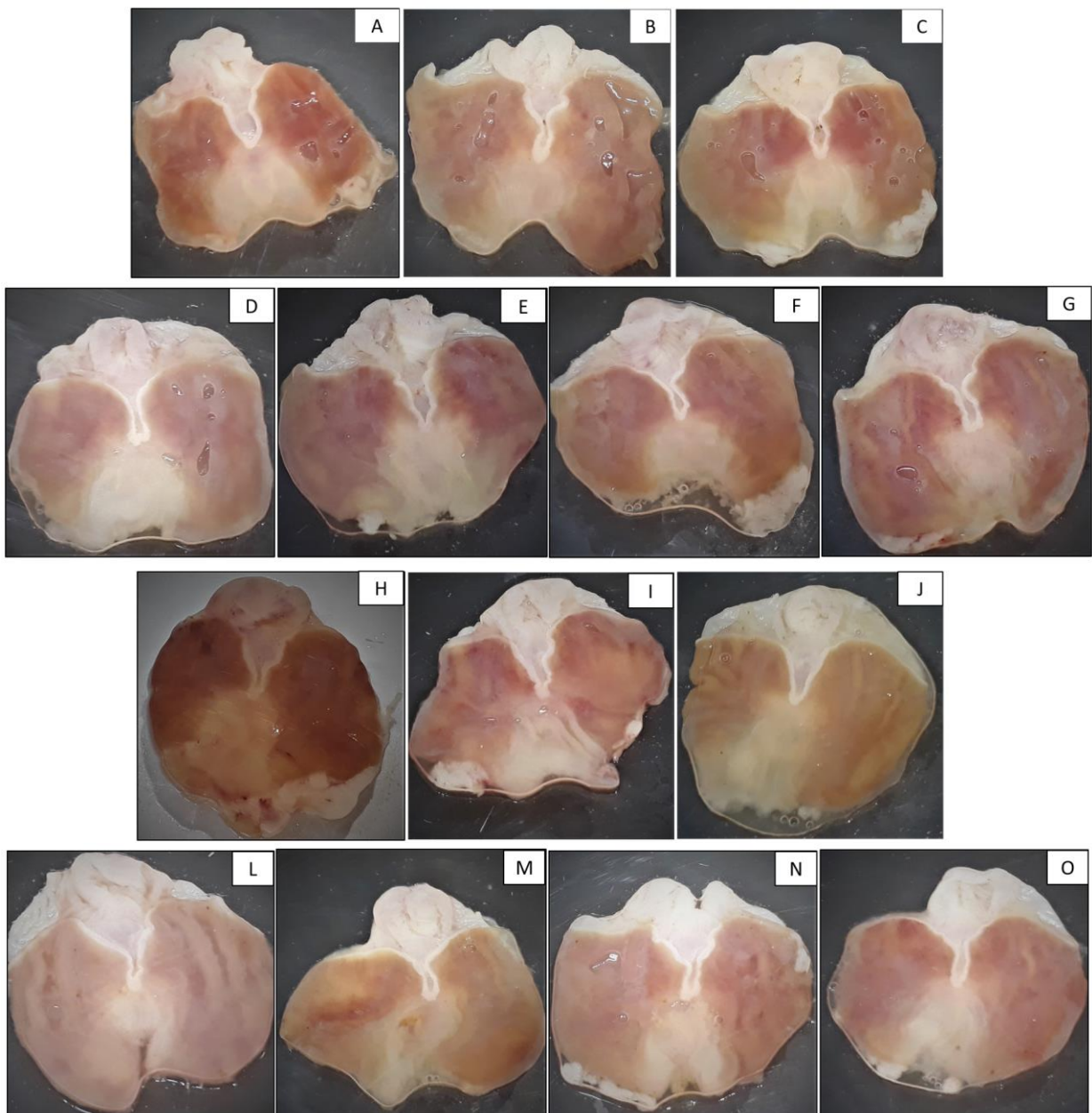
Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Notas: Os valores estão expressos como média ± E.P.M. Teste t, com significância de 5%. Grupo veículo: água desmineralizada em Tween 80 0,05 mg/kg (n=3). PAE: extrato de *P. amarus* (n=4); MgCl₂: Cloreto de magnésio P.A. (n=3) PAE+MgCl₂ = extrato de *P. amarus* + cloreto de magnésio, (n=4). HDL: lipoproteínas de alta densidade; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase. *p<0,05 vs veículo.

4.7 Avaliação de estômagos de ratas tratadas com dose única de 2000 mg/kg de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂.

A análise macroscópica dos estômagos dos animais tratados com dose única de PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ estão apresentados na **Figura 10**. A avaliação demonstrou que não foram identificadas lesões na mucosa gástrica dos animais, como ausência de pregas, edemas e hemorragia no tecido gástrico.

Figura 10 – Avaliação de estômagos de ratas tratadas com dose única de 2000 mg/kg. (A, B e C) Grupo veículo. (D, E, F e G) Grupo PAE. (H, I e J) Grupo MgCl₂. (L, M, N e O) Grupo PAE+MgCl₂.



5. Discussão

5.1 Citotoxicidade do PAE, MgCl₂ e PAE+MgCl₂ contra células peritoneais de murinos e células Raw

O PAE, nas concentrações testadas, reduziu a viabilidade celular de forma dependente da concentração e apresentou concentração citotóxica média (CC₅₀) igual a 193,96 µg/mL (**Figura 5**) enquanto o MgCl₂ não causou citotoxicidade aos macrófagos (**Figura 6**) e apresentou CC₅₀ maior que 800 µg/mL. O PAE+MgCl₂ apresentou CC₅₀ igual a 50 µg/mL e observou-se que todas as concentrações testadas reduziram a viabilidade celular de forma dependente da concentração. Entretanto, estudos anteriores sobre viabilidade celular do extrato etanólico de *P. amarus* em células imunes isoladas de ratos relataram que *P. amarus* não exerceu efeito citotóxico e mais de 90% de viabilidade celular foi registrada em ratos tratados com extratos de *P. amarus* em doses variando de 100 a 400 mg/kg (JANTAN et al., 2015). De acordo com a ISO 10993-5 (2009), caso a viabilidade seja reduzida para menor que 70% do branco, ela tem um potencial citotóxico.

A análise química do extrato de *P. amarus* realizado para a presente pesquisa, comprovou a presença de importantes lignanas como a filantina, hipofilantina, filtetralina, nirtetralina e nirantina (Figura 4). Pesquisas anteriores têm relatado que a filantina, um dos componentes principais de *P. amarus*, provocou efeito hepatoprotetor e antioxidante em pesquisas sobre estresse oxidativo induzido por etanol em hepatócitos de ratos (CHIRDCHUPUNSEREE, H; PRAMYOTHIN, P. 2010) e células hepáticas humanas (SUKKETSIRI; SAWANGJAROEN; TANASAWET, 2016).

A filantina e a hipofilantina também foram investigadas sobre seus potenciais antitumorais em linhagens celulares de câncer de mama (PARVATHANENI et al., 2014), carcinoma (ISLAM et al. 2008) e sobre possíveis vias de sinalização que inibiram a resposta inflamatória em células leucêmicas humanas (HARIKRISHNAN et al., 2018). Em outro estudo, os efeitos anti-apoptóticos, antioxidantes e anti-inflamatórios do extrato aquoso padronizado de *P. amarus*, utilizado no tratamento de colite em ratos, foram atribuídos ao efeito protetor da filantina e da hipofilantina (KIEMER et al. 2003; JANTAN et al., 2016). Diante do exposto, o extrato de *P. amarus* é promissor no desenvolvimento de drogas, devido à presença de

substâncias bioativas com importantes atividades farmacológicas, como as lignanas filantina e hipofilantina.

5.2 Ensaio de toxicidade aguda em ratos

O teste de toxicidade aguda de PAE, $MgCl_2$ ou PAE+ $MgCl_2$ foi conduzido empregando-se a via de administração oral, por ser a forma na qual as pessoas normalmente fazem uso dos preparados de plantas para fins medicinais. Na avaliação pré-clínica da toxicidade aguda não ocorreu mortes de animais em nenhum grupo, durante os 14 dias de observação. Desta forma, estima-se que a DL50 das substâncias testadas é maior que 2000 mg/kg.

Os ratos utilizados na análise de toxicidade aguda foram submetidos a avaliação dos parâmetros bioquímicos sanguíneos após 14 dias de observação. Os níveis séricos de aminotransferases (AST e ALT) são importantes indicadores de lesão dos hepatócitos (HESSEL, 1996). O presente estudo sugere que o uso das substâncias testadas de forma aguda pode não ser hepatotóxico, corroborando os estudos de Pramyothin et al., (2007). Outras pesquisas mostram que o extrato das folhas de *P. amarus* pode proteger o fígado contra danos oxidativos induzidos pelo etanol, possivelmente reduzindo a taxa de peroxidação lipídica e aumentando o mecanismo de defesa antioxidante em ratos (FAREMI et al., 2008). Além disso, outros estudos mostram que *P. amarus* possui em sua constituição substâncias bioativas, como a filantina, com função hepatoprotetora (SETHIYA et al. 2015; KHENG et al. 2015; JIA et al. 2016).

O peso corporal e o peso dos órgãos vitais não foram alterados em grupos que foram tratados com filantina, com doses variando entre 20 e 100 mg/kg, em relação ao grupo controle. Além disso, a administração oral de filantina diariamente com 20, 40 e 100 mg/kg por 14 dias consecutivos, não alterou significativamente o nível sérico dos parâmetros bioquímicos hepáticos AST e ALT (ILANGKOVAN; JANTAN; BUKHARI, 2016).

Neste trabalho não foram evidenciadas alterações nos valores de ureia, creatinina e ácido úrico, sugerindo que o tratamento com PAE, $MgCl_2$ e PAE+ $MgCl_2$ não provocou sobrecarga renal. A uréia, o produto final do metabolismo protéico, é excretada pelos rins. Os túbulos renais reabsorvem 40% desse produto, portanto, os níveis sanguíneos desse parâmetro constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER et al., 2001;

PASUPATHY et al., 2011). A creatinina também é indicada para verificar a função renal, uma vez que a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante, porém não é reabsorvida nos túbulos renais como a uréia (STEVEN; SCOTT, 2002). Portanto, a elevação nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico (VIJAYALAKSHMI et al., 2000; ADEBAYO et al., 2003).

Estudos sobre nefrotoxicidade induzida por paracetamol e gentamicina demonstraram que a espécie *P. amarus* atenuou os efeitos renais deletérios ocasionados pelas drogas (ADENEYE; BENEBO, 2008). Além disso, estudos fitoquímicos do extrato de *Phyllanthus amarus* relataram o isolamento e a determinação da presença de lignanas que podem ser responsáveis pela atividade nefroprotetora do extrato, sugerindo uma alternativa para a descoberta de um novo medicamento para o tratamento de nefrotoxicidade induzida por drogas (ADENEYE; BENEBO, 2008).

Sugere-se que o extrato administrado de forma aguda é bem tolerado por via oral em ratos, não interferindo na coordenação motora e nem em atividades relacionadas ao Sistema nervoso Central e Sistema Nervoso Autônomo. Além disso, não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos (fígado, coração, rins, estômago, baço, pulmões) dos animais tratados com PAE, MgCl₂ ou PAE+MgCl₂ na dose de 2000 mg/kg. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a toxicidade subcrônica e crônica em roedores.

6. Conclusões

Nas maiores concentrações testadas (200, 400 e 800 µg/mL) de PAE e PAE+MgCl₂ observou-se maior redução na viabilidade celular de linhagens de células de macrófagos, enquanto o MgCl₂ não causou citotoxicidade. Porém são necessários mais estudos que definam e caracterizem melhor a toxicidade destes compostos.

O teste farmacológico de dose única de PAE, MgCl₂ ou PAE+MgCl₂ por via oral não revelou a presença de sinais de toxicidade, não tendo ocorrido morte, podendo ser considerado seguro quando administrado por via oral. O tratamento com PAE, MgCl₂ ou PAE+MgCl₂ não produziu efeito tóxico em ratos tratados com dose de 2000 mg/kg, demonstrando ausência de toxicidade em parâmetros hepáticos e renais. No entanto, são necessários estudos mais prolongados para

averiguar possíveis danos no sistema fisiológico decorrente da administração crônica, bem como análises histopatológicas de órgãos vitais.

Referências

ADEBAYO, J. O.; YAKUBU, M. T.; EGWIM, E. C.; OWOYELE, V. B.; ENAIBE, B. U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **J. Ethnopharmacol.** v. 88, n. 1, p. 69-72, 2003.

ADENEYE, A. A. The leaf and seed aqueous extract of *Phyllanthus amarus* improves insulin resistance diabetes in experimental animal studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 705-711, 2012. doi:10.1016/j.jep.2012.10.017.

ADENEYE, A. A.; BENEBO, A. S. Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen-induced nephrotoxic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, n. 2, p. 318-323, 2008.

BECKER, R. A.; PLUNKETT, L. M.; BORZELLECA, J. F.; KAPLAN, A. M. Tiered toxicity testing: Evaluation of toxicity-based decision triggers for human health hazard characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 12, p. 2454-2469, 2007.

CASPI, R.; ALTMAN, T.; DREHER, K.; FULCHER, C. A.; SUBHRAVETI, P.; KESELER, I. M.; KOTHARI, A.; KRUMMENACKER, M.; LATENDRESSE, M.; MUELLER, L. A.; ONG, Q.; PALEY, S.; PUJAR, A.; SHEARER, A. G.; TRAVERS, M.; WEERASINGHE, D.; ZHANG, P.; KARP, P. D. The meta cyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 40, p. 742-753, 2012.

CHIRDCHUPUNSEREE, H; PRAMYOTHIN, P. Protective activity of phyllanthin in ethanol-treated primary culture of rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 172-176, 2010.

DE BAAIJ, J. H. F.; HOENDEROP, J. G. J.; BINDELS, R. J. M. Magnesium in man: implications for health and disease. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 1, p.1-46, 2015. doi:10.1152/physrev.00012.2014

FAREMI, T. Y.; SURU, S. M.; FAFUNSO, M. A. & OBIOHA, U. E. Hepatoprotective potentials of *Phyllanthus amarus* against ethanol-induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2658-2664, 2008. doi:10.1016/j.fct.2008.04.022.

GBADAMOSI, I. T. Antibacterial attributes of extracts of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus niruri* on *Escherichia coli* the causal organism of urinary tract infection. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 7, p. 80-86, 2015. <https://doi.org/10.5897/JPP20>.

HARIKRISHNAN, H.; JANTAN, I.; HAQUE, M. A.; KUMOLOSASI, E. Phyllanthin from *Phyllanthus amarus* inhibits LPS-induced proinflammatory responses in U937

macrophages via downregulation of NF- κ B/MAPK/PI3K-Akt signaling pathways. **Phytotherapy Research**, 2018. doi:10.1002/ptr.6190.

HESSEL, G.; DE SANTI-NETO, D.; COLLARES, E.F. Correlation between the severity of acute hepatic necrosis induced by acetaminophen and serum aminotransferase levels in rats fasted and sucrose-fed rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 793-79, 1996.

ILANGKOVAN, M.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. A. Phyllanthin from *Phyllanthus amarus* inhibits cellular and humoral immune responses in Balb/C mice. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1441-1450, 2016. doi:10.1016/j.phymed.2016.08.002

ISLAM, A.; SELVAN, T.; MAZUMDER, V.K.; GUPTA, M.; GOSHAL, S. Anti-tumour effect of phyllanthin and hypophyllanthin from *Phyllanthus amarus* against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmacol. V.2**, p. 796-807, 2008.

ISO. Biological evaluation of medical Devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. ISO 10993-5. 3ed. 2009. Disponível em <https://www.sis.se/api/document/preview/911177/>. Acesso em 20 de agosto de 2019.

JANTAN, I.; YUANDANI, Y.; ILLANGO VAN, M.; HUSAIN, K.; CHAN, K. M. Inhibitory effects of compounds from *Phyllanthus amarus* on nitric oxide production, lymphocyte proliferation, and cytokine release from phagocytes. **Drug Design, Development and Therapy**, 1935, 2016. doi:10.2147/dddt.s105651

JANTAN, I.; ILANGKOVAN, M.; MESA IK, M. A.; ABBAS BHUKARI, S. N. Immunosuppressive effects of the standardized extract of *Phyllanthus amarus* on cellular immune responses in Wistar-Kyoto rats. **Drug Design, Development and Therapy**, 4917, 2015. doi:10.2147/dddt.s88189

JIA, R.; DU, J.L.; CAO, L.P.; LIU, Y.J.; XU, P.; YIN, G.J. Protective action of the phyllanthin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in *Cyprinus carpio*. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.** v. 52, p. 1-9, 2016.

KHENG, L.O.; SUH, I.L.; MUNAVVAR, A.S.; TENGGU, T.M.; SHAIDA, F.S. Cytotoxic, caspase-3 induction and *in vivo* hepatoprotective effects of phyllanthin, a major constituent of *Phyllanthus niruri*. **J. Func. Foods**. v. 14, p. 236–243, 2015.

KIEMER, A.K.; HARTUNG, T.; HUBER, C.; VOLLMAR, A. M. *Phyllanthus amarus* has antiinflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF κ B pathway. **J. Hepatol.** v. 3, p. 289-297, 2003.

KUMAR, S.; CHANDRA, P.; BAJPAI, V.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, D. K.; KUMAR, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 143-152, 2015. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.02.012.

LONDHE, J. S.; DEVASAGAYAM, T. P.; FOO, L. Y.; GHASKADBI, S. S. Antioxidant activity of some polyphenol constituents of the medicinal plant *Phyllanthus amarus* Linn. **Redox Report**, v. 13, p. 199-207, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

OLIVEIRA, L. G. C. et al. In vitro effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran against *Leishmania amazonensis*. **Basic & Clin Pharm & Toxicol**, v. 1, n.1 p. 1-7, 2017.

PASUPATHY, P.; DHANALAKSHMI, G.; PONNUSHA, B.D.; AMBIKA, A. Cystatin C: A novel marker for renal failure. **Int J Cur Bio Med Sci.**, v. 1, n. 3, p. 120-125, 2011.

PEREIRA, R. G. et al. Supercritical fluid extraction of phyllanthin and niranthin from *Phyllanthus amarus* Schum.&Thonn. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 23-32, 2017.

PRAMYOTHIN, P.; NGAMTIN, C.; POUNGSHOMPOO, S.; CHAICHANTIPYUTH, C. Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: In vitro and in vivo studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 169-173, 2007. doi:10.1016/j.jep.2007.07.037.

PUTAKALA, M.; SUDHAKARA, G.; SRINIVASULU, N.; BONGU, S. B. R.; CHINTAKUNTA, N.; DESIREDDY, S. Assessment of in vitro antioxidant potential and quantification of total phenols and flavonoids of aqueous extract of *Phyllanthus amarus*, **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** v. 7, n. 439-445, 2015.

PUTAKALA, M.; GUJJALA, S.; NUKALA, S.; BONGU, S. B. R.; CHINTAKUNTA, N.; DESIREDDY, S. Cardioprotective effect of *Phyllanthus amarus* against high fructose diet induced myocardial and aortic stress in rat model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1359-1368, 2017. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.054

QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L. G.; GUIMARÃES, M. A.; SANTOS, R. C.; LIMA, D. F.; NASCIMENTO, C.; SILVA, M. P. N.; SOARES, M. J. S.; ROPKE, C. D.; EATON, P.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. **J. Ethnopharmacol.** v. 175, p. 287-294, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.026>.

SCHOSSLER, D.; ALIEVI, M. M.; EMANUELLI, M. P.; SCHOSSLER, J. P. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de *flunixin meglumine* e Ketoprofeno durante e trans e pós-operatório. **Acta Cir. Bras.** v.16, n. 1, p. 46-51, 2001.

SCHUTTEN, J. C.; JOOSTEN, M. M.; DE BORST, M. H.; BAKKER, S. J. L. Magnesium and Blood Pressure: A Physiology-Based Approach. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 25, n. 3, p. 244-250, 2018. doi:10.1053/j.ackd.2017.12.003

SETHIYA, N. K.; SHAH, P.; RAJPARA, A.; NAGAR, P. A.; MISHRA, S. H. Antioxidant and hepatoprotective effects of mixed micellar lipid formulation of phyllanthin and piperine in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. **Food Funct.** v. 11, p. 3593-3603, 2015.

SHOKUNBI, O. S.; ODETOLA, A. A. Gastroprotective and antioxidant activities of *Phyllanthus amarus* extracts on absolute ethanolinduced ulcer in albino rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 10, p. 261-267, 2008.

STEVEN, L. S.; SCOTT, M. S. Urinary sistem. In: Fundamentals of veterinary clinical pathology. Iowa: Iowa State; p. 277-336, 2002.

SUKKETSIRI, W.; SAWANGJAROEN, K.; TANASAWET, S. Anti-apoptotic effects of phyllanthin against alcoholinduced liver cell death. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 981, 2016. doi:10.4314/tjpr.v15i5.12.

VAN LAECKE, S.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Hypomagnesaemia, the kidney and the vessels. *Nephrol. Dial. Transpl.* v. 27 p. 4003-4010, 2012.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **J. Ethnopharmacol.** v. 69, n. 1, p. 9-15, 2000.

YAO, N. G.; KAMAGATÉ, M.; AMONKAN, A. K.; KOFFI, C.; KPAHE, F.; KOUAMÉ M. N.; DIÉKACOU, H. Comparative effects of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* and its fractions on urinary excretion in rat. **J. Phytopharmacol**, v. 5, n. 5, p. 182-184, 2016.

YAO, A. N.; KAMAGATÉ, M.; AMONKAN, A. K.; CHABERT, P.; KPAHÉ, F.; KOFFI, C.; DIE-KAKOU, H. The acute diuretic effect of an ethanolic fraction of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) in rats involves prostaglandins. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 2018. doi:10.1186/s12906-018-2158-0.

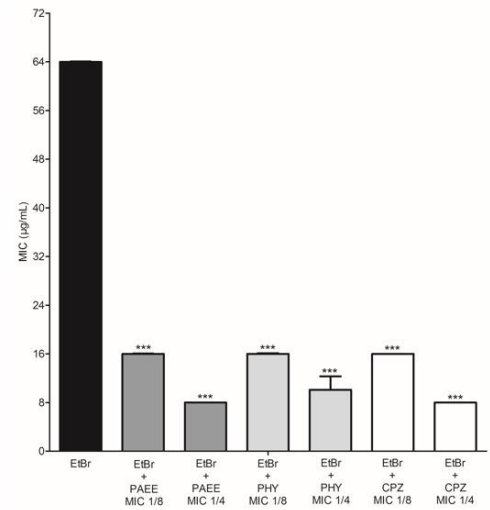
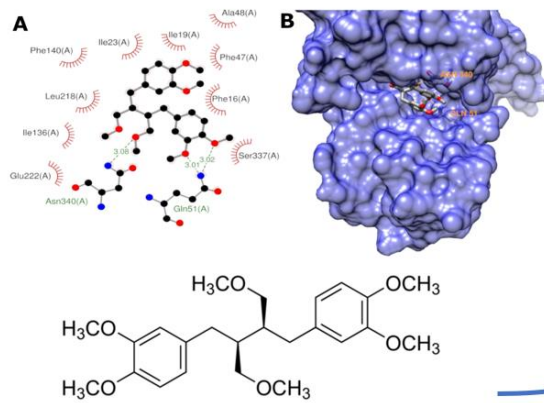
HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n.9, p. 686-699, 2005. doi:10.1016/j.annepidem.2005.02.004

Páginas Restritas
103 a 161 (Capítulo 2)

CAPÍTULO 3

Atividade antimicrobiana do extrato de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. e a atuação da Filantina na inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*

Resumo Gráfico



Atividade antimicrobiana do extrato de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. e a atuação da Filantina na inibição de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *P. amarus* (PAEE) e um de seus componentes principais, a Filantina, contra bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e leveduras, além de investigar se estes compostos naturais poderiam modular a resistência à fluoroquinolona em *S. aureus* SA1199-B por via da superexpressão da bomba de efluxo NorA. Testes de microdiluição foram realizados para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do PAEE ou Filantina contra várias cepas bacterianas e leveduras. PAEE mostrou atividade antimicrobiana contra cepas Gram-negativas, enquanto a Filantina foi inativa contra todas as cepas testadas. Para avaliar se o PAEE ou Filantina foram capazes de agir como moduladores da resistência às fluoroquinolonas, as CIMs para Norfloxacin e brometo de etídio foram determinadas na presença ou ausência de PAEE ou Filantina contra *S. aureus* SA1199-B. A adição de PAEE ou Filantina aos meios de crescimento em concentrações sub-inibitórias aumentou a atividade da Norfloxacin, bem como, Brometo de Etídio, contra *S. aureus* SA1199-B. Estes resultados indicam que a Filantina é capaz de modular a resistência às fluoroquinolonas, possivelmente por inibição de NorA. Esta hipótese foi apoiada pela análise *in silico docking*, que confirmou que a Filantina é um ligante NorA. Assim, este composto pode ser utilizado como um agente potencializador da atividade da norfloxacin no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistente a fluoroquinolonas.

Palavras-chaves: *Phyllanthus amarus*, Filantina, *Staphylococcus aureus*, fluoroquinolonas, resistência bacteriana, bombas de efluxo.

Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. and Phyllanthin in inhibiting efflux pumps in *Staphylococcus aureus*

Abstract

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the *P. amarus* ethanolic extract (PAEE) and Filantina against Gram-Positive, Gram-Negative and yeast bacteria, and to investigate whether these natural compounds could modulate the resistance to fluoroquinolone in *S. aureus* SA1199-B via overexpression of the NorA efflux pump. Microdilution tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of PAEE or Phyllanthin against various bacterial strains and yeasts. PAEE showed antimicrobial activity against Gram-negative strains, while Phyllanthin was inactive against all strains tested. To assess whether PAEE or Phyllanthin were able to act as modulators of fluoroquinolone resistance, MICs for norfloxacin and ethidium bromide were determined in the presence or absence of PAEE or Phyllanthin against *S. aureus* SA1199-B. Addition of PAEE or Phyllanthin to growth media at subinhibitory concentrations increased the activity of norfloxacin as well as, ethidium bromide against *S. aureus* SA1199-B. These results indicate that Phyllanthin is able to modulate resistance to fluoroquinolones, possibly by inhibition of NorA. This hypothesis was supported by in silico docking analysis, which confirmed that Phyllanthin is a NorA binder. Thus, this compound can be used as a potentiating agent of norfloxacin activity in the treatment of infections caused by fluoroquinolone resistant *S. aureus*.

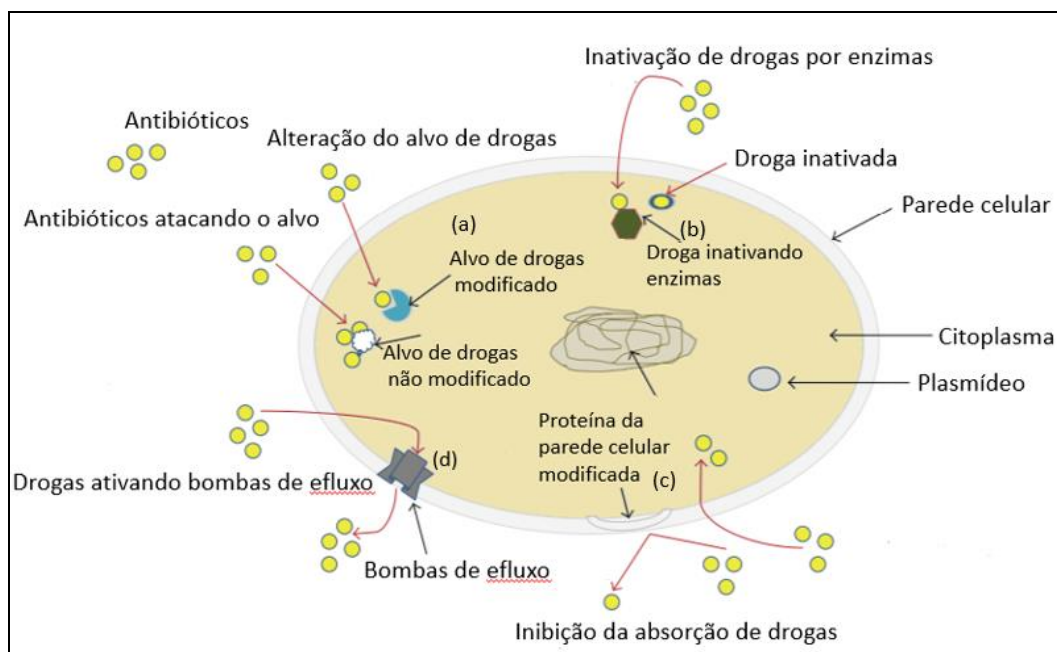
Key words: *Phyllanthus amarus*, Phyllanthin, *Staphylococcus aureus*, fluoroquinolones, bacterial resistance, efflux pumps.

1. Introdução

Phyllanthus amarus Schumach. & Thonn (Phyllanthaceae), popularmente conhecida como quebra-pedra, é uma erva medicinal amplamente distribuída em ambientes tropicais e subtropicais e utilizada para o tratamento de várias doenças devido às suas propriedades medicinais e farmacológicas (KHATOON et al., 2006; PATEL et al., 2011). Estudos sobre *P. amarus* têm validado antioxidantes (PUTAKALA et al., 2015), atividade gastroprotetora (SHOKUNBI e ODETOLA, 2008), cardioprotetora (PUTAKALA et al., 2017) e antimicrobiana, incluindo as bactérias multirresistentes (MAZUMDER et al., 2006; ADEGOKE et al., 2010; BABATUNDE et al., 2014). A filantina e a hipofilantina são as principais lignanas presentes em *P. amarus* (PEREIRA et al., 2017) e se destacam por apresentarem atividade vasorrelaxante (INCHOO et al., 2011), anti-tumor (ISLAM et al., 2008) e antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2019).

A prevalência de doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos multirresistentes aumentou em todo o mundo (CHUA et al., 2014; VALI et al., 2015). Vários mecanismos de resistência bacteriana (**Figura 1**) têm sido caracterizados e estudados, como a diminuição do influxo de antibióticos, inativação enzimática do antibiótico ou seu alvo, mutações, resultando em menor afinidade do antibiótico pelo seu alvo, além das bombas de efluxo ativas capazes de expulsar antibióticos para o meio extracelular (REDGRAVE et al., 2014).

Figura 1 - Mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2013.

Legenda: (a): Modificação do alvo do fármaco; (b): inativação do fármaco por enzimas; (c): redução da permeabilidade do fármaco por modificação de membrana; (d): efluxo ativo de drogas da célula bacteriana.

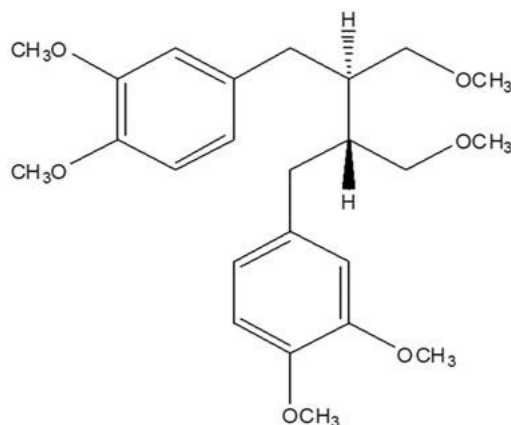
Dentre os microrganismos que apresentam os mecanismos de resistência anteriormente citados, a espécie *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) tem se destacado por causar altas taxas de mortalidade em pacientes infectados. O *S. aureus* MRSA é responsável por várias infecções de difícil tratamento no ser humano, incluindo infecções da pele e dos tecidos moles, septicemia, endocardite (CAHILL et al., 2017; HABIB et al., 2015; ASGEIRSSON et al., 2017), pneumonia (WUNDERINK et al., 2012), enterite, meningite, osteomielite e síndrome do choque tóxico, representando uma ameaça significativa à saúde global.

Desta forma, produtos naturais capazes de inibir os mecanismos de resistência têm sido utilizados em combinação com antibióticos (BEYTUR et al., 2014). Inibidores naturais ou sintéticos de bombas de efluxo têm sido propostos para seu possível uso como potencializadores da eficácia dos antimicrobianos contra a resistência dos microrganismos (COELHO et al., 2016; COSTA et al., 2016).

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana intrínseca do extrato de *P. amarus* (PAEE) e seu componente Filantina (PHY) (**Figura 2**). Além disso, foi investigado sobre a participação do PAEE ou da PHY em

modular a resistência à fluoroquinolona em *S. aureus* SA1199-B superexpressando o efluxo da bomba NorA.

Figura 2 - Estrutura química da filantina.



Fonte: HANH, SINCHAIPANID; MITREVE, 2013.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal e obtenção do extrato etanólico de *P. amarus* Schumach. & Thonn

As partes aéreas de *P. amarus* (**Figura 3**) foram coletadas na cidade de Angical do Piauí (latitude 06°05'09 "sul e longitude 42°44'20" oeste), Piauí, Brasil. A exsicata da espécie *P. amarus* foi levada ao Herbário Graziela Barroso, da Universidade Federal do Piauí (UFPI), a qual foi identificada pelo pesquisador Dr. Marcos José da Silva da Universidade Federal do Goiás (UFG), e depositada sob registro TEPB: 30821. A espécie foi cadastrada no SISGEN sob identificação A0ABD12.

Figura 3 - Partes aéreas de *P. amarus* Schumach. & Thonn.



O material vegetal foi macerado em etanol a 99% por 3 semanas, com filtragem e troca do reagente a cada 7 dias. Em seguida, o filtrado foi submetido ao rotaevaporador a 45 °C para a remoção do solvente e liofilizador para a obtenção final do extrato de *P. amarus* (PAEE) (QUELEMES et al., 2015).

2.2 Filantina

A Filantina (PHY) utilizada neste estudo foi adquirida da Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA. As soluções estoques de PHY foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO-MERCK).

2.3. Análise química do extrato etanólico de *P. amarus* Schumach. & Thonn

Aproximadamente 2 mg de PAE foram colocados em frascos de fundo redondo e selados com um septo de borracha. O sistema de reação foi purgado com nitrogênio e adicionadas duas gotas de piridina, recentemente destilada. A mistura reacional foi agitada até completa dissolução. Em seguida, 100 µL de N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) + trimetilclorosilano 1% (TMCS) foram adicionados. O sistema foi aquecido para 85 °C sob agitação e atmosfera inerte durante 1 h. Os constituintes foram analisados com o equipamento SHIMADZU GC-17A acoplado a espectrometria de massas GCMS-QP5050A, equipado com uma coluna capilar MS5 (30 mm x 0,2 mm x 0,2 µm espessura do filme) e a fonte de íons foi operada no modo de impacto de elétrons (EI) a 70 eV.

Um µL da mistura dos produtos foi injetado em modo split (1:30) e em uma temperatura de 300 °C e temperatura de interface de 300 °C. O programa de temperatura do forno foi a partir de temperatura inicial de 120 °C, com tempo inicial de 2 min, que foi aumentando para 300 °C a 10 °C min⁻¹. O gás hélio (99,9999%) foi utilizado como gás carreador a um fluxo de 1 mL/min⁻¹. O quadrupolo do espectrômetro de massa foi operado em modo de varredura completa na faixa de massa de 40 a 650 Da. O tempo total de varredura para uma corrida cromatográfica foi de 40 minutos. A identificação de constituintes foi feita por comparação de espectros de massa com bibliotecas computacionais Wiley 229 e NIST.

2.4 Cepas microbianas e drogas

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus*

epidermidis ATCC 12228; *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615), Gram negativas (*Serratia marcescens* ATCC 8100; *Escherichia coli* ATCC 25923; *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e uma estirpe de levedura (*Candida albicans* ATCC 10231). O efeito modulador da resistência à fluoroquinolona foi verificado em *S. aureus* SA1199-B, que superexpressa o gene *norA*.

As cepas bacterianas foram mantidas em placas de ágar nutriente (BHI, Himedia, Índia) e as leveduras em ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Himedia, Índia) a 4°C. No dia anterior aos testes, as cepas bacterianas foram semeadas overnight a 37°C em caldo cérebro-coração (BHI, Himedia, Índia) e as leveduras em caldo Sabouraud Dextrose (SDB, Himedia, Índia). Ciprofloxacina (Cip), Norfloxacina (Nor) e brometo de etídio (EtBr) foram obtidos da Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA. Antibióticos e EtBr foram dissolvidos em água estéril.

2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca

Esse ensaio teve por objetivo a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração microbicida mínima (CMM) para cada micro-organismo, a fim de conhecer o espectro de ação de PAEE e PHY. As soluções estoque de PAEE e PHY (10 mg/mL) foram preparadas em DMSO e, em seguida, foram diluídas em água destilada esterilizada para uma concentração final de 1.024 µg/mL.

Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas por ensaio de microdiluição, utilizando caldo BHI para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras (BARRETO et al., 2014), suspensões de células com aproximadamente 10^5 UFC/mL e soluções de PAEE variando de 8 a 512 µg/mL. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e então foram acrescidos 20 µL de resazurina (0,01% p / v em água destilada estéril) em cada poço para detectar o crescimento bacteriano pela mudança da cor do azul para o róseo (HUSSAIN et al., 2011).

As CIMs foram definidas como a concentração mais baixa na qual não foi observado crescimento microbiano. A inibição do crescimento microbiano foi confirmada transferindo uma alíquota de cada poço da microplaca utilizada no ensaio de CIM para uma placa com ágar BHI para as bactérias e ágar Sabouraud

Dextrose para as leveduras. Após 24 h de incubação a 37 °C foi verificado o crescimento dos micro-organismos.

2.6 Modulação dos ensaios de resistência à fluoroquinolona

Para avaliar se PAEE ou PHY foram capazes de modular a resistência aos antibióticos em *S. aureus* SA1199-B, CIM do antibiótico norfloxacin foi determinado na presença ou ausência de concentrações sub-inibitórias de cada produto natural (1/8 ou 1/4 MIC). As concentrações de antibióticos variaram de 0,125 a 128 µg/mL. Placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 24 h e as leituras foram realizadas com resazurina, como previamente descrito.

Para verificar se a modulação de resistência às drogas ocorreu devido à inibição da bomba de efluxo, o ensaio de modulação foi realizado substituindo norfloxacin por EtBr, um substrato conhecido de bombas de efluxo (MARKHAM et al., 1999) aqui usado como um indicador de inibição da bomba de efluxo. Também foram realizados ensaios de controle substituindo PAEE ou PHY por clorpromazina (CPZ), que é um conhecido inibidor da bomba de efluxo (NEYFAKH et al., 1993)

2.7 Previsão de estrutura de NorA e análise de docking molecular

Para entender o modo de ligação da PHY foi gerado um modelo tridimensional de NorA que foi usado para simulações de acoplamento de ligantes. Para gerar o modelo, a sequência primária de aminoácidos de NorA foi recuperada do banco de dados NCBI GenBank (ID do GenBank: NP_001038224) e foi inserido no servidor web I-TASSER. O melhor modelo com maior escore de confiança (escore C) foi escolhido. Simulações Acoplamento ligand foram realizadas usando o AutoDock Vina com AutoDockTools (ADT). Foi definido o número de modos de ligação para 100 e exaustividade definido para 20. A pontuação do poses de encaixe geradas foram baseadas na função de pontuação Vina.

2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram normalizados por cálculo dos valores médios geométricos. Desvio de erro e desvio padrão da média geométrica foram reveladas. Diferenças entre o tratamento com antibióticos sozinho ou associados a PAEE, PHY ou clorpromazina foram analisados

utilizando análise de variância (ANOVA). As diferenças mencionadas acima foram analisadas pelo pós-teste de Bonferroni e $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados e discussão

3.1 Atividade antibacteriana intrínseca

A análise da composição química do PAEE por GCMS mostrou a presença das lignanas nirantina, hipofilantina, nirtetralina, filantina e filtetralina como compostos principais, seguido por lignana D e lignana 370 (**Tabela 1**), como relatado em estudos anteriores (PEREIRA et al., 2016). Nossos resultados também estão de acordo com outro estudo que identificou filantina e nirantina nas partes aéreas da planta (PEREIRA et al., 2017).

Tabela 1 - Constituintes do extrato das partes aéreas de *P. amarus* (PAEE).

Composto	Tempo de retenção (min)	Área de pico (%)
Filantina	19,950	12,39
Filtetralina	20,042	9,57
Nirtetralina	20,500	13,48
Hipofilantina	21,033	13,53
Nirantina	21,100	20,87
Lignana D	21,192	1,18
Lignana 370	21,367	1,97

As concentrações mínimas inibitórias (MIC) e mínimas microbidas (MMC) encontradas para PAEE contra as cepas microbianas estudadas foram testadas pelo método de microdiluição e são apresentadas na Tabela 2. Para Holetz et al., (2002), extratos de plantas podem apresentar boa, moderada e fraca atividade antimicrobiana ou inativos se apresentarem MIC abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$, variando entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ou acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

De acordo com este critério, o PAEE não apresentou atividade antimicrobiana intrínseca clinicamente relevantes (CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/ml}$) contra as cepas de bactérias Gram-positivas testadas (*S. aureus*-ATCC-25923, *Staphylococcus aureus*-1199-B, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*), bem como da cepa fúngica *Candida albicans* ATCC 10231. No entanto, o PAEE mostrou boa atividade antibacteriana contra as cepas Gram-negativas (CIM variando de 32 a 128 $\mu\text{g/mL}$), exibindo efeito microbicida para *Serratia marcescens* ATCC 8100 e *Escherichia coli* ATCC 25923 e efeito bacteriostático para *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (**Tabela 2**).

Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior que verificou uma boa atividade para o extrato etanólico das partes aéreas de *P. amarus* contra *Escherichia coli* (GBADAMOSI, 2015). Resultados semelhantes também foram encontrados para o extrato metanólico de *P. amarus* contra bactérias Gram-negativas (MAZUMDER; MAHATO; MAZUMDER, 2006).

Tabela 2 - Médias geométricas da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do Extrato de *P. amarus* (PAEE) contra diferentes cepas.

Microrganismos	(μg/mL)			Efeito
	CIM	MMC	MMC/MIC	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4096	4096	-	Nenhuma atividade
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	2048	≥ 4096	-	Nenhuma atividade
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	2048	≥ 4096	-	Nenhuma atividade
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	128	512	4.0	Bactericida
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	32	128	4.0	Bactericida
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	32	256	8.0	Bacteriostática
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	128	725	5.6	Bacteriostática
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1024	2048	-	Nenhuma atividade

ATCC: Coleção de cultura americana.

Ensaio de microdiluição com PHY, um dos principais compostos de PAEE, também foram realizados, no entanto, foi inativo contra todas as cepas testadas.

Estes resultados indicam que a PHY não é o componente antimicrobiano do *P. amarus* como sugerido anteriormente (MAZUMDER; MAHATO; MAZUMDER et al., 2006). No entanto, não podemos descartar uma possível sinergia entre a PHY e outros compostos fitoquímicos presentes no PAEE, que atuam na inibição das bactérias Gram-negativas.

3.2 Modulação da atividade antibiótica

A atividade moduladora do PAEE ou PHY sobre a resistência à norfloxacinina foi avaliada usando a estirpe SA1199-B, que superexpressa o gene *norA*, o qual codifica o transportador de múltiplos fármacos, conferindo resistência às fluoroquinolonas por efluxo ativo (KAATZ et al., 1995). Neste ensaio, o MIC para norfloxacinina foi determinado na ausência ou presença de PAEE ou PHY em concentrações subinibitórias. Os resultados mostraram que o PAEE melhorou a atividade da norfloxacinina, diminuindo em quatro vezes (de 64 a 16 µg/mL) a CIM desse antibiótico contra a estirpe SA1199-B (Figura 4A).

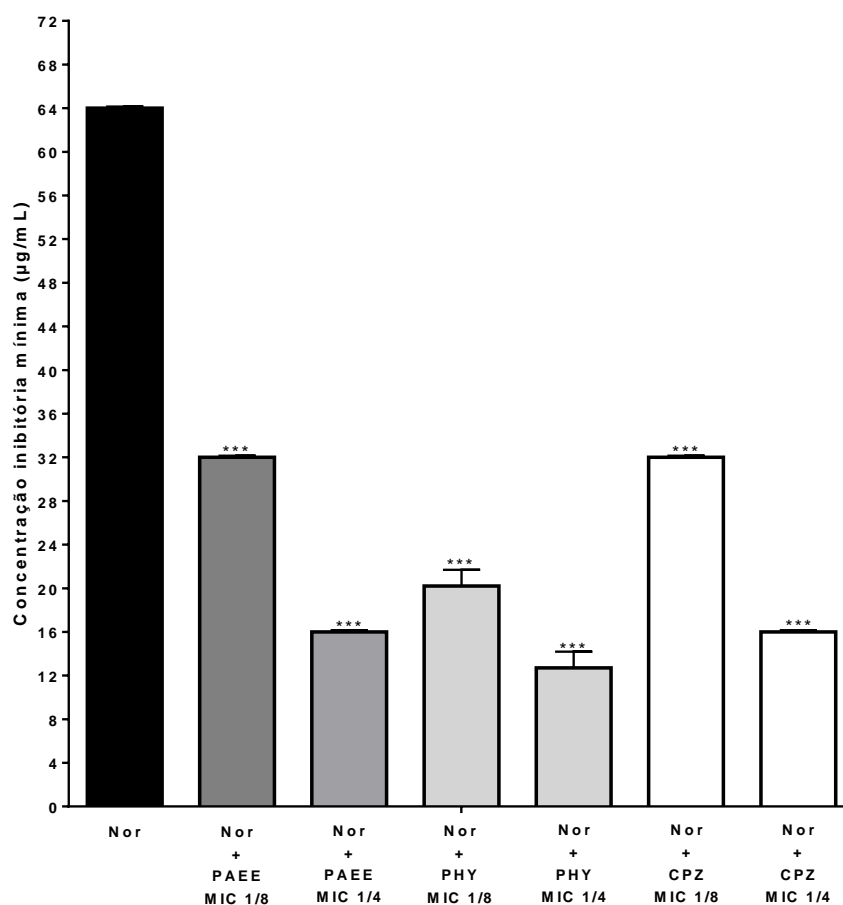
O efeito modulador do PAEE e PHY foi semelhante ao verificado para a clorpromazina (CPZ), um conhecido inibidor da bomba de efluxo (EPI) *NorA* comumente utilizada como controle positivo (NEYFAKH et al., 1993). Nossos resultados sugerem que o PAEE é formado por compostos capazes de modular a resistência às fluoroquinolonas em *S. aureus* superexpressando *NorA*, provavelmente por inibição de *NorA*.

O efeito modulador do PAEE também foi verificado quando o antibiótico foi substituído por brometo de etídio (EtBr) (**Figura 4B**), um conhecido substrato da bomba *NorA* e utilizado como controle positivo, cujo mecanismo de resistência é exclusivamente mediada por bombas de efluxo (MARKHAM, 1999). Este resultado indica que a modulação da resistência pelo PAEE pode ser devida à presença de inibidores de bomba *NorA* no extrato, levando à acumulação de EtBr nas células bacterianas.

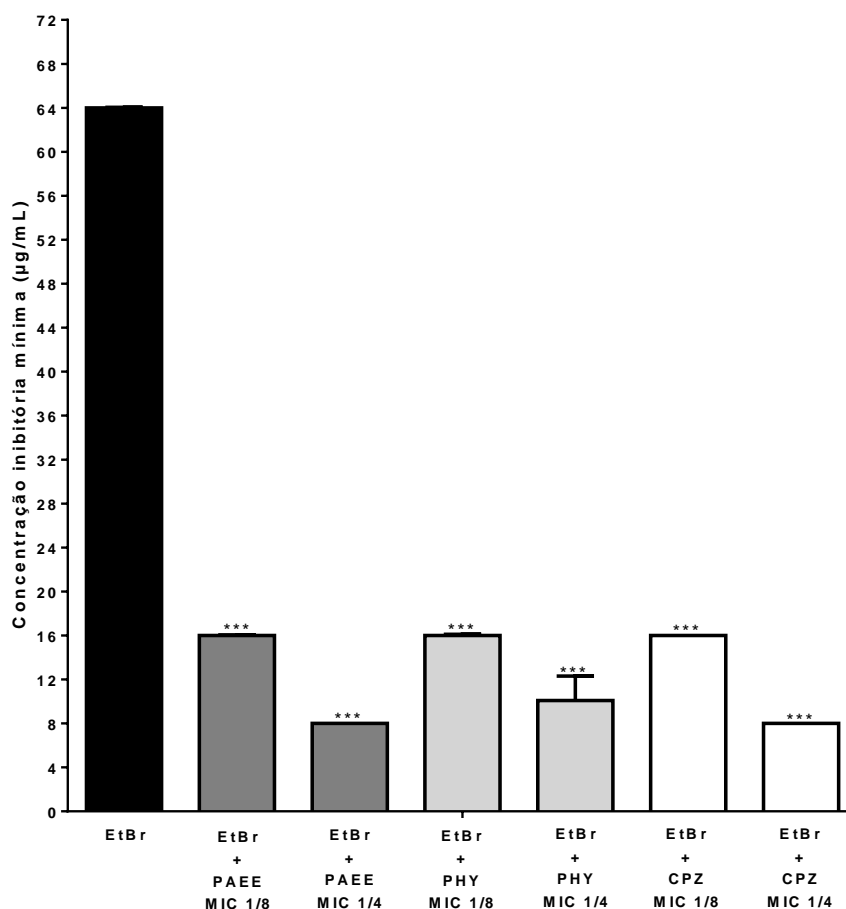
Os resultados encontrados para a PHY isolada mostraram que este composto apresentou melhor modulação da resistência à norfloxacinina do que o PAEE (**Figura 4A**), sendo capaz de diminuir a CIM de norfloxacinina em até 5 vezes (de 64 para 12,7 µg/mL) contra SA1199-B. Além disso, a PHY também foi capaz de modular a resistência ao EtBr indicando que a PHY é um dos inibidores de *NorA* presentes na composição do PAEE.

Figura 4 – Concentração inibitória mínima da Norfloxacin (Nor) **(A)** e Brometo de Etídio (EtBr) **(B)** na ausência ou presença de extrato etanólico de *Phyllanthus amarus* (PAEE), Filantina (PHY) ou Clorpromazina (CPZ) contra SA1199-B. Cada resultado é a média geométrica de três experimentos simultâneos. (****) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

A



B



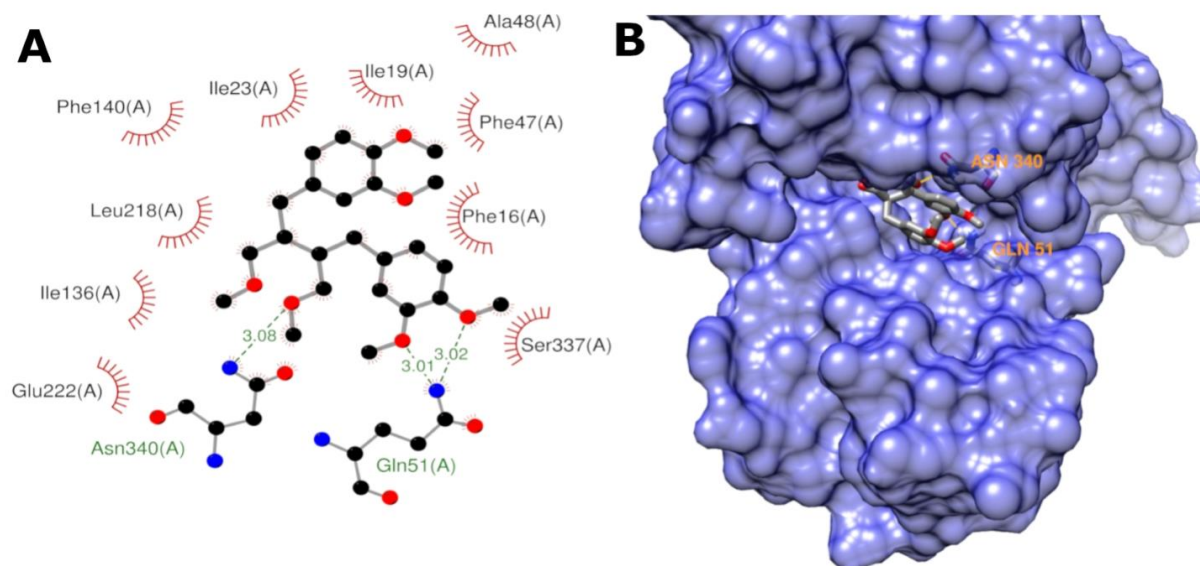
A inibição de bombas de efluxo de *S. aureus* foi relatada para diferentes compostos de plantas, tais como taninos (TINTINO et al., 2016; SANTOS et al., 2018), curcuminóides (JOSHI et al., 2014), flavonóides (SABATINI et al., 2011), terpenos (MILADI et al., 2016), cumarinas (ROY et al., 2013) e alcalóides (KALIA et al., 2012; COSTA et al., 2016).

Um estudo anterior verificou que o composto metoxilado 4',5,6,7 tetrametoxiflavona (log P=2.69) mostrou o melhor efeito modulador da resistência à norfloxacin na estirpe SA1199-B, sugerindo que o grau de lipofilicidade conferido pelos grupos metoxílicos é uma característica importante dos potenciais EPIs (KALIA et al., 2012). Além disso, um estudo recente relatou que a introdução de grupos metoxi no núcleo de 2-fenilquinolina melhorou a capacidade do derivado para inibir NorA (MAIA et al., 2011). Curiosamente, esse recurso é presente em PHY que tem

seis grupos metoxi e seu valor log P é $3,30 \pm 0,05$ a pH 7,48, sugerindo que a filantina é um composto lipofílico que pode ter boa permeabilidade através de membranas biológicas (FELICETTI et al., 2018).

Os resultados da análise de docagem molecular mostraram que PHY tem uma afinidade de ligação de $-6,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (**Figura 5**). Além disso, GLN51 e ASP510 estão envolvidos na ligação do hidrogênio entre o composto e o local de ligação NorA. Sequência múltipla de alinhamento do NorA com sequências protéicas pertencentes à família MFS revelou que Gln51 é conservado no domínio desta família (ROY et al., 2013). A interação com GLN51 desempenha um papel importante na ligação do ligante, como verificado para outro inibidor, como a Riparina-B (COSTA et al., 2016) Reserpina (HANH et al., 2013; ROY et al., 2013) e ginsenoside 20 (S)-Rh2 (HANH, et al., 2013). A ligação Asn340 e NorA foi observado em outros inibidores de NorA, como o ginsenosídeo 20 (S)-Rh2 (HANH et al., 2013) e Riparina-B. A orientação da filantina dentro da bolsa hidrofóbica forneceu estabilidade complexa adicional por fortes interações hidrofóbicas com os aminoácidos de NorA. Desta forma, a interação verificada entre a Filantina e NorA foi semelhante com outros estudos.

Figura 5 - Interação da filantina no local de ligação do NorA mostrando ligações H formação entre Filantina e GLN51 ou ASN340 que proporciona estabilidade ao complexo proteína/ligando (A). Orientação da filantina ligada à cavidade central da proteína (B).



Infecções causadas por *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) ainda é um sério problema de saúde pública que continua apresentando altas taxas de prevalência em hospitais e comunidades em todo o mundo (ZHANG et al., 2014). A superexpressão de bombas de efluxo é um importante mecanismo pelo qual o MRSA evita o efeito do antibiótico. Inibição das bombas de efluxo por compostos como PHY poderia ser uma estratégia promissora contra MRSA. Portanto, nossos resultados abrem a perspectiva de uma nova aplicação tecnológica da PHY como adjuvante da norfloxacina para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes às fluoroquinolonas por superexpressão de bombas de efluxo dependentes da força protônica como NorA.

4. Conclusão

O extrato das partes aéreas de *P. amarus* mostrou atividade antimicrobiana contra todas as cepas Gram-negativas testadas, mas foi inativa contra bactérias Gram-positivas e leveduras. Além disso, o extrato e um de seus compostos majoritários, a Filantina, foram capazes de potencializar a atividade antibiótica da norfloxacina contra o SA1199-B que superproduz a bomba de efluxo NorA. A

modulação da resistência à fluoroquinolona verificada neste estudo está relacionada com a inibição da bomba de efluxo dependente da força motriz próton NorA pela Filantina. Esta hipótese foi corroborada por docagem *in silico* entre Filantina e NorA. Assim, a filantina pode ser utilizada como adjuvante da norfloxacina no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistente a fluoroquinolona.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí, Universidade Federal do Piauí e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí pelo apoio financeiro.

Referências

- ADEGOKE, A. A.; IBERI, P. A.; AKINPELU, D. A.; AIYEGORO, O. A.; MBOTO, C. I. Studies on phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Phyllanthus amarus* against multiple antibiotic resistant bacteria. **Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.** v. 3: p. 6-12, 2010.
- ASGEIRSSON, H.; THALME, A.; WEILAND, O. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis – epidemiology and outcome: a review. **Infect. Dis. (Lond).** v. 6, p. 1-18, 2017.
- BABATUNDE, S. K.; ABUBAKARE, A. A.; ABDULRAHEEM, Y. J.; AJIBOYE, E. A. Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* on some human intestinal facultatively anaerobic flora. **Int. J. Med. Biomed. Res.** v. 3, p. 52-57, 2014. DOI: <https://doi.org/10.14194/ijmbr.3.1.9>.
- BARRETO, H. M.; FONTINELE, F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, D. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Res Int**, p. 1-7, 2014.
- BEYTUR, A.; YAKUPOGULLARI, Y.; OGUZ, F.; OTLU, B.; KAYSADU, H. Oral amoxicillin clavulanic acid treatment in urinary tract infections caused by extended-spectrum beta lactamase-producing organisms. **Jundishapur J. Microbiol**, v. 8, p.1-5, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5812/jjm.13792>.
- CAHILL, T. J.; BADDOUR, L. M.; HABIB, G.; HOEN, B.; SALAUN, E.; PETTERSSON, G. B.; SCHÄFERS, H. J.; PRENDERGAST, B. D. Challenges in infective endocarditis. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 69, p. 325-344, 2017.
- CHIRDCHUPUNSEREE, H.; PRAMYOTHIN, P. Protective activity of Phyllanthin in ethanol treated primary culture of rat hepatocytes. **J. Ethnopharmacol.** v. 128, p.172-176, 2010.

CHUA, K. Y. L.; HOWDEN, B. P.; JIANG, J. H.; STINEAR, T.; PELEG, A. Y. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. **Infect. Genet. Evol.** v. 21, p. 554-562, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.026>.

COÊLHO, M. L.; FERREIRA, J. H. L.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; KAATZ, G. W.; BARRETO, H. M.; CAVALCANTE, A. A. C. M. Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. **Microb. Pathogenesis**, v. 99, p.173-177, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.026>.

COSTA, L. M.; MACEDO, E. V.; OLIVEIRA, F. A. A.; FERREIRA, J. H. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; PELAEZ, W. J.; LIMA, F. C. A.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; KAATZ, F. V. R. M.; BARRETO, H. M. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **J. Appl. Microbiol.** v. 121, p.1312-1322, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13258>.

FELICETTI, T.; CANNALIRE, R.; PAIETRELLA, D.; LATACZ, G.; LUBELSKA, A.; MANFRONI, G.; BARRECA, M. L.; MASSARI, S.; TABAARRINI, O.; KIEC-KONONOWICZ, K.; SCHIDLER, B. D.; KAATZ, G. W.; CECCHETTI, V.; SABATINI, S. 2-Phenylquinoline *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors: evaluation of the importance of methoxy group introduction. **J. Med. Chem.** v. 61 p.7827-8848, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00791>.

GBADAMOSI, I. T. Antibacterial attributes of extracts of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus niruri* on *Escherichia coli* the causal organism of urinary tract infection. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 7, p.80-86, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/JPP2014.033>.

HABIB, G. et al. Guidelines for the management of infective endocarditis: the task force for the management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). **Eur. Heart J.** v. 36, p. 3075-3128, 2015.

HANH, N. D.; SINCHAIPANID, N.; MITREVEJ, A. Physicochemical characterization of phyllanthin from *Phyllanthus amarus* Schum. e Thonn **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Early Online. P. 1-10, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.788010>.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 7, p.1027-31, 2002.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MAZUMDAR, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **Food Sci Technol**, v. 44, p. 1199-1206, 2011.

INCHOO, M.; CHIRDCHUPUNSEREE, H.; PRAMYOTHIN, P.; JIANMONGKOL, S. Endothelium independent effects of phyllanthin and hypophyllanthin on vascular tension. **Fitoterapia**, v. 82, p.1231-1236, 2011.

ISLAM, A.; SELVAN, T.; MAZUMDER, U. K.; GUPTA, M.; GHOSAL, S. Antitumour effect of phyllanthin and hypophyllanthin from *Phyllanthus amarus* against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 796-807, 2008.

JOSHI, P.; SINGH, S.; WANI, A.; SHARMA, S.; JAIN, S. K.; SINGH, B.; GUPTA, B. D.; SATTI, N. K.; KOUL, S.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; BHARATE, S. B.; VISHWAKARMA, R. A. Osthol and curcumin as inhibitors of human Pgp and multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*: reversing the resistance against frontline antibacterial drugs. **Med. Chem. Commun.** v. 5, p. 1540-1547, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c4md00196f>.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 39, p. 2650-2655, 1995.

KALIA, N. P.; MAHAJAN, P.; MEHRA, R.; NARGOTRA, A.; SHARMA, J. P.; KOUL, S.; KHAN, I. A. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 67, p. 2401-2408, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.

KHATOON, S.; RAI, V.; RAWAT, A.; MEHROTRA, S. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **J. Ethnopharmacol.** v. 104, p. 79-86, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.048>.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. **International Journal of Bacteriology**, p.1-15, 2013. DOI: 10.1155/2013/204141.

STULIK, L.; MALAFA, S.; HUDCOVA, J.; ROUHA, H. B. Z.; HENICS, D.E. CRAVEN, et al., α -Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 190, p. 1139-1148, 2014.

MAIA, G. L. A.; FALCÃO-SILVA, V. S.; AQUINO, P. G. V.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; RODRIGUES, L. C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson Modulate Bacterial Drug Resistance. **Molecules**, v. 16, p. 4828-4835, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules16064828>.

MARKHAM, P. N.; WESTHAUS, E.; KLYACHKO, K.; JOHNSON, M. E.; NEYFAKH, A. A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 43, p. 2404-8, 1999.

MAZUMDER, A.; ARUN, M.; MAZUMDER, R. Antimicrobial potentiality of *Phyllanthus amarus* against drug resistant pathogens. **Nat. Prod. Res.** v. 20, p. 323-326, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410600650404>.

MILADI, H.; ZMANTAR, T.; CHAABOUNI, Y.; FEDHILA, K.; BAKHROUF, A. et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microb. Pathogenesis**, v. 99, p. 95-100, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.008>.

NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 37, p. 128-9, 1993.

PATEL, J. P. et al. *Phyllanthus amarus*: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.** v. 138, p. 286-313, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.040>.

PEREIRA, R. G.; GARCIA, V. L.; RODRIGUES, M. V. N.; MARTÍNEZ, J. Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods. **Sep. Purif. Technol.** v.158, p. 204-211, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.12.007>.

PEREIRA, R. G.; NAKAMURAA, R. N.; RODRIGUES, M. V. N.; OSORIO-TOBÓN, J. F.; GARCIA, V. L.; GARCIA, V. L. Supercritical fluid extraction of phyllanthin and niranthin from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. **J. Supercrit. Fluids**, v. 127, p. 23-32, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.017>.

PUTAKALA, M.; SUDHAKARA, G.; SRINIVASULU, N.; BONGU, S. B. R.; CHINTAKUNTA, N.; DESIREDDY, S. Assessment of in vitro antioxidant potential and quantification of total phenols and flavonoids of aqueous extract of *Phyllanthus amarus*, **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** v. 7, p. 439-445, 2015.

PUTAKALA, M.; SUDHAKARA, G.; SRINIVASULU, N.; BONGU, S. B. R.; CHINTAKUNTA, N.; DESIREDDY, S. Cardioprotective effect of *Phyllanthus amarus* against high fructose diet induced myocardial and aortic stress in rat model. **Biomed. Pharmacother.** v. 95, p. 1359-1368, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.054>.

QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L. G.; GUIMARÃES, M. A.; SANTOS, R.C.; LIMA, D. F.; NASCIMENTO, C.; SILVA, M. P. N.; SOARES, M. J. S.; ROPKE, C. D.; EATON, P.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. **J. Ethnopharmacol.** v. 175, p. 287-294, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.026>.

REDGRAVE, L. S.; SUTTON, S. B.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends Microbiol.** v. 22, p. 438-445, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>.

RIBEIRO, A. M. B.; SOUSA, J. N.; DA COSTA, L. M.; OLIVEIRA, F. A. A., DOS SANTOS, R. C.; SILVA, N. A. S., DE OLIVEIRA, A. P. Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 242-246, 2019. DOI:10.1016/j.micpath.2019.03.012.

ROY, S. K.; KUMARI, N.; PAHWA, S.; AGRAHARI, U. C.; BHUTANI, K. K. et al. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. **Fitoterapia**, v. 90, p. 140-150, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.015>.

SABATINI, S.; GOSETTO, F.; MANFRONI, G.; TABARRINI, O.; KAATZ, G. W.; PATEL, D.; CECCHETTI, V. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-

Propoxyphenyl) quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. **J. Med. Chem.** v. 54, p. 5722-5736, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm200370y>.

SANTOS, J. F. S.; TINTINO, S. R.; FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; MENEZES, I. R. A.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; CUNHA, F. A. B. In vitro e in silico evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v. 57, p. 22-28, 2018.

SHOKUNBI, O. S.; ODETOLA, A. A. Gastroprotective and antioxidant activities of *P. amarus* extracts on absolute ethanol-induced ulcer in albino rats. **J. Med. Plant Res.** v. 2, p. 261-267, 2008.

TINTINO, S. R.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; CAMPINA, F. F.; SILVA, R. L. P.; COSTA, M. S.; MENEZES, I. R. A.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; LEAL-BALBINO, T. C.; BALBINO, V. Q. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microb. Pathogenesis.** v. 97, p. 9-13, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.003>.

VALI, L.; DASHTI, A. A.; JADAON, M. M.; EL-SHAZLY, S. The emergence of plasmid mediated quinolone resistance qnrA2 in extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in the Middle East. **J. Pharm. Sci.** v. 23, p. 34, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0116-7>.

WUNDERINK, R. G.; NIEDERMAN, M.S.; KOLLEF, M.H.; SHORR, A.F.; KUNKEL, A.; BARUCH, M.J. et al., Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study. **Clin. Infect. Dis.** v. 54, p. 621-629, 2012.

ZHANG, J.; SUN, Y.; WANG, Y.; LU, M.; HE, J.; LIU, J.; CHEN, Q.; ZHANG, X. et al. Non-antibiotic agent ginsenoside 20(S)-Rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin in vitro and in vivo as a potential NorA inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.** v. 740, p. 277-284, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.020>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações finais

Esta pesquisa teve o objetivo de investigar a atividade biológica do PAE, $MgCl_2$, PAE+ $MgCl_2$ e/ou Chá PAE+ $MgCl_2$ 3%, quanto às propriedades toxicológicas, citotóxicas, hipotensora, anti-hipertensiva e antimicrobiana em protocolos *in vitro* e *in vivo*, de modo a propor uma alternativa para o tratamento da hipertensão, além de indicar substâncias que potencializam a atividade de antimicrobianos, cujos resultados possibilitaram as seguintes inferências:

- 1) Nas maiores concentrações testadas de PAE e PAE+ $MgCl_2$ observou-se maior redução na viabilidade celular de linhagens de células de macrófagos, enquanto o $MgCl_2$ não causou citotoxicidade. Porém são necessários mais estudos que definam e caracterizem melhor a toxicidade destes compostos.
- 2) O teste farmacológico com dose única de PAE, $MgCl_2$ ou PAE+ $MgCl_2$ por via oral não revelou a presença de sinais de toxicidade, não tendo ocorrido morte, podendo ser considerado seguro quando administrado por via oral.
- 3) O tratamento com PAE, $MgCl_2$ ou PAE+ $MgCl_2$ não produziu alterações bioquímicas em ratos tratados com dose única de 2000 mg/kg, demonstrando ausência de toxicidade em parâmetros hepáticos e renais. No entanto, são necessários estudos mais prolongados para averiguar possíveis danos no sistema fisiológico decorrente da administração crônica, bem como análises histopatológicas de órgãos vitais.
- 4) O PAE+ $MgCl_2$ administrado por via endovenosa nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, promoveu efeito hipotensor dose-dependente em ratos normotensos e efeito anti-hipertensivo dose-dependente, em animais hipertensos L-NAME;
- 5) O tratamento por via oral com PAE+ $MgCl_2$, por 7 dias na dose de 300 mg/kg/dia ou Chá PAE+ $MgCl_2$ (3%) apresentaram efeito anti-hipertensivo em modelos de animais L-NAME;
- 6) O PAE apresentou atividade antimicrobiana contra cepas Gram-negativas, enquanto a Filantina foi inativa contra todas as cepas testadas;
- 7) A adição de PAE ou Filantina aos meios de crescimento em concentrações sub-inibitórias aumentou a atividade da Norfloxacin, contra uma linhagem de *S. aureus* que superexpressa o gene NorA, sugerindo que os produtos naturais

testados podem potencializar a ação deste antibiótico no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistente a fluoroquinolonas.

ANEXOS

ANEXO 1: Avaliação do comitê de ética em experimentação animal da UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

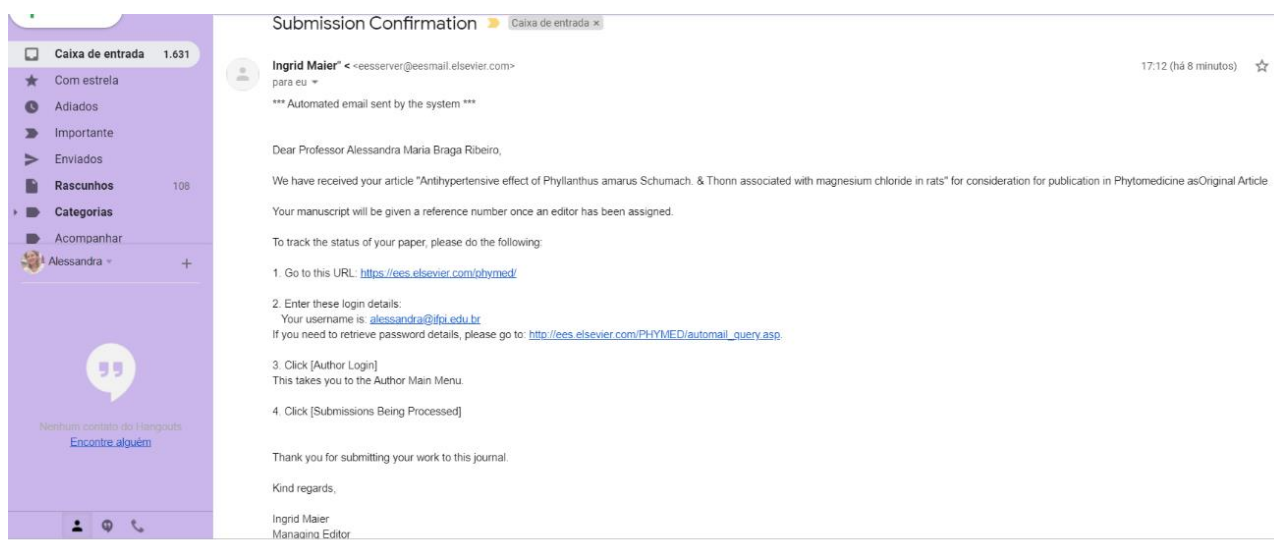
Certificamos que a proposta intitulada "Proposta de uma formulação farmacêutica extraído de *Phyllanthus niuri*, associada à *Mimosa pudica* e Cloreto de Magnésio com potencial anti-hipertensivo", registrada nº 223/16, sob a responsabilidade da Profa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA- Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 16/09/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Outubro/ 2016 à Fevereiro/ 2019
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo heterogênico/ <i>Swiss</i> 2. Rato heterogênico/ <i>Wistar</i>
Nº de Animais	1. 95 2. 190
Peso/ Idade	1. 25-30 g/ 3 meses 2. 200-250 g/ 3 meses
Sexo	1. 78 Machos/ 17 Fêmeas 2. Machos
Origem	Biotério do NPPM/CCS/UFPI

Teresina, 16 de Setembro de 2016.

PROF. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO 2: Confirmação de submissão à Revista Phytomedicine



Artigo submetido da Revista Phytomedicine: Qualis A1 em biotecnologia; Fator de impacto: 4.180

ANEXO 3: Artigo publicado Qualis B1 em Biotecnologia

Microbial Pathogenesis 130 (2019) 242–246



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin



Alessandra Maria Braga Ribeiro^a, Jonas Nascimento de Sousa^b, Luciana Muratori Costa^b, Felipe Araújo de Alcântara Oliveira^b, Raimunda Cardoso dos Santos^c, Aline Suelen Silva Nunes^a, Wanderson Oliveira da Silva^d, Paulo Jorge Marques Cordeiro^d, José de Sousa Lima Neto^e, José Pinto de Siqueira-Júnior^f, Glenn William Kaatz^g, Humberto Medeiros Barreto^{b,*}, Aldeídia Pereira de Oliveira^a

^a Medicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^b Laboratory of Research in Microbiology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^c Nucleus of Research in Biodiversity and Biotechnology, Biotec, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

^d Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Laboratory of Organic Geochemistry, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^f Laboratory of Genetics of Microorganisms, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Paraíba, Brazil

^g Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA