



Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae)

Nascimento, J.E.¹; Melo, A.F.M.¹; Lima e Silva, T.C.¹; Veras Filho, J.¹;
Santos, E.M.¹; Albuquerque, U.P.²; Amorim, E.L.C.^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Recebido 07/07/2008 - Aceito 01/10/2008

RESUMO

Avaliou-se o perfil fitoquímico e a toxicidade de três espécies do gênero *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. amarus* e *P. tenellus*), coletadas em diferentes localidades do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Os extratos brutos das três espécies foram submetidos a testes convencionais por cromatografia em camada delgada analítica para verificação das classes de metabólitos presentes, e testados frente a larvas de *Artemia salina* para obtenção das concentrações letais médias (CL₅₀). Os testes fitoquímicos demonstraram a presença de flavonóides, saponinas, terpenos, naftoquinonas, alcalóides, antraquinonas, lignanas e taninos. As três espécies de *Phyllanthus* apresentaram variações na composição fitoquímica e na toxicidade frente a *A. salina*. Dependendo do local de coleta, os valores de CL₅₀ variaram de 404,43 ± 49,64 µg/mL a 770,84 ± 51,78 µg/mL para *P. niruri*, 837,65 ± 61,45 µg/mL a 1075,89 ± 70,72 µg/mL para *P. amarus* e 534,60 ± 46,83 µg/mL a 1003,62 ± 65,15 µg/mL para *P. tenellus*.

Palavras-chave: *Phyllanthus niruri*; *Phyllanthus amarus*; *Phyllanthus tenellus*; análise fitoquímica preliminar; bioensaio toxicológico; CL₅₀

INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae) encontram-se largamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do globo e, segundo Calixto et al. (1998), são muito utilizadas na medicina popular para tratar os rins e distúrbios urinários, infecções intestinais, diabetes e hepatite B. Algumas espécies, conhecidas como quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva-pombinha são utilizadas, em geral, no tratamento de patologias associadas ao sistema urinário, entre estas *P. niruri* L., *P. amarus* Schum. & Thom. e *P. tenellus* Roxb. (Silva & Sales, 2004).

Além do potencial farmacológico dessas espécies destaca-se a baixa toxicidade em ratos. O extrato de *P. niruri*, por exemplo, apresenta baixa toxicidade aguda (Venkateswaran et al., 1987; Tona et al., 2001) e proteção

da hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (Harish & Shivanandappa, 2006). Foi observada, também, quimioproteção da ação tóxica provocada por ciclofosfamida com a utilização de *P. amarus* (Kumar & Kuttan, 2005) e baixa toxicidade de *P. tenellus* sobre os macrófagos com a ativação da atividade fagocitária (Ignácio et al., 2001).

Uma forma de complementar os estudos fitoquímicos é associá-los a bioensaios, por esta razão muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre esses bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo de água salgada comumente usada como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (Luna et al., 2005).

A constituição química de espécies vegetais pode ser influenciada qualitativamente e quantitativamente por variações climáticas, com repercussão direta sobre a atividade biológica. Neste estudo, buscou-se avaliar tais influências, sobre as três espécies de *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. amarus* e *P. tenellus*) a partir de dois ensaios práticos e reprodutíveis: a toxicidade aguda sobre *A. salina* e o perfil fitoquímico.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação do material vegetal

As três espécies selecionadas para este estudo foram coletadas entre os meses de junho e novembro de 2004, em diferentes localidades do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil (Tabela 1). A identificação do material foi confirmada pelo pesquisador Marcos José da Silva, do Laboratório de Taxonomia Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O material testemunho foi depositado no Herbário Prof. Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Tabela 1 - Locais de coleta de três espécies do gênero *Phyllanthus* conhecidas popularmente como quebra-pedra no estado de Pernambuco.

Região	Coordenadas geográficas	Local de coleta	Espécie coletada	Registro no Herbário
Litoral	Lat.: -07° 44' 52" Long.: -34° 49' 32" Alt.: 0	Itamaracá	<i>P. amarus</i>	45.197
Zona de Floresta Atlântica	Lat.: -08° 00' 08" Long.: -35° 01' 06" Alt.: 58 metros	Aldeia	<i>P. niruri</i>	45.199
	Lat.: -08° 01' 18" Long.: -34° 58' 52" Alt.: 55 metros	São Lourenço da Mata	<i>P. niruri</i>	46.198
		Cidade Universitária (CDU)	<i>P. amarus</i>	46.224
Zona Antropizada	Lat.: -08° 03' 14" Long.: -34° 52' 52" Alt.: 4 metros		<i>P. tenellus</i>	46.194
		Dois Irmãos	<i>P. amarus</i>	46.196
		Torre	<i>P. tenellus</i>	46.195
Região Metropolitana	Lat.: -07° 56' 27" Long.: -34° 52' 23" Alt.: 13 metros	Paulista	<i>P. amarus</i>	45.197
Agreste	Lat.: -08° 53' 25" Long.: -36° 29' 34" Alt.: 842 metros	Garanhuns	<i>P. tenellus</i>	45.200
			<i>P. niruri</i>	45.198

Obtenção dos extratos

As partes aéreas das plantas foram secas à temperatura ambiente e trituradas em processador industrial (Bermar BM30 TB 2L). Em seguida, foram submetidas à maceração com etanol 96°GL na proporção de duas partes de solvente por parte de planta seca e pulverizada. A cada período de sete dias o material foi filtrado e submetido a nova extração até esgotamento. Os filtrados foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, acondicionados em frasco âmbar e armazenados em dessecador.

Estudo fitoquímico

Foi realizada a análise fitoquímica dos extratos através de cromatografia em camada delgada (CCD), seguindo as metodologias descritas por Markhan (1982), Harbone (1984) e Wagner & Bladt (1996) com a utilização de padrões e reveladores específicos para alcalóides, saponinas, flavonóides, taninos, fenóis, quinonas, terpenóides, antocianinas e cumarinas.

Preparação das amostras e ensaio toxicológico

O bioensaio com *A. salina* foi baseado na técnica descrita por Meyer et al. (1982). Foram utilizados 10 mg do

extrato bruto de todas as amostras, nos quais foram adicionados 100 µL de Cremophor® e 1 mL de Tween 80 a 5% para ajudar a solubilização dos mesmos. As soluções foram homogeneizadas e o volume completado para 5 mL com água salinizada filtrada (água do mar e água destilada 1:1) a pH = 8,0. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 2500, 1875, 1250, 625, 250 e 125 µL que foram transferidas para outros balões de 5 mL e os volumes completados com o mesmo solvente, obtendo-se concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL para cada extrato.

Os ovos de *A. salina* (20 mg) foram incubados sob iluminação artificial por 48 horas para que houvesse a eclosão das larvas (metanúplios), e estas, separadas em sete grupos com 10 a 13 indivíduos cada. O primeiro grupo recebeu a solução controle (solvente e tensoativos) e os seis seguintes receberam as soluções dos extratos em diferentes concentrações. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas, após este período foram contabilizadas as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada extrato.

Análise estatística

Para obtenção dos valores de CL₅₀ foi utilizada a análise PROBIT, através do software STATPLUS® 2005, com 95% de confiança. Para comparação dos valores de CL₅₀ entre as espécies, nos diferentes locais de coleta, foi utilizado o intervalo de confiança obtido pela análise PROBIT.

RESULTADOS

Análise fitoquímica

Os testes demonstraram a presença de antraquinonas, flavonóides, taninos e terpenóides, e a ausência de antocianinas e cumarinas nas três espécies estudadas, independente do local de coleta. Foram detectados alcalóides em todos os extratos de *P. amarus* e *P. tenellus*, enquanto que *P. niruri* foi a única espécie que não apresentou este metabólito e onde foram reveladas antraquinonas glicosídicas. Ficaram evidentes as duas classes de taninos, hidrolisáveis, nas amostras estudadas de *P. niruri*, e condensados, nas amostras de *P. tenellus* e *P. amarus*. Saponinas foram reveladas em todos os extratos de *P. amarus*, variando nas outras espécies. Também ocorreu variação na composição química em relação à presença de naftoquinonas. Todas as amostras de *P. niruri* apresentam esta classe de metabólito, bem como as de *P. amarus* coletadas em Dois Irmãos e em Itamaracá, e as de *P. tenellus* oriundas da Cidade Universitária e de Paulista (Tabela 2).

Análise toxicológica

Todos os extratos testados de *P. amarus* mostraram baixa toxicidade (Figura 1a e Tabela 2) com valores de CL₅₀ acima de 837,65 ± 61,45 µg/mL, com exceção da amostra coletada em Itamaracá que apresentou CL₅₀ de 1075,89 ± 70,72 µg/mL, sendo considerada atóxica. Verificou-se, com 95% de confiança, que não há diferença significativa

entre os valores de CL₅₀ das amostras coletadas na Cidade Universitária, Dois Irmãos e no Bairro da Torre.

Todas as amostras de *P. niruri* apresentaram diferenças significativas nos valores de CL₅₀, na faixa de 95% de confiança, constatando-se que sofreram influência do local de coleta (Figura 1b e Tabela 2).

P. tenellus apresentou a maior variação entre os valores de CL₅₀ (Figura 1c e Tabela 2). Esta espécie se mostrou atóxica para um local de coleta (Garanhuns), com valor de CL₅₀ da ordem de 1003,62 ± 65,15 µg/mL e tóxica para os demais locais (CL₅₀ de 534,60 ± 46,83 µg/mL e CL₅₀ de 642,91 ± 39,02 µg/mL).

DISCUSSÃO

Análise fitoquímica

As três espécies estudadas apresentaram perfis semelhantes para algumas classes de metabólitos, independente do local de coleta, tanto pela presença, caso das antraquinonas, flavonóides, taninos e todos os terpenóides, quanto pela ausência de alguns grupos, caso das antocianinas e cumarinas (Tabela 2).

A resposta negativa para alcalóides nos extratos de *P. niruri* foi um resultado inesperado, uma vez que diversos trabalhos citam a sua presença (Mulchandani & Hassarajani, 1984; Joshi et al., 1986; Petchnaree et al., 1986; Hassarajani & Mulchandani, 1990). Entretanto, Cimanga et al. (2004) verificaram variações qualitativas e, principalmente, quantitativas desta classe em *P. niruri*, as quais foram atribuídas à influência das condições de

Tabela 2 - Classes de metabólitos presentes em espécies de *Phyllanthus* coletadas em diferentes localidades do estado de Pernambuco e os respectivos valores de CL₅₀ encontrados para os extratos brutos com 95% confiança.

Grupo Químico	<i>P. amarus</i> Schum. & Thom.				<i>P. niruri</i> Linn.			<i>P. tenellus</i> Roxb.		
	Itamaracá	CDU	Dois Irmãos	Torre	Aldeia	São Lourenço da Mata	Garanhuns	CDU	Paulista	Garanhuns
Alcalóides	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Antocianinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas agliconas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antraquinonas glicosídicas	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mono, sesqui e diterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naftoquinonas	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Saponinas	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CL₅₀ (µg/mL) (N=18)	1075,89 (±70,72)	849,10 (± 73,39)	860,67 (± 63,07)	837,65 (± 61,45)	570,16 (± 59,42)	770,84 (± 51,78)	404,43 (± 49,74)	642,91 (± 39,02)	534,60 (± 46,83)	1003,62 (± 65,15)

(+) Presença (-) Ausência

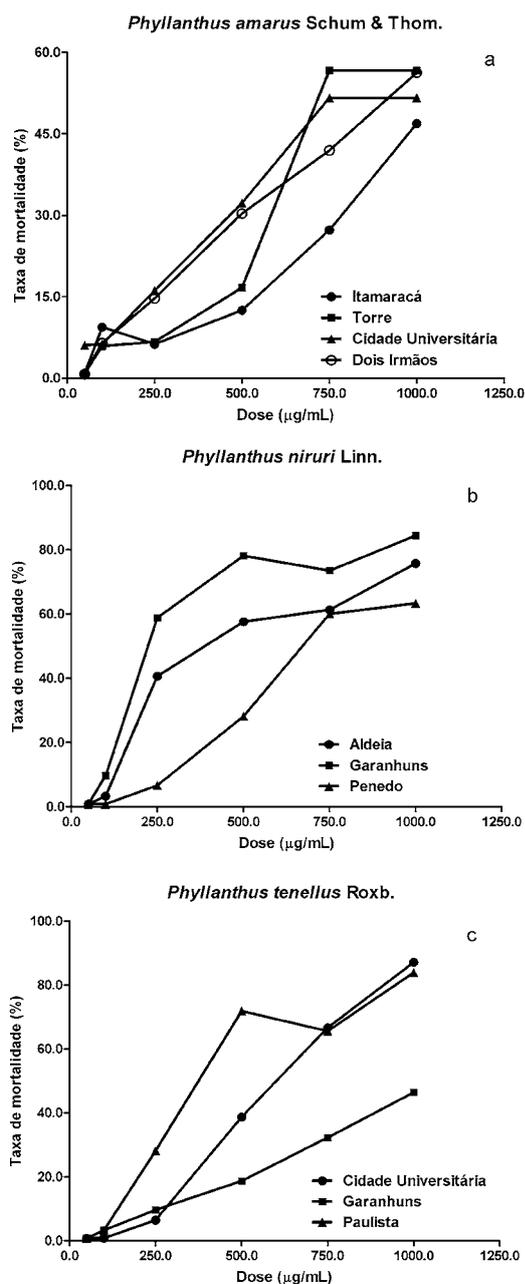


Figura 1. Taxas de mortalidade de *Artemia salina* Leach. em função da dose dos extratos das três espécies de *Phyllanthus* nos diferentes locais de coleta. a) *P. amarus* Schum. & Thom, b) *P. niruri* Linn. e c) *P. tenellus* Roxb.

crescimento vegetal. A sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento vegetal, temperatura, disponibilidade hídrica, incidência de radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, altitude e índice de poluição são apontados por Gobbo-Neto & Lopes (2007) como fatores que influenciam na produção dos metabólitos secundários das plantas.

Nos estudos encontrados sobre as três espécies, tanto os fitoquímicos como os que se referem à toxicidade, não foram consideradas as diferenças geográficas dos locais de coleta, mesmo sendo esse um gênero amplamente distribuído no globo, ficando demonstrado que a constituição química

dessas espécies vegetais pode ser diferente, dependendo do ambiente.

Já a constatação de antraquinonas glicosídicas corrobora com o trabalho de Mellinger et al. (2005), no qual, foi citada a existência de grupos polissacarídicos em *P. niruri*, e não há menção de polissacarídeos nas outras espécies.

A presença de taninos está de acordo com os dados da literatura consultada que cita a presença desta classe de metabólito (Foo 1993; 1995; Huang et al., 1998; Subeki et al., 2005) e de outras classes de compostos fenólicos em *P. niruri* (Ishimaru et al., 1992) e *P. tenellus* (Santiago et al., 2000).

Análise toxicológica

Meyer et al. (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1000 µg/mL, estes, são considerados atóxicos. Sendo assim, *P. amarus* coletado em Itamaracá pode ser considerado atóxico e os demais extratos testados da mesma espécie apresentaram baixa toxicidade. Além desta constatação, uma larga faixa nos valores de CL_{50} são encontrados na literatura, ratificando as variações no nível tóxico dessa espécie, Krishnarajua et al. (2005) descrevem a toxicidade de *P. amarus* coletada no Sudoeste da Índia sobre *A. salina*, relatando CL_{50} da ordem de 2900 µg/mL e Macrae et al. (1988) encontraram CL_{50} acima de 1000 µg/mL para a mesma espécie coletada na Amazônia Colombiana.

Todos os extratos analisados de *P. niruri* mostraram duas características: a primeira é que nenhum pode ser considerado atóxico; e a segunda, é que as concentrações letais sofreram influência do local de coleta. Não foram verificados na literatura, dados que relatem a CL_{50} sobre *A. salina* que possam servir como parâmetro de comparação, no entanto, nossos resultados apresentam outro ponto discrepante com relação aos trabalhos consultados, onde alguns estudos reportam baixa toxicidade do extrato de *P. niruri* em ratos (Venkateswaran et al., 1987; Tona et al., 2001; Harish & Shivanandappa, 2006).

P. tenellus também sofreu influência do local de coleta em todas as amostras analisadas, com 95% de confiança. Na literatura consultada, foi constatada baixa toxicidade desta espécie em ratos (Ignácio et al., 2001), porém, não foram encontrados outros estudos que tenham verificado sua toxicidade sobre *A. salina*.

Por se tratar de espécies pertencentes ao mesmo gênero, embora algumas semelhanças com relação ao perfil fitoquímico fossem esperadas, no presente trabalho estudou-se as diferenças, ocasionadas pelo ambiente em que cada espécie foi coletada. Conclui-se que houve variação na composição química intraespécie, especificamente nos grupos de saponinas e naftoquinonas.

Verificamos que as variações químicas qualitativas não tiveram relação com os valores de CL_{50} e com o

nível de toxicidade, sendo estas respostas atribuídas a possíveis diferenças quantitativas ou pela presença de outras substâncias que não foram avaliadas, uma vez que, espécies com valores de CL_{50} estatisticamente diferentes, foram qualitativamente semelhantes.

Há relatos sobre a toxicidade sobre *A. salina* apenas para *P. amarus* (Macrae et al., 1988; Krishnarajua et al., 2005); no presente estudo, obteve-se os mesmos resultados e as amostras foram consideradas atóxicas, já as análises feitas em *P. niruri* e *P. tenellus*, mostraram haver toxicidade, embora a literatura (Venkateswaran et al., 1987; Ignácio et al., 2001; Tona et al., 2001; Harish & Shivanandappa, 2006) aponte essas duas espécies como tendo baixo nível tóxico. Apenas uma amostra de *P. niruri* apresentou baixa toxicidade e uma de *P. tenellus* pode ser considerada atóxica. Os resultados observados mostraram claramente que para esses casos existe a necessidade de se avaliar as características geográficas e as condições climáticas do seu habitat, pois em função do local de coleta a atividade biológica pode ser diferente.

ABSTRACT

Phytochemical screening and toxicological bioassay with brine shrimp larvae (Artemia salina Leach) of three medicinal species of the genus Phyllanthus (Phyllanthaceae)

Phytochemical screening and toxicological bioassay were carried out on extracts from three herbaceous species of *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. amarus* and *P. tenellus*), collected from different places in Pernambuco state in the Northeast of Brazil. The extracts were tested by conventional thin layer chromatography (TLC) tests to check the chemical groups present and the lethal concentrations (LC_{50}) in *Artemia salina* shrimps were determined. The phytochemical tests demonstrated the presence of flavonoids, saponins, terpenes, naphthoquinones, alkaloids, anthraquinones, lignans and tannins and the absence of coumarins and anthocyanins. The species showed variations in chemical composition and toxicity to *Artemia salina*. In plants from different places, the LC_{50} varied from $404.43 \pm 49.64 \mu\text{g/mL}$ to $770.84 \pm 51.78 \mu\text{g/mL}$ for *P. niruri*, $837.65 \pm 61.45 \mu\text{g/mL}$ to $1075.89 \pm 70.72 \mu\text{g/mL}$ for *P. amarus* and $534.60 \pm 46.83 \mu\text{g/mL}$ to $1003.62 \pm 65.15 \mu\text{g/mL}$ for *P. tenellus*.

Keywords: *Phyllanthus niruri*; *Phyllanthus amarus*; *Phyllanthus tenellus*; phytochemical screening; toxicological bioassay; LC_{50}

REFERÊNCIAS

Calixto JB, Santos AR, Cechinel Filho V, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* 1998; 18(4):225-58.

Cimanga RK et al. In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae): part 2. *J Ethnopharmacol* 2004; 95:399-404

Foo LY. Amariin, a di-dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* 1993; 33(2):487-91.

Foo LY. Amariinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* 1995; 39(1):217-24.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 2007; 30(2):374-81.

Harbone JB. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman & Hall; 1984. 216p.

Harish R, Shivanandappa T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chem* 2006; 95(2):180-5.

Hassarajani SA, Mulchandani NB. Securinine type of alkaloids from *Phyllanthus niruri*. *Indian J Chem* 1990; 29(9):801-3.

Huang YL, Chen CC, Hsu FE, Chen CF. Two tannins from *Phyllanthus tenellus*. *J Nat Prod* 1998; 61:523-4.

Ignácio SRN, Ferreira JLP, Almeida MB, Kubelka CF. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. *J Ethnopharmacol* 2001; 74(2):181-7.

Ishimaru K, Yoshimatsu K, Yamakawa T, Kamada H, Shimomura K. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry* 1992; 31(6):2015-8.

Joshi BS, Gawad DH, Pelletier SW, Kartha G, Bhandary K. Isolation and structure (X-ray analysis) of ent-norsecurinine, an alkaloid from *Phyllanthus amarus*. *J Nat Prod* 1986; 49(4):614-20.

Krishnarajua AV, Raoa TVN, Sundararajua D, Vanisreeb M, Tsayb H, Subbarajua GV. Assessment of bioactivity of indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Int J Eng Sci* 2005; 3(2):125-34.

Kumar KB, Kuttan R. Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine* 2005; 12(6-7):494-500.

Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'Ana AEG. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 2005; 97(2):199-206.

- Macrae WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the pharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. *J Ethnopharmacol* 1988; 22(2):143-72.
- Markhan KR. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press; 1982. 113p.
- Mellinger CG, Carbonero ER, Cipriani TR, Gorin PAJ, Iacomini M. Xylans from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. *J Nat Prod* 2005; 68(1):129-32.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam LB, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J Med Plant Res* 1982; 45:31-4.
- Mulchandani NB, Hassarajani SA. 4-methoxy-nor-securinine, a new alkaloid from *Phyllanthus niruri*. *Planta Med* 1984; 1:104-5.
- Petchnaree P, Bunyapraphatsara N, Cordell GA, Cowe HJ, Cox PJ, Howie RA, Patt SL. X-ray crystal and molecular-structure of nirurine, a novel alkaloid related to the securinega alkaloid skeleton, from *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae). *J Chem Soc* 1986; 1(9):1551-6.
- Santiago LJM, Louro RP, Oliveira DE. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonialyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Ann Bot* 2000; 86(5):1023-32.
- Silva MJ, Sales MF. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no bioma caatinga do estado de Pernambuco-Brasil. *Rodriguésia* 2004; 55(84):101-26.
- Subeki S et al. Anti-babesial and anti-plasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. *J Nat Prod* 2005; 68(4):537-9.
- Tona L et al. In-vivo antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus amarus*. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95(1):47-57.
- Venkateswaran PS, Millman I, Blumberg BS. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: in vitro and in vivo studies. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84(1):274-8.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2nd.ed. Berlim: Springer Verlag; 1996. 384p.