



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



ANDRESSA BLAINSKI

Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru

Maringá

2010

ANDRESSA BLAINSKI

Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2010

B634e Blainski, Andressa
Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru / Andressa Blainski – 2010
133 f. : il., 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2010.
Referências bibliográficas: f. 120-131.
Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

1. *Limonium brasiliense*. 2. Substâncias polifenólicas.
3. Baicuru. 4. Validação analítica. 5. Atividade hormonal.
6. Estudo toxicológico. I. Título.

CDD 615.07

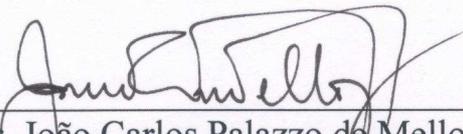
ANDRESSA BLAINSKI

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA, ATIVIDADE HORMONAL,
TOXICIDADE AGUDA E MUTAGENICIDADE *IN VIVO* DE *LIMONIUM
BRASILIENSE* (BOISS.) KUNTZE (PLUMBAGINACEAE) - BAICURU**

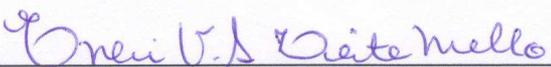
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 08 de fevereiro de 2010

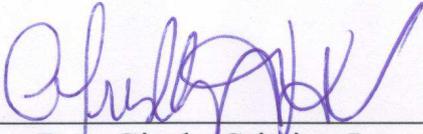
BANCA EXAMINADORA



Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Gisely Cristiny Lopes
Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, por ter me ensinado os verdadeiros valores da vida, me criando com dignidade, responsabilidade e muito amor e, ao meu irmão, por sempre achar que sou capaz de superar meus desafios.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela orientação, compreensão, paciência e confiança na execução desse trabalho.

A minha família, por toda compreensão, incentivo e carinho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação que contribuíram para minha formação.

Aos professores que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho, Profa. Eneri, Profa. Rúbia, Profa. Márcia Batista, Profa. Márcia Consolaro, Prof. Edilson, Prof. Celso, Prof. Marcos e Prof. Ubiratã.

Aos professores que compõem esta banca examinadora, por participarem na discussão deste trabalho.

A todos os técnicos de laboratórios que ajudaram, seja na rotina laboratorial, no treinamento de procedimentos farmacológicos ou no sacrifício dos animais, destacam-se: Admir, Jailson, Marcos, Euride, Maria dos Anjos e Maristela.

Aos colegas, Gisely, Gislaine, Vivian, Jackeline, e, em especial, Marco Antônio, cuja participação foi fundamental.

À Helena por sempre me auxiliar com muito carinho.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, sem os quais o dia-a-dia seria entediante.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À Deus, por todas as coisas boas que me concede e proporciona.

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos auxílios concedidos.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

RESUMO

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), conhecida como baicuru, é uma planta nativa do litoral sul do Brasil e da região do rio da Prata. Suas raízes são empregadas popularmente no tratamento de tensão pré-menstrual, distúrbios menstruais e infecções genito-urinário. Estudos prévios reportam a presença de substâncias fenólicas, taninos e flavonóides em grande concentração em espécies pertencentes ao gênero *Limonium*. Relaciona-se esta presença a uma ampla gama de atividade biológica, tais com atividade anti-inflamatória, leishmanicida, tripanossomicida, antimalária, antiviral, antitumoral, antimicrobiana e inseticida. Embora o *L. brasiliense* tenha um amplo uso popular e ter sido usado como matéria-prima em, pelo menos, oito formas farmacêuticas de produção industrial, os estudos existentes são escassos e insuficientes para caracterizar a droga vegetal e assegurar seu uso e efetividade. Este trabalho estabeleceu critérios de caracterização físico-química e padronização do extrato das raízes da espécie *L. brasiliense*, assim como parâmetros de controle de qualidade. Foi avaliada a atividade hormonal do extrato bruto de *L. brasiliense* em ratas imaturas e verificou-se o efeito do tipo antiestrogênico ou progesterônico. Ensaios pré-clínicos toxicológicos realizados em camundongos para determinar a toxicidade aguda não demonstraram qualquer alteração anatômica e de peso relativo nos órgãos (coração, pulmão, baço, rins e fígado); a DL₅₀ foi de 4,8 g/kg. Além disso, a validação do método de determinação do teor de polifenóis totais, pela reação de Folin-Ciocalteu, do extrato bruto de *L. brasiliense*, mostrou que a metodologia atende às exigências das aplicações analíticas e assegura a confiabilidade dos resultados. Entretanto, a determinação do teor de taninos totais foi dificultada pela baixa seletividade/especificidade do método.

Palavras-chave: *Limonium brasiliense*, baicuru, substâncias polifenólicas, validação analítica, atividade hormonal, estudo toxicológico.

ABSTRACT

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), known as baicuru, is a common Brazilian south coast plant that is also commonly found near the *Prata* River region. The roots are specially used at the treatment of premenstrual syndrome, menstrual disturb and genito-urinary infections. Studies report the presence of a large concentrations of phenols substances, tannins and flavonoids at the *Limonium* genus. The presence of these substances is related to a large number of biological activity, such as antileishmanial, trypanomacidal, antimalarial, anti-inflammatory, antiviral, antitumor, antibacterial and inseticide. Although the *L. brasiliense* has a large popular use and has been used as materia prima in, at least, eight industrial pharmaceutical forms, the works are little and insufficient to characterize a plant drug and assure the use and the effective treatment. This work shows possible the stablishment of physico-chemical characterization criteria and standartization of extract of the roots of *L. brasiliense*; It was evaluated the hormonal activity of crude extract of *L. brasiliense* in immature rats and, it was observed antiestrogenic or progesteronic-like activity. The acute toxicity did not anatomic exchange and relative weight in organs (heart, lung, spleen, kidneys, liver); the LD₅₀ was 4,8 g/kg. Also, the validation of the method to determine the content of polyphenols, by Folin-Ciocalteu reaction, of the crude extract of *L. brasiliense*, showed that methodology complies with the analytical application demands and to secure the reliability of the results. However, the determination of the tannins content was difficult because low selectivity/specificity of method.

Keywords: *Limonium brasiliense*, baicuru, polyphenol substances, analytical validation, hormonal activity, toxicological studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fitoecdisteroides identificados em espécies do gênero <i>Limonium</i> : (1) 20-hidroxiecdisona (C ₂₇ H ₄₄ O ₇), (2) ecdisona (C ₂₇ H ₄₄ O ₆) e (3) ponasterona A (C ₂₇ H ₄₄ O ₆).	27
Figura 2 – <i>Limonium brasiliense</i> , (A) partes aéreas e raízes, (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata das raízes. Foto: Andressa Blainski.	29
Figura 3 – (1) Exemplo de tanino hidrolisável [β -1,2,3,4,6-pentagalolil-D-glicose] e (2) exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4 β →8)-catequina] (SANTOS; MELLO, 2007).	33
Figura 4 – Rota de trabalho e obtenção do extrato bruto de <i>L. brasiliense</i>	37
Figura 5 – Curva de distribuição granulométrica das raízes de <i>L. brasiliense</i> cominuídas em moinho de martelos no processo de tamisação.	51
Figura 6 – Espectros de varredura no visível (400 a 800 nm) das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de <i>L. brasiliense</i> pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu no tempo de 30 min.	57
Figura 7 – Percentual de aumento da absorvância média de um comprimento de onda em relação ao comprimento de onda anterior considerando as leituras à 691, 715, 760 e 800 nm de 10 a 40 min das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de <i>L. brasiliense</i> pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu.	59
Figura 8 – Percentual de aumento da absorvância em um tempo de leitura em relação ao tempo anterior considerando as leituras à 10, 20, 30 e 40 min à 760 nm das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de <i>L. brasiliense</i> pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu.	60
Figura 9 – Estrutura química das substâncias de referências: (1) ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅), (2) catequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆), (3) pirogalol (C ₆ H ₆ O ₃) e (4) ácido tânico (C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆).	61
Figura 10 – Reação colorimétrica, em concentração crescente para PT (A) e PNA (B) do EB de <i>L. brasiliense</i> pela reação de Folin-Ciocalteu. Fotos: Andressa Blainski.	63
Figura 11 – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (R ²) e equação da reta para PT e PNA, obtidos pela relação de cinco diferentes concentrações de EB de <i>L. brasiliense</i> pelas absorvâncias obtidas na reação com reagente Folin-Ciocalteu.	64
Figura 12 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade para PT das amostras de EB <i>L. brasiliense</i>	65

Figura 13 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de EB de <i>L. brasiliense</i> para análise de PT.	65
Figura 14 – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (R^2) e equação da reta para PT e PNA, obtidos pela relação de cinco diferentes concentrações de EB de <i>L. brasiliense</i> acrescidas de 0,64 µg/ml de pirogalol e as absorvâncias obtidas pela reação com reagente Folin-Ciocalteu.	67
Figura 15 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de especificidade para PT das amostras de EB <i>L. brasiliense</i>	68
Figura 16 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de EB de <i>L. brasiliense</i> para análise de PT.	68
Figura 17 – Comparação entre as absorvâncias de EB de <i>L. brasiliense</i> e EB + substância referência pirogalol para PT.	69
Figura 18 – Reação colorimétrica, em concentração crescente para PT no limite inferior (A) e superior (B) do EB de <i>L. brasiliense</i> pela reação de Folin-Ciocalteu. Fotos: Andressa Blainski.	71
Figura 19 – Representação gráfica das absorvâncias de PT de diferentes massas de EB <i>L. brasiliense</i> utilizadas na determinação do intervalo de quantificação e limite de detecção para reação com Folin-Ciocalteu.	71
Figura 20 – Curva de linearidade dos pontos que formam o intervalo do limite de quantificação para EB <i>L. brasiliense</i> na reação da reagente Folin-Ciocalteu.	73
Figura 21 – Curva de calibração do pirogalol na reação com reagente Folin-Ciocalteu.	78
Figura 22 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol.	79
Figura 23 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol.	79
Figura 24 – Sistema endócrino humano (PROFESSORA LUCIMAR, 2009)	81
Figura 25 – Estruturas químicas dos hormônios estrogênicos (estradiol – 1; estrona – 2 e estriol – 3) e da progesterona (4) (LEHNINGER et al., 2006).	82
Figura 26 – Cascata de liberação, atuação e controle hormonal do sistema endócrino sexual (UNFER, 2009).	84
Figura 27 – Ciclo menstrual feminino (MANUAL MERCK, 2009).	85

Figura 28 – Procedimento de gavagem (A) e de coleta da secreção vaginal (B) em ratas no ensaio para atividade hormonal do EB de <i>L. brasiliense</i> . Fotos: Thaisa Violin.....	93
Figura 29 – Biotério (A), camundongo autopsiado (B) e órgãos analisados (P-pulmão, R-rins, B-baço, Co-coração e F-fígado) no ensaio de toxicidade aguda do EB de <i>L. brasiliense</i> . Fotos: Andressa Blainski.	95
Figura 30 – Retirada do fêmur (A), par de fêmures (B) e retirada da medula óssea por soro bovino (C) no ensaio de mutagenicidade do EB de <i>L. brasiliense</i> . Fotos: Andressa Blainski.	96
Figura 31 – Representação das médias (g) ± desvio padrão, por grupo, dos pesos das ratas nos dias 1, 7 e 15 de experimentação para atividade hormonal. Dados analisados por MANOVA; **P<0,001 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Bonferroni.....	99
Figura 32 – Representação das médias ± desvio padrão, por grupo, das idades (dias) da abertura do canal vaginal da experimentação para atividade hormonal do EB de <i>L. brasiliense</i> . Dados analisados por ANOVA; *P<0,05; +P<0,1 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Kruskal-Wallis.....	100
Figura 33 – Representação das médias ± desvio padrão, por grupo, dos pesos relativos dos úteros para atividade hormonal de EB de <i>L. brasiliense</i> . Dados analisados por ANOVA; +P<0,1 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Tukey.	103
Figura 34 – Cortes histológicos, coloração hematoxilina-eosina, no teste hormonal do EB de <i>L. brasiliense</i> . Grupo CN-Salina ou CN-DMSO na fase proestro e estro (A, B, C e D) e fase metaestro e diestro (E, F, G e H). Corte transversal do útero 4X (A, E) e 40X (B, F), vagina 40X (C, G) e ovário 4X (D e H). Legenda: LU – Luz uterina; EU – Endométrio uterino; GI – Glândula; Qu – Queratina; CL – Corpo lúteo; Barra de calibração – 40 µm (B, C, F e G) e 200 µm (A, D, E e H).	107
Figura 35 – Cortes histológicos do grupo CP, coloração hematoxilina-eosina, no teste hormonal do EB de <i>L. brasiliense</i> . Corte transversal do útero 4X (A) e 40X (B), vagina 40X (C) e ovário 4X (D). Legenda: LU – Luz uterina; EU – Endométrio uterino; GI – Glândula; Qu – Queratina; Barra de calibração – 40 µm (B e C) e 200 µm (A e D).	108
Figura 36 – Cortes histológicos do grupo T-1,2, coloração hematoxilina-eosina, no teste hormonal do EB de <i>L. brasiliense</i> . Corte transversal do útero 4X (A) e 40X (B), vagina 40X (C) e ovário 4X (D). Legenda: LU – Luz uterina; EU – Endométrio uterino; GI – Glândula; CL – Corpo lúteo; Barra de calibração – 40 µm (B e C) e 200 µm (A e D).....	109

Figura 37 – Representação das médias (g) ± desvio padrão dos pesos por grupo de animais machos nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA; a – P<0,05 do grupo 1,0 g/kg em relação ao peso médio inicial do próprio grupo; b – P<0,001 do grupo 3,0 g/kg em relação ao peso médio inicial do próprio grupo; c – P<0,05 do grupo 3,0 g/kg em relação ao peso médio do grupo controle negativo no mesmo período pelo teste de Bonferroni.	112
Figura 38 – Representação das médias (g) ± desvio padrão dos pesos por grupo de animais fêmeas nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA; a – P<0,05 do grupo CN e 2,0 g/kg de EB em relação ao peso médio inicial do próprio grupo pelo teste de Bonferroni.....	113
Figura 39 – Representação das médias ± desvio padrão do peso relativo (%) do coração, pulmão, fígado, baço e rins para teste de toxicidade aguda do EB de <i>L. brasiliense</i> . Dados analisados por ANOVA; P<0,05 como critério de significância comparado ao peso relativo (%) do grupo controle negativo (CN) pelo teste de Tukey.....	115
Figura 40 – Equação da reta para determinação da DL ₅₀ do EB de <i>L. brasiliense</i>	116
Figura 41 – Fotomicrografia do esfregaço da medula óssea (100X) no ensaio de mutagenicidade do EB de <i>L. brasiliense</i> . Legenda: M – eritrócito policromático micronucleado; barra de calibração – 40 µm.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise granulométrica por tamisação das raízes de <i>L. brasiliense</i> cominuídas em moinho de martelos.	50
Tabela 2 - Valores médios dos ensaios físico-químicos, ensaios quantitativos e granulometria média obtidos das raízes de <i>L. brasiliense</i>	53
Tabela 3 – Absorvância das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de <i>L. brasiliense</i> pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu em diferentes tempos (min) e comprimentos de onda (nm).....	58
Tabela 4 – Absorvâncias específicas das substâncias de referência e teor de polifenóis totais aproximado no EB de <i>L. brasiliense</i> expressos em cada substância à 760 nm e 30 min pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu.....	62
Tabela 5 – Concentração de EB de <i>L. brasiliense</i> utilizadas e as respectivas absorvâncias médias (n=3) para a obtenção da curva de linearidade.	63
Tabela 6 – Concentração de EB de <i>L. brasiliense</i> utilizada acrescida de substância referência e as respectivas absorvâncias médias (n=3) obtidas no teste de especificidade.	67
Tabela 7 – Absorvância de diferentes concentrações de EB de <i>L. brasiliense</i> obtidas na reação de Folin-Ciocalteu para PT para a determinação do intervalo de quantificação e o limite de detecção.	72
Tabela 8 – Absorvâncias obtidas no teste de precisão com amostras de 26,0 mg de EB de <i>L. brasiliense</i> para PT e PNA.....	75
Tabela 9 – Médias das absorvâncias obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação do EB de <i>L. brasiliense</i> (26,0 mg) na análise de PT.....	76
Tabela 10 – Médias das absorvâncias (n=3) obtidas no teste de robustez de EB de <i>L. brasiliense</i> (26,0 mg) na análise de PT.....	77
Tabela 11 – Ciclo estral de ratas normais de acordo com os estudos de Long e Evans (1922 apud MARCONDES et al., 2002).....	87
Tabela 12 – Média (g) ± desvio padrão [coeficiente de variação (%)] dos pesos por grupo de animais no 1º, 7º e 15º dias e aumento de peso relativo durante a experimentação para atividade hormonal. Dados analisados por MANOVA; **P<0,001 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Bonferroni.	98

Tabela 13 – Idades de abertura do canal vaginal durante a experimentação para atividade hormonal. Dados analisados por ANOVA; *P<0,05; †P<0,1 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Kruskal-Wallis.	100
Tabela 14 – Peso relativo do útero para atividade hormonal do EB de <i>L. brasiliense</i> . Dados analisados por ANOVA; †P<0,1 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Tukey.	102
Tabela 15 – Classificação da fase estral da ratas pela análise citológica da secreção vaginal no teste hormonal para EB de <i>L. brasiliense</i>	104
Tabela 16 – Média (g) ± desvio padrão [coeficiente de variação (%)] dos pesos por grupo de animais machos nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA e comparados ao grupo controle negativo (CN) pelo teste de Bonferroni.	111
Tabela 17 – Média (g) ± desvio padrão [coeficiente de variação (%)] dos pesos por grupo de animais fêmeas nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA e comparados ao grupo controle negativo (CN) pelo teste de Bonferroni.	113
Tabela 18 – Média ± desvio padrão [coeficiente de variação (%)] do peso relativo (%) do coração, pulmão, fígado, baço e rins para teste de toxicidade aguda do EB de <i>L. brasiliense</i> . Dados analisados por ANOVA; P<0,05 como critério de significância comparado ao grupo controle negativo (CN) pelo teste de Tukey.	115
Tabela 19 – Média ± desvio padrão [coeficiente de variação (%)] do número de eritrócitos policromáticos micronucleados por 2000 eritrócitos policromáticos no teste de mutagenicidade do EB de <i>L. brasiliense</i> . Dados analisados por ANOVA; **P <0,001 comparado ao grupo controle negativo pelo teste de Kruskal-Wallis.	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DL ₅₀	Dose letal que mata 50% dos animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picridrazila
EB	Extrato bruto de <i>L. brasiliense</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRL	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% dos radicais
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Instrumental
LH	Hormônio luteinizante
MALDI-TOF-MS	Ionização/Dessorção de matriz Assistida por Laser – Tempo de voo – Espectrômetro de massas
MANOVA	Análise de Variância Multivariada
PNA	Polifenóis não adsorventes
PT	Polifenóis totais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SM	Solução-mãe
TPM	Tensão pré-menstrual
TT	Taninos totais
uA	Unidades de absorvância
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS GERAIS.....	23
CAPÍTULO 1	
DROGA VEGETAL, CONTROLE DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	24
1 REVISÃO DE LITERATURA	25
1.1 ASPECTOS GERAIS	25
1.1.1 Família Plumbaginaceae	25
1.1.2 Gênero <i>Limonium</i>.....	26
1.1.3 <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	29
1.2 ASPECTOS QUÍMICOS.....	31
1.2.1 Substâncias fenólicas de plantas medicinais	31
1.2.2 Taninos.....	32
1.3 ASPECTOS ANALÍTICOS.....	35
1.3.1 Validação de metodologia analítica	35
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	37
3.2 MATERIAL	38
3.2.1 Solventes, reagentes e soluções.....	38
3.2.2 Equipamentos.....	38
3.3 CONTROLE DE QUALIDADE	39
3.3.1 Análises físico-químicas	39
3.3.1.1 Determinação da perda por dessecação.....	39
3.3.1.2 Determinação da granulometria dos pós.....	39
3.3.1.3 Determinação do teor de resíduo seco	40
3.3.1.4 Determinação de cinzas totais	40
3.3.2 Análise quantitativa.....	40
3.3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais.....	40
3.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	42

3.4.1	Extrato bruto (EB)	42
3.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS EM EXTRATO BRUTO DE <i>L. BRASILIENSE</i>	42
3.5.1	Determinação de taninos totais	43
3.5.2	Pré-validação	44
3.5.3	Linearidade	45
3.5.4	Especificidade	45
3.5.5	Seletividade	45
3.5.6	Limite de detecção	45
3.5.7	Limite de quantificação	46
3.5.8	Intervalo	46
3.5.9	Precisão	46
3.5.10	Exatidão	46
3.5.11	Robustez	47
3.5.12	Curva de calibração da substância de referência	47
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	CONTROLE DE QUALIDADE	49
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	54
4.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS EM EXTRATO BRUTO DE <i>L. BRASILIENSE</i>	55
4.3.1	Pré-validação	55
4.3.2	Linearidade	62
4.3.3	Especificidade	66
4.3.4	Seletividade	69
4.3.5	Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo	70
4.3.6	Precisão	74
4.3.7	Exatidão	76
4.3.8	Robustez	76
4.3.9	Curva de calibração da substância de referência	77
CAPÍTULO 2		
	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS	80

1	REVISÃO DA LITERATURA	81
1.1	ASPÉCTOS FISIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DO SISTEMA REPRODUTIVO.....	81
1.1.1	Fisiologia dos hormônios sexuais	81
1.1.2	Fisiologia dos hormônios sexuais em ratas.....	86
1.1.3	Toxicologia de produtos fitoterápicos	87
2	OBJETIVOS	90
3	MATERIAL E MÉTODOS	91
3.1	MATERIAL	91
3.1.1	Solventes, reagentes e soluções.....	91
3.1.2	Equipamentos.....	91
3.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA	92
3.2.1	Animais	92
3.2.2	Comitê de ética	92
3.2.3	Atividade hormonal	92
3.2.3.1	Tratamento dos animais e avaliação do ganho de peso	92
3.2.3.2	Avaliação da abertura do canal vaginal e citologia da secreção vaginal ...	93
3.2.3.3	Avaliação uterotrófica e análise histológica do ovário, útero e vagina	94
3.2.4	Toxicidade aguda	94
3.2.5	Atividade mutagênica.....	96
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	96
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.1	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA	97
4.1.1	Atividade hormonal	97
4.1.2	Toxicidade aguda	110
4.1.3	Atividade mutagênica.....	116
	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	120
	ANEXOS	132

INTRODUÇÃO

O estudo das plantas medicinais remonta praticamente ao princípio da evolução do homem sobre a terra. O homem pré-histórico observava o comportamento dos animais na hora de curar suas feridas ou diminuir sofrimentos. Destas observações deu-se início ao processo instintivo e empírico de caracterização de diversas plantas e seus efeitos, permitindo ao homem discernir quais delas possuíam efeitos medicinais e quais possuíam efeitos tóxicos (ALONSO, 1998).

Até nas culturas mais antigas, procedeu-se à coleta metodológica e científica de informações sobre ervas medicinais para o desenvolvimento de farmacopeias. Grande parte das farmacopeias deriva de tradições de povos nativos. Além disso, as farmacopeias modernas contêm pelo menos 25% de fármacos derivados de plantas e muitos outros que são análogos sintéticos de substâncias isoladas destas (FARNSWORTH et al., 1985; ASTIN, 1998).

A maioria da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais para satisfazer suas necessidades em saúde, sendo frequentemente empregadas em serviços primários e atendimento básico. Mesmo em áreas onde os medicamentos modernos estão disponíveis, o interesse pela fitoterapia aumentou rapidamente nos últimos anos (WHO, 1998).

As plantas medicinais têm despertado interesse crescente na indústria farmacêutica, pois representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL; WANI, 1996). Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os fármacos em uso clínico, sendo que 25% destes são originados de plantas superiores (BALANDRIN et al., 1993).

De forma similar aos microorganismos, as plantas produzem uma grande variedade de substâncias químicas (SIMÕES et al., 1996), as quais apresentam uma ampla diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996).

A biodiversidade do Brasil possui um grande potencial de moléculas inovadoras, apresentando uma vantagem competitiva de aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas (BARATA; QUEIROZ, 1995; BRASIL, 2006), de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES et al., 1996). No entanto, esta megadiversidade brasileira ainda é pouco conhecida, permanecendo como o maior potencial de obtenção de novos produtos farmacêuticos (REIS et al., 2007).

Contudo, o setor fitoterápico necessita de regulamentação para proporcionar a realização do tratamento sem danos ao paciente (WHO, 1998). A legislação brasileira que trata dos fitoterápicos, Resolução RDC 48/2004, é prova do esforço coletivo em prol da otimização de recursos e procedimentos com intuito de garantir à população produtos eficazes, seguros e com qualidade (BRASIL, 2004a).

Assim, uma das principais limitações até agora relacionadas com a questão dos produtos naturais como fonte de novos fitomedicamentos é a complexidade do processo de avaliação, pois os extratos são considerados misturas biológicas complexas e de difícil caracterização (NISBET; MOORE, 1997). Além disso, os constituintes das plantas medicinais podem variar de acordo com fatores genéticos, clima, qualidade do solo e outros fatores externos (SCHULZ et al., 2002). A partir da resolução RDC nº 48 de 16/03/2004 da ANVISA, a padronização e o controle de qualidade dos fitomedicamentos é exigência legal para fins de registro (BRASIL, 2004a).

O estudo de plantas medicinais tradicionalmente usadas não deve basear-se exclusivamente na busca de drogas quimioterapêuticas potenciais. Tão importante quanto a caracterização química e a comprovação farmacológica de drogas vegetais é a determinação da segurança no seu uso contínuo (VERSCHAEVE et al., 2004). A Portaria nº 116/96 (BRASIL, 1996) determina que todos os fitomedicamentos devem possuir estudos toxicológicos. A Resolução RE nº 90/04 (BRASIL, 2004b) para estudo pré-clínico prevê a realização de ensaios para toxicidades aguda, subaguda e crônica, nas quais deve-se e/ou pode-se avaliar sinais tóxicos de caráter geral, efeitos sobre a locomoção, comportamento, respiração, número de mortes, variação de peso, consumo de alimento e água, exames bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Além desses, integram a legislação a determinação da carcinogenicidade e mutagenicidade da droga vegetal em estudo.

O mercado de fitomedicamentos cresce anualmente abrangendo todas as especialidades médicas. Na prática ginecológica, os fitomedicamentos têm sido empregados no tratamento de diversas doenças. A descoberta dos fitoesteróis representa um grande avanço na terapia de reposição hormonal. Assim, como exemplo, pode-se citar a soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) que tem como princípios ativos primordiais as isoflavonas e os óleos essenciais que encontram indicação clínica no tratamento dos sintomas do climatério. Pode-se também citar o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) que é empregado no alívio de disfunções menstruais, devido à presença de seus constituintes: isoflavonas, flavonóides, glicirrina. A primula (*Oenothera biennis* L.), que tem como princípio ativo o ácido linoleico, um óleo graxo essencial largamente empregado no alívio das síndromes pré-menstruais (BAGNOLI et al., 2006). Plantas medicinais são amplamente usadas por mulheres para o

alívio de cólicas menstruais, sintomas da menopausa, mudanças de humor e saúde óssea (TESCH, 2002). Relaciona-se este uso à atividade adaptogênica dessas plantas (KLEIN, 2004; MENDES; CARLINI, 2007). Exemplo disso é o efeito adaptogênico, conferido principalmente por fitoesteroides, de *Vitex agnus-castus* L., utilizado no tratamento de ciclo menstrual irregular (MILEWICZ; JEDRZEJUK, 2006).

Os sintomas e disfunções relatados na menstruação são multidimensionais e afetam diversos sistemas fisiológicos. Os mecanismos biológicos relacionados a esta patologia propõem, principalmente, a atuação dos hormônios gonadais, seus metabólitos e interação com neurotransmissores e sistema neurohormonal (HALBREICH, 2003). Os níveis hormonais estão relacionados às alterações de humor característico em mulheres com idade reprodutiva no período da tensão pré-menstrual (TPM), e em mulheres na menopausa (RUBINOW; SCHMIDT, 2006). Segundo Birzniece et al. (2006), neuroesteróides, como estrogênio e progesterona, possuem atividade sobre o sistema gabaérgico e serotoninérgico, conseqüentemente, afetando as funções cognitivas e, relacionando-se, as alterações de humor, depressão pós-parto, ansiedade e doença de Alzheimer.

É importante considerar que uma parcela expressiva da população feminina em idade reprodutiva, cerca de 85%, sofre de TPM, de leve a grave, e muitas possuem distúrbios menstruais tais como, dismenorreia, hipermenorreia, oligomenorreia, polimenorreia, anovulação ou amenorreia primária e secundária (ACOG, 2008).

Do ponto de vista experimental, diversas plantas mostram atividade estrogênica e antiestrogênica tais como: *Polygonum hyperpiper* L. (HAZARIKA; SARMA, 2006), *Erythrina lysistemon* Hutch (TANEE, et al., 2007), *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. (BOLLE, et al., 2007), *Ailanthus excelsa* Roxb. (RAVICHANDRAN, et al., 2007) e *Achillea millefolium* L. (DALSENTER et al., 2004).

Entre as drogas vegetais da biodiversidade brasileira, as raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze são empregadas popularmente como anti-séptico nas infecções geniturinárias, adstringente, depurativo e, principalmente, no tratamento de cólicas menstruais e como regulador dos períodos menstruais (MOURA, 1984; CARDOSO, 1990). Acredita-se, também, serem efetivas no tratamento de hemorragia, reumatismo e, ainda, possuir propriedades cardioprotetoras (MURRAY et al., 2004). Esta espécie apresenta grande potencial e perspectiva para um possível medicamento fitoterápico. Destaca-se que esta droga, já compôs o mercado farmacêutico industrial em, pelo menos, oito diferentes formulações, todos com indicação ao tratamento de distúrbios menstruais e TPM, porém, nenhum desses produtos permanece legalmente no mercado brasileiro por falta de estudos científicos.

Estudos evidenciam as ações farmacológicas e características químicas de drogas vegetais, usadas na medicina popular, pertencentes à família Plumbaginaceae ou, ainda, ao gênero *Limonium*. Entre eles, relaciona-se a presença de compostos fenólicos e fitoecdisteroides às suas respectivas atividades biológicas. Estas classes químicas destacam-se, ainda, por estarem, provavelmente, envolvidas nas propriedades adaptogênicas do vegetal (WHITING et al., 1998; KLEIN, 2004).

No entanto, os estudos sobre *L. brasiliense* são praticamente inexistentes ou superados pelos recentes avanços tecnológicos que permitem a caracterização adequada de uma determinada matéria-prima vegetal. Dessa forma, não se têm, em relação a *L. brasiliense*, definidos os parâmetros de qualidade, efetividade e segurança exigidos aos fitomedicamentos.

OBJETIVOS GERAIS

Tento em vista o contexto atual de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, este trabalho objetivou realizar o controle de qualidade farmacognóstico da matéria-prima vegetal e a validação da técnica de determinação do teor de taninos totais do extrato bruto das raízes secas de *L. brasiliense* por espectrofotometria UV/Vis, assim como, a avaliação farmacológica e toxicológica desse extrato por estudo da atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade.

CAPÍTULO 1

DROGA VEGETAL, CONTROLE DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO ANALÍTICA

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ASPECTOS GERAIS

1.1.1 Família Plumbaginaceae

A família Plumbaginaceae compreende cerca de 300 espécies classificadas em 10 gêneros, sendo o *Limonium* o maior deles. Essas espécies estão presentes em regiões semiárida, litorânea e salgada, principalmente da Ásia Central e Mediterrâneo. Os gêneros estão divididos em 2 subfamílias, Plumbagineae e Staticeae. Essa divisão foi determinada por caracteres morfológicos, entretanto, parece estar coerente do ponto de vista químico. Na subfamília Plumbagineae é constante a presença de naftoquinonas nas raízes, enquanto que na Staticeae estas substâncias estão ausentes. Além disso, é constatada uma maior prevalência de flavonóides nas folhas e flores de Staticeae e a presença de taninos, enquanto este último não foi encontrado na Plumbagineae (LAWRENCE, 1951; HARBORNE, 1967).

As Plumbaginaceae são plantas herbáceas, arbustivas ou subarbustivas, com folhas inteiras, alternas, sem estípulas. As flores são vistosas, de coloração azul e simetria radial. No Brasil, existe uma espécie do gênero *Plumbago*, na região Nordeste e Leste, e uma do gênero *Limonium* em solos salgados, na região Sul (JOLY, 2005).

Trabalhos recentes de fitoquímica e farmacologia de produtos naturais relatam a presença de plumbagina, uma naftoquinona ativa contra *Helicobacter pylori*, em *Plumbago zeylanica* L., uma planta da subfamília Plumbagineae (LIN et al., 2003; HSIEH et al., 2005; WANG; HUANG, 2005a; WANG; HUANG, 2005b).

No estudo bibliográfico realizado por Paiva et al. (2003) estão relacionados os experimentos científicos de diferentes espécies pertencentes à família Plumbaginaceae. Foram relacionadas diversas atividades biológicas, entre elas, atividade leishmanicida, tripanossomicida, antimalária, antiviral, antitumoral, antimicrobiana e inseticida. A atividade anti-radicais livres de espécies da família Plumbaginaceae foi verificada em espécies vegetais independentes da subdivisão taxonômica. Essa ação foi relatada por Aniya et al. (2002) na espécie *Limonium wrightii* (Hance) Kuntze, pertencente a subfamília Staticeae, e por Natarajan et al. (2006) na espécie *P. zeylanica*.

Além disso, um composto de extratos de raízes vegetais, popularmente usado como contraceptivo na Índia, contendo *P. rosea* L. (Plumbaginaceae), foi administrado em ratas e verificaram-se alterações histológicas nas estruturas do útero e ovário. Os ensaios demonstraram que o ovário foi o principal sítio de ação (SARMA; MAHANTA, 2000).

1.1.2 Gênero *Limonium*

O gênero *Limonium* abrange cerca de 150 espécies e tem despertado interesse pela presença de substâncias fenólicas, principalmente taninos. Somente o *L. brasiliense* (Boiss.) Kuntze é encontrado no Brasil (LAWRENCE, 1951).

Murakeozy et al. (2002) verificaram e determinaram a concentração de *D*-pinitol (principal carboidrato do vegetal) em folhas e raízes de *L. gmelini* subsp. *hungarica*, planta nativa das áreas salgadas no interior da Hungria. Além disso, foi estudada a sazonalidade dessa substância e, relacionado sua presença com a função de proteção do vegetal em estresse osmótico.

Segundo Duhazé et al. (2003), o *L. latifolium* Kuntze possui rotas múltiplas para a produção de β -alanina e betaína β -alanina, substâncias envolvidas na osmoproteção do vegetal. Além disso, Duhazé et al. (2002) relacionaram as vias de degradação de espermidina, substância acumulada nas raízes, com a biossíntese de β -alanina e betaína β -alanina em *L. tataricum*.

O extrato aquoso de *L. wrightii* (Hance) Kuntze demonstrou forte ação anti-radicaís livres *in vitro* pelos métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e ânion superóxido e moderada ação para radicaís hidroxilas. A administração intraperitoneal desse extrato em ratos, que tiveram intoxicação hepática induzida por tetracloreto de carbono, demonstrou a redução da atividade sérica da aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase, efeito característico de atividade anti-radicaís livres *in vivo*. Essa ação foi relacionada principalmente com a presença de ácido gálico no extrato (ANIYA et al., 2002).

Utilizando o mesmo modelo de injúria hepática, Tang et al. (2007) verificaram o efeito hepatoprotetor do extrato das raízes de *L. sinense* (Girard) Kuntze. Foi observado o bloqueio significativo do aumento da atividade sérica da aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase. Além disso, o extrato demonstrou diminuir a condensação nuclear, a deposição lipídica e aumentar a transcrição e transdução do canal aniônico voltagem-dependente da mitocôndria.

A análise de amostras de sementes de 17 espécies diferentes de *Limonium* (não incluindo *L. brasiliense*) constatou, pela primeira vez nessa família, a presença de fitoecdisteroides (Figura 1) em 7 espécies (*L. bellidifolium* Dumont, *L. binervosum* Salmon, *L. gerberi* Soldano, *L. otolepis*, *L. peregrinum* R.A.Dyer, *L. perezii* (Stapf) F.T. Hubb. e *L. ramosissimum* (Poir) Maire). O estudo também demonstrou uma alta concentração dessa classe de substância nos extratos das folhas e raízes dessas espécies (WHITING et al., 1998). Os fitoecdisteroides foram descobertos em 1966 e estão presentes em aproximadamente 6% das espécies vegetais. Estas substâncias proporcionam ao vegetal a

atividade adaptogênica, que está envolvida nas propriedades anabólicas, antioxidantes, hepatoprotetores e hipoglicêmicas. Assim, drogas vegetais com estas substâncias estão envolvidas com atividades biológicas como agente antimutagênico, imunoestimulante e apresentam propriedades nutritivas e tônicas, bem como hipocolesterolêmica (KLEIN, 2004).

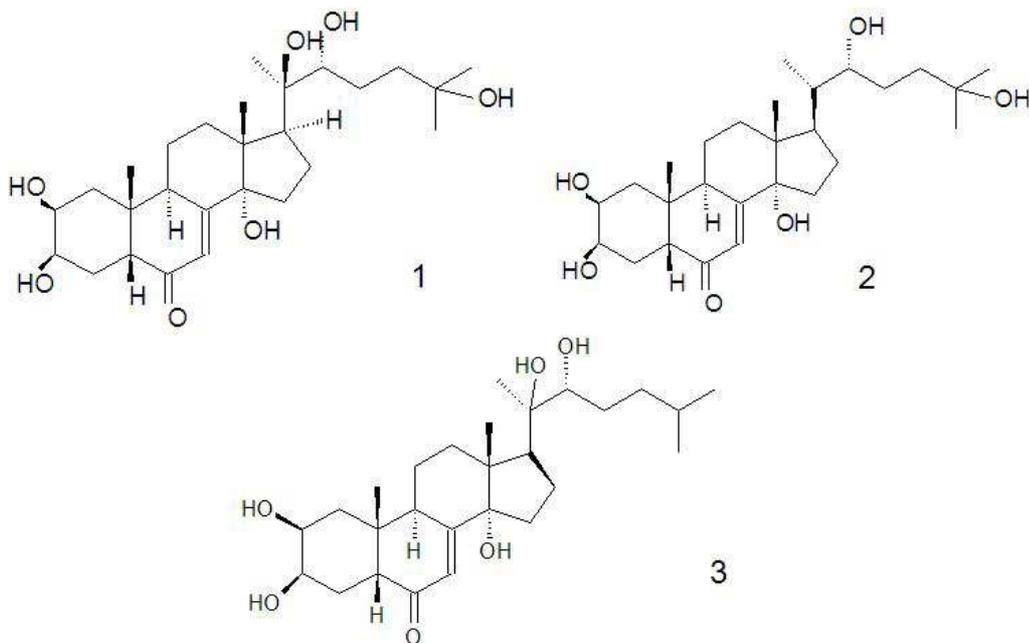


Figura 1 – Fitoecdisteroides identificados em espécies do gênero *Limonium*: (1) 20-hidroxiecdisona ($C_{27}H_{44}O_7$), (2) ecdisona ($C_{27}H_{44}O_6$) e (3) ponasterona A ($C_{27}H_{44}O_6$).

Adaptógenos são plantas medicinais que aumentam o “estado de resistência não específico” do organismo ao estresse, aumentando a resistência ao estresse físico, biológico, químico e psicológico, levando ao aumento da concentração, desempenho e tolerância durante a fadiga e promovendo a adaptação do organismo aos fatores ambientais e evitando danos a partir desses fatores. O mecanismo de ação dos adaptógenos é parcialmente associado com o eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal e sua resposta biológica se devem aos mediadores do estresse tal como corticosteróides, catecolaminas e óxido nítrico (BREKHMANN; DARDYMOV, 1969 apud MENDES; CARLINI, 2007; REGE et al., 1999; PANOSSIAN; WAGNER, 2005; PANOSSIAN; WIKMAN, 2005; MENDES; CARLINI, 2007; PANOSSIAN et al., 2009).

Segundo Kurul’kina et al. (2004a) e Zhusupova (2006), o *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze é usado na medicina popular, na república do Cazaquistão, como adstringente, em doenças gastrintestinais e do trato respiratório superior. Essa droga possui grande potencial

industrial, sendo incorporado na medicina e demonstrado em estudos pré-clínicos e clínicos de fase 1 e 2 a ação antiexsudato, antiproliferativa, antimicrobiana e ação necrolítica no uso tópico e em mucosas.

Os níveis de aminoácidos e minerais presentes nas partes aéreas e raízes do *L. gmelinii* foram relacionados por Zhusupova (2006), que constatou, significativamente, maior concentração nas partes aéreas, o que indica seu valor biológico. Além disso, foram identificadas duas protoantocianidinas diméricas (2*R*,3*R*,4*R*-epigalocatequina-(4 β →8)-2*R*,3*R*-epigalocatequina-3-*O*-galato e 2*R*,3*R*,4*R*-epigalocatequina-(4 β →8)-2*R*,3*R*,3,5,7,3',4',6'-hexahidroxiflavana) do extrato hidroetanólico das raízes de *L. gmelinii* (ZHUSUPOVA; ABIL'KAEVA, 2006a).

KURUL'KINA et al. (2004b) isolaram e identificaram, por métodos espectrométricos, substâncias biologicamente ativas das partes aéreas e raízes de *L. gmelinii* e *L. popovii*. As substâncias isoladas foram: ácido gálico, quercetina, miricetina, miricetrina, epigalocatequina-3-*O*-galato, 3-*O*- β -D-(6"-galoila)-galactopiranosídeo, miricetina 3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, 3-*O*- β -D-glucopiranosídeo, 3-*O*- β -D-(6"-galoila)-glucopiranosídeo, 3,5,7,3',4',6'-hexahidroxiflavona, miricetina 3-*O*- α -L-(2'-galoila)-arabopiranosídeo, sendo as duas últimas inéditas na literatura. Também foram isolados de *L. gmelinii*, os flavan-3-óis, galocatequina e epigalocatequina (ZHUSUPOVA; ABIL'KAEVA, 2006b). Anteriormente, já haviam sido isolados derivados de miricetina do *L. sinuatum* (ROSS, 1984).

Foi estudada a composição de ácidos graxos presentes nas raízes e partes aéreas de diferentes espécies de *Limonium* da região do Cazaquistão (*L. gmelinii*, *L. otolepis*, *L. popovii*, *L. myrianthum* (Schrenk) Kuntze, *L. leptophyllum* Kuntze, *L. suffruticosum*). Verificou-se que a composição qualitativa de ácidos graxos saturados e insaturados foi a mesma, porém, houve diferenças quantitativas entre as espécies. Além disso, verificou-se a maior concentração nas folhas em relação às flores e que a concentração de ácido graxo insaturado foi de duas a quatro vezes maior que de saturado nas partes aéreas (ZHUSUPOVA et al., 2006a; ZHUSUPOVA et al., 2006b).

A *L. bicolor* (Bunge) Kuntze, planta originária da China, é utilizada popularmente como enriquecedor do sangue e homeostásico, na cura de desordens menstruais e no tratamento de carcinomas uterinos. Três substâncias flavônicas do extrato das partes aéreas desta espécie foram isoladas e identificadas (ZHANG; ZOU, 2004).

Cinco flavonóides derivados da miricetina nas folhas e raízes de *L. meyeri* Kuntze, planta popularmente usada na Ásia, foram identificados por Movsumov e Garaev (2005). Já em *L. aureum* (L.) Hill, também da Ásia, foram encontrados 14 flavonóides, entre eles,

miricetina e seus derivados, quercetina e seus derivados, homoeriodictiol, naringenina, eriodictiol e canferol, isolados por Ye e Huang (2006).

Estudos recentes com o extrato etanólico das raízes secas de *L. sinense*, planta chinesa, demonstraram que o extrato é efetivo contra o vírus da Herpes Simplex tipo 1. Pelo fracionamento bioguiado isolou-se a samarangenina B, que em ensaios mostrou ser um agente antiviral contra a replicação do vírus e, aparentemente, sem citotoxicidade *in vitro* (KUO et al., 2002).

1.1.3 *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze

Inicialmente designado como *Statice brasiliense* Boiss. (DE CANDOLLE, 1848), foi apresentada, por Kuntze (1891), pelo nome botânico *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Figura 2). É conhecida, popularmente, como baicuru e guaicuru. É uma erva perene, distribuída pela Argentina, Uruguai e sul do Brasil – Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul – preferencialmente em terrenos baixo e sujeitos à maré (solo salino) e às margens do Rio da Prata (MOURA, 1984, MURRAY et al., 2004). Segundo Engler (1964), *L. brasiliense* é uma espécie pertencente à família Plumbaginaceae e à subfamília Staticeae.



Figura 2 – *Limonium brasiliense*, (A) partes aéreas e raízes, (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata das raízes. Foto: Andressa Blainski.

As características morfoanatômicas da raiz de baicuru estão descritas somente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (SILVA, 1926). O baicuru é uma erva de 30 a 50 cm de altura, com folhas basilares, longamente pecioladas, disposta em rosetas, com flores pequenas, de cálice avermelhado e corola azulada dispostas em panículas piramidais (MOURA, 1984).

Estudos prévios demonstraram a presença de taninos, leucoantocianinas, ácido hidroxicinâmico e ácido elágico nas raízes (MEDICINA et al., 1977 apud MURRAY et al., 2004; RAGONESE; MILANO, 1984 apud MURRAY et al., 2004).

No estudo bibliográfico e etnobotânico realizado por Fenner et al. (2006), *L. brasiliense* foi uma das espécies citadas pela população e usada no tratamento de úlceras e leucorréias, estando seu uso relacionado a uma potencial atividade antifúngica.

Atividades biológicas, como bacteriostática, anti-inflamatória e antagonista de bradicinina e ocitocina, foram relacionadas ao uso do extrato etanólico das raízes de *L. brasiliense* (JANHS; CRESCENTE, 1976 apud MURRAY et al., 2004).

Rosito (1975 apud CARDOSO, 1990) verificou a atividade do extrato hidroetanólico das raízes de baicuru frente *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. Além disso, verificou a presença de taninos hidrolisáveis, condensados, ácido 4-metóxi-gálico, β -sitosterol e saponinas triterpênicas no referido extrato.

Murray et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante, pela determinação do IC₅₀ através da habilidade de quelar radicais livres usando o método de DPPH. Do extrato metanólico das raízes de *L. brasiliense* foi isolado miricetina-3-O- α -raminopiranosídeo como componente mais ativo (IC₅₀=40,0 μ M) apresentando IC₅₀ de 20,7 μ M. Também foram verificadas a presença de ácido gálico, epigalocatequina, galocatequina, e epigalocatequina-3-O-galato.

Cardoso (1990) verificou a presença de ácido gálico, epicatequina e taninos condensados por técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). A interferência de fatores tecnológicos na produção de extratos (diferente teor alcoólico, tempo de maceração, granulometria da droga, método de extração) foi avaliada sobre a quantidade de ácido gálico extraído.

A atividade anti-inflamatória foi determinada no extrato etanólico das raízes de baicuru (250 mg/kg, i.p.) pela inibição do edema da pata de rato, induzido por carragenina, sendo os taninos os principais responsáveis por essa atividade. A ação antibacteriana foi relatada, sendo o ácido gálico responsável pelo efeito. O extrato apresentou sinais expressivos de toxicidade, pelo teste de toxicidade excessiva, por meio da administração

intravenosa (veia caudal), somente na dose de 2,0 g/kg. Além do ácido gálico, foram isolados ácido elágico, β -sitosterol, benzoato de benzila, sacarose, miricetina, uma flavona, uma isoflavona, uma flavonona, uma cumarina e três saponinas triterpênicas. No entanto, as estruturas descritas não foram elucidadas (MOURA, 1984).

Moura (1984) relata a comercialização de produtos industriais à base de baicuru pelos Laboratórios Regius (Elixir de Baicuru), Cageri (Tintura de Baicuru e Elixir de Agoniada e Baicuru), Flora da Índia (Elixir de Agoniada e Baicuru) e Klein (Tintura de Baicuru), além da comercialização em outros países da América do Sul.

Atualmente, os medicamentos relatados encontram-se, todos, com o registro vencido, segundo informações da base de dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os medicamentos são Elixir de Baicuru, Elixir de Caju e Chapéu de Couro (Laboratório Regius) e Elixir de Caroba Composto (Laboratório Kley Hertz) e o vencimento do registro foi em agosto/2003, setembro/2004 e maio/2006, respectivamente (BRASIL, 2008). Entretanto, o fitoterápico Agoniada Composto, do Laboratório Cibecol (2006), e Agoniada e Baicuru, do Laboratório Natusul, podem ser facilmente adquirido nas farmácias do Rio Grande do Sul, apesar de também não possuírem registro na ANVISA.

1.2 ASPECTOS QUÍMICOS

1.2.1 Substâncias fenólicas de plantas medicinais

Substâncias fenólicas abrangem uma ampla variedade de substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes em comum. As substâncias fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrem mais frequentemente combinadas com açúcares como glicosídeos e se localizam geralmente no vacúolo das células (HARBORNE, 1998).

As substâncias fenólicas contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitas delas importantes economicamente pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Têm-se relatado atividade antioxidante, sugerindo que doenças causadas pelas oxidações reativas em sistemas biológicos poderiam ser retardadas pela ingestão de substâncias fenólicas (CARVALHO et al., 2007). Pulido et al. (2000) afirmaram que o grau de hidroxilação e extensão de conjugação parecem ser os critérios que regem o poder redutor dos polifenóis da dieta, bem como o citado por Resende (2007) que constatou a capacidade antioxidante crescente para as substâncias epicatequina, procianidina B₂ e procianidina C₁, que possuem em suas estruturas, respectivamente, 4, 8 e 12 hidroxilas.

O processo clássico para detectar fenóis simples utiliza solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1%, obtendo-se assim colorações verde, púrpura, azul ou preta (HARBORNE, 1998). Além disso, os fenólicos são todos aromáticos, sendo assim, todos mostram uma intensa absorção na região do UV (CARVALHO et al., 2007; HARBORNE, 1998). Métodos espectrométricos são, dessa forma, especialmente importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE, 1998).

1.2.2 Taninos

A palavra tanino foi usada pela primeira vez por Seguin, em 1796, para definir o princípio adstringente da casca de carvalho que possui a propriedade de transformar a pele dos animais em couro (COSTA, 2002).

Taninos constituem um grupo de produtos naturais de grande diversidade estrutural e larga distribuição filogenética (HASLAM et al., 1975), sendo que sua ocorrência nas angiospermas é particularmente associada aos tecidos lenhosos (HARBORNE, 1998).

Industrialmente, os taninos são substâncias que, devido à habilidade de se complexarem com proteínas, são capazes de transformar peles de animais em couro. Nas plantas, devido ao seu sabor adstringente, uma das maiores funções dos taninos é a de ser uma barreira para herbívoros e insetos (HARBORNE, 1998).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias, tais como: diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substância. Dentre essas atividades podem-se citar: ação bactericida, fungicida (SCALBERT, 1991; SANCHES et al., 2005), antiviral (OKUDA et al., 1993; FELIPE et al., 2006), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993), ação antitumoral (OKUDA et al., 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpeessoai* (HOLETZ et al., 2005), atividade cicatrizante (LOPES et al., 2005), atividade de inibição de *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006), inibição de *Cryptococcus neoformans* (ISHIDA et al., 2009) e ação antinociceptivo (MELO et al., 2007). Os taninos podem atuar também como captadores de radicais, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2007).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis (Figura 3). Tais características são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

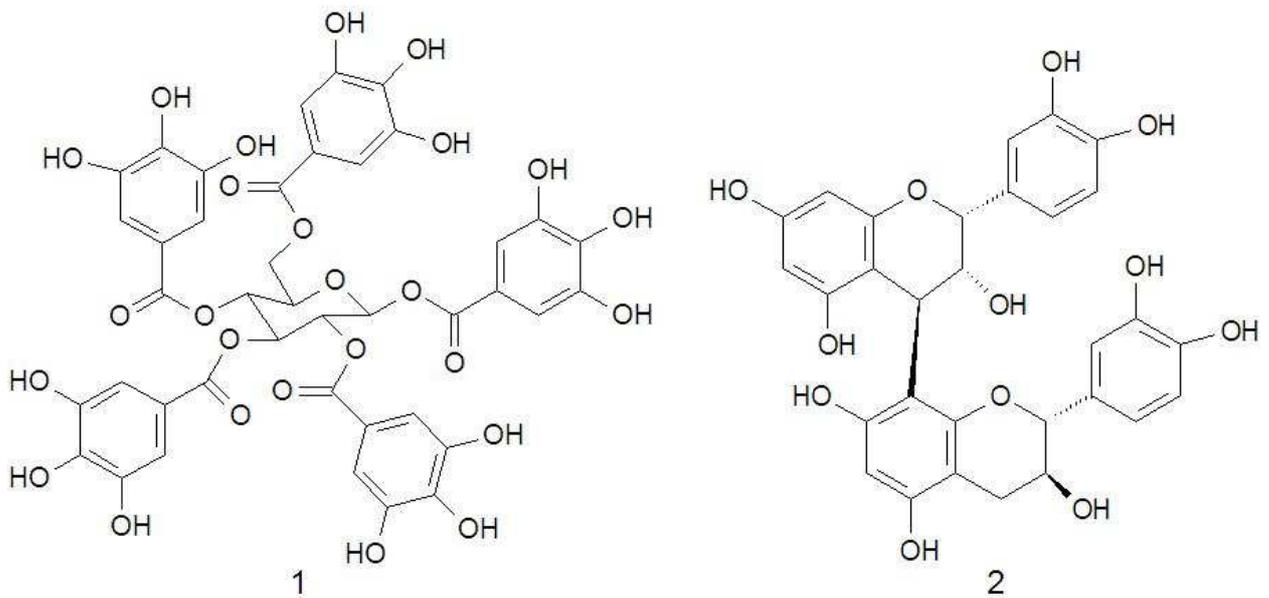


Figura 3 – (1) Exemplo de tanino hidrolisável [β -1,2,3,4,6-pentagaloil-*D*-glicose] e (2) exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4 β →8)-catequina] (SANTOS; MELLO, 2007).

Os taninos podem formar complexos com proteínas de forma reversível (pontes de hidrogênio) ou irreversível (ligação covalente). As pontes de hidrogênio são formadas provavelmente entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas. Já as interações covalentes ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos proteicos (LUCK et al., 1994). Esta propriedade de complexação com proteínas confere aos taninos a capacidade de inibir enzimas (SCHOLZ, 1994).

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Enquanto as proantocianidinas ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetales das dicotiledôneas (SANTOS; MELLO, 2007).

A análise de taninos em material vegetal é dificultada pela complexidade estrutural dessas substâncias e a obtenção de dados analíticos significantes depende de vários fatores, tais como, preparação, estocagem e técnica de extração apropriadas. Estes requerem certo conhecimento sobre a reatividade e estrutura da substância presente (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

A variabilidade estrutural de taninos hidrolisáveis é devido ao acoplamento oxidativo de unidades vizinhas de ácido gálico ou pela oxidação dos anéis aromáticos. Estas reações podem levar a formação de taninos hidrolisáveis de alta complexidade que são dificilmente detectados em técnicas colorimétricas, uma vez que estas detectam somente produtos mais simples, como a galloila ou a hexahidroxidifenoila (MUELLER-HARVEY, 2001).

Os taninos condensados são polímeros de unidades flavanol, que estão unidas por acoplamento oxidativo. Os taninos condensados podem ser solúveis ou insolúveis (alto peso molecular ou cadeia linear) (SCHOFIELD et al., 2001).

Para o processo de extração de taninos recomenda-se, devido à foto- e termo-sensibilidade dessas substâncias, a utilização da planta fresca ou, numa segunda opção, a droga vegetal liofilizada. Entretanto, estas condições podem ser inviáveis, assim, se utiliza, freqüentemente, o material seco a baixa temperatura (<40 °C) em estufa de ar circulante. Os taninos apresentam diferentes solubilidades e, portanto, a extração pode ocorrer com diferentes solventes. Em geral, prefere-se usar a mistura água-acetona por ser menos suscetível a reagir com os taninos hidrolisáveis (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

Para a triagem de amostras vegetais, técnica como CCD, considerada simples e acessível, são fundamentais na pesquisa e controle de qualidade de taninos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também é utilizada para a separação de taninos hidrolisáveis e condensados e, é possível, tanto o uso de colunas de fases normais como reversas (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

Técnicas mais modernas são usadas para determinar a identidade estrutural dos taninos. Destaca-se a ressonância nuclear magnética (RMN) e a espectrometria de massas, sendo a MALDI-TOF-MS a mais apropriada devido ao alto peso molecular das substâncias (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

Os ensaios biológicos, bioquímicos e químicos devem ser abordados em conjunto quando se considera o estudo de taninos. Somente quando se conhece o composto ativo e suas propriedades é que torna possível a escolha de uma técnica analítica particular e exata (MUELLER-HARVEY, 2001).

1.3 ASPECTOS ANALÍTICOS

1.3.1 Validação de metodologia analítica

A utilização cada vez mais difundida da medicina tradicional para o tratamento das necessidades primárias de saúde envolvendo o uso de plantas medicinais, e a consequente maior entrada de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos no mercado brasileiro, tem tornado mais clara, ainda, a necessidade de se buscar parâmetros para o controle de qualidade destes produtos. Um fator limitante para uma maior utilização das plantas é que, a maioria das que estão em uso não possui parâmetros de qualidade definidos, assim o estabelecimento de métodos analíticos validados, que garantam a quantificação de marcadores químicos para o controle da matéria-prima vegetal e dos produtos em transformação, tanto intermediários quanto finais, é fundamental para a produção de fitoterápicos com qualidade (SCHWANZ, 2006).

A implantação da validação de métodos analíticos de controle de qualidade é justificada por razões legais, técnicas e comerciais. A Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, diz que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO et al., 2003). A validação requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos (RIBEIRO et al., 2008).

Diversos guias contendo diretrizes sobre a validação estão disponíveis atualmente (ICH, 1996; BRASIL, 2003). No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (RIBEIRO et al., 2008).

A literatura dispõe de vários trabalhos, que abrangem as áreas biológica, farmacêutica e química, que definem critérios que devem ser seguidos durante a validação de métodos analíticos. Os critérios são abordados de acordo com sua área, e enfatiza-se a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação (BRITO et al., 2003).

2 OBJETIVOS

Este capítulo do trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a qualidade das raízes secas de *L. brasiliense* por técnicas de controle farmacognóstico.
- Preparar o extrato bruto das raízes secas de *L. brasiliense*.
- Validar a metodologia analítica de determinação do teor de taninos totais por espectrofotometria UV/Vis do extrato bruto de *L. brasiliense*.
- Determinar o teor de polifenóis totais no extrato bruto de *L. brasiliense*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze foram coletadas na cidade de Rio Grande, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (S 32° 09' 22"/W 52° 06' 01") em maio de 2006. As exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande sob o número HURG-004208. O material vegetal foi rasurado e seco em estufa de ar circulante à temperatura de 37 ± 2 °C, posteriormente moído em moinho de martelos e utilizado no desenvolvimento do trabalho conforme ilustrado na Figura 4. A coleta do material vegetal está registrada no IBAMA-SISBIO sob o número 11995-2, de 5 de julho de 2007, código de autenticação 79766943, sob a responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello.

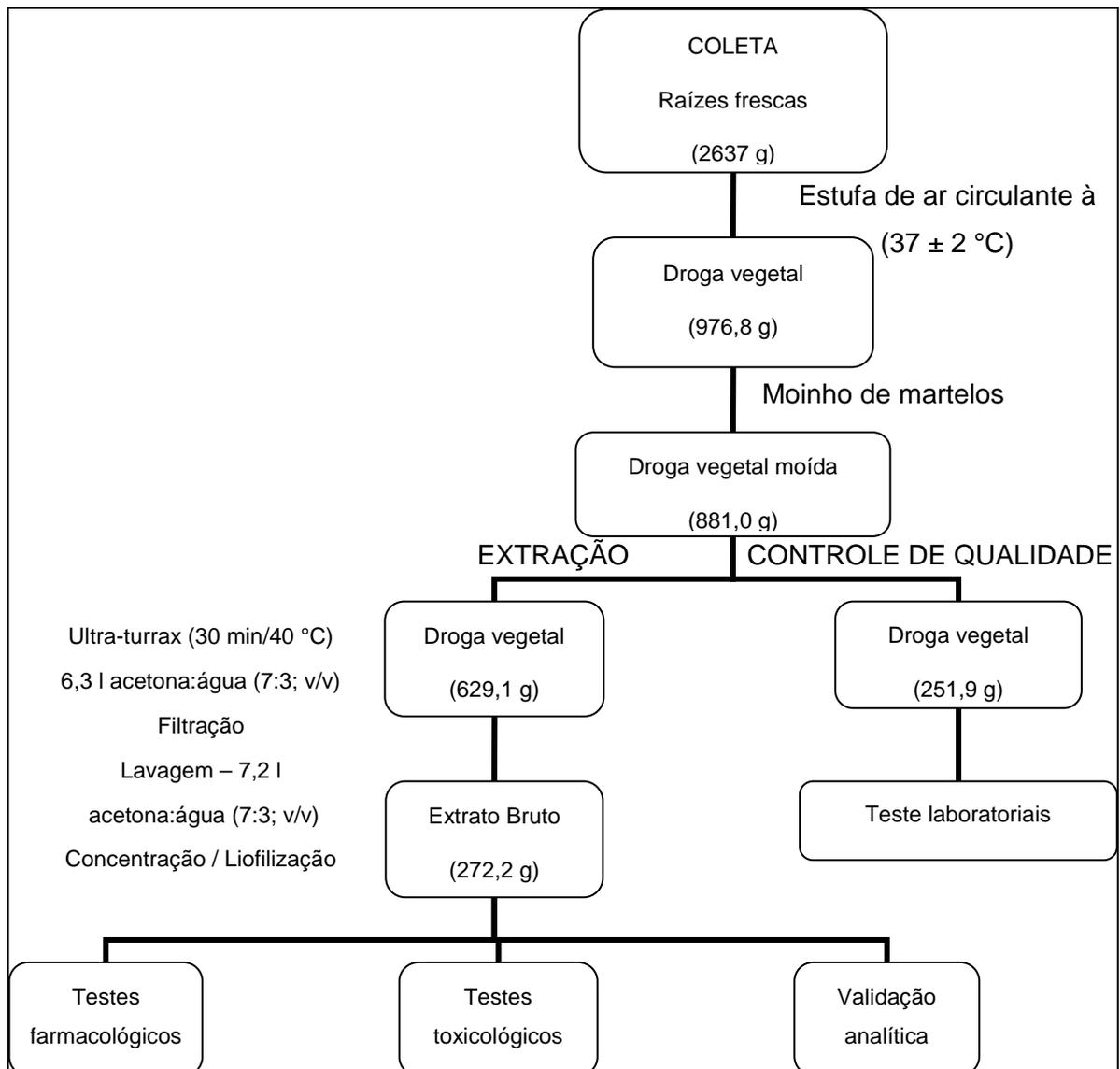


Figura 4 – Rota de trabalho e obtenção do extrato bruto de *L. brasiliense*.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vetec® ou Synth®, exceto quando especificado.

- Acetona
- Ácido gálico
- Ácido tânico
- Álcool de cereais
- Carbonato de sódio anidro
- Catequina
- Cloreto de sódio
- Metanol
- Nitrogênio líquido – Departamento de Física da UEM
- Pirogalol
- Pó de pele levemente cromado Freiberg®
- Reagente de Folin-Ciocalteu

3.2.2 Equipamentos

- Agitador magnético Fisatom
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica dessecadora com sistema de infravermelho, Ohaus® MB200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Banho-maria Fanem mod 120/3
- Bomba a vácuo Vaccubrand Labortechnik tipo MZ 2C
- Bomba a vácuo Vacumaster 15601
- Desumidificador de ar Arsec modelo 250M3U
- Espectrofotômetro Shimadzu UV/Vis PC-1650
- Estufa 105 °C J. Prolab JP101

- Evaporador rotatório Büchi R-114 capacidade 2 l
- Evaporador rotatório Büchi R-153 capacidade 20 l
- Liofilizador – Christ Alpha 1-4
- Moinho de martelos Tigre ASN-5
- Mufla LML
- Tamisador vibratório - RETSCH.
- Turbolizador Sire 2 l
- Ultra-som Unique USC 1540, 25 Hz
- Ultra-turrax UTC 115KT

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE

As técnicas para a avaliação da qualidade da droga vegetal foram realizadas segundo normas farmacopeicas e não farmacopeicas.

3.3.1 Análises físico-químicas

3.3.1.1 Determinação da perda por dessecação (FARMACOPEIA, 1988)

Cerca de 1 g da droga vegetal cominuída foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e colocado em estufa por 2 h, à temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, o pesa-filtro foi pesado e recolocado em estufa por mais 30 min. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados são expressos em perda de massa percentual, pela média de, no mínimo, cinco determinações.

3.3.1.2 Determinação da granulometria dos pós (HELMAN, 1982)

Foi empregada a técnica de análise granulométrica por tamisação. Foram utilizados tamises com malha de abertura: 0,84; 0,50; 0,42; 0,35; 0,21 e 0,18 mm e o coletor. Pesaram-se 25,0 g do vegetal moído que foram colocados no conjunto de tamises. O conjunto foi tamisado durante 20 min a 70 vibrações por minuto. Após a tamisação, procedeu-se à pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada peneira. O resultado é fornecido sob forma tabelar, apresentando-se classe granulométrica (CG; mm); intervalo de abertura de malha (Δm ; mm); dimensão granulométrica média (\bar{m} ; mm); fração retida percentual (F; %); fração resíduo percentual (R; %) e fração passagem percentual (P; %). Esses dados possibilitaram o cálculo do diâmetro médio de partícula (d_{50})

pelo ponto de cruzamento das curvas de passagem e retenção. Além disso, esse resultado foi comparado ao diâmetro médio calculado pela equação (ANSEL et al., 2005):

$$d_{50} = \frac{\bar{m} \cdot \sum R(\%)}{100}$$

3.3.1.3 Determinação do teor de resíduo seco (DEUTSCHES, 1986)

Cerca de 20,0 g da solução extrativa foram exatamente pesadas em pesa-filtro previamente tarado e evaporadas até *secura* em banho de água, sob agitação casual. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 3 h à temperatura de aproximadamente 105 °C, resfriado em dessecador, pesado e recolocado em estufa por mais 30 min. Este procedimento foi repetido até peso constante. O resultado é expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de, no mínimo, cinco determinações. As soluções extrativas analisadas foram: (A) Solução hidroetanólica 50 °GL; (B) Solução hidroetanólica 70 °GL; (C) Solução hidroetanólica 90 °GL; (D) Solução metanol:água (1:1, v/v); (E) Solução acetona:água (7:3, v/v). Todas as soluções foram preparadas em turbolizador (15 min/40 °C) na proporção de 10% (p/v) da droga vegetal moída.

3.3.1.4 Determinação de cinzas totais (FARMACOPEIA, 1988)

Foram exatamente pesados cerca de 3 g da droga pulverizada, transferidos para cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado. Após distribuir a amostra uniformemente no cadinho, incinerou-se em bico de Bünsen sobre placa de amianto. Em seguida, o cadinho foi calcinado, à temperatura de 450 °C, em mufla até que todo o carvão fosse eliminado; resfriou-se em dessecador e pesou-se a amostra. O resultado é calculado pela média de, no mínimo, três determinações quanto à porcentagem de cinzas em relação à droga seca.

3.3.2 Análise quantitativa

3.3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais (GLASL, 1983)

Foram pesados exatamente cerca de 0,750 g de droga pulverizada, transferida para um erlenmeyer com 150 ml de água deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 80 °C. Após resfriamento em água corrente, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Cerca de 80 ml do

extrato foram filtrados, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Em seguida, 2 ml dessa solução foram transferidos com 1 ml de reagente fosfomolibdotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio anidro 14,06%. Após 15 min da adição da última solução foi medida a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco.

Para determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos para um béquer contendo 0,100 g de pó-de-pele R e agitados durante 60 min. Após, a solução foi filtrada e 5 ml do filtrado foram diluídos com água para 25 ml em balão volumétrico. Em seguida, 2 ml dessa solução foram transferidos com 1 ml de reagente fosfomolibdotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio anidro 14,06% (p/v). Após 15 min da adição da última solução foi medida a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Os resultados são expressos pela média de, no mínimo, cinco determinações.

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as expressões:

$$PT = \frac{15625.Abs}{1000.m}$$

$$PNA = \frac{15625.Abs}{1000.xm}$$

$$TT = PT - PNA$$

Em que:

PT = polifenóis totais (%);

PNA = polifenóis não adsorventes (%);

Abs = absorvância;

m = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água;

TT = teor de taninos totais (%);

1000 = absortividade específica pela média da catequina, ácido gálico e ácido tânico.

As soluções extrativas descritas no item 3.3.1.3 (p. 40) foram liofilizadas e a determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais realizadas nos respectivos extratos secos. Seguiu-se a metodologia descrita acima, excluindo-se a etapa de extração. A quantidade de extrato na tomada de amostra foi calculada com base nos respectivos rendimentos dos extratos. Para se determinar a seletividade de extração de taninos de cada extrato, foi calculada a porcentagem de taninos totais em relação aos polifenóis totais pela fórmula:

$$\% = \frac{TT \cdot 100}{PT}$$

3.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

3.4.1 Extrato bruto (EB)

As raízes secas foram cominuídas em moinho de martelos. A extração foi realizada em Ultra-turrax, utilizando acetona:água (7:3; v/v) como líquido extrator, por 30 min com intervalos de 5 min, à temperatura inferior a 40 °C, na proporção de 10% (p/v). Em seguida a solução extrativa foi filtrada sob pressão reduzida em funil de Büchner, através do método de filtração por profundidade com tela de nylon de malha 0,182 µm, seguido por papel de filtro comum (gramatura de 94 g/m²) e algodão. Após, efetuou-se a evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório sob pressão reduzida, o extrato foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim o extrato bruto (EB).

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS EM EXTRATO BRUTO DE *L. BRASILIENSE*

Conforme a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003): “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, foi realizada a validação do método analítico para determinação de taninos totais, segundo metodologia geral proposta pela Farmacopeia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007) por espectrofotometria UV-Vis para a padronização do EB de *L. brasiliense*.

Para o processo de validação, que deve atender as exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados, foram realizados os seguintes ensaios: linearidade, especificidade, seletividade, limite de detecção e quantificação, intervalo, precisão, exatidão e robustez.

3.5.1 Determinação de taninos totais (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007)

Solução mãe: Pesar quantidade estabelecida de extrato e transferir para balão volumétrico de 250 ml. Completar o volume com água destilada.

Solução para polifenóis totais (PT): Diluir 5,0 ml do filtrado em balão volumétrico de 25 ml com água destilada. Transferir volumetricamente 2,0 ml desta solução, 1,0 ml de reagente fosfomolibdotúngstico R e 10,0 ml de água destilada em balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com solução de carbonato de sódio R a 29% (p/v). Determinar a absorvância em 760 nm (A_1) após 30 min, utilizando água destilada como líquido de compensação.

Solução para polifenóis não adsorventes por pó-de-pele (PNA): Para 10,0 ml do filtrado adicionar 0,100 g de pó-de-pele e agitar mecanicamente em béquer de 50 ml durante 60 min. Filtrar em papel de filtro. Diluir 5,0 ml desse filtrado em balão volumétrico de 25 ml com água destilada. Transferir volumetricamente 2,0 ml desta solução, 1,0 ml de reagente fosfomolibdotúngstico R e 10,0 ml de água destilada em balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com solução de carbonato de sódio R a 29% (p/v). Determinar a absorvância em 760 nm (A_2) após 30 min, utilizando água destilada como líquido de compensação.

Solução padrão: Dissolver imediatamente antes do uso 50,0 mg de pirogalol R em balão volumétrico de 100,0 ml com água destilada. Transferir volumetricamente 5,0 ml da solução em balão volumétrico de 100,0 ml e completar com água destilada. Transferir volumetricamente 2,0 ml dessa solução, 1,0 ml de reagente fosfomolibdotúngstico R e 10,0 ml de água destilada em balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com solução de carbonato de sódio R a 29% (p/v). Determinar a absorvância em 760 nm (A_3) após 30 min, utilizando água destilada como líquido de compensação.

Todas as operações foram protegidas da luz.

Calcular o teor em porcentagem de taninos totais (TT), expressos em pirogalol, usando a expressão:

$$TT = \frac{62,5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

Em que:

A_1 = absorvância da solução amostra para polifenóis totais;

A_2 = absorvância da solução amostra para polifenóis não adsorventes em pó-de-pele;

A_3 = absorvância da solução padrão;

m_1 = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água;

m_2 = massa de pirogalol, em gramas.

Para atender as condições laboratoriais, a solução de carbonato de sódio R 29% (p/v) foi preparada com carbonato de sódio anidro e a concentração corrigida para 10,75% (p/v). A solução mãe foi preparada em balão volumétrico de 25 ml e a tomada de amostra para os parâmetros de validação determinada para esse volume. Para o reagente fosfomolibdotúngstico R foi utilizado o disponível comercialmente reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 N.

3.5.2 Pré-validação

A metodologia foi submetida a uma etapa de pré-validação, na qual se avaliou a cinética de reação, comprimento de onda de absorção máxima e substância de referência que melhor caracteriza o EB de *L. brasiliense*. Dissolveu-se 1,0 mg, separadamente, de pirogalol, ácido gálico, ácido tânico e catequina em água destilada para balão volumétrico de 50 ml e, 7,5 mg de EB em balão volumétrico de 25 ml. Transferiram-se 2 ml de cada solução para balões volumétricos de 25 ml adicionando-se 10 ml de água destilada, 1 ml de reagente Folin-Ciocalteu e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio anidro 10,75% (p/v). Realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis no período de 10 a 40 min após a adição da última solução, em intervalos de 2 min entre cada leitura, determinando-se os espectros de varredura entre 400 e 800 nm. Utilizou-se água destilada como líquido de compensação. A comparação do percentual de aumento na absorvância de cada solução foi realizada considerando os comprimentos de onda de 691 (GLASL, 1983), 715 (FARMACOPEIA, 2004), 760 (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007) e 800 nm. Esse percentual foi calculado dividindo-se a diferença das absorvâncias médias entre dois comprimentos de onda pela absorvância média do comprimento de onda menor e multiplicando por 100. Em seguida, a comparação do percentual de aumento na absorvância de cada solução considerando os tempos de leitura de 10, 20, 30 e 40 min após o início da reação à 760 nm foi realizada. Esse percentual, de forma similar, foi calculado dividindo-se a diferença entre as absorvâncias de dois tempos pela absorvância obtida na leitura em menor tempo e multiplicando-se por 100.

3.5.3 Linearidade

Para esta análise foram utilizadas amostras de 10,0; 18,0; 26,0; 34,0 e 42,0 mg de EB de *L. brasiliense*, em triplicata, e realizada a análise da equação da reta. Considerou-se o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R^2) igual ou maior que 0,99, para que o método apresente linearidade dentro do intervalo de quantificação. Os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

3.5.4 Especificidade

A especificidade do método foi testada pelo acréscimo de 1 ml de uma solução (1,0 mg/ml) de pirogalol às cinco diferentes concentrações, em triplicata, da amostra em análise (descritas na linearidade). A curva gerada foi analisada e comparada com a curva de linearidade. O critério de aceitação para um método específico é a obtenção do mesmo coeficiente angular em ambas as curvas.

3.5.5 Seletividade

A seletividade do método foi testada pela adição de 2,0 mg de rutina (substância de referência para flavonóides) na amostra de 26,0 mg de EB de *L. brasiliense*, em triplicata. O método é considerado seletivo para taninos quando há aumento da absorvância em PT e PNA, permanecendo a diferença entre eles (TT) inalterada.

3.5.6 Limite de detecção

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da amostra até a menor concentração detectável do analito, escolhendo-se uma concentração inicial que esteja dentro do limite de quantificação. O resultado foi comparado ao limite de quantificação determinada pela curva de linearidade do EB de *L. brasiliense* pela fórmula:

$$LD = \frac{DPa.3}{IC}$$

Em que:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva

3.5.7 Limite de quantificação

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da menor amostra da curva de linearidade, e tomando-se amostras maiores que a maior amostra da linearidade. Foi determinada a menor e a maior amostra que manteve a linearidade da curva dentro do critério de aceitação de linearidade, coeficiente de correlação (R^2) igual ou maior que 0,99. O limite de quantificação inferior foi comparado ao resultado determinado pela curva de linearidade do EB de *L. brasiliense* pela fórmula:

$$LD = \frac{DPa.10}{IC}$$

Em que:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva

3.5.8 Intervalo

O intervalo de quantificação foi estipulado pelos limites de quantificação inferior e superior, no qual é possível analisar amostras e obter linearidade, exatidão e precisão.

3.5.9 Precisão

Foram avaliadas a precisão intra-corrída (repetibilidade) e a precisão inter-corrída (intermediária). A repetibilidade foi analisada por 6 determinações da amostra de 26,0 mg do EB de *L. brasiliense*. Para a precisão intermediária foi analisada, em triplicata, em dias diferentes (pelo menos 2 dias de intervalo), não sendo admitido coeficiente de variação superior a 5% em relação ao resultado obtido no teste de repetibilidade.

3.5.10 Exatidão

A exatidão do método foi realizada pela porcentagem de recuperação, considerando a adição de 1, 2 e 3 ml (concentrações baixa, média e alta, respectivamente) de soluções de pirogalol (1,0 mg/ml), em triplicata, à 26,0 mg de EB de *L. brasiliense*. A porcentagem de recuperação foi calculada pela fórmula:

$$R(\%) = \frac{A.100}{A_T}$$

Em que:

R(%) = porcentagem de recuperação;

A = absorvância obtida nas amostras;

A_T = absorvância teórica das amostras

A absorvância teórica foi calculada pela soma da absorvância de 26,0 mg de EB de *L. brasiliense* no teste de linearidade e da absorvância esperada pelo pirogalol determinada pela equação da reta da curva de calibração para cada nível (baixo, médio e alto).

3.5.11 Robustez

Para se determinar a robustez do método foi avaliada a estabilidade da solução à luz (realização do teste sem proteção da luz) e influência do pH na reação colorimétrica (ensaio com solução de carbonato de sódio anidro a 14,06% e 7,5% (p/v)), uma vez que a reação de Folin-Ciocalteu necessita de pH básico para ocorrer. As amostras foram preparadas, em triplicata, partindo-se de 26,0 mg de EB de *L. brasiliense* e os resultados comparados com a absorvância obtida, por essa amostra, no teste de linearidade.

3.5.12 Curva de calibração da substância de referência

A substância de referência escolhida como padrão externo para a determinação de polifenóis totais e taninos totais no EB de *L. brasiliense* foi o pirogalol. Para a determinação das absorvâncias teóricas do teste de exatidão e a absorvância específica da substância, foi feita a curva de calibração com 5 pontos pela tomada de amostra 2,0; 3,5; 5,0; 6,5 e 8,0 mg de substância e seguiu-se a metodologia descrita no 3.5.1 (p. 43). Considerou-se o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R^2) igual ou maior que 0,99 e os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Statistica[®] 8.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007). Os resultados foram expressos como a média±desvio padrão [coeficiente de variação (%)] e os mesmos foram analisados utilizando análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas

através do teste de Tukey para variância constante, considerando $P < 0,05$ como critério de significância. Os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples e residual, considerando R^2 igual ou maior que 0,99.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE

A qualidade e a disponibilidade dos medicamentos fitoterápicos são fatores problemáticos devido à complexidade estrutural das substâncias em análise e, principalmente, por o fitomedicamento ser constituído, na maioria das vezes por um conjunto de substâncias capazes de interagir e influenciar na farmacocinética, farmacodinâmica e segurança dos medicamentos e, dificultar o estudo analítico do mesmo. Assim, alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar, dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos, na pureza e mesmo nas características fenotípicas, ressaltam a importância da caracterização farmacognóstica, correlacionados com atividade farmacológica. Por isso, a origem geográfica exata e as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, coleta, secagem e armazenamento, bem como de tratamentos com agrotóxicos, descontaminantes e conservantes devem ser conhecidos (BRITISH, 1996). Embora o cultivo de plantas medicinais não constitua parte da tecnologia farmacêutica, esta etapa pode influenciar positivamente a formulação e uso de um fitomedicamento (LIST, SCHMIDT; 1989). Sem um adequado controle de qualidade e de produção, tornam-se inviáveis tarefas farmacêuticas essenciais como a garantia de reprodutibilidade dos lotes, conteúdo e concentração de princípios ativos ou ausência de contaminantes (YAMADA, 2006).

Portanto, para a obtenção de fitomedicamentos com qualidade, eficazes e seguros, além da pesquisa farmacológica, é necessário um longo processo de desenvolvimento, que se inicia desde o adequado processo de cultivo, estabilização e processamento dessa matéria-prima. Afinal, as influências ambientais que as plantas estão sujeitas, podem traduzir-se em alterações qualitativas e quantitativas dos seus constituintes químicos, que por sua vez, está ligada à eficácia e segurança farmacológica (MELLO, 1989).

Para o controle de qualidade de uma matéria-prima vegetal, diversos métodos químicos, físicos e físico-químicos tais como determinação da perda por dessecação, resíduo seco, quantificação do teor de substâncias ativas são utilizados a fim de caracterizar e padronizar o material vegetal ou mesmo seus derivados extrativos.

No desenvolvimento de um fitomedicamento, somente um processo eficaz de produção e de controle de qualidade, aliado aos estudos farmacológicos, podem garantir um adequado emprego terapêutico, pois, apesar dos efeitos adversos dos fitomedicamentos serem relatados com menor frequência, eles existem e vêm sendo confirmados nos estudos clínicos controlados. Com isso, a padronização química e o conhecimento da constituição do

fitocomplexo são importantes para diferenciar a ação farmacológica da potencial toxicidade (YAMADA, 2006).

A distribuição granulométrica obtida na técnica por tamização está descrita na Tabela 1 e representada na Figura 5. O diâmetro médio (d_{50}) das partículas, determinado pelo ponto de intersecção das curvas de passagem e retenção, é de 0,42 mm, enquanto o valor determinado pela equação proposta por Ansel et al. (2005), é de 0,22 mm. Esses valores apresentam diferença considerável e um estudo, considerando outros métodos de determinação do d_{50} , como métodos microscópicos, devem ser realizados, a fim de determinar com exatidão o d_{50} das partículas e discutir a falta de precisão entre os métodos. A distribuição granulométrica é um fator importante na obtenção de um extrato, já que um maior ou menor rendimento na extração está intimamente relacionado com a área de superfície e dimensões das partículas em contato com o líquido extrator (CARDOSO, 2002).

Tabela 1 – Análise granulométrica por tamização das raízes de *L. brasiliense* cominuídas em moinho de martelos.

CG (mm)	Δm (mm)	\bar{m} (mm)	F (%) ;	R (%)	P (%)
0,84	> 0,84		18,2	18,2	81,2
0,50	0,84 – 0,50	0,67	21,0	39,2	60,8
0,42	0,50 – 0,42	0,46	28,5	49,5	50,5
0,35	0,42 – 0,35	0,38	29,5	58,0	42,0
0,21	0,35 – 0,21	0,28	44,5	74,0	26,0
0,18	0,21 – 0,18	0,20	39,9	84,4	15,5
Coletor	0,00 – 0,18	0,09	15,6	100,0	0,0

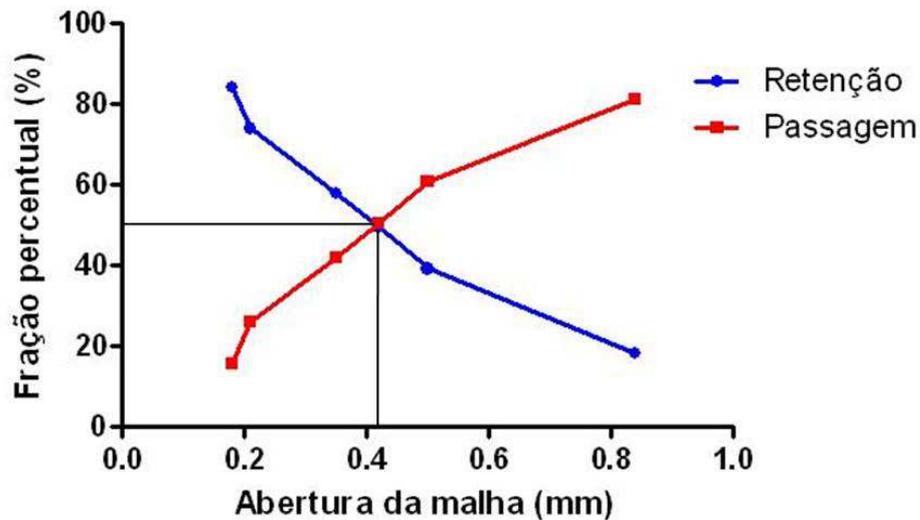


Figura 5 – Curva de distribuição granulométrica das raízes de *L. brasiliense* cominuídas em moinho de martelos no processo de tamisação.

A avaliação do teor de umidade presente nas raízes de *L. brasiliense* foi determinada pela perda por dessecação. As raízes secas moídas de *L. brasiliense* apresentam teor de umidade, pela técnica gravimétrica de perda por dessecação, de $11,09 \pm 0,25\%$ [CV(%)=2,28]. Este resultado demonstra a eficiência do processo de secagem. O teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias, assim como o descrito na Farmacopeia Brasileira 4ª edição, varia entre 8 e 14% para a droga vegetal, com poucas exceções especificadas nas monografias (FARMACOPEIA, 1988; FARIAS, 2007).

A presença de água em excesso, em drogas vegetais, promove o crescimento de fungos, bactérias ou insetos e hidrólise de constituintes. Por essa razão, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas nas quais a deterioração é promovida pela presença de água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado. Este parâmetro é fundamental para determinar a estabilidade da droga frente ao período de armazenamento (CARDOSO, 2002).

As raízes secas moídas de *L. brasiliense* apresentam teor de cinzas totais de $5,62 \pm 0,15\%$ [CV(%)=2,67]. O teor de cinzas totais varia de acordo com a espécie vegetal e, especificado individualmente em suas monografias farmacopeicas. Para droga vegetal, esse teor pode variar entre 3 a 15%, como pode ser observado em algumas monografias presentes na Farmacopeia Brasileira 4ª Edição (FARMACOPEIA, 2004; 2005), tais como

cinzas totais de Guaraná/*Paullinia cupana* Kunth (3%), Endro/*Anethum graveolens* L. (7%), Quebra-Pedra/*Phyllanthus niruri* (6%), Quebra-Pedra/*Phyllanthus tenellus* (8%), Pitangueira/*Eugenia uniflora* L. (12%), Ruibarbo/*Rheum palmatum* L. e/ou *Rheum officinale* Baill. (13%) e Guaco-Cheiroso/*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex. Baker. (15%).

A determinação de cinzas totais constitui um parâmetro de determinação da quantidade de impurezas inorgânicas não voláteis e de controle de qualidade, pois considera possível contaminação ou adulteração de produtos como por outras drogas vegetais (FARIAS, 2007). As cinzas totais incluem as derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderentes à superfície da droga vegetal (cinzas não-fisiológicas) (FARMACOPEIA, 1988).

O teor de constituintes químicos de um vegetal pode variar consideravelmente com a época e local de coleta, formas de cultivo, condições climáticas, entre outros. Assim, sugere-se a determinação do limite mínimo aceitável através de um estudo científico sistemático. Dessa forma, o doseamento de composto ou grupos químicos torna-se um parâmetro importante de qualidade (FARIAS, 2007).

No presente trabalho, as raízes secas moídas de *L. brasiliense* foram submetidas à extração em turbo-extrator, por 15 min não excedendo a temperatura de 40 °C, com 5 diferentes soluções. Os resultados estão expostos na Tabela 2. A determinação do teor de resíduo seco, além de um dado complementar de controle de qualidade, uma vez que determina quantitativamente as substâncias totais extraíveis de certa droga vegetal, contribui para a escolha do melhor líquido extrator, pois possibilita a utilização de diferentes soluções extrativas.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, há um aumento significativo no teor de resíduo seco da solução extrativa acetona:água (7:3; v/v) comparada às demais soluções ($F_{4,20}=136,0$; $P<0,001$). Além disso, o extrato seco dessa solução, apresentou significativamente maior teor de PT ($F_{4,20}=23,7$; $P<0,001$) e TT ($F_{4,20}=37,0$; $P<0,001$) e, seletivamente, maior teor de TT em relação aos PT ($F_{4,20}=86,0$; $P<0,001$). Essa diferença somada ao maior rendimento desse extrato (39,3%) demonstra que o melhor líquido extrator para a preparação do extrato bruto das raízes de *L. brasiliense* é a solução acetona:água (7:3; v/v). Segundo Santos e Mello (2007), a acetona promove o bloqueio da associação tanino-proteína, tornando assim a extração quantitativamente maior.

Tabela 2 - Valores médios dos ensaios físico-químicos, ensaios quantitativos e granulometria média obtidos das raízes de *L. brasiliense*.

Teores	Droga vegetal	Solução hidroetanólica 50 °GL*	Solução hidroetanólica 70 °GL*	Solução hidroetanólica 90 °GL*	Solução metanol:água (1:1, v/v)*	Solução acetona:água (7:3, v/v)*
Polifenóis totais $\bar{x} \pm dp$ [CV(%)]	15,78%±0,12 [0,77]	31,00%±0,32 [1,03]	29,27%±0,34 [1,17]	30,20%±1,12 [3,70]	31,27%±0,46 [1,49]	33,07%±0,64 [1,95]
Taninos totais $\bar{x} \pm dp$ [CV(%)]	13,81%±0,16 [1,22]	27,57%±0,33 [1,21]	25,34%±0,36 [1,42]	25,88%±1,02 [3,97]	27,74%±0,42 [1,54]	29,49%±0,60 [2,04]
%TT/PT $\bar{x} \pm dp$ [CV(%)]		88,94±0,27 [0,30]	86,55±0,34 [0,39]	85,69±0,50 [0,59]	88,70±0,21 [0,24]	89,19±0,49 [0,55]
Resíduo seco $\bar{x} \pm dp$ [CV(%)]		3,86%±0,06 [1,49]	3,59%±0,04 [0,99]	3,56%±0,02 [0,50]	3,88%±0,08 [2,06]	4,29%±0,07 [1,7]
Rendimento do extrato seco (g/100g)		37,8	32,4	29,5	37,2	39,3

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; * Soluções preparadas na proporção de 10% (p/v) de droga vegetal.

A ausência de dados oficiais farmacopeicos atualizados desta espécie dificulta a discussão destes resultados, mas o mesmo pode ser utilizado como parâmetro básico de controle de qualidade e padronização.

Kommission (1994) determinou um teor de taninos de 3% para o *Crataegus oxyacanta* L. (cratego) e de 10% para a ratânia (*Krameria triandra* Ruiz ET Pavon), drogas vegetais clássicas para taninos. Enquanto que para *Stryphnodendron obovatum* Benth. e *S. polyphyllum* Mart., Lopes et al. (2005) determinaram o teor de taninos em 19 e 12%, respectivamente.

Para a determinação do teor de taninos totais foram utilizadas as raízes secas e pulverizadas e os extratos secos obtidos pela concentração e liofilização das soluções extrativas preparadas para a determinação do resíduo seco. O método utilizado foi a clássica reação de Folin-Ciocalteu, um método espectrofotométrico que determina a intensidade da coloração azul formada pela redução do ácido fosfotúngstico com compostos fenólicos (FOLIN; MACALLUN, 1912; FOLIN; CIOCALTEU, 1927). Esta técnica baseia-se na associação dos taninos às proteínas, o que o torna mais específico, além de apresentar maior sensibilidade e robustez que os métodos gravimétricos para determinação de taninos (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Para contornar o problema da elevação da temperatura, foi realizada a técnica com duração de 30 min em seis etapas de 5 min, com intervalos de 10 min entre cada etapa, para resfriamento do sistema. O solvente de escolha para a extração foi acetona:água (7:3; v/v), como discutido no item 4.1 (p. 52) seguido de filtração, liofilização e rendeu 43,26% de um extrato de coloração marrom escuro, denominado extrato bruto (EB). O processo de turbo-extração se baseia na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, devido às forças de cisalhamento. O processo favorece a rápida dissolução das substâncias ativas tornando o método eficiente (VOIGT, 1993), o que soma simplicidade, rapidez e versatilidade, que permitem a fácil utilização dessa técnica em processamentos de pequena e média escala. Utilizou-se o Ultra-turrax®, que possui a inconveniência de gerar calor durante o processo e, posteriormente, dificultar a filtração, devido à fragmentação excessiva do material durante o processamento.

4.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS EM EXTRATO BRUTO DE *L. BRASILIENSE*

4.3.1 Pré-validação

Várias técnicas são empregadas para a análise de taninos. Embora as técnicas colorimétricas sejam amplamente usadas, muitas vezes, elas não representam um dado quantitativo exato, pois muitos compostos fenólicos possuem a propriedade de alterar diferentemente a cor por unidade de massa. Dessa forma, a utilização de um padrão externo implica na obtenção de um dado semi-quantitativo voltado, principalmente, para o propósito comparativo. Como alternativa aos métodos colorimétricos, métodos gravimétricos já foram propostos, entretanto estes são muito menos sensíveis e pouco robustos. O ensaio com azul da Prússia (*Prussian Blue*) é, provavelmente, o mais conhecido deles. Para taninos hidrolisáveis destacam-se reações colorimétricas específicas como os ensaios com reagente KIO_3 fornecendo coloração rosa, reagente de Rodanina para cor púrpura e, reagente $NaNO_2$ para cor vermelho. Entretanto, estas reações apresentam algumas desvantagens, como a especificidade para alguns grupos de taninos hidrolisáveis e/ou a inviabilidade da execução da técnica numa rotina laboratorial. Para taninos condensados, podem ser realizadas análises colorimétricas com butanol-HCl e vanilina produzindo antocianidinas vermelhas. Métodos alternativos como ensaios enzimáticos, precipitação de proteínas e inibição do crescimento microbiano tem a vantagem de refletir o modo biológico de ação dos taninos, porém dependem de muitas variáveis como a escolha da proteína ou enzima adequada (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

A metodologia de determinação de taninos totais pela redução do ácido fosfotúngstico formando a coloração azul, provavelmente, é a metodologia mais difundida e empregada, entretanto grande diversidade de especificidade é encontrada nas bibliografias científicas. A Farmacopeia Europeia (2007) determina o método de doseamento de taninos totais como uma técnica geral, podendo ser aplicada a qualquer planta que se deseja obter esse teor, desde que a quantidade de amostra utilizada no teste forneça uma absorvância dentro do intervalo linear de quantificação. A Farmacopeia Brasileira (2004; 2005) apresenta a metodologia a cada monografia em que a determinação do teor de taninos seja preconizada à droga vegetal. Notam-se diferenças entre as metodologias sugerindo que esta deva ser estudada e adequada a cada espécie vegetal. Encontram-se diferentes tempos de leitura (2 ou 3 min), a utilização do reagente Folin-Denis e ácido fosfotúngstico SR, diferentes comprimentos de onda (691, 715 ou 750 nm) e concentrações da solução de carbonato de sódio anidro (10,6%, 14,06% ou 20%). Dados que não se assemelham aos da

Farmacopeia Europeia que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, 30 min para leitura, comprimento de onda de 760 nm e carbonato de sódio anidro 10,75%.

Além disso, existe a falta de concordância entre as metodologias propostas em artigos. Glasl (1983) utilizou reagente Folin-Ciocalteu, 15 min para a realização da leitura, comprimento de onda de 691 nm e solução de carbonato de sódio anidro 14,06%. Silva (2007) utilizou reagente Folin-Ciocalteu, 30 min para a leitura a 760 nm e solução de carbonato de sódio 7,5%. Pansera et al. (2003) utilizaram reagente Folin-Denis, 2 h para a leitura a 725 nm e solução de carbonato de sódio 8%. Grubešić et al. (2005) utilizaram reagente Folin-Ciocalteu, 720 nm e solução de carbonato de sódio 12,4%.

O íon lítio presente na composição do reagente Folin-Ciocalteu promove a proteção dos reagentes à foto-decomposição e leva a melhor estabilidade da reação quando comparado aos reagentes Folin-Denis e fosfotúngstico SR, sendo mais indicado nas reações para determinação de polifenóis em drogas vegetais (FEDERMAN NETO; MARRETO, 2006)

O agente de adsorção dos taninos, utilizado na preparação da solução de polifenóis não adsorventes, também é variado; ora se utiliza pó-de-pele, ora caseína. Pode-se afirmar que a variabilidade de resultados experimentais está associada tanto ao tipo (purificada ou grau técnico) como à quantidade de caseína utilizada, que podem levar à obtenção de resultados errôneos. O pó-de-pele, assim como a caseína, demonstra capacidade de complexar com outros polifenóis além dos taninos, independente da quantidade utilizada na reação, demonstrando uma falta de seletividade do método de determinação de taninos totais (VERZA et al., 2007).

A escolha do padrão externo como referência na determinação de taninos totais é importante e bastante discutível. Enquanto as Farmacopeias Brasileira e Europeia adotam a utilização de pirogalol como substância de referência, artigos científicos apresentam os teores de taninos expressos em outras substâncias como ácido tânico e ácido gálico (CELESTE et al., 1992; PANSERA et al., 2003; SILVA, 2007). Por outro lado, é sabido que cada vegetal apresenta composição química característica e, geralmente há uniformidade nos grupos fenólicos numa mesma espécie. Assim, espera-se que estruturas químicas semelhantes apresentem potencial reacional semelhante. Verificou-se que a substância que melhor assemelha-se às características da composição química da uva-ursi é o ácido tânico; da ratânia, a catequina; da hamamélis, o ácido tânico e o ácido gálico; e da tormentila e do carvalho vermelho, o ácido gálico e a catequina. Nessas, em que mais de uma substância apresenta semelhança com a constituição química da espécie, é calculada a média da absorvidade específica entre as substâncias de referências (GLASL, 1983).

Nessa etapa, preliminar à validação, e tendo como base a metodologia preconizada pela Farmacopeia Europeia, realizou-se o estudo cinético da reação e a leitura entre 400 e 800 nm, comparando-se o comportamento do EB de *L. brasiliense* com diferentes soluções de referência (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol). Os desempenhos das soluções estão na Figura 6.

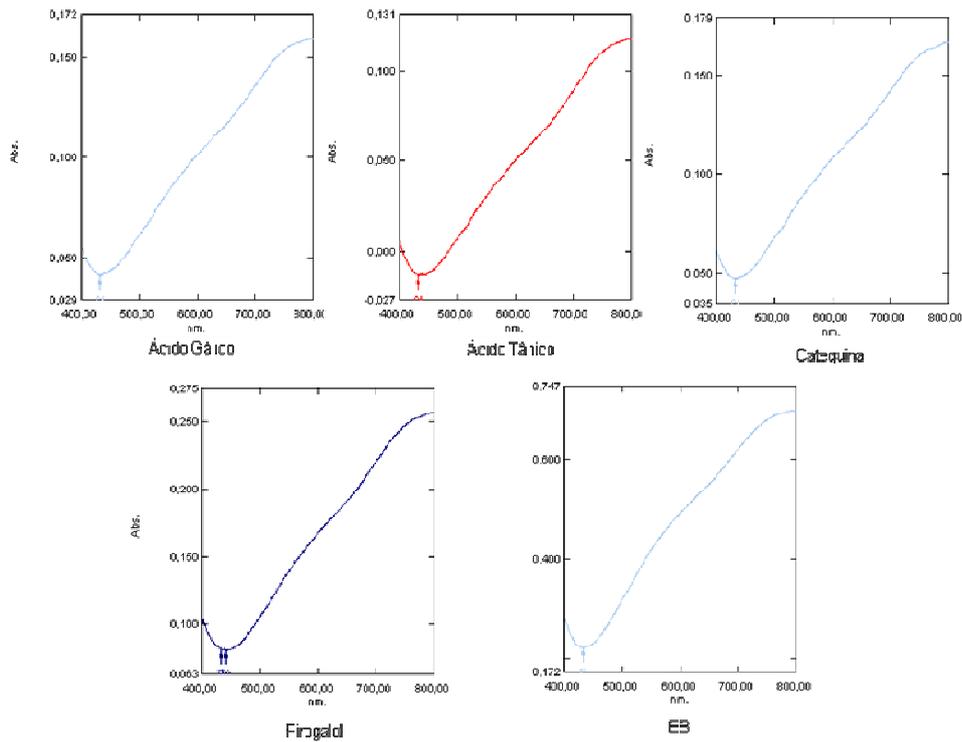


Figura 6 – Espectros de varredura no visível (400 a 800 nm) das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de *L. brasiliense* pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu no tempo de 30 min.

Como pode se perceber na Figura 6, os espectros não apresentam diferenças suficientes para distinguir a melhor substância de referência para o EB de *L. brasiliense*. Por essa razão, buscou-se comparar o percentual de aumento na absorvância de cada solução considerando os comprimentos de onda de 691, 715, 760 e 800 nm (Figura 7 e Tabela 3).

Tabela 3 – Absorvância das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de *L. brasiliense* pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu em diferentes tempos (min) e comprimentos de onda (nm).

Tempo (min)/ λ (nm)	Ácido Gálico				Ácido Tânico				Catequina				Pirogalol				EB de <i>L. brasiliense</i>			
	691	715	760	800	691	715	760	800	691	715	760	800	691	715	760	800	691	715	760	800
10	0,127	0,137	0,151	0,155	0,080	0,091	0,108	0,113	0,134	0,144	0,157	0,161	0,209	0,224	0,244	0,249	0,600	0,635	0,679	0,692
12	0,129	0,139	0,153	0,156	0,081	0,092	0,109	0,114	0,135	0,144	0,158	0,162	0,211	0,226	0,246	0,252	0,602	0,636	0,682	0,694
14	0,130	0,140	0,154	0,157	0,082	0,093	0,110	0,114	0,136	0,146	0,160	0,163	0,212	0,227	0,247	0,253	0,604	0,638	0,683	0,695
16	0,131	0,140	0,154	0,158	0,083	0,094	0,110	0,115	0,136	0,146	0,160	0,164	0,213	0,227	0,248	0,254	0,605	0,639	0,684	0,697
18	0,131	0,141	0,155	0,158	0,083	0,094	0,111	0,115	0,137	0,146	0,161	0,164	0,213	0,228	0,249	0,255	0,606	0,640	0,685	0,697
20	0,131	0,141	0,155	0,159	0,083	0,095	0,111	0,116	0,137	0,146	0,161	0,164	0,214	0,228	0,249	0,255	0,606	0,641	0,686	0,698
22	0,132	0,141	0,156	0,159	0,084	0,095	0,112	0,116	0,138	0,147	0,161	0,165	0,214	0,229	0,250	0,256	0,607	0,641	0,686	0,698
24	0,132	0,142	0,156	0,159	0,084	0,095	0,112	0,117	0,138	0,147	0,161	0,165	0,214	0,229	0,250	0,256	0,607	0,641	0,686	0,699
26	0,132	0,142	0,156	0,159	0,084	0,095	0,112	0,117	0,138	0,147	0,162	0,165	0,214	0,229	0,250	0,256	0,608	0,642	0,687	0,699
28	0,132	0,142	0,156	0,160	0,084	0,096	0,113	0,117	0,138	0,148	0,162	0,166	0,215	0,229	0,250	0,257	0,608	0,642	0,687	0,699
30	0,132	0,142	0,156	0,160	0,085	0,096	0,113	0,118	0,139	0,148	0,162	0,166	0,215	0,230	0,251	0,257	0,608	0,642	0,687	0,699
32	0,132	0,142	0,156	0,160	0,085	0,096	0,113	0,118	0,139	0,148	0,162	0,166	0,215	0,230	0,251	0,257	0,608	0,642	0,687	0,699
34	0,132	0,142	0,156	0,160	0,085	0,096	0,113	0,118	0,139	0,148	0,162	0,166	0,215	0,230	0,251	0,257	0,609	0,642	0,687	0,699
36	0,133	0,142	0,156	0,160	0,085	0,096	0,113	0,118	0,139	0,148	0,162	0,166	0,216	0,230	0,251	0,258	0,609	0,642	0,687	0,699
38	0,133	0,142	0,156	0,160	0,085	0,097	0,114	0,119	0,139	0,148	0,163	0,166	0,216	0,230	0,251	0,258	0,609	0,643	0,687	0,699
40	0,133	0,142	0,157	0,161	0,086	0,097	0,114	0,119	0,139	0,148	0,163	0,167	0,216	0,231	0,251	0,258	0,609	0,643	0,687	0,699

A análise estatística considerando as médias de cada comprimento de onda (691, 715, 760 e 800 nm) no período de 10 a 40 min demonstra um aumento significativo na absorvância a 760 nm quando comparado com os valores obtidos a 691 e 715 nm para todas as soluções (ácido gálico, $F_{60,3}=1081,9$, $P<0,001$; ácido tânico, $F_{60,3}=1213,8$, $P<0,001$; catequina, $F_{60,3}=1033,2$, $P<0,001$; pirogalol, $F_{60,3}=1337,4$, $P<0,001$; EB, $F_{60,3}=4910,0$, $P<0,001$). Esta análise também aponta uma diferença significativamente maior para as absorvâncias a 800 nm, porém, como a Figura 7 demonstra, esse acréscimo é inferior a 5% comparado à absorvância a 760 nm. Este dado, somado a possíveis interferentes que possa existir nesse comprimento de onda sugere não se escolher essa condição e justifica a permanência da leitura a 760 nm como preconizado pela Farmacopeia Europeia.

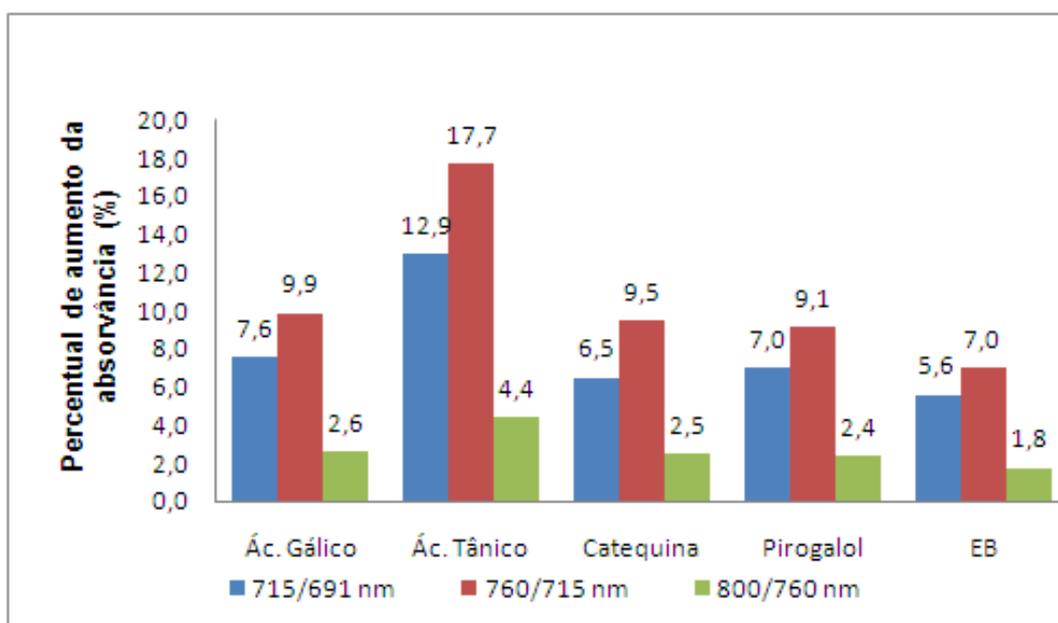


Figura 7 – Percentual de aumento da absorvância média de um comprimento de onda em relação ao comprimento de onda anterior considerando as leituras à 691, 715, 760 e 800 nm de 10 a 40 min das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de *L. brasiliense* pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu.

Considerando a escolha pelo comprimento de onda de 760 nm, comparou-se o percentual de aumento na absorvância de cada solução considerando os tempos de leitura de 10, 20, 30 e 40 min após o início da reação (Figura 8).

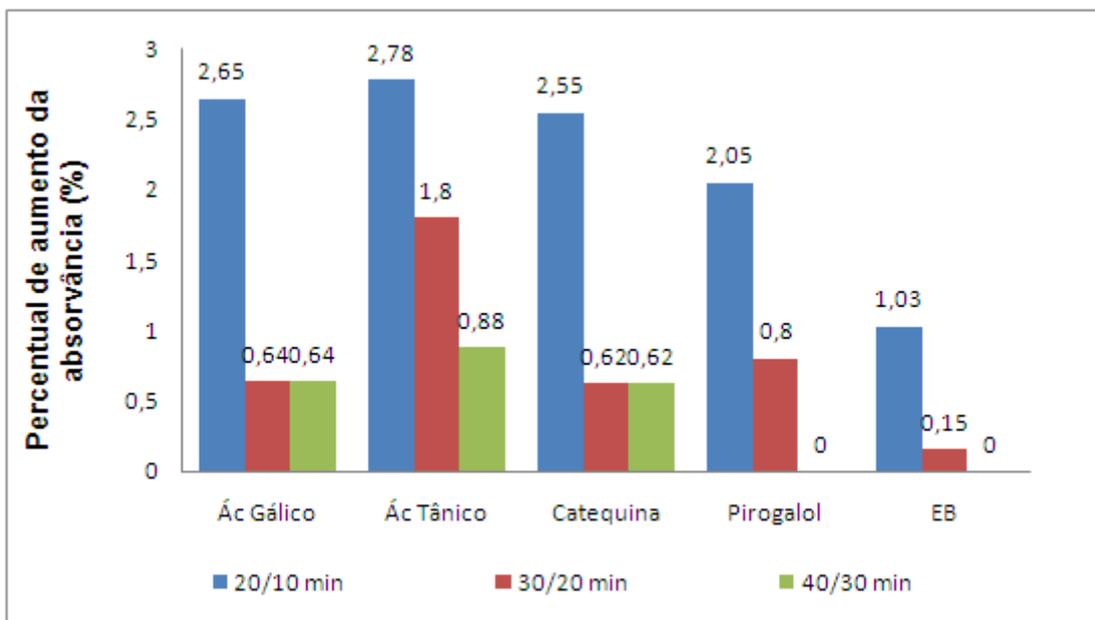


Figura 8 – Percentual de aumento da absorvância em um tempo de leitura em relação ao tempo anterior considerando as leituras à 10, 20, 30 e 40 min à 760 nm das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de *L. brasiliense* pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu.

Os dados da Figura 8 demonstram que a reação de redução do ácido fosfotúngstico é estável sendo que o aumento na absorvância a 30 min não ultrapassa 5% em relação à absorvância a 10 min. Além disso, não há decréscimo na absorvância a partir dos 30 min. Assim, opta-se pela permanência da leitura a 30 min, como preconizado inicialmente pela metodologia.

A cinética de reação do reagente Folin-Ciocalteu com pirogalol e EB de *L. brasiliense* mostraram comportamentos semelhantes (Figuras 7 e 8). O percentual de aumento das absorvâncias de ambos é próximo e, atinge a absorvância máxima em 30 min. Além disso, as substâncias analisadas apresentam diferentes absorvidades específicas (Tabela 4) o que demonstra que diferentes polifenóis podem alterar diferentemente a cor, da solução reacional, por unidade de massa e, levar à determinação de teor de polifenóis ou taninos totais que não refletem a quantidade real. A intensidade reacional dos compostos fenólicos com o reagente Folin-Ciocalteu segue o princípio clássico da relação estrutura-atividade, em que a ordem de atividade é proporcional à disponibilidade de grupos hidroxilas presentes no anel aromático (SINGLETON et al., 1999 apud NENADIS et al., 2007). Nenadis et al. (2007) compararam o potencial reacional de diferentes substâncias, entre elas, ácido gálico, ácido caféico, ácido ascórbico e trolox, e verificaram que a atividade reducional das substâncias

com o reagente Folin-Ciocalteu é proporcional à quantidade de hidroxila disponível e influenciada por grupamentos substituídos que podem diminuir ou aumentar o potencial reducional da molécula. Considerando a estrutura molecular das substâncias de referências em estudo (Figura 9), observa-se que o pirogalol é o que apresenta maior número de hidroxilas proporcional à massa molar. Além disso, o pirogalol constitui-se por apenas um anel aromático e ausência de grupamentos substituídos, o que proporciona uma estrutura tridimensional com hidroxilas com menor influência por interações eletrônicas, como impedimento estérico ou efeito ressonância, que diminuiriam a disponibilidade dessas hidroxilas em promover a redução de outros compostos. Dessa forma, o pirogalol apresenta maior absorvidade específica (Tabela 4) e, provavelmente, seja a melhor substância de referência na determinação de taninos totais por, indiretamente, representar o potencial reducional da droga vegetal considerando a disponibilidade total das hidroxilas ligadas ao anel aromático.

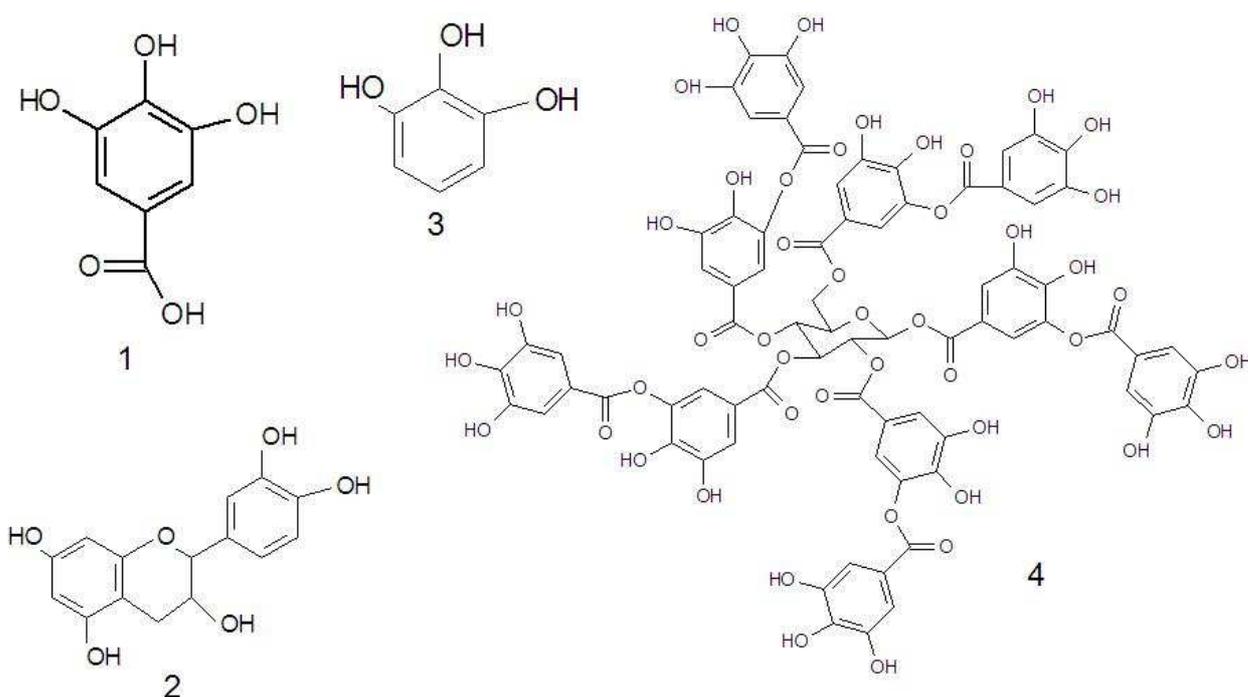


Figura 9 – Estrutura química das substâncias de referências: (1) ácido gálico ($C_7H_6O_5$), (2) catequina ($C_{15}H_{14}O_6$), (3) pirogalol ($C_6H_6O_3$) e (4) ácido tânico ($C_{76}H_{52}O_{46}$).

Tabela 4 – Absorvâncias específicas das substâncias de referência e teor de polifenóis totais aproximado no EB de *L. brasiliense* expressos em cada substância à 760 nm e 30 min pela reação colorimétrica com Folin-Ciocalteu.

	Absortividade específica	Teor de polifenóis totais em EB de <i>L. brasiliense</i> (%)
Ácido gálico	975,0	29,4
Ácido tânico	802,6	35,7
Catequina	1191,2	24,0
Pirogalol	1584,6	18,1

As absortividades específicas das substâncias referências em estudo estão na Tabela 4. A comparação com dados da literatura é dificultada pelas diferenças metodológicas de cada determinação. Glasl (1983) determinou a absortividade específica do ácido gálico, ácido tânico e catequina, pela reação com reagente Folin-Ciocalteu após 15 min e à 691 nm, e obteve os resultados 1181; 918 e 1006, respectivamente. O ácido gálico, comparativamente, apresentou maior absortividade específica que a catequina, fato não observado neste trabalho. Entretanto, para verificar quais das duas substâncias realmente apresentam maior atividade reducional do reagente Folin-Ciocalteu, um estudo priorizando a influência estrutural da molécula deve ser realizado.

4.3.2 Linearidade

Para esta análise foi realizada a metodologia descrita no item 3.5.1 (p. 43). A demonstração da intensidade da reação colorimétrica para linearidade está na Figura 10. As massas do EB de *L. brasiliense* utilizadas e suas respectivas absorvâncias estão descritas na Tabela 5 e Figura 11.

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

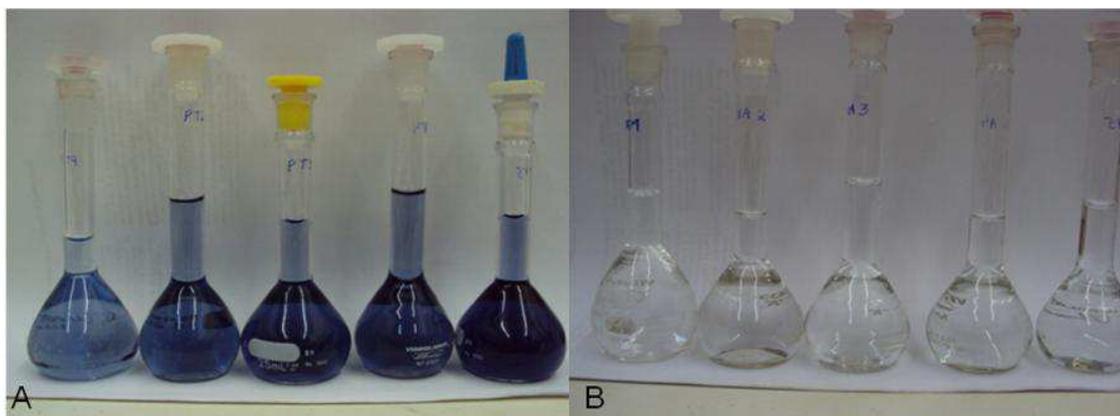


Figura 10 – Reação colorimétrica, em concentração crescente para PT (A) e PNA (B) do EB de *L. brasiliense* pela reação de Folin-Ciocalteu. Fotos: Andressa Blainski.

Tabela 5 – Concentração de EB de *L. brasiliense* utilizadas e as respectivas absorvâncias médias (n=3) para a obtenção da curva de linearidade.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$) EB	Absorvância (uA) para PT ($\bar{x} \pm dp$ [CV(%)])	Absorvância (uA) para PNA ($\bar{x} \pm dp$ [CV(%)])
6,40	0,227 \pm 0,01 [4,8]	0,011 \pm 0,005 [44,4]
11,52	0,393 \pm 0,01 [3,5]	0,022 \pm 0,002 [7,9]
16,64	0,550 \pm 0,01 [1,6]	0,017 \pm 0,004 [24,2]
21,76	0,698 \pm 0,01 [2,1]	0,030 \pm 0,004 [12,0]
26,88	0,834 \pm 0,003 [0,3]	0,029 \pm 0,004 [15,0]

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

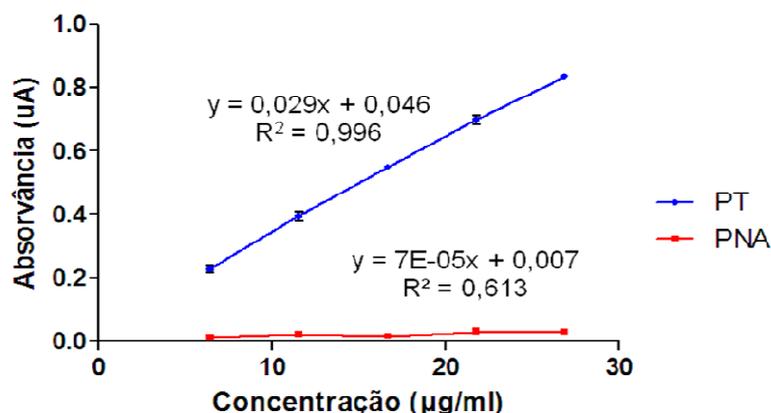


Figura 11 – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (R^2) e equação da reta para PT e PNA, obtidos pela relação de cinco diferentes concentrações de EB de *L. brasiliense* pelas absorvâncias obtidas na reação com reagente Folin-Ciocalteu.

Na determinação da melhor faixa de aplicação, foram utilizadas análises estatísticas. Baseando-se nas análises dos resultados obtidos, os pontos caem próximos da reta, demonstrando uma distribuição normal para a amostra (Figura 12) e, se observa que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero (Figura 13). Além disso, para analisar a adequação do método e a significância estatística do modelo linear, duas condições precisam ser satisfeitas: a 'soma do erro puro' deve ser maior que o 'erro por falta de ajuste' e, o 'quadrado médio do erro por falta de ajuste' dividido pelo 'quadrado médio do erro puro' deve ser menor que o valor tabelado na distribuição "F" para determinado grau de liberdade. Os valores obtidos na análise de resíduo no teste de linearidade para 'soma do erro puro', 'erro por falta de ajuste', 'quadrado médio do erro por falta', 'quadrado médio do erro puro' foram, respectivamente, 0,0012; 0,0010; 0,00010 e 0,00040. Sendo o "F tabelado" para esses dados 3,71, o método satisfaz as condições estatísticas, demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa ($F_{1,13}=3999,8$, $P<0,001$).

Considerando os resultados obtidos e a representação na curva para a análise de PNA, observa-se que não há linearidade do método para esse parâmetro. Esse dado pode ser devido à falta de especificidade/seletividade da complexação do pó-de-pele, levando à adsorção de outras substâncias além dos taninos ou, ainda, pela própria constituição química do EB de *L. brasiliense*, se esta contiver concentrações insignificantes de polifenóis que não taninos, isto poderia levar a obtenção de uma absorvância abaixo do limite de quantificação.

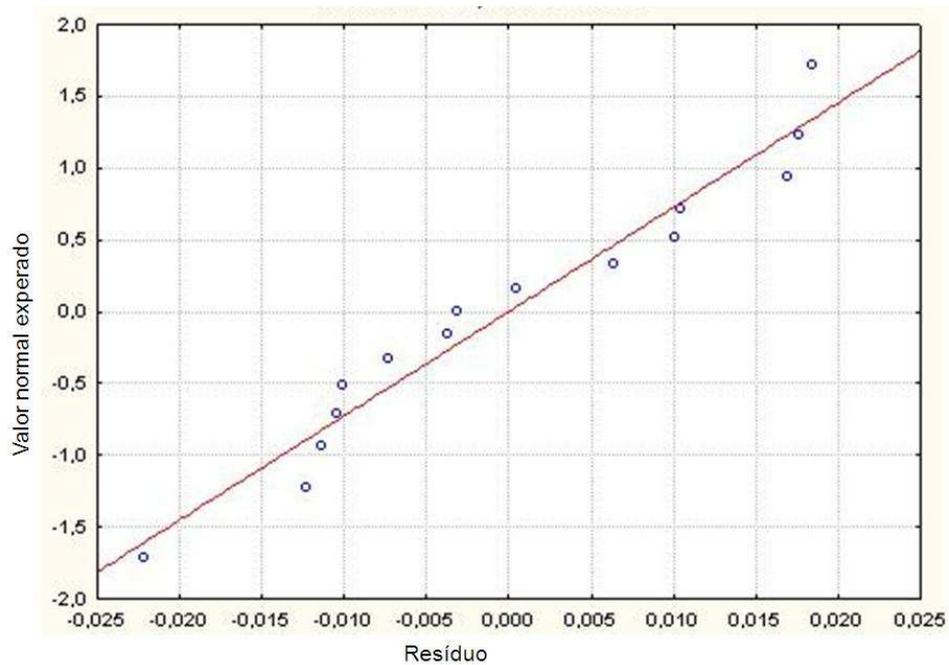


Figura 12 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade para PT das amostras de EB *L. brasiliense*.

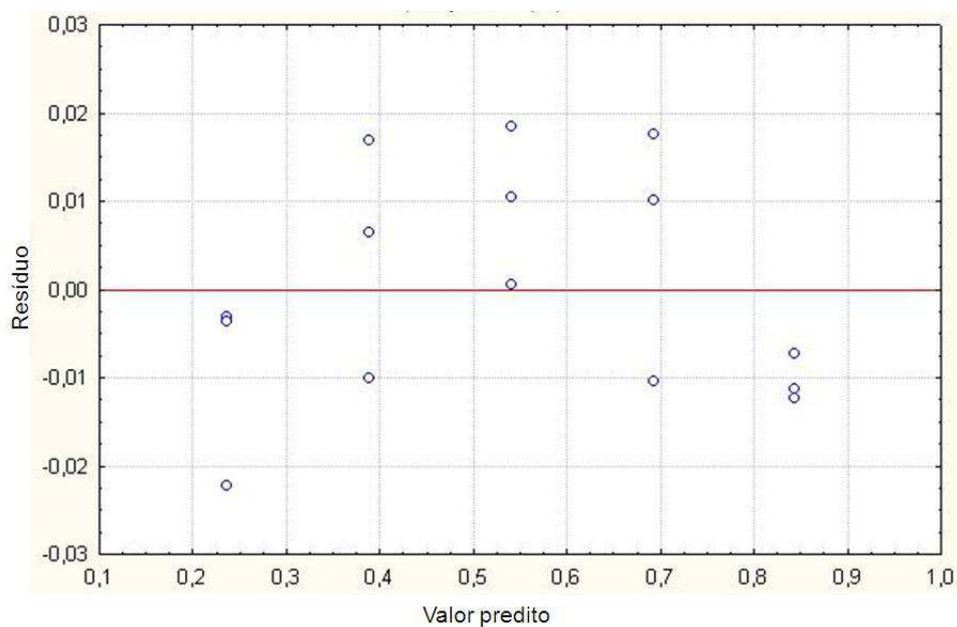


Figura 13 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de EB de *L. brasiliense* para análise de PT.

Segundo a RE nº. 889/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R^2) deve ser igual a 0,99. No entanto, apenas o valor do coeficiente de

correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Modelos de calibração com resíduos altos no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um comportamento linear (RIBEIRO et al., 2008).

4.3.3 Especificidade

As médias das absorvâncias estão apresentadas na Tabela 6 e representadas na Figura 14 de acordo com a metodologia proposta. Assim, foi adicionado 1 ml de uma solução de pirogalol 1,0 mg/ml a cada solução-mãe nas concentrações descritas no teste de linearidade. Realizou-se o teste em triplicata para PT e PNA normalmente.

Baseando-se nas análises estatísticas dos resultados obtidos, os pontos caem próximos da reta, assim a amostra segue uma distribuição normal (Figura 15) e, se observa que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero (Figura 16) e pode-se dizer que há linearidade do método para a análise de PT.

Considerando os resultados obtidos e a representação da curva para a análise de PNA, repete-se o anteriormente observado no teste de linearidade, verificando-se que não há linearidade do método para esse parâmetro no teste de especificidade. Além disso, esperava-se que o pirogalol acrescido na solução-mãe, como substância de referência para taninos, tivesse o comportamento de taninos sendo adsorvido pelo pó-de-pele. Isso não é verificado, uma vez que se observa o aumento na absorvância dos PNA na mesma proporção que nos PT (aproximadamente 0,1 uA).

Tabela 6 – Concentração de EB de *L. brasiliense* utilizada acrescida de substância referência e as respectivas absorvâncias médias (n=3) obtidas no teste de especificidade.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$) EB + 1 $\mu\text{g/ml}$ de substância referência	Absorvância PT (μA) ($\bar{x} \pm dp$ [CV(%)])	Absorvância PNA (μA) ($\bar{x} \pm dp$ [CV(%)])
6,40	0,325 \pm 0,004 [1,3]	0,101 \pm 0,007 [7,3]
11,52	0,496 \pm 0,005 [1,1]	0,114 \pm 0,004 [3,6]
16,64	0,654 \pm 0,008 [1,3]	0,118 \pm 0,004 [3,4]
21,76	0,820 \pm 0,004 [0,53]	0,124 \pm 0,004 [3,7]
26,88	0,960 \pm 0,018 [1,8]	0,144 \pm 0,016 [11,4]

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

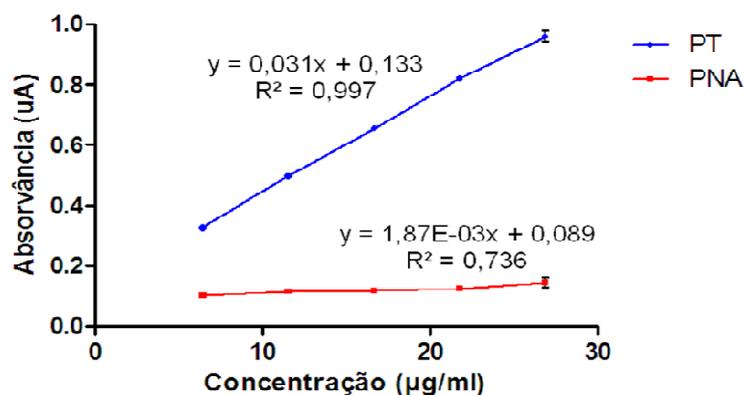


Figura 14 – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (R^2) e equação da reta para PT e PNA, obtidos pela relação de cinco diferentes concentrações de EB de *L. brasiliense* acrescidas de 0,64 $\mu\text{g/ml}$ de pirogaloil e as absorvâncias obtidas pela reação com reagente Folin-Ciocalteu.

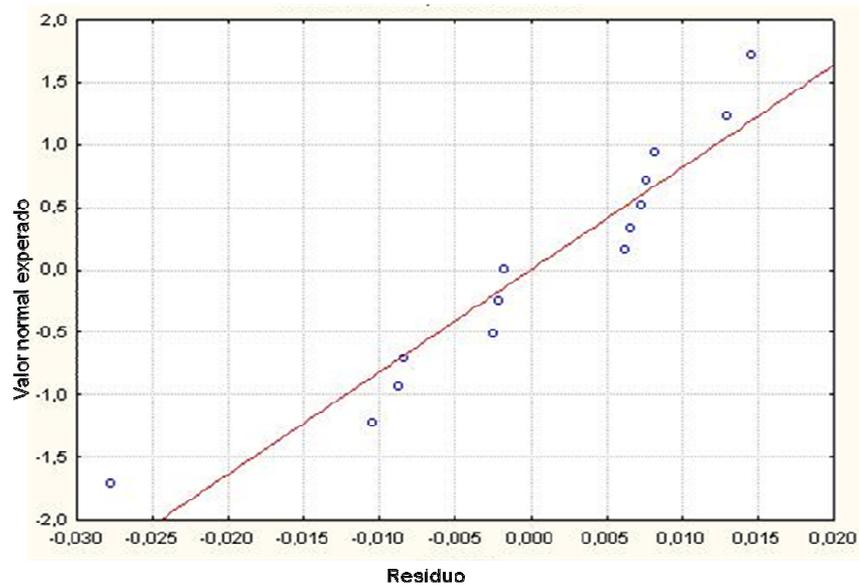


Figura 15 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de especificidade para PT das amostras de EB *L. brasiliense*.

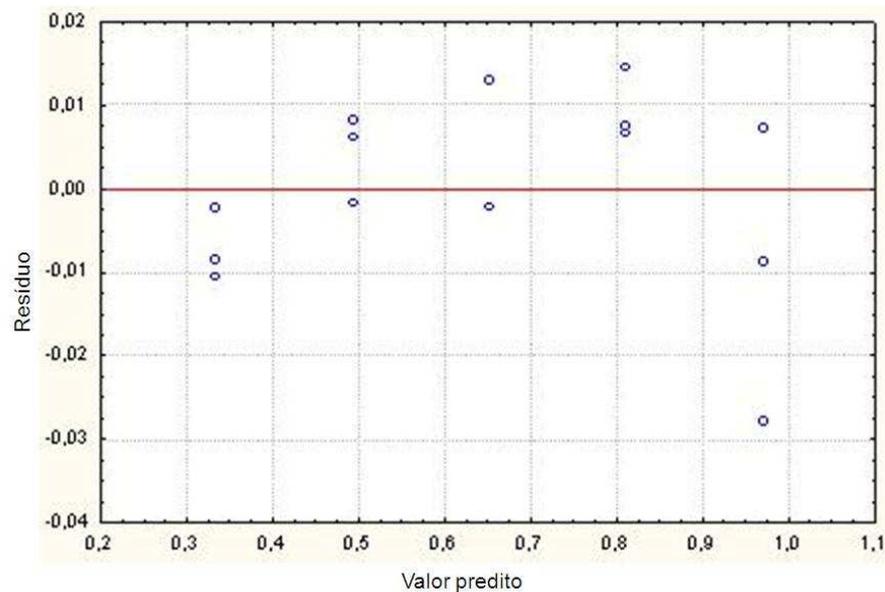


Figura 16 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de EB de *L. brasiliense* para análise de PT.

Para a comprovação da especificidade do método, é necessário que a curva analítica de EB + substância referência, apresente linearidade. Conforme discutido para o teste de linearidade, além do valor do coeficiente de correlação, são necessários testes estatísticos para a análise dos resíduos. A observação dos resultados obtidos nestes testes

(Figuras 15 e 16) confirma a linearidade da curva analítica. Além disso, os valores obtidos na análise de resíduo no teste de especificidade para ‘soma do erro puro’, ‘erro por falta de ajuste’, ‘quadrado médio do erro por falta’, ‘quadrado médio do erro puro’ foram, respectivamente, 0,0009; 0,0008; 0,00008 e 0,00030. Sendo o “F tabelado” para esses dados 3,71, o método satisfaz as condições estatísticas, assim como no teste de linearidade, demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa ($F_{1,13}=5880,8$, $P<0,001$).

Na comparação da curva de PT da linearidade entre EB de *L. brasiliense* e EB + pirogalol (Figura 17), pode-se observar que há uma diferença de cerca de 6,5% no coeficiente angular da análise de PT. Isso, somado aos resultados obtidos para PNA (a não adsorção do pirogalol pelo pó-de-pele) compromete a especificidade na determinação de taninos totais.

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

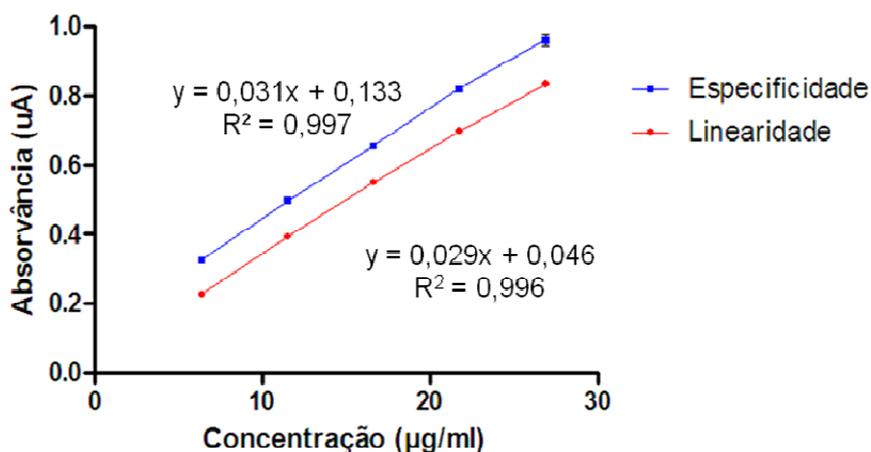


Figura 17 – Comparação entre as absorvâncias de EB de *L. brasiliense* e EB + substância referência pirogalol para PT.

4.3.4 Seletividade

A absorvância obtida para PT foi de $0,549 \pm 0,016$ [2,93] e para PNA de $0,035 \pm 0,005$ [13,96]. Comparando esses valores com os resultados obtidos pela amostra (26,0 mg de

EB) sem adição de rutina, verifica-se que não há diferença significativa entre as absorvâncias para os testes de PT ($t_{1,4}=0,12$; $P=0,9$). Entretanto, observa-se diferença significativa entre as absorvâncias para PNA ($t_{1,4}=-5,1$; $P<0,001$). Porém, este resultado não é estatisticamente confiável devido ao alto coeficiente de variação e ao limite de quantificação que encontra-se discutido no item 4.3.5 (adiante). Dessa forma, pode-se afirmar que a quantidade de rutina acrescentada não foi suficiente para gerar uma alteração significativa e passível de ser analisada. Também se verifica que a intensidade da alteração da cor na reação com reagente Folin-Ciocalteu é diferente para taninos e flavonóides; enquanto 1 mg de pirogalol, substância de referência para taninos, aumentou a absorvância das soluções em 0,1; 2,0 mg de rutina não foram capazes de alterar significativamente a absorvância, demonstrando que o potencial reacional do reagente Folin-Ciocalteu é maior para taninos do que para outros polifenóis.

4.3.5 Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo

Este estudo foi realizado pela leitura da absorvância de sucessivas diluições da amostra, para análise de PT, a partir da menor concentração do teste de linearidade (6,4 $\mu\text{g/ml}$) e pela preparação de amostras de concentração superior à maior concentração de teste de linearidade (26,88 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 18). Pelos resultados, apresentados na Tabela 7 e representados na Figura 19, determina-se o limite de detecção pela menor concentração que apresenta diferença significativa e que se diferencia de outros interferentes como ruído do equipamento; já limites de quantificação inferior e superior são determinados pela menor e a maior concentração de amostra que mantém a linearidade da curva, respectivamente.

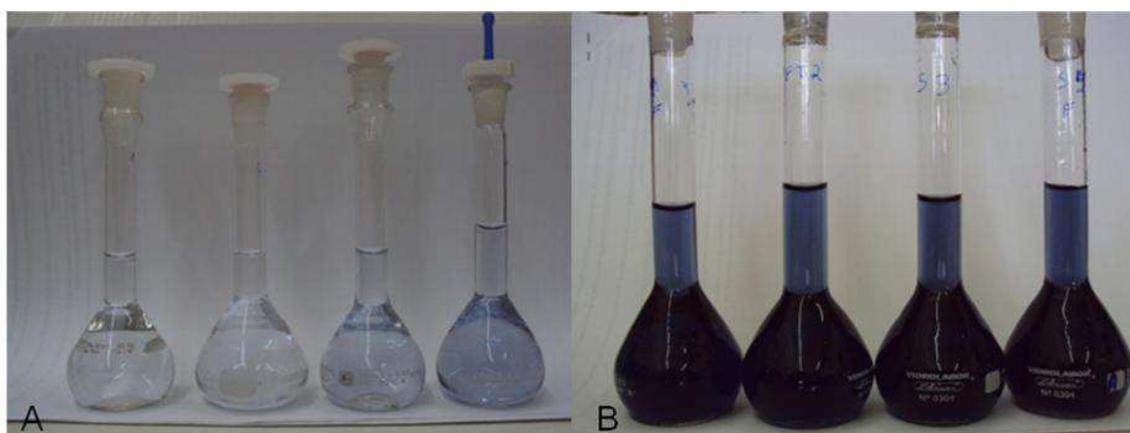


Figura 18 – Reação colorimétrica, em concentração crescente para PT no limite inferior (A) e superior (B) do EB de *L. brasiliense* pela reação de Folin-Ciocalteu. Fotos: Andressa Blainski.

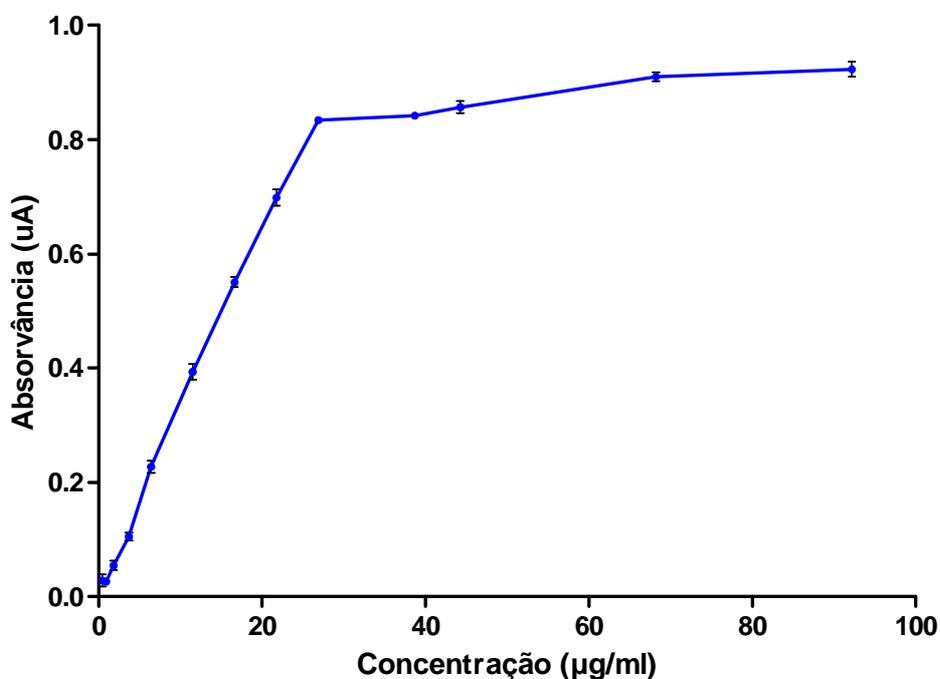


Figura 19 – Representação gráfica das absorvâncias de PT de diferentes massas de EB *L. brasiliense* utilizadas na determinação do intervalo de quantificação e limite de detecção para reação com Folin-Ciocalteu.

A análise estatística dos dados constantes na Tabela 7 demonstra que há diferença significativa entre as absorvâncias das amostras de 0,92 e 1,84 µg/ml de EB ($t_{1,4}=-5,7$, $P<0,001$), sendo a amostra de 1,84 µg/ml (absorvância de 0,055) o limite de detecção para o EB de *L. brasiliense*.

Tabela 7 – Absorvância de diferentes concentrações de EB de *L. brasiliense* obtidas na reação de Folin-Ciocalteu para PT para a determinação do intervalo de quantificação e o limite de detecção.

Concentração (µg/ml) EB	Absorvância (uA) ($\bar{x} \pm dp$ [CV(%)])
0,46	0,028±0,01 [38,1]
0,92	0,026±0,002 [9,2]
1,84	0,055±0,008 [14,9]
3,68	0,105±0,007 [6,9]
6,40	0,227±0,01 [4,8]
11,52	0,393±0,01 [3,5]
16,64	0,550±0,01 [1,6]
21,76	0,698±0,01 [2,1]
26,88	0,834±0,003 [0,3]
38,71	0,842±0,005 [0,6]
44,24	0,867±0,01 [1,2]
68,20	0,910±0,008 [0,8]
92,16	0,923±0,01 [1,4]

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

De acordo com a Figura 20, pode-se dizer que o intervalo de quantificação para o EB de *L. brasiliense* encontra-se entre 3,68 e 26,88 µg/ml de EB. Acima deste limite o método se mantém preciso, mas não exato. De acordo com a lei de Lambert-Beer, a partir de certa concentração da amostra, deixa de haver proporcionalidade entre a concentração e a absorvância (VOGEL, 2002).

Os limites de detecção e quantificação inferior podem ser calculados, de acordo com o preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003), considerando a equação da reta da curva de linearidade ($y=0,029x+0,046$). O desvio padrão do intercepto com o eixo y é 0,0097 e a inclinação da reta é 0,029; assim, os limites de detecção e quantificação seriam, respectivamente, 1,00 e 3,34 $\mu\text{g/ml}$. Os limites de detecção e quantificação calculados são relativamente 46% e 9%, respectivamente, menor que o determinado experimentalmente; isso, provavelmente, se deve ao fato da curva de linearidade apresentar regressão linear satisfatória, o que diminui o desvio padrão do intercepto y, que é diretamente proporcional ao limite de detecção e quantificação.

Assim, os limites de quantificação inferior e superior estipulados foram, respectivamente, 3,68 e 26,88 $\mu\text{g/ml}$, que correspondem a 0,105 e 0,834 de absorvância, ou seja, entre esses valores, a quantidade do analito em uma amostra pode ser determinada com precisão e exatidão.

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas. Enquanto o intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, em que o analito pode ser quantificado com precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2003).

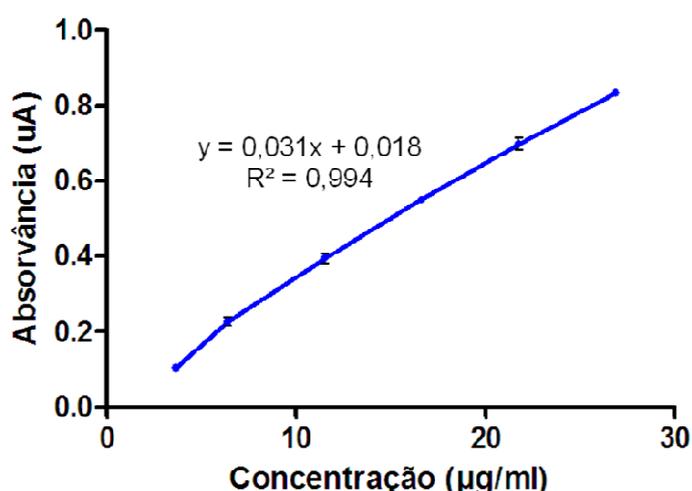


Figura 20 – Curva de linearidade dos pontos que formam o intervalo do limite de quantificação para EB *L. brasiliense* na reação da reagente Folin-Ciocalteu.

4.3.6 Precisão

As absorvâncias estão apresentadas na Tabela 8. A média da absorvância obtida para PT foi de 0,552, com um coeficiente de variação (CV) igual a 4,9% e desvio padrão de 0,027. A média obtida para PNA foi de 0,025, com um coeficiente de variação (CV) igual a 45,3% e desvio padrão de 0,01, porém esse dado não pode ser avaliado quantitativamente pois encontra-se fora do intervalo de quantificação. Isso pode significar que os polifenóis detectados pela metodologia correspondem, em sua totalidade, a taninos, ou que a metodologia analítica para determinação somente de taninos não apresenta especificidade e/ou seletividade como discutido anteriormente.

De acordo com a RE nº. 899, de 23 de maio de 2003, os valores encontrados para o coeficiente de variação não devem ser superiores a 5%. Portanto, pode-se afirmar que o método apresenta repetibilidade para determinação de polifenóis totais.

As absorvâncias obtidas para amostras (n=3) de 26,0 mg de EB de *L. brasiliense* realizada após uma semana do teste de repetibilidade (Tabela 8) não demonstra diferença entre os dias para PT ($t_{1,7}=1,34$, $P=0,22$) pela análise estatística. Os resultados de PNA não foram comparados por não ser um dado quantitativo.

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragens múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). Usualmente, é expressa como o desvio padrão, variância ou coeficiente de variação de diversas medidas.

A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação. É a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003).

Tabela 8 – Absorvâncias obtidas no teste de precisão com amostras de 26,0 mg de EB de *L. brasiliense* para PT e PNA.

REPETIBILIDADE		
	Absorvância (uA) para PT	Absorvância (uA) para PNA
1	0,560	0,022
2	0,538	0,019
3	0,586	0,039
4	0,526	0,019
5	0,580	0,039
6	0,522	0,012
$(\bar{x} \pm dp)$ [CV(%)]	0,552±0,027 [4,9]	0,025±0,010 [45,3]
PRECISÃO INTERMEDIÁRIA		
	Absorvância (uA) para PT	Absorvância (uA) para PNA
1	0,532	0,035
2	0,526	0,026
3	0,532	0,032
$(\bar{x} \pm dp)$ [CV(%)]	0,530±0,003 [0,65]	0,031±0,004 [14,8]

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

4.3.7 Exatidão

As absorvâncias obtidas estão na Tabela 9 e as absorvâncias teóricas foram determinadas pela soma da absorvância obtida nessa concentração no teste de linearidade (0,550 uA) e as absorvâncias esperadas pelo pirogalol determinadas pela equação da reta da curva de calibração no item 4.3.9 (adiante).

O índice de recuperação aceitável para matriz complexa pode variar entre 85 e 115% segundo a RE nº. 899/2003. Os resultados apresentados na Tabela 9 demonstram que a recuperação obtida nas três concentrações utilizadas foi aceitável, assim pode-se dizer que há exatidão no método. Pois, a exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Tabela 9 – Médias das absorvâncias obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação do EB de *L. brasiliense* (26,0 mg) na análise de PT.

	Absorvância esperada (uA)	Absorvância obtida (uA) ($\bar{x} \pm dp$) [CV%]	Recuperação (%)
Baixa	0,644 (0,550+0,094)	0,654±0,008 [1,3]	101,6
Média	0,735 (0,550+0,185)	0,663±0,01 [1,7]	90,2
Alta	0,825 (0,550+0,275)	0,742±0,03 [4,0]	89,9

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

4.3.8 Robustez

Os dados (Tabela 10) obtidos foram comparados estatisticamente com o resultado da absorvância obtida na amostra de 26,0 mg (0,550±0,01 [1,6]) no teste de linearidade para a análise de PT.

Pela análise estatística dos resultados, observou-se que não há diferença significativa entre as médias quando comparadas com a absorvância da amostra 26,0 mg do

teste de linearidade ($F_{3,8}=4,2$, $P=0,05$), porém há uma tendência da análise realizada nas condições estabelecidas (proteção da luz e carbonato de sódio 10,75%) apresentar maior absorvância. De qualquer forma, verifica-se que o método é robusto quanto à concentração de carbonato de sódio e a estabilidade à luz. Destaca-se, nesse parâmetro de validação, o estudo realizado na pré-validação (item 4.3.1 – p. 55), no qual se nota a robustez quanto ao comprimento de onda e ao tempo de leitura.

Tabela 10 – Médias das absorvâncias (n=3) obtidas no teste de robustez de EB de *L. brasiliense* (26,0 mg) na análise de PT.

	Absorvância (uA) ($\bar{x} \pm dp$) [CV(%)]
Sem proteção da luz	0,530±0,005 [0,89]
Sol. Na₂CO₃ 7,5% (p/V)	0,530±0,01 [1,82]
Sol. Na₂CO₃ 14,06% (p/V)	0,531±0,01 [1,81]

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

4.3.9 Curva de calibração da substância de referência

A substância de referência escolhida como padrão externo nessa validação foi o pirogalol como discutido no item 4.3.1 (p. 55). Foi obtida a curva linear dessa substância após leitura das absorvâncias da amostra nas concentrações de 1,28; 2,24; 3,20; 4,16 e 5,12 µg/ml (Figura 21).

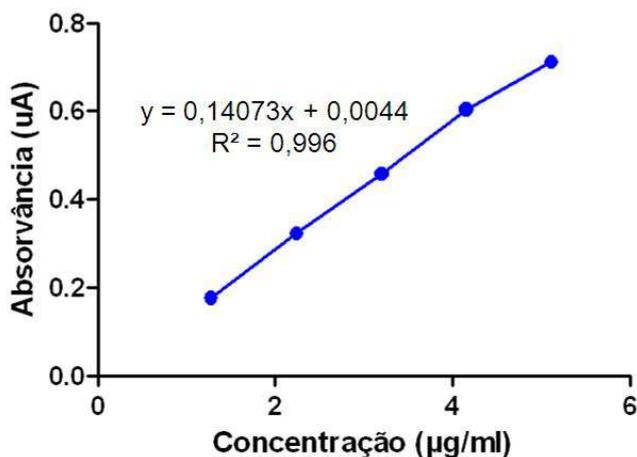


Figura 21 – Curva de calibração do pirogalol na reação com reagente Folin-Ciocalteu.

Baseando-se nas análises dos resultados obtidos, os pontos caem próximos da reta, demonstrando uma distribuição normal para a amostra (Figura 22) e, se observa que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero (Figura 23). Além disso, os valores obtidos na análise de resíduo para a curva analítica do pirogalol para ‘soma do erro puro’, ‘erro por falta de ajuste’, ‘quadrado médio do erro por falta’, ‘quadrado médio do erro puro’ foram, respectivamente, 0,099; 0,0097; 0,033 e 0,010. Sendo o “F tabelado” para esses dados 3,71, o método satisfaz as condições estatísticas, de forma similar ao discutido no item 4.3.2 (p. 62), demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa ($F_{1,13}=3901,2$, $P<0,001$).

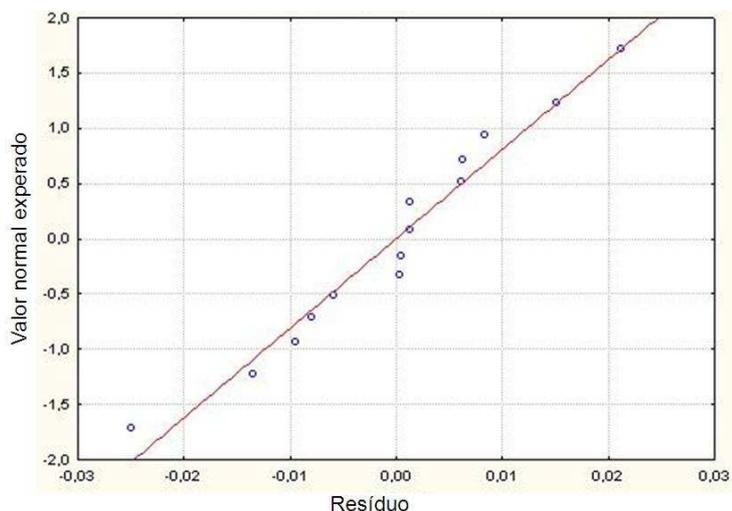


Figura 22 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol.

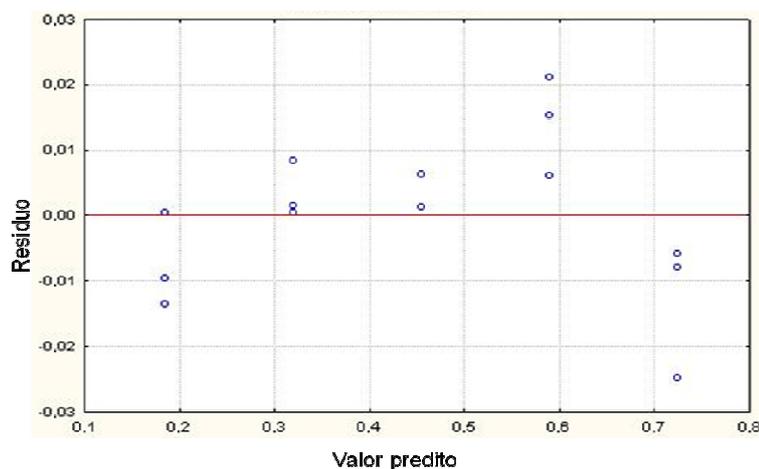


Figura 23 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos na curva analítica do pirogalol.

Considerando que a absorvância específica equivale a absorvância de uma solução a 1% (1 g/100 ml), ou seja, 10000 $\mu\text{g/ml}$. Pela equação da reta ($y=0,14073x + 0,0044$) determinou-se que a absorvância específica do pirogalol é de 1407,3, assim, o teor de polifenóis totais no EB de *L. brasiliense* é 23,5%. Esse resultado é mais confiável que o obtido na pré-validação (Tabela 4 – p. 62), uma vez que a absorvância específica representa os dados de 5 concentrações, preparadas em triplicatas, do pirogalol e, não apenas, uma única amostra da substância. A determinação de taninos totais não foi estabelecida, pois as absorvâncias de PNA foram inferiores ao limite de quantificação.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ASPÉCTOS FISIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DO SISTEMA REPRODUTIVO

1.1.1 Fisiologia dos hormônios sexuais

Hormônios são substâncias químicas secretadas em pequenas quantidades, por uma célula ou grupo de células, para os líquidos corporais internos e exercem efeito fisiológico de controle sobre outras células do corpo. O sistema endócrino humano é formado por diversos órgãos, como visualizado na Figura 24. Com relação aos hormônios sexuais, devem ser consideradas a atuação do hipotálamo, glândula pituitária ou hipófise anterior, ovários ou testículo (GUYTON; HALL, 2006).

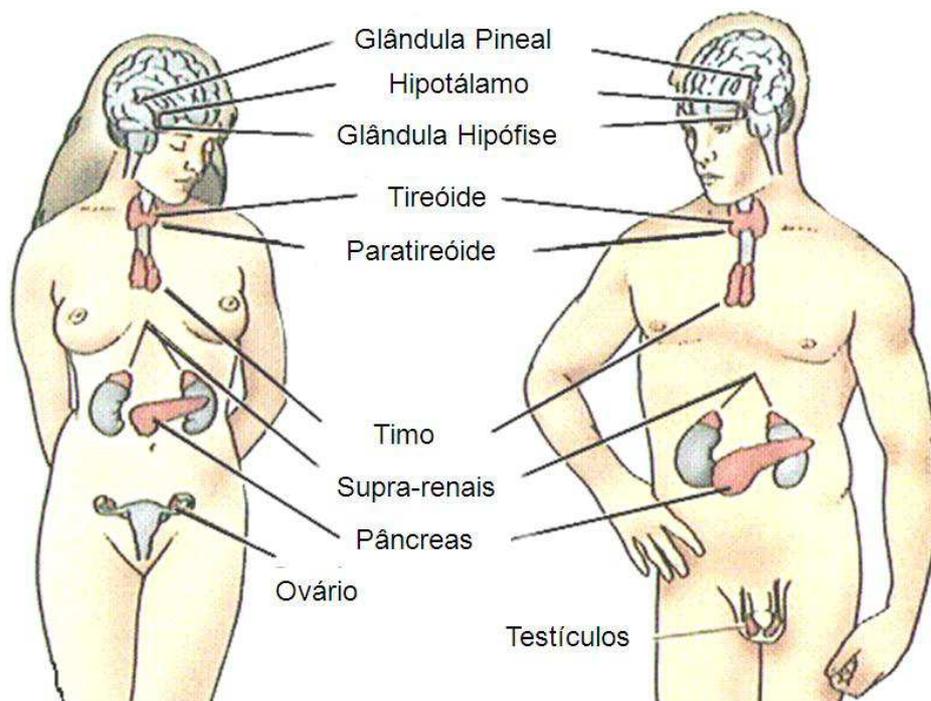


Figura 24 – Sistema endócrino humano (PROFESSORA LUCIMAR, 2009)

Os principais hormônios envolvidos no sistema endócrino sexual feminino são o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRL), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrogênio e progesterona. Esses hormônios são divididos, quimicamente, em dois grupos, os hormônios esteróides, em que a estrutura química é baseada no núcleo esteróide e são derivados do colesterol (estrogênio e progesterona); e os hormônios protéicos ou peptídicos, em que os hormônios são proteínas, peptídeos ou derivados destes (GnRL, FSH e LH). O hormônio estrogênio, na verdade, é um termo usado para designar um grupo de hormônio, sendo que os três principais são os hormônios

estradiol, estrona e estriol, dos quais o estradiol é o mais potente, equivalendo a cerca de 12 e 60 vezes a estrona e o estriol, respectivamente (Figura 25) (LEHNINGER et al., 2006).

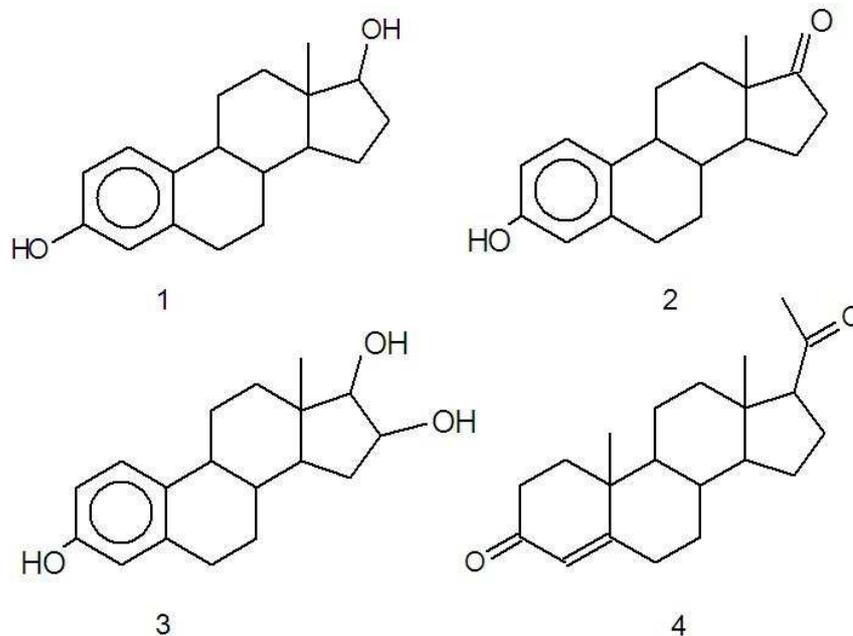


Figura 25 – Estruturas químicas dos hormônios estrogênicos (estradiol – 1; estrona – 2 e estriol – 3) e da progesterona (4) (LEHNINGER et al., 2006).

Os hormônios protéicos são sintetizados na forma de pré-pró-hormônio no retículo endoplasmático granular. As vesículas de transporte celular levam esses hormônios para o aparelho de Golgi, onde é clivado formando o hormônio ativo. Este é empacotado e armazenado no citoplasma até um sinal específico (nervoso ou hormonal) para sua liberação. Os hormônios esteróides são sintetizados por enzimas, sob estímulo apropriado, a partir do colesterol e intermediários da síntese que ficam armazenados nas células glandulares. Em poucos minutos esses hormônios são formados e imediatamente secretados (VANDER et al., 1981).

Os hormônios liberados no sangue são transportados por proteínas, principalmente a albumina. O controle da liberação hormonal é feito principalmente pela regulação de *feedback* negativo, isto é, a estimulação da liberação de um determinado hormônio provoca a inibição do hormônio estimulador. Os hormônios possuem ação apenas em órgãos com receptores específicos. Esses receptores podem estar localizados na membrana celular, no citoplasma ou no núcleo. O número de receptores numa célula-alvo não é constante e sua produção/ativação pode ser estimulada ou inibida pela presença de hormônios. A ativação

dos receptores hormonais causa mudanças na célula como a alteração da permeabilidade da membrana, ativação de enzimas intracelulares ou ativação de genes pela fixação de receptores intracelulares (GUYTON; HALL, 2006).

De forma resumida, o GnRH liberado pelo hipotálamo, segue via “vasos porta hipotálamo-hipófise” e promove a liberação dos hormônios FSH e LH pela hipófise anterior. Esses hormônios, promovem *feedback* negativo sobre o GnRH e são transportados pelo sistema sanguíneo, atingindo os ovários do sistema reprodutor feminino. O FSH promove o crescimento dos folículos ovarianos primordiais que, passam a liberar estrogênio. O LH auxilia na liberação do ovócito pelo folículo ovariano maduro, sem esse hormônio o folículo não progride até o estágio de liberação do ovócito (mecanismo ainda não compreendido), e atua na transformação das células granulosas e teais a células luteínicas (formação do corpo lúteo) que secretam progesterona. Ambos os hormônios, estrogênio e progesterona, atuam como *feedback* negativo aos FSH e LH, somada a atuação do hormônio inibina (também produzido pelos folículos ovarianos). Essa ação leva ao declínio dos níveis séricos de FSH e LH. Sem o LH, o corpo lúteo degenera e o nível de progesterona decresce, soma-se a isso à diminuição dos níveis de estrógeno pós-ovulação. Com isso, o efeito inibitório da liberação de GnRH é cessado e este é novamente liberado e um novo ciclo se inicia (Figuras 26 e 27) (VANDER et al., 1981; GUYTON; HALL, 2006).

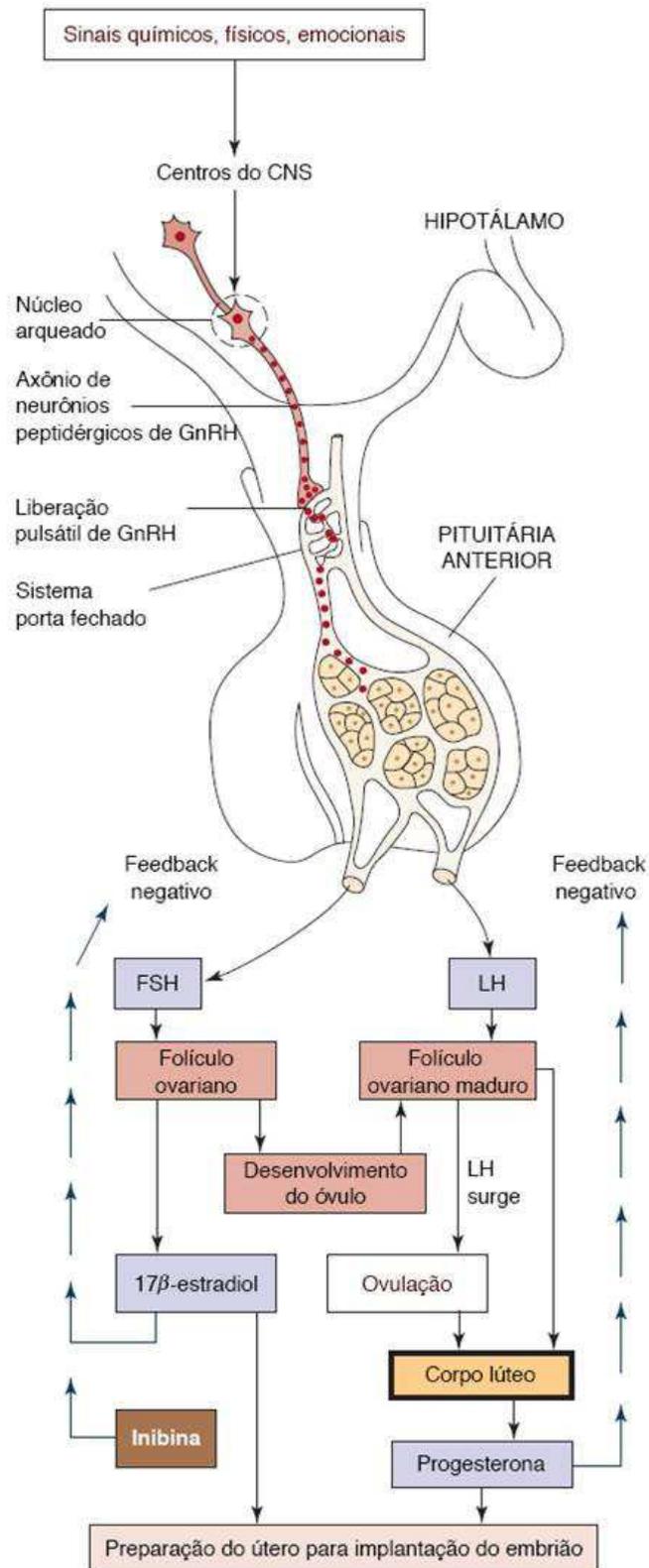


Figura 26 – Cascata de liberação, atuação e controle hormonal do sistema endócrino sexual (UNFER, 2009).

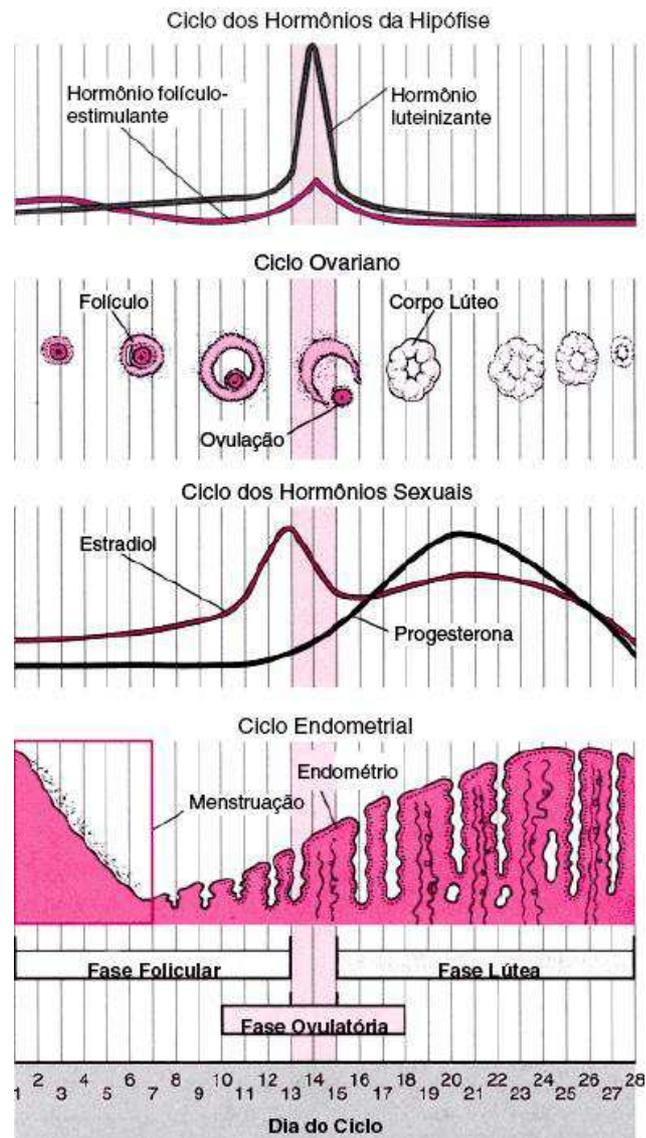


Figura 27 – Ciclo menstrual feminino (MANUAL MERCK, 2009).

Os hormônios sexuais têm ação nos mais diversos órgãos, o estrogênio, por exemplo, além da ação nos órgãos-alvos clássicos, como ovários, vagina, útero, glândulas mamárias, glândula adrenal, glândula hipófise e hipotálamo, possui receptores estrógeno-específico nos rins, fígado, ossos, sistema cardiovascular, macrófagos, células linfóides, células do timo, osteoblastos, tecido adiposo e células glia. Por esta razão, várias patologias, como arteriosclerose, osteoporose, perda de habilidades cognitivas, doenças degenerativas do sistema nervoso central e alguns tipos de câncer, estão associados à alterações dos níveis séricos desses hormônios (DIEL et al., 2002).

A participação neuronal na regulação da liberação dos hormônios sexuais é evidenciada por vários experimentos de longa data, como o bloqueio da ovulação pela

administração de bloqueadores colinérgicos e a indução da ovulação pela administração de adrenalina em coelhos, além do bloqueio da ovulação por estimulação elétrica sobre o sistema nervoso central (EVERETT, 2006).

Recentemente, vem se estudando os efeitos hormonais sobre doenças psíquicas em mulheres. Sugere-se que a neurogênese (proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular) do hipocampo é sexo-dependente, isto é, ocorre de forma distinta entre homens e mulheres, o que leva a atuação diferenciada dos hormônios sobre o hipocampo, sobre o aprendizado e memória hipocampo-dependente e sobre a incidência de depressão no sexo feminino. Experimentos demonstram que a administração de estrogênio em ratas ovariectomizadas eleva a proliferação celular no hipocampo. Entretanto, ensaios mostram que existe uma diminuição no desempenho da aprendizagem hipocampo-dependente. Assim, estudos em diferentes modelos, que relacionam áreas cerebrais diferentes, demonstram que o estrogênio modula o processo de aprendizagem dependendo da dose e da área do cérebro recrutada (GALEA et al., 2008).

Transtornos psíquicos em mulheres são freqüentemente relacionados aos hormônios. Cerca de 75% das mulheres reportam perda da memória curta, esquecimento, desorientação, confusão, falha de concentração ou dificuldade de leitura durante o período final da gravidez ou no pós-parto recente. A depressão afeta aproximadamente 1 em cada 5 pessoas no mundo, sendo a incidência em mulheres 2 a 3 vezes maior, particularmente na idade reprodutiva (GALEA et al., 2008).

A TPM, também um problema de caráter hormonal, consiste em um grupo de sintomas psicológicos e físicos que regularmente ocorrem durante a fase lútea do ciclo menstrual e desaparecem após a menstruação. Estes sintomas envolvem alterações de humor e comportamento, irritabilidade, tensão, depressão, ansiedade, fadiga, vontade de chorar, problema de concentração, dores de cabeça, perda de libido, dor nas mamas, distensão abdominal, entre outros. Mais de 90% das mulheres em idade reprodutiva relatam terem pelo menos um desses sintomas e, cerca de 6% apresentam TPM severa, conhecida como desordem disfória pré-menstrual. Tratamentos, freqüentemente adotados para estes casos, têm como alvo o eixo hipotálamo-hipófise-ovário ou as sinapses serotoninérgicas cerebrais (CAMPAGNE; CAMPAGNE, 2007; INDUSEKHAR et al., 2007).

1.1.2 Fisiologia dos hormônios sexuais em ratas

Os ratos albinos (*Rattus norvegicus*) são os animais mais utilizados em pesquisa experimental. Dentre as vantagens, estão o rápido amadurecimento sexual (50 ± 10 dias),

breve período gestacional (20 a 23 dias), prole considerável (8 a 15 filhotes) e a alta possibilidade de procriação com expectativa de vida de 2,5 anos (GUIMARÃES; MÁZARO, 2004).

Com relação aos estudos para atividade hormonal, as ratas, assim como na fisiologia humana, apresentam integração de sistemas neuroendócrino, nervoso central e ovários, constituindo o eixo hipotálamo-hipófise-ovário. A abertura do canal vaginal ocorre normalmente entre 33 a 42 dias e o ciclo hormonal (ciclo estral) regular inicia-se após cerca de uma semana (GUIMARÃES; MÁZARO, 2004). O ciclo estral das ratas é de curta duração (4 a 5 dias) e, estudos iniciais de Long e Evans (1922 apud MARCONDES et al., 2002) revelaram a relação entre os hormônios ovarianos e a citologia vaginal, caracterizando o ciclo em 4 fases distintas (Tabela 11).

Tabela 11 – Ciclo estral de ratas normais de acordo com os estudos de Long e Evans (1922 apud MARCONDES et al., 2002).

Metaestro	Diestro	Proestro	Estro
Fase transitória	Fase pré-ovulatória	Fase ovulatória	Fase pós-ovulatória
6-8 h	55-57 h	12-14 h	25-27 h
Igual proporção das diferentes células	Predomínio de leucócitos	Predomínio de células nucleadas	Predomínio de células anucleadas
EFEITO PROGESTERÔNICO		EFEITO ESTROGÊNICO	

1.1.3 Toxicologia de produtos fitoterápicos

As plantas medicinais vêm sendo usadas desde a antiguidade pelo homem. Isso se soma à falsa divulgação mercadológica e resulta na associação destes produtos ao conceito de possuírem substâncias atóxicas, ou popularmente, “não faz mal”. Porém, equívocos na

preparação dos fitoderivados, na dosagem ou posologia podem levar a efeitos tóxicos. A Portaria 116/96 (BRASIL, 1996) normatiza o estudo da toxicidade aguda e crônica dos produtos fitoterápicos. Essa medida deixa implícita a necessidade de realização de testes toxicológicos já em etapas anteriores ao desenvolvimento tecnológico do produto (SONAGLIO et al., 2007). Entretanto, a verificação da toxicidade depende principalmente de experimentos em animais, que nem sempre reproduzem a toxicidade em seres humanos (SCHENKEL et al., 2007).

Fitomedicamentos, com doses terapêuticas bem definidas, tem se mostrado com grande margem de segurança em relação às doses tóxicas. Exemplos dessa situação podem ser verificados com o extrato bruto de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) em que a dose efetiva está entre 200 a 800 mg/kg (dependendo da ação desejada) e a dose letal que mata 50% dos animais (DL_{50}) é de 2,7 g/kg (REBECCA et al., 2002); o boldo bahiano (*Vernonia condensata* Baker) em que a DL_{50} é maior que 5,0 g/kg (MONTEIRO et al., 2001); o extrato do cipó-cruz (*Chicocca alba* (L.) Hitchc) administrado pela via intraperitoneal apresentou mortes dos animais na dose de 125 mg/kg (GAZDA et al., 2006); a fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) apresenta DL_{50} do extrato maior que 5,0 g/kg (FÉRES et al., 2006); o ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze) não apresentou alterações histológicas nos órgãos na administração de doses até 1,0 g/kg (CARNEIRO et al., 2007); e, a casca d'anta (*Drimys angustifolia* Miers.) que, embora, tenha apresentado animais mortos pela administração do extrato oral de 3.5 g/kg, a DL_{50} não pôde ser determinada (WITAICENIS et al., 2007).

A resolução RE 90/04 (BRASIL, 2004a) contempla a realização da toxicidade aguda, subcrônica e crônica, que visam o monitoramento de parâmetros fisiológicos, análises morfológicas, histológicas e bioquímicas, a realização de ensaios mutagênicos e carcinogênicos.

Os efeitos mutagênicos podem ser verificados no teste de micronúcleos, pelo aumento significativo no número de eritrócitos policromáticos micronucleados retirados da medula óssea de roedores (VILAR et al., 2008). Este teste é recomendado pela ANVISA para avaliação e registro de novos produtos farmacêuticos (BRASIL, 2004a; 2004b) Micronúcleos são cromatinas citoplasmática que surge como resultado da quebra de cromossomos por indução clastogênica ou pelo efeito de agentes que danificam o DNA (HEDDLE et al., 1991; CHENG et al., 2004; WINTER et al., 2007). Um exemplo é a ciclofosfamida (controle positivo), um conhecido agente clastogênico e quimioterápico citotóxico. O teste com medula óssea de mamíferos é um modelo apropriado pois as células estão constantemente em divisão (HEDDLE, 1973; WINTER et al., 2007).

Diversas drogas vegetais, comumente utilizadas, como *Cochlospermum regium* Mart. (CASTRO et al., 2004), *Anacardium occidentale* L. (KONAN et al., 2007) e *Copaifera langsdorfii* Desfon (CHEN-CHEN; SENA, 2002), apresentaram efeito mutagênico pelo teste de micronúcleos, o que sugere que sua posologia deve ser bem estabelecida a fim de evitar efeitos danosos ao paciente. Outras plantas não apresentam efeito mutagênico pelo teste de micronúcleos, como a *Annona crassiflora* Mart. (VILAR et al., 2008) e a *Byrsonima intermedia* A. Juss. (SANNOMIYA et al., 2007).

2 OBJETIVOS

Este capítulo do trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a possível atividade hormonal do extrato bruto das raízes secas de *L. brasiliense* em ensaio com ratas Wistar imaturas.
- Determinar o perfil toxicológico do extrato bruto de *L. brasiliense* por parâmetros fisiológicos e determinação da DL₅₀ pelo teste agudo em camundongos Swiss.
- Avaliar a mutagenicidade do extrato bruto de *L. brasiliense* pelo teste de micronúcleos da medula óssea de camundongos Swiss.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vetec® ou Synth®, exceto quando especificado.

- Alaranjado G
- Álcool absoluto
- Cera de abelha
- Ciclofosfamida (Baxter Oncology)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Eosina
- Eosina Amarelada
- Etanol 92,8 % (p/p)
- Giemsa (Newprov)
- Hematoxilina
- May-Grunwald (Newprov)
- Parafina
- Ração para camundongos e ratos Nuvilab®
- Soro bovino fetal (Gibco)
- Valerato 17 β -estradiol
- Xilol

3.1.2 Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix AP56
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Câmara de CO₂

- Microscópio de captura de imagem Olympus BX41 UTU 0.5XC-3
- Microscópio Nikon YS2
- Micrótomo Leica RM2245

3.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA

3.2.1 Animais

Para atividade hormonal foram utilizadas ratas Wistar imaturas com 21 dias (30-40 g) provenientes do Biotério Central e mantidas em biotério experimental exclusivo no Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá. Para toxicidade aguda e efeito mutagênico foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas de 8 semanas com peso entre 28-56 g provenientes do Biotério Central e mantidas em biotério experimental no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. As ratas foram aclimatadas por 2 dias em biotério setorial e os camundongos por, pelo menos, 5 dias; os animais foram mantidos em condições laboratoriais padronizadas (temperatura de 22 ± 1 °C e umidade relativa de $50\pm 10\%$) e, ciclo dia-noite de 12 h com livre acesso à ração e água.

3.2.2 Comitê de ética

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação – CEAE da Universidade Estadual de Maringá para avaliação e aprovação (Protocolo 051/2008 – Anexo 1).

3.2.3 Atividade hormonal

3.2.3.1 Tratamento dos animais e avaliação do ganho de peso

As ratas imaturas foram divididas em 6 grupos ($n=7$) e tratadas por gavagem por período de 14 dias e os procedimentos de manipulação, incluindo gavagem e coleta de secreção vaginal (Figura 28), foram realizados pela manhã. Os grupos controle negativo receberam apenas salina (NaCl 0,9%) ou DMSO 1% (veículo para o EB) e o grupo controle positivo recebeu valerato de 17β -estradiol (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Os demais grupos foram testados com o EB de *L. brasiliense* nas doses de 400, 800 e 1200 mg/kg (solubilizados em DMSO 1%), denominados, respectivamente de T-0,4, T-0,8 e T-1,2. Os animais foram pesados no 1º dia de experimento, que corresponde a 1ª gavagem realizada, para determinação da dose a ser administrada. As ratas foram novamente pesadas no 7º dia, para correção da dose, e

no dia em que foram sacrificadas, 15º dia. Esses dados foram avaliados quanto ao ganho de peso dos animais representado pelo percentual de aumento relativo (peso final/peso inicial x 100) para avaliar possíveis efeitos toxicológicos ou metabólicos.

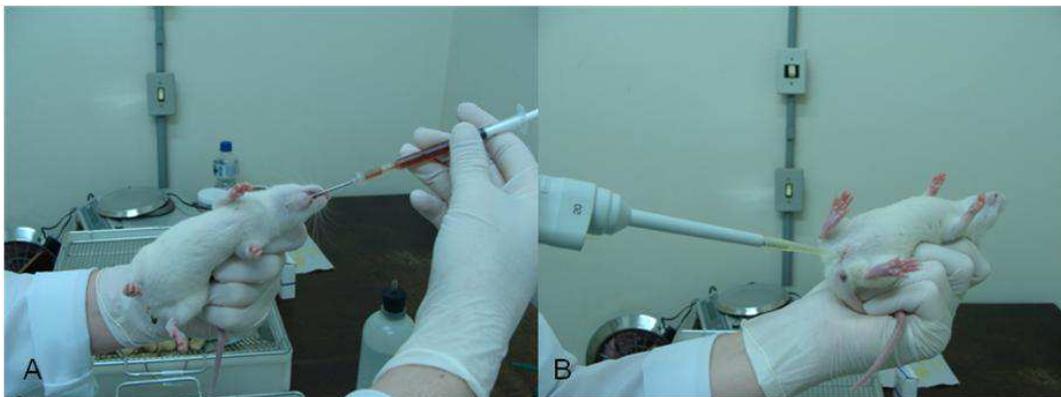


Figura 28 – Procedimento de gavagem (A) e de coleta da secreção vaginal (B) em ratas no ensaio para atividade hormonal do EB de *L. brasiliense*. Fotos: Thaisa Violin.

3.2.3.2 Avaliação da abertura do canal vaginal e citologia da secreção vaginal

As ratas, diariamente, foram submetidas à verificação visual da abertura do canal vaginal. A partir da ocorrência da abertura do canal vaginal, em intervalos de dois dias, foram coletadas amostras da secreção vaginal com 10 a 20 μ l salina e auxílio de uma pipeta automática (Figura 28). O material foi colocado em lâminas e avaliado à fresco em microscópio de luz (objetivas de 10 e 40x) para monitoramento da fase do ciclo estral das ratas durante o experimento. Posteriormente, esse material foi espalhado sobre a lâmina, seco ao ar, fixado em álcool 92,8% (p/p) e submetido à coloração de Papanicolau (PAPANICOLAOU, 1942) como se segue: o material foi hidratado em série alcoólica decrescente (álcool 70,0 e 50,0% (p/p) e água destilada); corado por hematoxilina (5 a 10 min); lavado com água destilada; lavado, 3 a 4 vezes, com solução de ácido clorídrico 0,5% (v/v); lavado novamente com água destilada; levado por 1 min em solução de carbonato de lítio (3 gotas de uma solução aquosa saturada para 100 ml de água destilada); lavado com água destilada e submetido à desidratação gradual (álcool 50,0; 70,0; 80,0 e 95,0% (p/p)); corado com solução Alaranjado G por 1 min; removido o excesso de corante com álcool 95,0% (p/p); corado com Eosina Amarelada por 2 min; lavado com álcool 95,0% (p/p) e, após, álcool absoluto e xilol. As lâminas contendo a secreção vaginal corada por técnica de Papanicolau foram analisadas sob microscopia de luz (objetiva de 40x) e a fase do ciclo estral (MARCONDES et al., 2002) foi determinada pela proporção de células presentes

(células nucleadas, anucleadas ou queratinizadas e leucócitos) de acordo com a Tabela 11 (p. 87).

3.2.3.3 Avaliação uterotrópica e análise histológica do ovário, útero e vagina

Após 24 h da administração da última dose, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e os ovários, útero e vagina foram retirados, livres de toda gordura, e o útero foi pesado. O resultado é expresso como peso relativo (peso do útero/peso corporal x 100) (DALSENTER et al., 2004; BOLLE et al., 2007).

Esses órgãos foram fixados em solução fixadora de Bouin (ácido pícrico:ácido fórmico:ácido acético; 75:25:5 (v/v)) por 24 h e, após, mantidos em álcool 70,0% (p/p) para posterior preparação das lâminas histológicas (HAZARIKA; SARMA, 2006). O material foi submetido à desidratação por uma série gradual de álcool (álcool 80,0 e 90,0% (p/p) e álcool absoluto; pelo tempo de 15, 15 e 90 min, respectivamente), clarificado por xilol (2 h) e colocado em mistura de parafina e cera de abelha a 60 °C (3 h); o material foi colocado em pequenas caixas de papel com a mistura de parafina e cera de abelha e deixado à temperatura ambiente até sua solidificação e formação dos blocos. Os blocos foram desbastados até que os órgãos pudessem ser expostos, então foram mergulhados em água por 24 h para hidratação desses tecidos.

O material emblocado foi levado ao micrótomo e cortes semisseriados (7 µm) foram realizados. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro limpas. Para cada animal foram preparadas 2 lâminas com 3 cortes de cada tecido. Os cortes foram feitos transversalmente na parte mais externa da vagina, na região mediana da tuba uterina e medial do ovário. As lâminas foram submetidas à desparafinização em xilol (25 min), hidratação por série alcoólica decrescente (álcool absoluto, 90,0; 80,0; 70,0% (p/p) e água destilada, por 2 min cada); coloração em hematoxilina (20 s), água destilada (10 min), coloração com eosina (10 s), lavado com água destilada, posterior desidratação em álcool absoluto (10 min), clarificação em xilol (10 min) e, por fim, fixação da lamínula com gotas de Permount. Os cortes foram analisados sob microscopia de luz (objetivas de 10 e 40x) acoplada à captura de imagem e a arquitetura histológica dos tecidos foi observada e fotomicrografada.

3.2.4 Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada de acordo com as diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2004a). Os camundongos foram divididos em 6 grupos de 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas) e tratados por gavagem em dose única. O grupo controle negativo

recebeu apenas salina e os demais grupos receberam EB de *L. brasiliense* nas doses de 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 e 1,0 g/kg, respectivamente. Os animais foram observados após o tratamento nos períodos de 15, 30, 60 min, 4, 8, 12 e 24 h e, após, diariamente até 14 dias.

Foram avaliados os parâmetros de hiperventilação, piloereção, diarreia, salivação, astenia, hipnose ou sedação, catatonia, ptose, convulsão, hiperexcitação, hipotermia, alteração motora, contorções abdominais e morte dos animais.

Os animais foram pesados no início do tratamento (tempo zero), após 24 h, 7 e 14 dias. Após 14 dias da administração, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e autopsiados (Figura 29) verificando-se a presença de alguma alteração anatômica, em seguida, os órgãos (coração, pulmão, fígado, baço, rim direito e esquerdo) foram pesados e o resultado expresso em peso relativo. O número de animais mortos durante os 14 dias do experimento foi contabilizado para a determinação da DL₅₀.

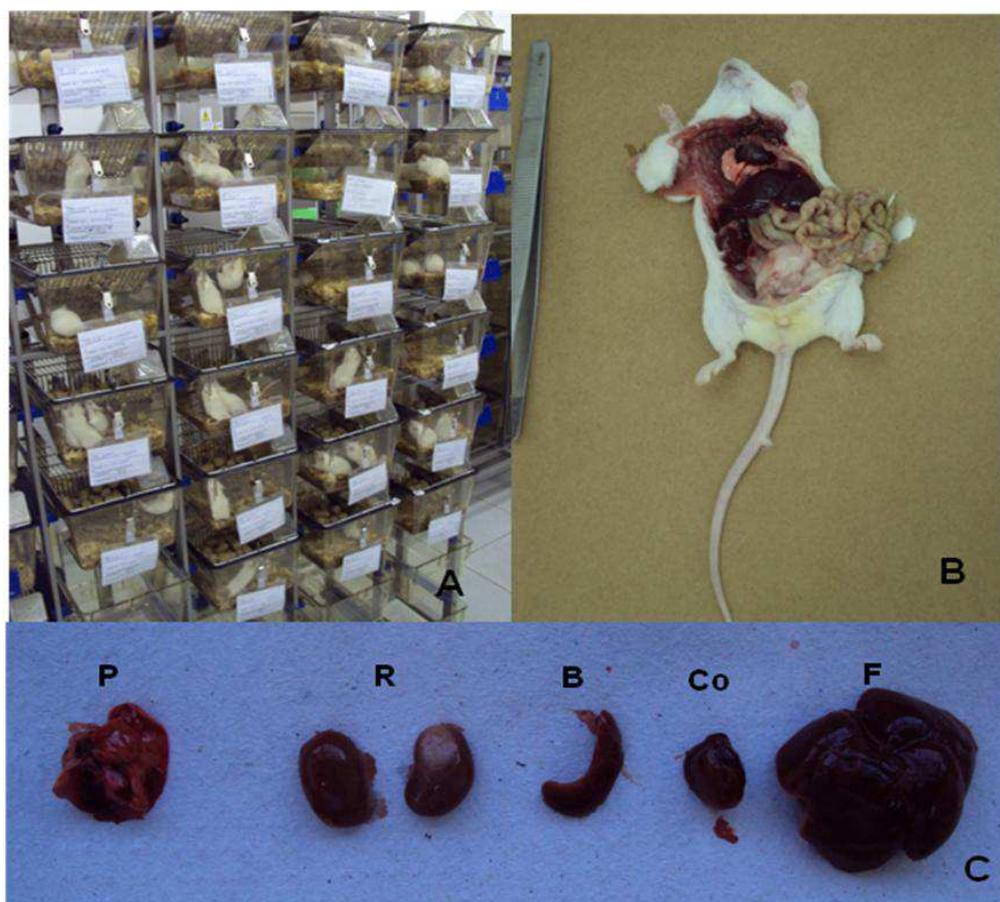


Figura 29 – Biotério (A), camundongo autopsiado (B) e órgãos analisados (P-pulmão, R-rins, B-baço, Co-corção e F-fígado) no ensaio de toxicidade aguda do EB de *L. brasiliense*. Fotos: Andressa Blainski.

3.2.5 Atividade mutagênica (CASTRO et al., 2004)

Os camundongos foram divididos em 6 grupos de 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas) e tratados por gavagem em dose única. O grupo controle negativo recebeu apenas salina e o grupo controle positivo recebeu apenas ciclofosfamida (50 mg/kg). Os demais grupos foram testados com EB de *L. brasiliense* nas doses de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 g/kg. Após 24 h da administração, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o par de fêmur foi retirado. Em seguida, as epífises próximas foram limpas e seccionadas e a medula óssea foi retirada, lavada com soro bovino fetal e centrifugada (3000x g, 5 min) (Figura 30). Foram feitos esfregaços do sedimento obtido em lâminas limpas e desengorduradas. Após secagem ao ar, estas lâminas foram coradas com May-Grunwald-Giemsa para detecção dos eritrócitos policromáticos micronucleados. Para cada animal foram preparadas três lâminas e 2000 eritrócitos policromáticos foram contados para a determinação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz (objetiva de 100x). O efeito mutagênico é caracterizado pelo aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao controle negativo.

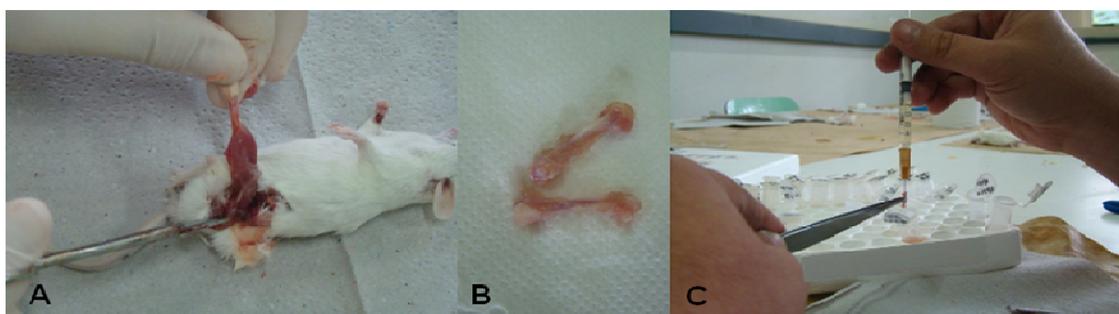


Figura 30 – Retirada do fêmur (A), par de fêmures (B) e retirada da medula óssea por soro bovino (C) no ensaio de mutagenicidade do EB de *L. brasiliense*. Fotos: Andressa Blainski.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Statistica[®] 8.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007). Os resultados foram expressos como a média±desvio padrão [coeficiente de variação (%)] e os mesmos foram analisados utilizando análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey para os dados homogêneos e o teste de Kruskal-Wallis para dados heterogêneos, e, foi considerado $P < 0,05$ como critério de significância. A análise de peso dos animais foi realizada por análise de variância de medidas repetidas (MANOVA) e as

diferenças significativas determinadas pelo teste de Bonferroni com $P < 0,05$ como critério de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA

4.1.1 Atividade hormonal

Os grupos que receberam EB de *L. brasiliense* apresentaram, durante todo o período de experimentação, comportamento mais agressivo, como brigas entre os animais do grupo, além de maior resistência ao procedimento de gavagem comparados aos animais dos grupos controles. Os animais de número 1 do grupo T-1,2; 1 e 6 do grupo T-0,8 e 3 e 6 do grupo T-0,4 morreram durante o período de administração do EB de *L. brasiliense*. Dois desses animais morreram logo após a gavagem, o que pode caracterizar um erro no procedimento, e os outros 3 foram encontrados mortos nas caixas. A dificuldade em proceder a gavagem, pela agitação dos animais, com eventual penetração da cânula de gavagem na traqueia, levando a parada respiratória, é a provável causa da morte de animais especificamente nos grupos que receberam EB de *L. brasiliense*. Esses animais foram excluídos de todos os parâmetros de análise. A resistência ao procedimento de gavagem e a agressividade dos animais pode ser devido às características de indigestibilidade do extrato, como ao possível efeito antiestrogênico ou progesterônico. Marcondes et al. (2001) verificaram a relação entre a ansiedade e a fase do ciclo estral das ratas em labirinto em cruz elevado, e constataram que o nível de ansiedade em ratas foi significativamente maior durante a fase diestro quando comparado à fase proestro. Além disso, o efeito sobre o tempo de permanência nos braços abertos é modulado pela ação estrogênica, sendo que a administração de estradiol aumentou o tempo nos braços abertos.

Os animais foram pesados no 1º, 7º e 15º dia de experimentação. Os dados encontram-se na Tabela 12 e a representação das médias na Figura 31. A análise estatística (MANOVA) desses dados demonstra que todos os grupos tiveram ganho de peso significativo em relação ao período anterior. Além disso, não há diferença significativa entre as médias dos pesos entre os grupos no início do experimento, 1º dia, e no 7º dia; porém, os grupos T-1,2 e T-0,8 apresentam menor peso médios que os grupos controles no 15º dia de experimento ($F_{5,31}=6529,5$, $P < 0,001$). Essa diferença de peso, evidenciada pelo menor ganho de peso, pode se dever a efeitos metabólicos do EB de *L. brasiliense* e/ou, provavelmente, a alta quantidade de taninos presente na EB (23,5% expressos em pirogalol – item 4.3.9, Cap. 1, p. 77). É conhecido o efeito nutricional de taninos em ruminantes, nos quais, a interação tanino-proteína pode levar a reduções na taxa alimentar, digestibilidade

de nutriente e disponibilidade de proteínas (LOWRY et al., 1996). Além disso, estudos com duas espécies de peixe, o piaçu (*Leporinus macrocephalus*) e a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), demonstram que a presença de taninos na ração desses animais, acima de 0,46 e 0,63%, respectivamente, resulta em menor ganho de peso e efeitos deletérios significativos sobre a digestibilidade de nutrientes (PINTO et al., 2000; 2001). Em experimento, ratos foram tratados por gavagem com chá verde padronizado em catequina durante 28 dias e apresentaram menor ganho de peso em relação ao grupo controle, nas doses acima de 1,0 g/kg (CHENGELIS et al., 2008).

Tabela 12 – Média (g) \pm desvio padrão [coeficiente de variação (%)] dos pesos por grupo de animais no 1º, 7º e 15º dias e aumento de peso relativo durante a experimentação para atividade hormonal. Dados analisados por MANOVA; **P<0,001 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Bonferroni.

	1º dia	7º dia	15º dia	Aumento relativo (%)
CN-Salina	60,1 \pm 5,5 [9,2]	77,7 \pm 6,3 [8,1]	114,8 \pm 5,0 [4,4]	47,7 \pm 3,6 [7,6]
CN-DMSO	52,1 \pm 4,9 [9,4]	85 \pm 5,0 [5,9]	114,4 \pm 4,2 [3,6]	54,2 \pm 5,7 [10,3]
CP	56,0 \pm 7,8 [13,9]	88,3 \pm 8,6 [9,7]	119,8 \pm 11,4 [9,5]	53,4 \pm 2,5 [4,7]
T-1,2	59,2 \pm 4,5 [7,7]	79,0 \pm 8,9 [11,3]	97,7 \pm 5,9 [6,1]**	38,4 \pm 6,6 [17,3]
T-0,8	59,2 \pm 4,5 [7,7]	82,6 \pm 5,5 [6,7]	96,6 \pm 9,0 [9,3]**	38,2 \pm 8,0 [21,0]
T-0,4	57,4 \pm 8,6 [14,9]	85,8 \pm 8,1 [9,4]	109,0 \pm 15,1 [13,9]	47,3 \pm 3,6 [7,7]

CN-Salina – Controle negativo com salina 0,9%

CN-DMSO – Controle negativo com DMSO 1%

CP – Controle positivo valerato de 17 β -estradiol (400 μ g/kg)

T-1,2 – Teste EB de *L. brasiliense* (1,2 g/kg)

T-0,8 – Teste EB de *L. brasiliense* (0,8 g/kg)

T-0,4 – Teste EB de *L. brasiliense* (0,4 g/kg)

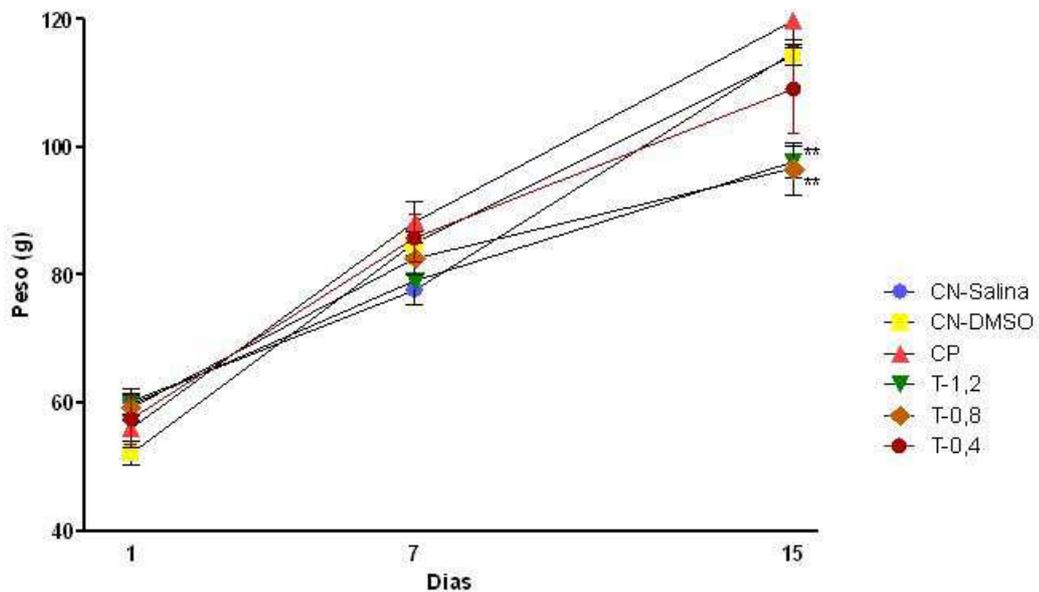


Figura 31 – Representação das médias (g) \pm desvio padrão, por grupo, dos pesos das ratas nos dias 1, 7 e 15 de experimentação para atividade hormonal. Dados analisados por MANOVA; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Bonferroni.

O efeito hormonal do EB de *L. brasiliense* foi avaliado pelo início da maturação sexual caracterizada pela abertura do canal vaginal (Tabela 13, Figura 32), ação uterotrópica (peso relativo do útero), avaliação do ciclo estral pelo acompanhamento citológico da secreção vaginal e análise histológica da vagina, útero e ovário.

A avaliação estatística da abertura do canal vaginal foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis uma vez que os dados não apresentaram homogeneidade. Esta avaliação demonstra que há diferença significativa entre os grupos com relação à idade de abertura do canal vaginal ($H_{5,35}=17,5$, $P=0,004$), comparado ao grupo CN-Salina, o que caracteriza a maturação sexual acelerada no grupo CP e pela tendência em diminuir a idade de abertura do canal vaginal no grupo T-1,2. Destaca-se que uma rata do grupo CN-DMSO e uma do grupo T-0,8 não apresentaram abertura do canal vaginal durante o período de observação, não sendo possível incluí-las nessa análise estatística.

Tabela 13 – Idades de abertura do canal vaginal durante a experimentação para atividade hormonal. Dados analisados por ANOVA; *P<0,05; †P<0,1 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Kruskal-Wallis.

	Idade (dias) ($\bar{x} \pm dp$) [CV%]
CN-Salina	31,6±1,7 [5,4]
CN-DMSO	30,2±2,8 [9,5]
CP	25,7±0,5 [1,9]*
T-1,2	28,3±3,7 [13,4]†
T-0,8	30,8±3,5 [11,4]
T-0,4	30,8±1,9 [6,2]

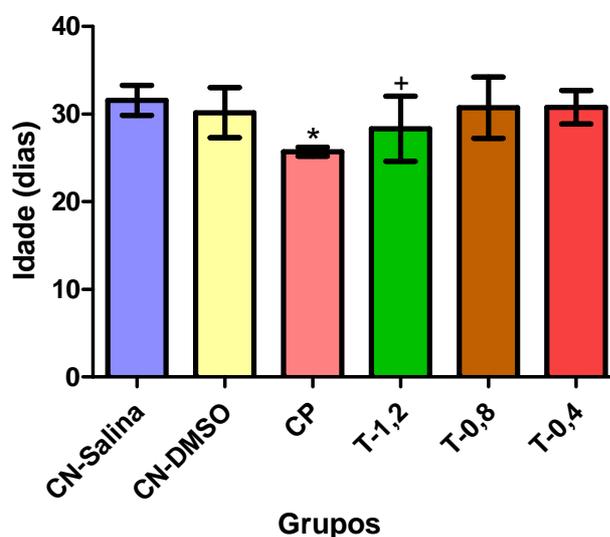


Figura 32 – Representação das médias \pm desvio padrão, por grupo, das idades (dias) da abertura do canal vaginal da experimentação para atividade hormonal do EB de *L. brasiliense*. Dados analisados por ANOVA; *P<0,05; †P<0,1 comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Kruskal-Wallis.

A abertura do canal vaginal caracteriza o início da maturidade sexual em roedores; em ratas Wistar ocorre, em média, com 38 dias de idade (MAZETI; FURLAN, 2008). Sookvanichsilp et al. (2008) procederam a administração de 17β -estradiol, dissolvido em óleo de milho, via subcutânea, por três dias consecutivos, em ratas imaturas (21 a 22 dias de idade), e verificaram, ao final desse período, a diferença significativa entre a abertura do canal vaginal nesse grupo (5 em 6 ratas apresentaram abertura do canal vaginal) comparado ao grupo controle negativo (nenhuma rata do grupo apresentou abertura do canal vaginal). Similarmente, o tratamento de ratas imaturas ovariectomizadas com etinil-estradiol também promoveu a abertura do canal vaginal (VASUDEVA; SHARMA, 2006). De forma antagônica, a administração subcutânea de fulvestranto (Faslodex®, AstraZaneca), bloqueador da ação estrogênica, dissolvido em óleo de amendoim, por 12 dias, em ratas imaturas (25 dias de idade), demonstrou que apenas 20% das ratas apresentaram abertura do canal vaginal comparado a 97% de abertura pelas ratas do grupo controle negativo. Destaca-se que a média da idade da abertura do canal vaginal nas ratas do grupo controle negativo foi de $32,1 \pm 2,3$ dias (ASHBY et al., 2005).

A diminuição da idade de abertura do canal vaginal no grupo CP demonstra que a administração da substância estrogênica apresentou a ação esperada, porém, nota-se que a média de dias para a abertura nos grupos CN-Salina e CN-DMSO foram de, respectivamente, 31,6 e 30,2. Embora, a abertura do canal vaginal não fosse esperada nesses grupos, uma vez que os animais foram sacrificados com 37 dias de idade e a literatura reporta que a média de abertura do canal vaginal em ratas Wistar é de 38 dias, experimentos, como a de Ashby et al. (2005), revelam que as ratas em experimentação podem apresentar idade de abertura do canal vaginal menor que o preconizado. Embora as ratas estivessem em caixas separadas e em biotério exclusivo, provavelmente, esses cuidados não foram suficientes para evitar possíveis interferências entre os grupos, como, por exemplo, a interferência por ferormônios.

O termo ferormônio foi introduzido por Karlson e Luscher (1959 apud GRAMMER et al., 2005) e é definido como substâncias que agem como mensageiros químicos, assim como os hormônios, porém são liberados no ambiente por um organismo e com capacidade de ativar respostas fisiológicas e comportamentais específicas em outro indivíduo da mesma espécie. De acordo com McClintock (2000 apud GRAMMER et al., 2005) os ferormônios são capazes de ativar o eixo adrenal-hipófise-hipotalâmico e levar a secreção de GnRH, desencadeando a cascata hormonal com reflexos sobre todo o sistema reprodutivo. Entre as funções específicas dos ferormônios, destaca-se a atração pelo sexo oposto, repelência pelo mesmo sexo, ligação maternal e modulação do ciclo menstrual (CUTLER, 1999 apud GRAMMER et al., 2005). Avaliando este último item, Lee e Boot (1955 apud GRAMMER et

al., 2005) foram os primeiros pesquisadores a verificar a ocorrência da sincronização do ciclo estral de ratas mantidas juntas. Esta modulação do ciclo menstrual pode estar relacionada a possíveis interferências do grupo estradiol-tratado sobre os controles negativos que refletiriam na idade reduzida da abertura do canal vaginal, observada nesse experimento.

Os dados do ensaio uterotrópico encontram-se na Tabela 14 e a representação das médias na Figura 33. O resultado foi calculado em peso relativo, uma vez que a análise em peso absoluto do útero, poderia apresentar falsos resultados, devido a diferença entre o peso corporal dos animais entre os grupos, como discutido na página 97. Pela análise estatística, nota-se que não há diferença significativa entre o grupo CP e os grupos CN. Esperava-se que o tratamento com hormônio estrogênico promovesse uma ação uterotrópica positiva, caracterizada pelo aumento do peso relativo desse órgão (BOLLE et al., 2007; DALSENTER et al., 2004). Esse dado reforça que os grupos sofreram, possivelmente, interferência entre eles, como discutido anteriormente. Em relação aos grupos tratados com EB de *L. brasiliense*, a análise estatística ($F_{5,31}=2,2$, $P<0,1$) demonstra que há uma tendência na diminuição do peso relativo do útero nos grupos T-1,2 e T-0,8, que poderia estar relacionada a um possível efeito antiestrogênico. Como apresentado por Ashby et al. (2005), a administração de fulvestranto levou à diminuição do peso absoluto do útero em relação ao controle negativo.

Tabela 14 – Peso relativo do útero para atividade hormonal do EB de *L. brasiliense*. Dados analisados por ANOVA; * $P<0,1$ comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Tukey.

	Peso relativo (%) ($\bar{x} \pm dp$) [CV%]
CN-Salina	0,30±0,16 [54,5]
CN-DMSO	0,24±0,13 [54,0]
CP	0,28±0,15 [54,8]
T-1,2	0,12±0,04 [33,5] ⁺
T-0,8	0,14±0,10 [71,1] ⁺
T-0,4	0,16±0,11 [72,0]

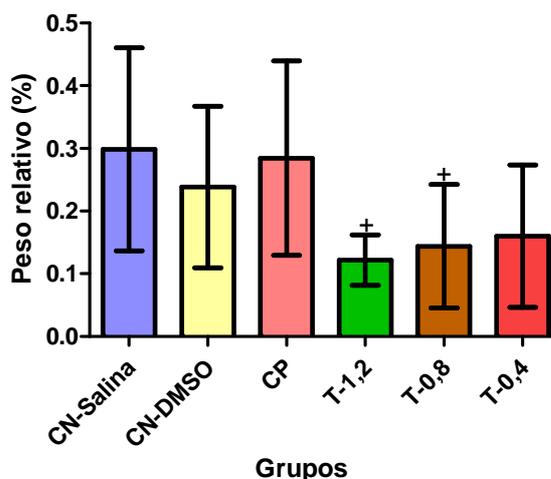


Figura 33 – Representação das médias \pm desvio padrão, por grupo, dos pesos relativos dos úteros para atividade hormonal de EB de *L. brasiliense*. Dados analisados por ANOVA; * $P < 0,1$ comparado ao grupo CN-Salina pelo teste de Tukey.

A secreção vaginal das ratas é caracterizada pela presença de 3 tipos celulares: células nucleadas, células anucleadas e leucócitos. Pela análise dessas células é possível determinar qual fase do ciclo estral o animal se encontra e qual efeito hormonal predominante (item 1.1.2, p. 86). A fase estral de cada rata, observada pela secreção vaginal a cada dois dias, após a constatação da abertura do canal vaginal, encontra-se na Tabela 15. Por esses dados, observou-se que as ratas dos grupos CN mantêm o ciclo estral normal, variando entre 4 a 5 dias em cada ciclo. As ratas do grupo CP, como esperado, apresentam em todas as coletas células anucleadas caracterizando a fase estro e efeito estrogênico. As ratas dos grupos tratados com EB de *L. brasiliense* apresentam ciclo estral anormal; embora tenha sido determinada a passagem pelas 4 fases do ciclo, nota-se a predominância nas fases metaestro e, principalmente, diestro, caracterizando o prolongamento das fases sob efeito progesterônico, principalmente no grupo T-1,2. Wood et al. (2007) relacionaram os níveis séricos de estrogênio e progesterona com as fases do ciclo estral, determinada pela análise da secreção vaginal, e constataram que, de fato, o nível sérico de progesterona é significativamente mais alto quando as ratas encontram-se na fase diestro em relação às outras fases do ciclo. Além disso, a administração de progesterona em ratas aumentou a duração do ciclo estral (maior que 4 dias) e interferiu nos parâmetros de atividade estral, sugerindo um efeito antagonizante à ação estrogênica (AXELSON et al., 1981). Dessa forma, pode-se afirmar que, um possível efeito do EB de *L. brasiliense* é a ação progesterônica.

Tabela 15 cont.

Dias de experimentação	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º	
T-1,2	D		D		D		P		E		D	
	D		D		P		M		D		D	
					E		P		M		D	
										D	P	
	P		D		D		M		M		D	
		D		D		E		D		E		
										E	M	
T-0,8							E		P		M	
				E	M		P		M		D	
		Canal vaginal fechado										
		E	E		D		M		P		D	
					E		E		M		D	
T-0,4								D	D		M	
			E		M		M		D		E	
						D	M		D		D	
							E		E		E	

M – metaestro; D – diestro; P – proestro; E – Estro

A análise histológica dos tecidos vaginal, uterino e ovariano, como visualizados na Figura 34, apresenta características distintas entre os grupos testados para atividade hormonal. As ratas dos grupos CN-Salina e CN-DMSO, que não apresentaram diferenças nas suas estruturas morfológicas, podem ser divididas em duas categorias, as que apresentaram, no 14º dia de experimento (Tabela 15) a fase metaestro ou diestro e as que apresentaram a fase proestro ou estro. No primeiro caso, o corte transversal do corno uterino apresenta, visualmente, endométrio menos espesso e glândulas menos evidentes; o corte transversal da vagina não apresenta queratinização das células do epitélio vaginal e, os ovários apresentam folículos ovarianos em diversas fases de maturação e presença de

corpo lúteo. As ratas desses grupos em fase proestro ou estro apresentam espessamento do endométrio uterino, maior presença de glândulas e epitélio vaginal queratinizado. Essas observações condizem com o padrão normal do ciclo estral das ratas e a atuação hormonal sobre esses órgãos sexuais.

Cherdshewasart et al. (2008) verificaram que a administração de estradiol por 14 dias em ratas induziu a queratinização vaginal e que esse efeito prolongou-se até 6 dias após cessar o tratamento. De forma similar, Kang et al. (2000) constataram a queratinização do epitélio vaginal pela administração de estradiol em ratas imaturas. Em adição, o efeito estrogênico sobre o útero pode ser notado pelo aumento da altura do epitélio uterino em ratas estradiol-tratadas (KANG et al., 2005; TANEE et al., 2007; KUMMER et al., 2008). Além disso, a administração do extrato das raízes de *Polygonum hydropiper* em ratas adultas ovariectomizadas e ovário-intactas, por três ciclos estrais consecutivos, promoveu alterações similares às ratas ovariectomizadas estradiol-tratadas. A estrutura uterina apresentou hiperplasia endometrial característico e, as glândulas uterinas apresentaram núcleos de coloração intensa e camada epitelial desorganizada. De forma contrária, as ratas controles ovariectomizadas apresentaram epitélio luminal uterino com camada simples e pouca proliferação glandular (HAZARIKA; SARMA; 2006).

No grupo CP (Figura 35), as observações são semelhantes as dos grupos CN-Salina e CN-DMSO nas fases estro, embora com características mais acentuadas, o que condiz com o tratamento estrogênico recebido por esses animais. Em relação aos ovários, existe maior quantidade de folículos ovarianos maduros e, uma diferença significativa é a ausência de corpo lúteo, comprovando que essas ratas mantiveram-se por todo o experimento na fase estro.

As ratas testadas com EB de *L. brasiliense* apresentaram estruturas histológicas muito semelhantes entre si, equivalentes às observadas nas ratas CN-Salina e CN-DMSO nas fases metaestro e diestro. Porém, nota-se a espessura do endométrio uterino acentuadamente mais diminuído e presença de poucas glândulas, canal vaginal menos volumoso e não queratinizado. A análise dos ovários não demonstrou diferença morfológica das estruturas foliculares observadas nos grupos CN-Salina e CN-DMSO (Figura 36).

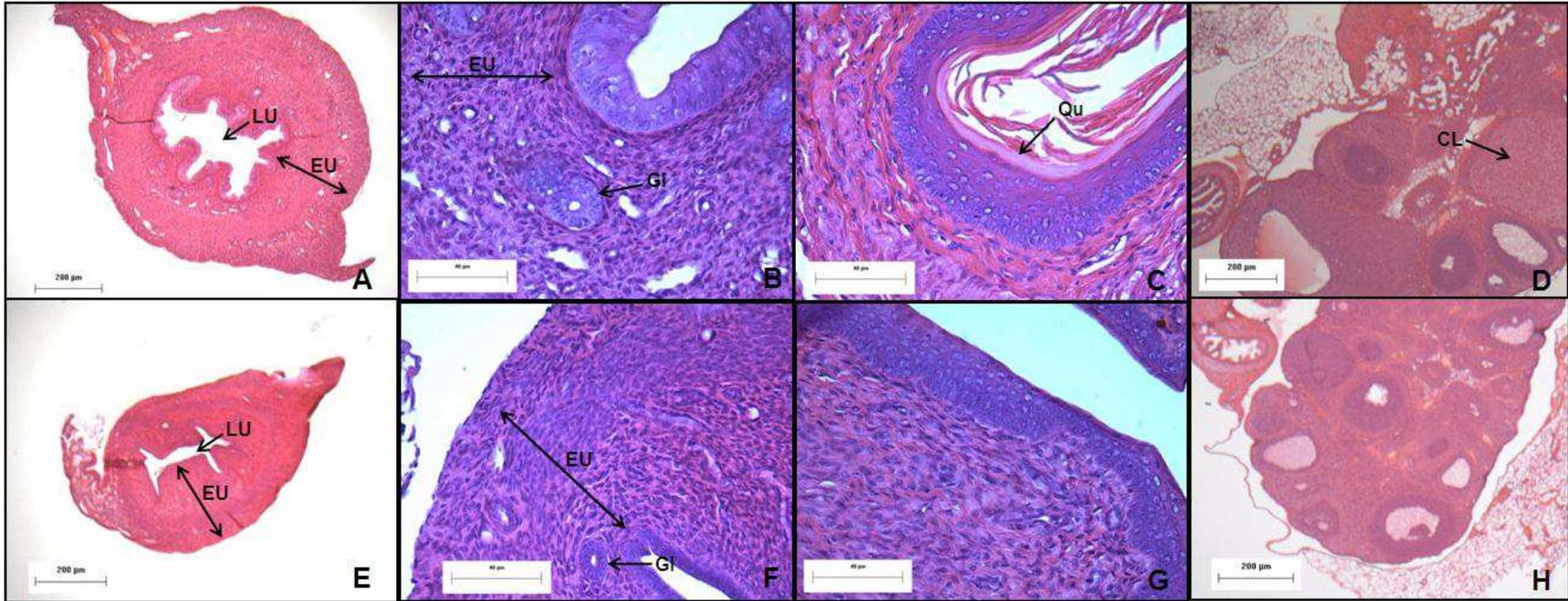


Figura 34 – Cortes histológicos, coloração hematoxilina-eosina, no teste hormonal do EB de *L. brasiliense*. Grupo CN-Salina ou CN-DMSO na fase proestro e estro (A, B, C e D) e fase metaestro e diestro (E, F, G e H). Corte transversal do útero 4X (A, E) e 40X (B, F), vagina 40X (C, G) e ovário 4X (D e H). Legenda: LU – Luz uterina; EU – Endométrio uterino; GI – Glândula; Qu – Queratina; CL – Corpo lúteo; Barra de calibração – 40 μm (B, C, F e G) e 200 μm (A, D, E e H).

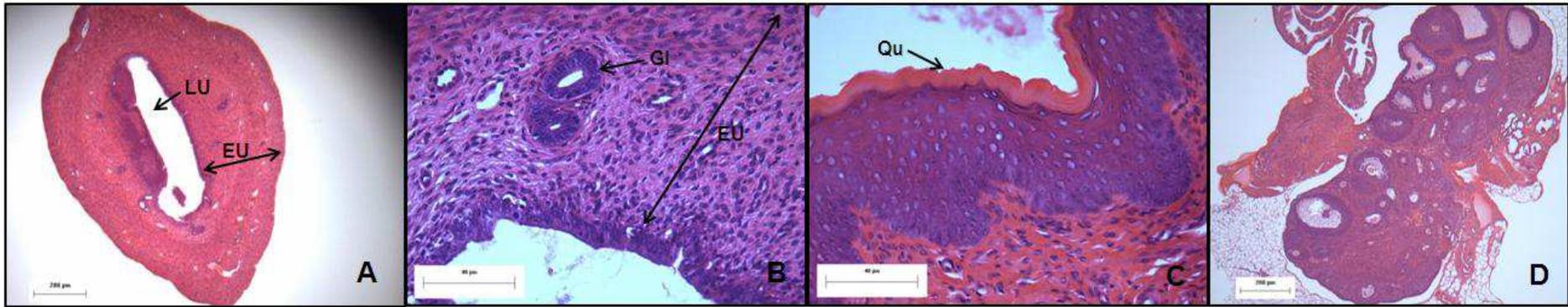


Figura 35 – Cortes histológicos do grupo CP, coloração hematoxilina-eosina, no teste hormonal do EB de *L. brasiliense*. Corte transversal do útero 4X (A) e 40X (B), vagina 40X (C) e ovário 4X (D). Legenda: LU – Luz uterina; EU – Endométrio uterino; GI – Glândula; Qu – Queratina; Barra de calibração – 40 µm (B e C) e 200 µm (A e D).

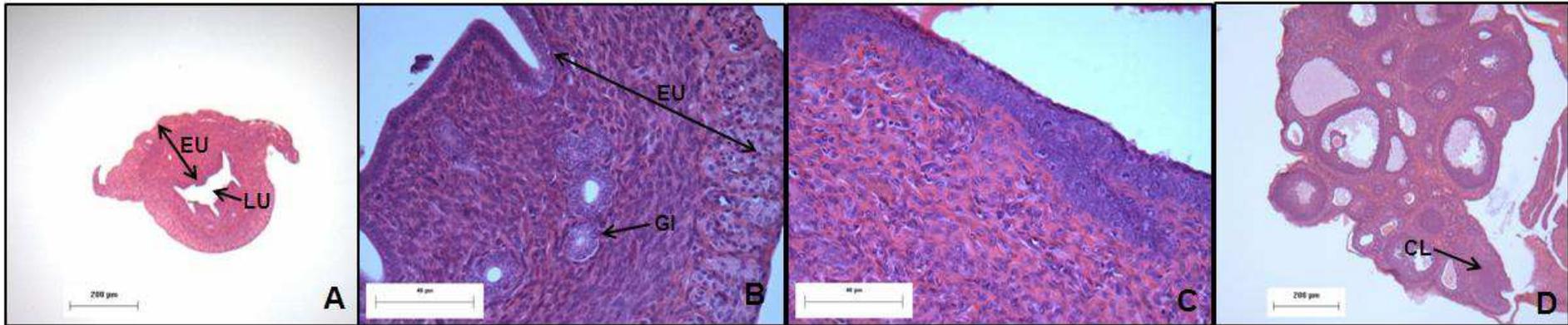


Figura 36 – Cortes histológicos do grupo T-1,2, coloração hematoxilina-eosina, no teste hormonal do EB de *L. brasiliense*. Corte transversal do útero 4X (A) e 40X (B), vagina 40X (C) e ovário 4X (D). Legenda: LU – Luz uterina; EU – Endométrio uterino; GI – Glândula; CL – Corpo lúteo; Barra de calibração – 40 µm (B e C) e 200 µm (A e D).

Hazarika e Sarma (2006) testaram o extrato das raízes de *Polygonum hydropiper* L. em ratas adultas e, verificaram que nos ovários de ratas-tratadas houve maior recrutamento folicular associado à atividade estrogênica dessa droga. Além do aumento do número de folículos ovarianos, alterações morfológicas foram notadas como a formação de células tecas e granulosa picnóticas, coloração nuclear mais intensa nessas células, mais espaços intercelulares entre as células granulosa, diminuição do número de camadas de células tecas e granulosa. As alterações estruturais dos folículos nos grupos tratados levaram à atresia folicular caracterizada pela diminuição do espaço antral e por menor volume de fluido antral.

Em relação à avaliação da atividade hormonal de EB de *L. brasiliense*, destaca-se que as ratas 4 e 7 do grupo T-0,4 apresentaram comportamento diferenciado do descrito acima. A rata 4 apresentou queratinização da parede vaginal, mas destaca-se que essa rata estava na fase estro no 14º dia do experimento e que as ratas que receberam EB de *L. brasiliense*, tiveram alternância da fase do ciclo estral, como as ratas dos grupos CN-Salina e CN-DMSO, porém não condizente com o padrão normal. A rata 7 não teve comportamento similar ao restante do grupo, pois na análise citológica (Tabela 15) apresentou permanência na fase estro, porém a parede vaginal não estava queratinizada. Essa observação está fora da normalidade para o estudo da ação hormonal. Entretanto, é importante frisar que indivíduos-resistentes ou com problemas hormonais intrínsecos possam existir na amostragem do teste.

Para a constatação da atividade hormonal, a avaliação isolada de qualquer parâmetro abordado nesse item pode levar a conclusões equivocadas. Para maior segurança na determinação dessa atividade, esses parâmetros devem ser considerados em conjunto. Dessa forma, pode-se afirmar que o EB de *L. brasiliense* tem ação sobre o sistema hormonal de ratas Wistar, pois promove a diminuição da idade média para abertura do canal vaginal, a diminuição no peso relativo do útero, o prolongamento do ciclo estral com predomínio da fase diestro e, histologicamente, apresenta estruturas morfológicas sob efeito progesterônico. Além disso, é possível afirmar que essa ação não é do tipo estrogênico, podendo ser uma ação antiestrogênica, progesterônica ou relacionada à regulação hormonal no eixo hipotálamo-hipófise.

4.1.2 Toxicidade aguda

Para avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL₅₀, os camundongos receberam dose única de EB de *L. brasiliense* e foram observados por 14 dias. Com relação ao peso médio dos camundongos machos (Tabela 16, Figura 37), os grupos tratados não

apresentaram diferença significativa, em relação ao grupo controle no início do experimento. Os grupos que receberam 1 g/kg e 3 g/kg de EB apresentam perda de peso significativa em relação ao peso médio inicial do próprio grupo, porém, apenas o grupo 3 g/kg apresenta nesse período peso médio significativamente menor que o grupo controle. Ambos os grupos recuperaram o peso aos 14 dias de experimentação ($F_{5,22}=4732,0$, $P<0,001$).

Tabela 16 – Média (g) \pm desvio padrão [coeficiente de variação (%)] dos pesos por grupo de animais machos nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA e comparados ao grupo controle negativo (CN) pelo teste de Bonferroni.

	0 h	24 h	7 dias	14 dias
CN	53,3 \pm 3,7 [7,9]	53,2 \pm 3,2 [6,0]	53,5 \pm 4,2 [7,8]	55,3 \pm 4,8 [8,7]
1,0 g/kg EB	48,3 \pm 2,6 [5,5]	46,6 \pm 2,3 [4,9]	44,2 \pm 0,4 [1,0] ^a	49,2 \pm 2,3 [4,6]
2,0 g/kg EB	49,8 \pm 3,2 [6,4]	45,6 \pm 4,9 [10,7]	46,6 \pm 4,0 [8,5]	49,0 \pm 4,1 [8,3]
3,0 g/kg EB	49,0 \pm 5,0 [10,3]	46,2 \pm 4,2 [8,7]	44,0 \pm 3,6 [8,1] ^{b,c}	49,3 \pm 3,7 [7,5]
4,0 g/kg EB	53,5 \pm 7,1 [13,3]	50,0 \pm 5,6 [11,3]	49,2 \pm 2,9 [5,8]	51,5 \pm 3,7 [7,2]
5,0 g/kg EB	47,8 \pm 4,0 [8,4]	44,8 \pm 4,9 [11,0]	43,0 \pm 4,2 [9,9]	44,0 \pm 2,8 [6,4]

a – $P<0,05$ em relação ao peso médio inicial do próprio grupo;

b – $P<0,001$ em relação ao peso médio inicial do próprio grupo;

c – $P<0,05$ em relação ao peso médio do grupo controle negativo no mesmo período.

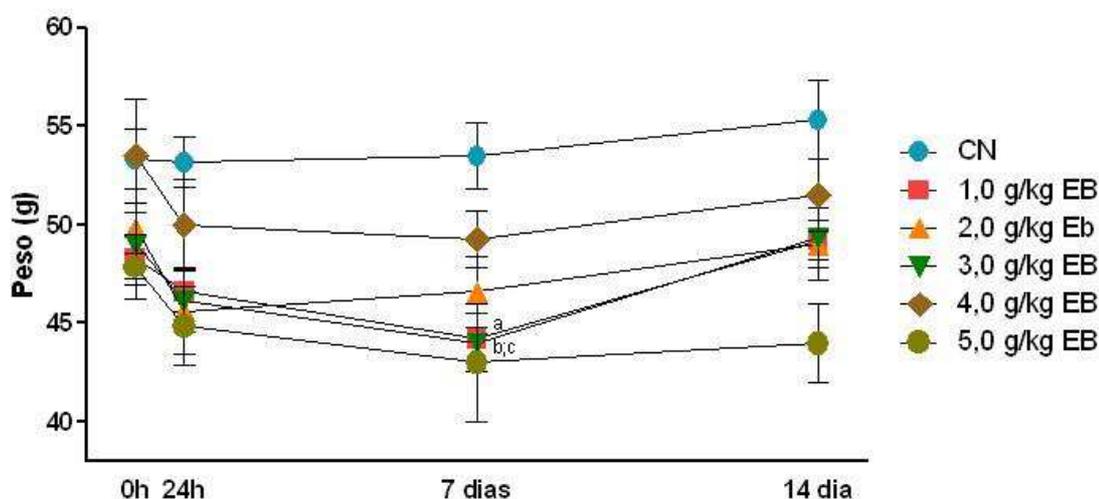


Figura 37 – Representação das médias (g) \pm desvio padrão dos pesos por grupo de animais machos nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA; a – $P < 0,05$ do grupo 1,0 g/kg em relação ao peso médio inicial do próprio grupo; b – $P < 0,001$ do grupo 3,0 g/kg em relação ao peso médio inicial do próprio grupo; c – $P < 0,05$ do grupo 3,0 g/kg em relação ao peso médio do grupo controle negativo no mesmo período pelo teste de Bonferroni.

Com relação ao peso médio dos grupos de fêmeas (Tabela 17, Figura 38), os grupos tratados não apresentam significativa perda de peso nos primeiros dias de observação, como nos grupos de machos e nem diferença significativa do peso médio entre os grupos tratados e o controle durante todo o experimento. A análise dos dados demonstra apenas que o grupo fêmea tratado com 2,0 g/kg de EB apresenta maior peso médio ao 14º dia do que no início do experimento. Além disso, o grupo controle negativo apresentou menor peso médio ao 7º dia e posterior recuperação ($F_{5,26}=3321,8$, $P < 0,001$).

Tabela 17 – Média (g) \pm desvio padrão [coeficiente de variação (%)] dos pesos por grupo de animais fêmeas nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA e comparados ao grupo controle negativo (CN) pelo teste de Bonferroni.

	0 h	24 h	7 dias	14 dias
CN	34,8 \pm 5,1 [14,7]	35,3 \pm 5,4 [15,2]	32,2 \pm 4,1 [12,6] ^a	36,3 \pm 3,8 [10,5]
1,0 g/kg EB	32,8 \pm 0,8 [2,3]	32,2 \pm 0,8 [2,3]	33,2 \pm 1,3 [4,0]	33,8 \pm 1,3 [3,9]
2,0 g/kg EB	30,8 \pm 3,1 [9,9]	31,5 \pm 2,9 [9,1]	32,5 \pm 2,9 [8,9]	33,5 \pm 2,7 [8,0] ^a
3,0 g/kg EB	36,3 \pm 4,8 [13,2]	36,2 \pm 4,0 [11,1]	36,8 \pm 3,8 [10,2]	38,2 \pm 4,0 [10,5]
4,0 g/kg EB	38,0 \pm 4,3 [11,4]	37,5 \pm 4,1 [10,9]	38,3 \pm 4,2 [10,9]	39,8 \pm 3,5 [8,9]
5,0 g/kg EB	38,0 \pm 3,7 [9,7]	35,8 \pm 1,5 [4,1]	37,0 \pm 2,0 [5,4]	37,3 \pm 1,5 [4,1]

a – P<0,05 em relação ao peso médio inicial do próprio grupo.

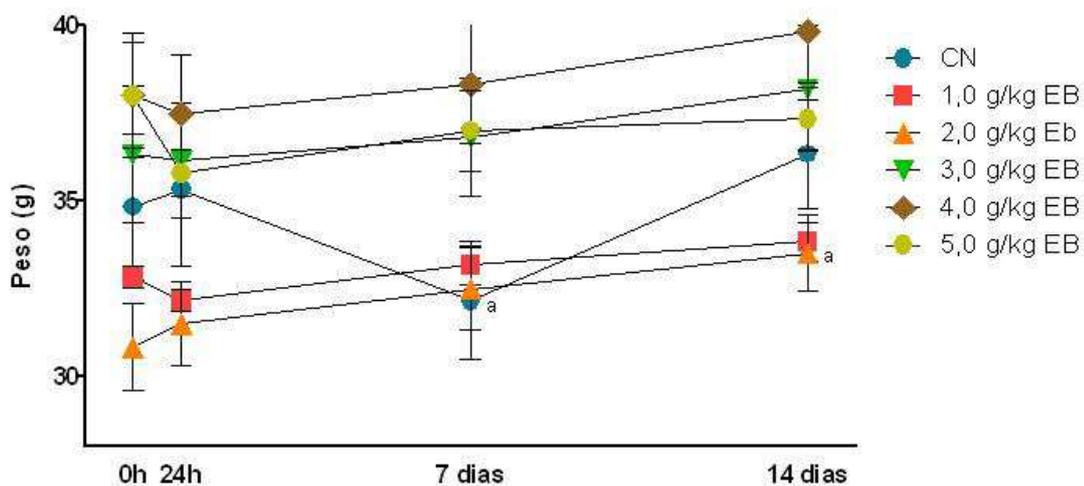


Figura 38 – Representação das médias (g) \pm desvio padrão dos pesos por grupo de animais fêmeas nos tempos 0 e 24 h, 7 e 14 dias durante o teste de toxicidade aguda. Dados analisados por MANOVA; a – P<0,05 do grupo CN e 2,0 g/kg de EB em relação ao peso médio inicial do próprio grupo pelo teste de Bonferroni.

A tendência no aumento do peso durante o experimento (14 dias) é decorrente do próprio crescimento dos animais nesse período. A diminuição do peso médio do grupo controle negativo fêmeas (7^o dias) é um fato imprevisto e que não consta na literatura científica sobre o assunto. Por outro lado, a diminuição do peso médio dos grupos tratados com EB de *L. brasiliense*, tendência observada principalmente nos grupos de machos, pode estar relacionada aos efeitos dos taninos sobre a redução da taxa alimentar, digestibilidade de nutriente e disponibilidade de proteínas, como apresentado anteriormente (item 4.1.1, p. 97). Nota-se que essa diminuição ocorre logo após a administração do EB de *L. brasiliense* (dose única) e que os animais apresentam recuperação do peso até o final do experimento, demonstrando que esse efeito não é permanente e pode ser revertido com a suspensão do tratamento.

Não se observou a presença de nenhum dos parâmetros fisiológicos monitorados no grupo controle. Porém, os animais dos grupos tratados com EB de *L. brasiliense* apresentaram sinais de toxicidade reversíveis, como hiperventilação, que desapareceu após 4 h do tratamento; piloereção foi observada nos animais do grupo 2,0 g/kg até 4 h após o tratamento e, no grupo 5,0 g/kg, surgiu após 8 h do tratamento e desapareceu após as 12 h.

Os animais foram autopsiados e não se observou alteração anatômica dos órgãos. Primeiramente, os grupos de machos e fêmeas, com o mesmo tratamento, foram comparados. Constatado que não havia diferença significativa do peso relativo dos órgãos entre os sexos, a análise estatística foi procedida considerando apenas a divisão dos grupos pelo tratamento. Em relação a essa análise (Tabela 18, Figura 39), não houve diferença significativa dos pesos relativos (%) entre os grupos tratados e o grupo controle considerando o coração ($F_{5,66}=0,7$, $P=0,6$), pulmão ($F_{5,66}=0,7$, $P=0,6$), fígado ($F_{5,66}=0,3$, $P=0,9$), baço ($F_{5,66}=0,7$, $P=0,6$) e rins ($F_{5,66}=0,2$, $P=0,9$).

Tabela 18 – Média \pm desvio padrão [coeficiente de variação (%)] do peso relativo (%) do coração, pulmão, fígado, baço e rins para teste de toxicidade aguda do EB de *L. brasiliense*. Dados analisados por ANOVA; $P < 0,05$ como critério de significância comparado ao grupo controle negativo (CN) pelo teste de Tukey.

	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins
CN	0,56 \pm 0,08 [13,8]	0,57 \pm 0,08 [13,9]	5,44 \pm 0,78 [14,3]	0,45 \pm 0,13 [28,2]	1,32 \pm 0,24 [18,2]
1,0 g/kg EB	0,53 \pm 0,10 [18,4]	0,63 \pm 0,27 [42,6]	5,6 \pm 1,02 [18,2]	0,51 \pm 0,09 [17,3]	1,30 \pm 0,19 [14,4]
2,0 g/kg EB	0,52 \pm 0,09 [17,3]	0,68 \pm 0,32 [47,2]	5,42 \pm 0,54 [9,9]	0,51 \pm 0,14 [27,3]	1,27 \pm 0,16 [12,7]
3,0 g/kg EB	0,52 \pm 0,08 [14,6]	0,63 \pm 0,24 [37,6]	5,56 \pm 0,79 [14,2]	0,55 \pm 0,16 [28,6]	1,35 \pm 0,23 [16,9]
4,0 g/kg EB	0,50 \pm 0,07 [13,7]	0,62 \pm 0,14 [22,6]	5,51 \pm 0,58 [10,6]	0,48 \pm 0,16 [34,1]	1,28 \pm 0,24 [18,7]
5,0 g/kg EB	0,52 \pm 0,07 [13,9]	0,72 \pm 0,13 [18,5]	5,77 \pm 1,05 [18,2]	0,48 \pm 0,13 [27,7]	1,29 \pm 0,17 [13,1]

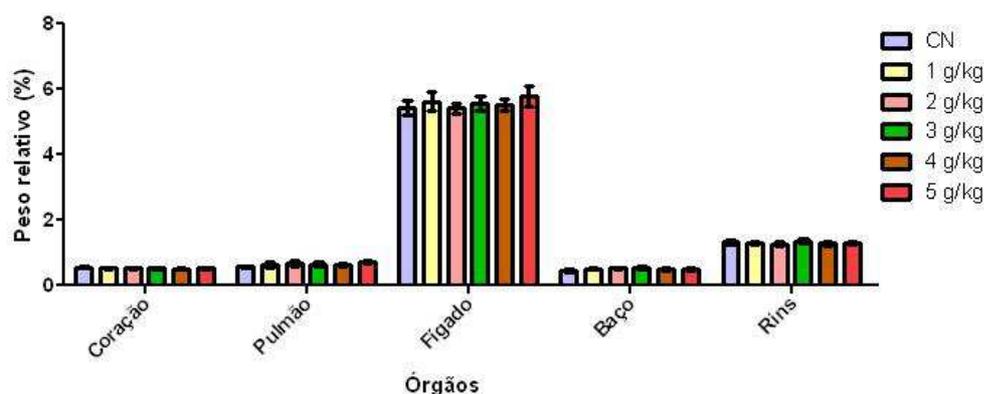


Figura 39 – Representação das médias \pm desvio padrão do peso relativo (%) do coração, pulmão, fígado, baço e rins para teste de toxicidade aguda do EB de *L. brasiliense*. Dados analisados por ANOVA; $P < 0,05$ como critério de significância comparado ao peso relativo (%) do grupo controle negativo (CN) pelo teste de Tukey.

Durante os 14 dias do experimento, os animais que morreram foram contabilizados, sendo um do grupo 1,0 g/kg, um do grupo 2,0 g/kg, um do grupo 3,0 g/kg, dois do grupo 4,0 g/kg e sete do grupo 5,0 g/kg. Assim, a DL_{50} para o EB de *L. brasiliense* é de 4,8 g/kg, determinada pela equação da reta entre as doses 4,0 e 5,0 g/kg (Figura 40). Esse dado demonstra que o EB de *L. brasiliense* apresenta baixa toxicidade.

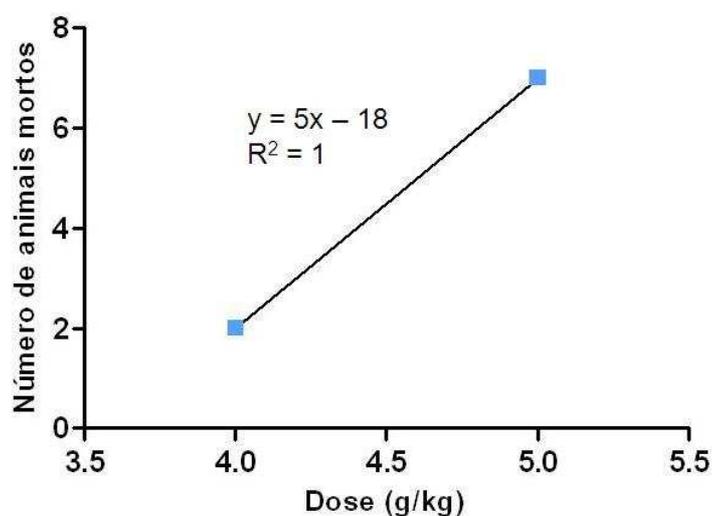


Figura 40 – Equação da reta para determinação da DL_{50} do EB de *L. brasiliense*.

4.1.3 Atividade mutagênica

Os dados da análise do efeito mutagênico do EB de *L. brasiliense* encontram-se na Tabela 19 e a representação da análise microscópica está na Figuras 41. Para esse teste, indica-se o tratamento com doses equivalentes a no máximo 80% da DL_{50} , isto é, a administração da dose que pode provocar sinais de toxicidade sem causar a morte dos animais, ou a dose máxima de 2,0 g/kg quando a DL_{50} não for determinada (VILAR et al., 2008). Considerando que a DL_{50} determinada foi 4,8 g/kg, adotou-se a dose máxima de 2,0 g/kg, sendo utilizada as doses de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/kg. Para a análise estatística, os dados não apresentaram variância constante, portanto foi adotada a avaliação pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise estatística apresenta um aumento significativo no número de eritrócitos policromáticos micronucleados no grupo tratado com ciclofosfamida, característico do controle positivo, e no grupo tratado com 2,0 g/kg. Nos demais grupos, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle negativo ($H_{5,60}=42,5$, $P<0,001$).

Tabela 19 – Média \pm desvio padrão [coeficiente de variação (%)] do número de eritrócitos policromáticos micronucleados por 2000 eritrócitos policromáticos no teste de mutagenicidade do EB de *L. brasiliense*. Dados analisados por ANOVA; **P <0,001 comparado ao grupo controle negativo pelo teste de Kruskal-Wallis.

	Eritócitos policromáticos micronucleados ($\bar{x} \pm dp$) [CV%]
CN	7,2 \pm 2,5 [54,5]
CP	26,7 \pm 7,0 [54,0]**
0,5 g/kg	11,8 \pm 2,8 [54,8]
1,0 g/kg	10,6 \pm 3,5 [33,5]
1,5 g/kg	9,7 \pm 1,4 [71,1]
2,0 g/kg	17,9 \pm 4,7 [72,0]**

CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo

A frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea de ratos é muito sensível ao índice de dano produzido por radiação ionizante e por mutação química. Esse ensaio apresenta vantagens em relação a outros, como o baixo custo e a utilização de mamíferos que apresentam capacidade de metabolização similar aos humanos (RABELLO-GAY, 1991 apud VILAR et al., 2008).

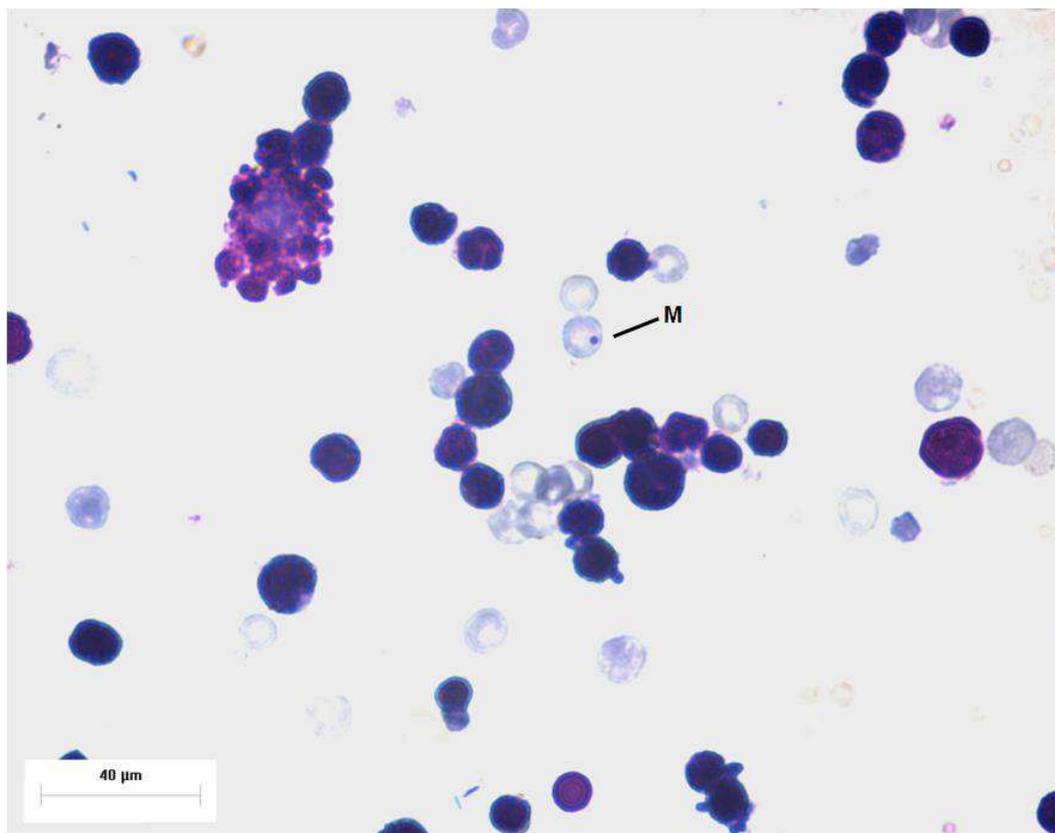


Figura 41 – Fotomicrografia do esfregaço da medula óssea (100X) no ensaio de mutagenicidade do EB de *L. brasiliense*. Legenda: M – eritrócito policromático micronucleado; barra de calibração – 40 μm .

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que o EB de *L. brasiliense* apresenta baixo potencial mutagênico, porém seu uso deve ser monitorado a fim de se evitar superdosagem e efeitos danosos ao organismo. Ensaio com algodãozinho-do-campo (*Cochlospermum regium* Mart.) demonstram aumento significativo do número de micronúcleos na dose de 38,0 mg/kg (i.p.; 20% da DL_{50}) e, relaciona-se esse efeito mutagênico à presença de flavonóides, taninos e terpenos (CASTRO et al., 2004). Além disso, a avaliação da mutagenicidade de três extratos de murici (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), metanólico, hidrometanólico e clorofórmico, apresentou sinais de toxicidade para o extrato metanólico e, esse efeito, foi relacionado à presença de flavonóides. A composição do extrato metanólico e hidrometanólico é similar, porém maior teor de procianidinas foi detectado nesse último que não apresentou sinais de genotoxicidade (SANNOMIYA et al., 2007).

CONCLUSÃO

A utilização de plantas medicinais como medicamentos é crescente e o estudo dessas plantas é imprescindível para se garantir qualidade, segurança e efetividade na utilização terapêutica. A abordagem físico-química deste trabalho apresentou parâmetros necessários para o controle de qualidade adequado das raízes de *L. brasiliense*. Entretanto, dados conclusivos só poderão ser obtidos após um estudo ampliado em controle de qualidade farmacopeico, considerando avaliações sazonais e regionais dos parâmetros de qualidade abordados neste trabalho.

A validação do método de determinação do teor de taninos totais pela reação com Folin-Ciocalteu mostrou-se limitada pela baixa seletividade/especificidade do método envolvendo a etapa de adsorção por pó-de-pele. Entretanto, a determinação polifenóis totais no EB de *L. brasiliense* mostrou-se confiável no intervalo de quantificação de 3,68 a 26,88 µg/ml, cujos resultados dos parâmetros avaliados (linearidade, precisão, exatidão e robustez) foram satisfatórios. Essa metodologia mostrou-se aplicável à rotina laboratorial para controle de qualidade como um método complementar e importante, uma vez que taninos são moléculas de alta complexidade e de difícil padronização, sendo as técnicas mais sofisticadas de maior custo operacional.

O ensaio para atividade hormonal mostrou que o EB de *L. brasiliense* tem ação sobre o sistema reprodutor. Esta ação foi do tipo antiestrogênico, podendo estar relacionada ao bloqueio de alguma etapa bioquímica envolvida na ação estrogênica nos órgãos-alvos, a um efeito progesterônico ou, ainda, a um efeito central em nível de hipotálamo-hipófise. Este resultado pode estar relacionado com o uso popular de *L. brasiliense* como regulador hormonal e para TPM. Diferentes modelos experimentais devem ser testados para definir o tipo de ação e o mecanismo envolvido.

Os testes toxicológicos mostram resultados preliminares de baixa toxicidade e potencial genotóxico (ausência de alteração anatômica, DL₅₀ de 4,8 g/kg e efeito genotóxico em doses acima de 2.0 g/kg) do EB de *L. brasiliense*; um estudo toxicológico completo, envolvendo toxicidade crônica e clínica, e, eventualmente, toxicidade reprodutiva, será necessário para que esta planta se desenvolva tecnologicamente até a obtenção de um fitomedicamento.

REFERÊNCIAS

- ACOG, American College of Obstetricians and Gynecologists. Premenstrual Syndrome. Disponível em: http://www.acog.org/publications/patient_education/bp057.cfm. Acesso em: 25 de abril de 2008.
- ALONSO, J.R. *Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Indusgraf S.A., 1998. p.17.
- ANIYA, Y.; MIYAGI, C.; NAKANDAKARI, A.; KAMIYA, S.; IMAIZUMI, N. ICHIBA, T. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine*, v.9, p.239-44, 2002.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 8. ed, Baltimore: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 738 p., 2005.
- ASHBY, J.; ODUM, J.; BURNS, A.; LEFEVRE, P. The reported in vitro anti-estrogen pentachloronitrobenzene enhances the estrogenic activity of estradiol in vivo in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.20, p. 199–208, 2005.
- ASTIN, J.A. Why patients use alternative medicine: results of a national study. *Journal of the American Medical Association*, v.279, p.1548–1553, 1998.
- AXELSON, J.F.; GERALD, A.A.; ALBERS, H.E. Effect of progesterone on the estrous activity cycle of the rat. *Physiology & Behavior*, v. 26, n.4, p. 631-635, 1981.
- BAGNOLI, V.R.; FONSECA, A.M.; ARIE, W.M.Y.; JUNQUEIRA, P.A.A. Fitomedicamentos Utilizados em Ginecologia e Obstetrícia. In: Lima, S.M.R.R. *Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica*. Ed. Atheneu. São Paulo, 2006.
- BALANDRIN, M.F.; KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R., Plant-derived natural products in drug discovery and development. An overview. In: *Human Medicinal Agents from Plants*, ACS Symposium Series 534, 1993, Washington, USA, American Chemical Society ISBN 0-8412-2705-5, p.2-12, 1993.
- BARATA, L.E.S.; QUEIROZ, S.R.R. *Contribuição Efetiva do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade*. Campinas: MCT/PADCT/PGCT, 1995.
- BIRZNIECE, V.; BÄCKSTRÖM, T.; JOHANSSON, I.M.; LINDBLAD, C.; LUNDGREN, P.; LÖFGREN, M.; OLSSON, T.; RAGAGNIN, G.; TAUBE, M.; TURKMEN, S.; WAHLSTRÖM, G.; WANG, M.; WIHLBÄCK, A.C.; ZHU, D. Neuroactive steroids effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. *Brain Research Reviews*, v. 51, p. 212-39, 2006.
- BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; PERRONE, F.; EVANDRI, MG. Estrogen-like effect of *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by in vivo, ex vivo and in vitro assays. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 107, p. 262-9, 2007.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Portaria nº 116 – Norma para Estudo de Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos - de 8 de agosto de 1996. Brasília, DF. 1996.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - de 29 de maio de 2003. Brasília, DF. 2003.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 - Registro de medicamentos fitoterápicos - de 16 de março de 2004. Brasília, DF. 2004a.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90 – Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos - de 16 de março de 2004. Brasília, DF. 2004b.

BRASIL, Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica – Brasília-DF, 2006.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resultado da Consulta de Produtos de Empresas – Medicamento. Disponível em:

<http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_internet.asp>. Acesso em: 21 de abril de 2008.

BREKHMANN, I.I.; DARDYMOV, I.V. New substances of plants origin which increase non-specific resistance. *Annual Review of Pharmacology*, v.9, p. 419–430, 1969 apud MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, p. 493-500, 2007.

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

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P. de; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos estratégia e discussão. *Pesticidas Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.13, p. 129-146, 2003.

CAMPAGNE, D.M.; CAMPAGNE, G. The premenstrual syndrome revisited. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.130, p.4-17, 2007.

CARDOSO, M.L.C. *Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento galênico de extratos*. 1990. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 101 f., 1990.

CARDOSO, M.L.C. Desenvolvimento de técnica analítica e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., Malpighiaceae, (nó-de-cachorro). Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 128 f., 2002.

CARNEIRO, C.S.; COSTA-PINTO, F.A.; SILVA, A.P.; PINELLO, K.C.; SILVA, T.C.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M.K.; GÓRNIAC, L.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; DAGLI, M.L.Z. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.58, p.427-431, 2007.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, , cap.20, p.519-36, 2007.

CASTRO, D.B.; SANTOS, D.B.; FERREIRA, H.D.; SANTOS, .SC.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 6, n. 3, p. 15-9, 2004.

CELESTE, M.; TOMÁS, C.; CLADERA, A.; ESTELA, J.M.; CERDÀ, V. Enhanced automatic flow-injection determination of the total polyphenol index in wines using Folin-Ciocalteu reagent. *Analytical Chimica Acta*, v.269, n.1, p.21-28, 1992.

CHEN-CHEN, L.; SENA, M.A. Atividade Tóxica e Mutagênica do Óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) em Camundongos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.5, n.1, p. 37-40, 2002.

- CHENG, Y.W., LEE, W.W., LI, C.H., LEE, C.C., KANG, J.J. Genotoxicity of motorcycle exhaust particles *in vivo* and *in vitro*. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*, v.81, p. 103–111, 2004.
- CHENGELIS, C.P.; KIRKPATRICK, J.B.; REGAN, K.S.; RADOVSKY, A.E.; BECK, M.J.; MORITA, O.; TAMAKI, Y.; SUZUKI, H. 28-Day oral (gavage) toxicity studies of green tea catechins prepared for beverages in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p. 978–989, 2008.
- CHERDSHEWASART, W.; SRIWATCHARAKUL, S.; MALAIVIJITNOND, S. Variance of estrogenic activity of the phytoestrogenrich plant. *Maturitas*, v.61, p. 350–357, 2008.
- COSTA, A.F. *Farmacognosia*. Lisboa: Editora Calouste Gilbenkian, 2002.
- CUTLER, W.B. Human sex-attractant pheromones: discovery, research, development, and application in sex therapy. *Psychiatric Annals*, v.29, p. 54–59, 1999 apud GRAMMER, K.; FINK, B.; NEAVE, N. Human pheromones and sexual attraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.118, p. 135–142, 2005.
- DALSENTER, P. R.; CAVALCANTI, A.M.; ANDREDE, A.J.M.; ARAÚJO, S.L.; MARQUES, M.C.A. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reproductive toxicology*, v. 18, p.819-23, 2004.
- DE CANDOLLE, A. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. Paris, v.12, 1848, p. 644.
- DEUTSCHES Arzneibuch. 9. ed., Stuttgart: Wissenschaftliche, 1986.
- DIEL, P.; SCHMIDT, S.; VOLLMER, G. In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B*, v.777, p.191-202, 2002.
- DUHAZÉ, C.; GOUZERH, G.; GAGNEUL, D.; LARHER, F.; BOUCHEREAU, A. The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant Science*, v. 163, p. 639-46, 2002.
- DUHAZÉ, C.; GAGNEUL, D.; LEPORT, L.; LARHER, R.; BOUCHEREAU, A. Uracil as one of the multiple sources of β -alanine in *Limonium latifolium*, a halotolerant β -alanine baine accumulating Plumbaginaceae. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 993-8, 2003.
- ENGLER, A. Syllabus der Pflanzenfamilien. Berlin, Borntraeger, v.2, 1964, p. 394-6.
- EUROPEAN PHARMAOPOEIA. Council of Europe. Determination of tannins in herbal drugs. European Directorate for the Quality of Medicines, 6. Ed., p. A286, 2007.
- EVERETT, J.W. Pituitary and hypothalamus: Perspectives and Overview. In: NEIL, J.D. *Physiology of reproduction*. 3. ed. Ed. Elsevier, cap. 26, p. 1289-1307, 2006.
- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias –primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre, Ed. da UFRGS; Florianópolis, Ed. da UFSC, p. 263-288, 2007.
- FARMACOPEIA Brasileira, parte I. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira, 4ª Ed., São Paulo. Ed. Atheneu, 1988.
- FARMACOPEIA Brasileira, parte II, 5º Fascículo . Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira, 4ª Ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2004.
- FARMACOPEIA Brasileira, parte II, 6º Fascículo. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira, 4ª Ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.

- FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTA, D.D.; ENO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of World Health Organization*, v.63, p.226-230, 1985.
- FEDERMAN NETO, A; MARRETO, R. History and new chemical developments on the folin's reagents. a new test for antioxidant compounds. 2. Simpósio Internacional de Pós-graduação e Pesquisa, Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 29 a 31 de agosto de 2006. Disponível em: <<http://sinpospq.org/2006/node/91>>. Acesso em: 14 de outubro de 2009.
- FELIPE, A.M.M.; RINCÃO, V.P.; BENATI, F.J.; LINHARES, R.E.C.; GALINA, K.J.; TOLEDO, C.E.M.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.29, n.6, p.1092-1095, 2006.
- FENNER, R. BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 3, p. 269-394, 2006.
- FÉRES, C.A.O.; MADALOSSO, R.C.; ROCHA, O.A.; LEITE, J.P.V.; GUIMARÃES, T.M.D.P.; TOLEDO, V.P.P.; TAGLIATI, C.A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 108, p.450-4566, 2006.
- FOLIN, O.; MACALLUN, A.B. On the blue color reaction of phosphotungstic acid (?) with uric acid and other substances. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 11, p. 265-266, 1912.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 73, p. 627-650, 1927.
- GALEA, L.A.M. ULBAN, K.A.; EPP, J.R.; BRUMMELTE, S.; BARHA, C.K.; WILSON, W.L.; LIEBLICH, S.E.; PAWLUSKI, J.L. Endocrine regulation of cognition and neuroplasticity: Our pursuit to unveil the complex interaction between hormones, the brain, and behavior. *Canadian Journal of Experimental Psychology*, v.62, n.4, p.247-260, 2008.
- GAZDA, V.E.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; BARBI, N.S.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicological evaluation of na ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, v.105, p.187-195, 2006.
- GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 123, p. 1979-1983, 1983.
- GRUBEŠIĆ, R.J.; VUKOVIĆ, J.; KREMER, D.; VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago L. species*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, p.837-842, 2005.
- GUIMARÃES, M.A.; MÁZARO, R. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentações*. Ed. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, 2004.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11.ed. Elsevier, Rio de Janeiro-RJ, p.839-940, 2006.
- HALBREICH, U. The etiology, biology, and evolving pathology of premenstrual syndromes. *Psychoneuroendocrinology*, v.28, p.55-99, 2003.
- HARBORNE, J.B. Comparative biochemistry of the flavonoids-IV. Correlations between chemistry, pollen morphology and systematics in the family plumbaginaceae. *Phytochemistry*, v.6, n.10, p.1415-28, 1967.
- HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall. 3.ed. 1998.

- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. *Journal of Natural Products*, v.59, p.205-215, 1996.
- HASLAM, E.; HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. *The flavonoids*. London: Chapman and Hall, v.9, p.505-560, 1975.
- HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.38, p.717-720, 1990.
- HAZARIKA, A.; SARMA, H.N. The estrogenic effects of *Polygonum hydropiper* root extract induce follicular recruitment and endometrial hyperplasia in female albino rats. *Contraception*, v.74, p. 426– 434, 2006.
- HEDDLE, J. A. A rapid in vitro test for chromosomal damage. *Mutation Research*, v.18, p. 187-190, 1973.
- HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M.D., TUCKER, J.D., VANPARYS, P., MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage; past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* V.18, p. 277–291, 1991.
- HELMAN, J. *Farmacotecnica teorica y practica*. 3 ed. Mexico: Continental, 1982.
- HOLETZS, F.B.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; TOLEDO, C.E.M.; NAKAMURA, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.4, p.397-401, 2005.
- HSIEH, Y.J.; LIN, L.C.; TSAI, T.H. Determination and identification of plumbagin from the roots *Plumbago zeylanica* L. by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1083, p. 141-5, 2005.
- ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of pharmaceutical for human use. validation of analytical procedures: text and methodology – q2 (r1). 17 f. 1996. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 15 de outubro de 2009.
- INDUSEKHAR, R.; USMAN, S. B.; O'BRIEN, S. Psychological aspects of premenstrual syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v.21, n.2, p.207-220, 2007.
- ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.58, p.942-949, 2006.
- ISHIDA, K.; ROZEMAL, S.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v.5, n.29, 2009.
- JANHS, R.T.; CRESCENTE, A.S. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluido de *Limonium brasiliense* e N-acetil-p-aminophenol. *Trib.Pharm.*, Curitiba, v. 44, p. 105-11, 1976 apud MURRAY, A.P.; RODRIGUEZ, S. FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, A.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift-fuer-Naturforschung-Section-C-Journal-of-Biosciences*, Tübingen, v. 59c, p. 477-80, 2004.
- JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2005.

- KANG, K.S.; KIM, H.S.; RYU, D.Y.; CHE, J.H.; LEE, Y.S. Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of *p*-nonylphenol in Sprague–Dawley rats. *Toxicology Letters*, v.118, p. 109–115, 2000.
- KANG, H.G.; JEONG, S.H.; CHO, J.H.; KIM, D.G.; PARK, J.M.; CHO, M.H. Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats. *Toxicology*, v.213, p. 147–156, 2005.
- KARLSON, P.; LUSCHER, M. 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, v.183, p. 55–56, 1959 apud GRAMMER, K.; FINK, B.; NEAVE, N. Human pheromones and sexual attraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.118, p. 135–142, 2005.
- KLEIN, R. Phytoecdysteroid. *Journal of the American Herbalist Guild*. Fall/Winter, p. 18-28, 2004.
- KOMMISSION, E. Bundesanzeiger n. 133 de 19.07.1994. Liste der Monographien. Bundesgesundheitsamt: Institut für Arzneimittel, 1994.
- KONAN, N.A.; BACCHI, E.M.; LINCOPAN, N.; VARELA, S.D.; VARANDA, E.A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 30–8, 2007.
- KUMMER, V.; MAŠKOVÁ, J.; ZRALÝ, Z.; NEČA, J.; ŠIMEČKOVÁ, P.; VONDRÁČEK, J.; MACHALA, M. Estrogenic activity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in uterus of immature Wistar rats. *Toxicology Letters*, v.180, p. 212–221, 2008.
- KUNTZE, C. E. O. *Revisio Generum Plantarum*. Leipzig, v.2, 1891, p. 395.
- KUO, Y.C.; CHWEN, L.; JERN, TSAI, W.J.; CHOU, C.J.; KUNG, S.H.; HO, Y.H. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.9, p. 2854-64, 2002.
- KURUL'KINA, L.M.; ZHUSUPOVA, G.E.; SHUL'TS, E.E.; ERZHANOV, K.B. Fatty-acid composition of two *Limonium* plant species. *Chemistry of Natural Compounds*, v.40, n.5, p. 417-9, 2004a.
- KURUL'KINA, L.M.; SHUL'TS, E.E.; ZHUSUPOVA, G.E.; ABILOV, ZH.A.; ERZHANOV, K.B.; CHAUDRI, M.I. Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.40, n.5, p. 465-71, 2004b.
- LABORATÓRIO CIBECOL. Agoniada composto. Disponível em: <http://www.cibecol.com.br/produtos.php>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2006.
- LAWRENCE, G.H.M. *Taxonomy of vascular plants*. New York: The Macmillan Company, p. 661-662, 1951.
- LEE, S.; BOOT, L.M. Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta Physiologica et Pharmacologica Neerlandica*, v.4, p. 442–443, 1955 apud GRAMMER, K.; FINK, B.; NEAVE, N. Human pheromones and sexual attraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.118, p. 135–142, 2005.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 4. ed. Sarvier, Sao Paulo, p.506-9, 2006.
- LIN, L.C.; YANG, L.L.; CHOU, C.J. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry*, v.62, p. 619-22, 2003.

- LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. Quality assurance of phytopharmaceuticals. In: _____. *Phytopharmaceutical Technology*, Bodton: CRC Press, cap. 6, p. 341-352, 1989.
- LONG, J.A.; EVANS, H.M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, v. 6, p.260-265, 1922 apud MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- LOPES, G.C.; SANCHES, A. C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 265-272, 2005.
- LOWRY, J.B.; MCSWEENEY, C.S.; PALMER, B. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the rumina. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 47, n. 6, p. 829-842, 1996.
- LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N.J.; GRIMMER, H.R.; WARMINSKI, E.E.; WILLIAMSON, M.P.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. Polyphenols, Adstringency and Proline-rich Proteins. *Phytochemistry*, v.37, n.2, p.357-371, 1994.
- MANUAL MERCK. Hormônios e reprodução. Disponível em:
<http://www.manualmerck.net/artigos/imprime.asp?id=258&cn=1610>. Acesso em: 26 de outubro de 2009.
- MARCONDES, F.K.; MIGUEL, K.J.; MELO, L.L.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, v.74, p. 435– 444, 2001.
- MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. review. *Phytochemistry*, v.24, p.639-652, 1985.
- MAZETI, C.M.M.; FURLAN.M.M.D.P. Crescimento e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar, em restrição alimentar desde o nascimento. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v.30, n.2, p.197-204, 2008.
- MCCLINTOCK, M.K. Human pheromones: primers, releasers, signallers or modulators? In: WALLEN, K.; SCHNEIDER, E. *Reproduction in context*. Cambridge, MA: MIT Press, p. 335–420, 2000 apud GRAMMER, K.; FINK, B.; NEAVE, N. Human pheromones and sexual attraction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.118, p. 135–142, 2005.
- MEDICINA et al. Phytochemical screening of Argentine plants with potencial pharmacological activity. *Planta Med.* v. 50, p. 136-40, 1977 apud MURRAY, A.P.; RODRIGUEZ, S. FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, A.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift-fuer-Naturforschung-Section-C-Journal-of-Biosciences*, Tübingen, v. 59c, p. 477-80, 2004.
- MELLO, J.P.C. Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (Less.) DC. – Compositae – (Carqueja). Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 135 f, Porto Alegre, 1989.
- MELO, J.O.; ENDO, T.H.; BERSANI-AMADO, L.E.; SVIDZINSKI, A.E.; BARONI, S.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.3, 465-469, 2007.
- MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, p. 493-500, 2007.

- MILEWICZ, A.; JEDRZEJUK, D. Premenstrual syndrome: from etiology to treatment. *Maturitas*, v. 55s, p. s47-s54, 2006.
- MONTEIRO, M.H.D.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSZWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernnia condensata*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.149-157, 2001.
- MOURA, T.F.A.L. *Sobre o Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, o baicuru da Farm. Bras. I.* 1984. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 146 f., 1984.
- MOVSUMOV, I.S.; GARAEV, E.A. Flavonoids from *Limonium meyeri*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.41, n.3, p. 348, 2005.
- MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, p.3-20, 2001.
- MURAKEOZY, E.O.; SMIRNOFF, N.; NAGY, Z. TUBA, Z. Seasonal accumulation pattern of pinitol and othes carbohydrates in *Limonium gmelini* subsp. *hungarica*. *Journal of Plant Physiology*, v. 159, p. 485-90, 2002.
- MURRAY, A.P.; RODRIGUEZ, S. FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, A.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift-fuer-Naturforschung-Section-C-Journal-of-Biosciences*, Tübingen, v. 59c, p. 477-80, 2004.
- NATARAJAN, K.S.;NARASIMHAN, M.; SHANMUGASUNDARAM, K.R.; SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. Antioxidant activity of a salt-spice-herbal mixture against free radical induction. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p.76-83, 2006.
- NENADIS, N.; LAZARIDOU, O.; TSIMIDOU, M.Z. Use of reference compound in antioxidant activity assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p. 5452-5460, 2007.
- NISBET, L.J.; MOORE, M. *Will natural products remain na important source of drug research for the future?* *Current Opinion in Biotechnology*, n.8, p.708-712, 1997.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO,T. New methods of analysing tannins. *Journal of Natural Products*, v.52, p.1-31, 1989.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO,T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, v.32, p.507-521,1993.
- OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, v.27, p.124-129, 1993.
- PAIVA, S.R.; MARQUES, S.S.; FIGUEIREDO, A.R.; KAPLAN, A.C. Plumbaginales: a pharmacological approach. *Floresta e Ambiente*, v. 10, n. 1, p. 98-105, 2003.
- PANOSSIAN, A.; WAGNER, H. Stimulating effects of adaptogens: an overview of clinical trials of adaptogens with particular reference to their efficacy on single dose administration. *Phytotherapy Research*, v.19, p. 819–838, 2005.
- PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G. Effect of adaptogens on the central nervous system. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica*, v.2, p. 109–131, 2005.

- PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G.; KAURB, P.; ASEA, A. Adaptogens exert a stress-protective effect by modulation of expression of molecular chaperones. *Phytomedicin*, v.16, p. 617–622, 2009.
- PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINI, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, n.1, p.17-22, 2003.
- PAPANICOLAOU, G.N. A New Procedure for Staining Vaginal Smears. *Science*, v. 95, n. 2469, p. 438-439, 1942.
- PINTO, L.G.Q.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M.; FURUYA, W.M. Ação do tanino na digestibilidade de dietas pela tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, v.22, n.3, p.677-681, 2000.
- PINTO, L.G.Q.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. Desempenho do Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado com dietas contendo diferentes teores de tanino. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.4, p. 1164-1171, 2001.
- PROFESSORA LUCIMAR. Sistema endócrino e controle das funções do corpo. Disponível em: <http://professoralucimar.blogspot.com/2008/08/sistema-endocrino-e-o-controle-das-funes.html>. Acesso em: 26 de outubro de 2009.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.3396-3402, 2000.
- RABELLO-GAY, MN. *Teste do Micronúcleo em Medula Óssea. In: Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. Ed. SBG, Ribeirão Preto, 246 p., 1991 apud VILAR, J.B.; FERREIRA, F.L.; FERRI, P.H.; GUILLO, L.A.; CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 1, p. 141-7, 2008.
- RAGONESE, A.E.; MILANO, V.A. Vegetales y sustancias tóxicas de La flora Argentina. In: *Enciclopedia Argentina de agricultura y Jardinería*. ACME, Buenos Aires, 1984 apud MURRAY, A.P.; RODRIGUEZ, S. FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, A.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift-fuer-Naturforschung-Section-C-Journal-of-Biosciences*, Tübingen, v. 59c, p. 477-80, 2004.
- RAVICHANDRAN, V.; SURESH, B.; SATHISHKUMAR, M.N.; ELANGO, K.; SRINIVASAN, R. Antifertility activity of hidroalcoholic extract of *Ailanthus excels* (Roxb.): an ethnomedicines used of tribals of Nilgiris region in Tamilnadu. *Journal of Ethnofarmacology*, v. 112, p. 189-91, 2007.
- REBECCA M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPLAN, R.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. V.83, p.101-104, 2002.
- REGE, N.N.; THATTE, U.M.; DAHANUKAR, S.A. Adaptogenic properties of six *Rasayana* herbs used in ayurvedic medicine. *Phytotherapy Research*, v.13, p. 275–291, 2005.
- REIS, M.S. dos; MARIOT, A; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap.24, p.615-56.

- RESENDE, F.O. *Trichilia catigua*: Avaliação farmacognóstica, fitoquímica e biológica *in vitro*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 167 f, Maringá, 2007.
- RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v. 31, p. 164-171, 2008.
- ROSITO, J.F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1975 apud CARDOSO, M.L.C. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, *Plumbaginaceae* (Baicuru): *Desenvolvimento galênico de extratos*. 1990. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.
- ROSS, S.A. Myricetin-3'methyl ether-7-glucoside from *Limonium sinuatum*. *Journal of Natural Products*, v. 47, n. 5, p. 862-4, 1984.
- RUBINOW, D. R.; SCHMIDT, P. Gonadal steroid regulation of mood: the lessons of premenstrual syndromes. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 27, p. 210-16, 2006.
- SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.1-7, 2005.
- SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C.R.P.; FIGUEIREDO, M.E.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; SANTOS, F.V.; SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I.M.S.; VILEGAS, W. VARANDA, E.A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermédia* A. Juss. Leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.112, p.319-326, 2007.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.24, p.615-656, 2007.
- SARMA, H.N.; MAHANTA, H.C. Effects of composite root extract on histological structures of Graffan follicle na endometrial epithelium in albino rat. *Contraception*, v. 61, p. 335-9, 2000.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v.30, p.3875-3883, 1991
- SCHENKEL, E.L.; ZANNIN, M.; MENTZ, L.A.; BORDIGNON, S.A.L.; IRGANG, B. Plantas tóxicas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre, Ed. da UFRGS; Florianópolis, Ed. da UFSC, p. 959-994, 2007.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, p.21-40, 2001.
- SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxicologie. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v.134, n.34, p.3167-3179, 1994.
- SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. *Fitoterapia Racional*: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 1.ed., Barueri: Ed. Manole, cap.1, 3, p.1-40, 125-126, 2002.

- SCHWANZ, M. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e avaliação preliminar de sua estabilidade. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 81 f, 2006.
- SILVA, C.H.T.P. Validação de metodologia analítica para matéria-prima e produto acabado contendo *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. 75f. Recife, 2007.
- SILVA, R.A.D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. 1ª Ed. São Paulo, 1926, p.499-500.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. 5.ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1996.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, p. 152-178, 1999 apud NENADIS, N.; LAZARIDOU, O.; TSIMIDOU, M.Z. Use of reference compound in antioxidant activity assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p. 5452-5460, 2007.
- SONAGLIO, D. ORTELA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre, Ed. da UFRGS; Florianópolis, Ed. da UFSC, p. 289-326, 2007.
- SOOKVANICHASILP, N.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; BOONLEANG, C. Estrogenic activity of the dichloromethane extract from *Pueraria mirifica*. *Fitoterapia*, v.79, p. 509–514, 2008.
- TANEE, F.S.F.; NJAMEN, D. ; MAGNE NDÉ, C.B. ; WANJI, J. ; ZIERAU, O. ; FOMUM, Z.T. ; VOLLMER, G. Estrogenic effect of the ethyl-acetate extract of the stem bark of *Erythrina lysistemon* Huntch (Fabaceae). *Phytomedicine*, v. 14, p.222-6, 2007.
- TANG, X.; GA, J.; CHEN, J.; XU, L.; TANG, Y.; DOU, H.; YU, W.; ZHAO, X. Expression of VDAC regulated by extracts of *Limonium sinense* Ktze root against CCl4-induced liver damage. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, v.8, p. 204-13, 2007.
- TESCH, B.J. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. *Dis. Mon.*, v. 48, p. 671-96, 2002.
- UNFER, T.C. A saga dos hormônios femininos. Redesenhado de NORMAN, A.W.; LITWACK, G. *Hormones*. New York: Academic Press, 1987. Disponível em: http://tais cristina unfer.blogspot.com/2008_11_01_archive.html. Acesso em 26 de outubro de 2009.
- VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. *Fisiologia Humana*. McGraw-Hill do Brasil, p.557-606, 1981.
- VASUDEVA, N.; SHARMA, S.K. Post-coital antifertility activity of *Achyranthes aspera* Linn. Root. *Journal of Ethnopharmacology*, v.107, p. 179–181, 2006.
- VERSCHAEVE, L., KESTENS, V., TAYLOR, J.L.S., ELGORASHI, E.E., MAES, A., VAN PUYVELDE, L., de KIMPE, N.; VAN STADEN, J. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicologia in Vitro*, v. 18, n. 1, p. 29-35, 2004.
- VERZA, S.G.; KREINECKER, M.T.; REIS, V.; HENRIQUES, A.T.; ORTEGA, G.G. Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

- VILAR, J.B.; FERREIRA, F.L.; FERRI, P.H.; GUILLO, L.A.; CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 1, p. 141-7, 2008.
- VOGEL, A.I. *Química analítica quantitativa*. Tradução: AFONSO, J.C.; AGUIAR, P.F.; ALEMCASTRO, R.B. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed. LTC, 462 p., 2002.
- VOIGT, R. *Pharmazeutische Technologie*. 7. ed. Ausgabe, Berlin: Ullstein Mosby, p.65-69, 1993.
- WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v.51, p.239-254, 1996.
- WANG, Y.C.; HUANG, T.L. High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. *Journal of Chromatography A*, v. 1094, p. 99-104, 2005a.
- WANG, Y.C.; HUANG, T.L. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plant. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 43, p. 295-300, 2005b.
- WHITING, P. SAVCHENKO, T.; SARKER, S.D.; REES, H.H.; DINAN, L. Phytoecdysteroids in genus *Limonium* (Plumbaginaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 26, p. 695-8, 1998.
- WHO - World Health Organization. *Guidelines for the appropriate use of herbal medicines*. Manila, 1998.
- WINTER, M.J., ELLIS, L.C.J., HUTCHINSON, T.H. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. *Mutation Research*, v.629, p. 89-99, 2007.
- WITAICENIS, A.; ROLDÃO, E.F.; SEITO, L.N.; ROCHA, N.P.; DI STASI, L.C. Pharmacological and toxicological studies of *Drimys angustifolia* Miers. (Winteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p.541-546, 2007.
- WOOD, G.A.; FATA, J.E.; WATSON, K.L.M.; KHOKHA, R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*, v.133, p. 1035-1044, 2007.
- YAMADA, C. S. B. Fitomedicamentos: a importância do controle de qualidade na produção. In: Lima, S.M.R.R. *Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica*. Ed. Atheneu. São Paulo, 2006.
- YE, G.; HUANG, C. Flavonoids of *Limonium aurium*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.2, p. 232-4, 2006.
- ZHANG, L.; ZOU, G. Flavanol of *Limonium bicolor*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.40, n.6, p. 602-3, 2004.
- ZHUSUPOVA, G.E. Amino-acid and mineral composition of substances from the aerial part and roots of *Limonium gmelinii*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.1, p. 123-4, 2006.
- ZHUSUPOVA, G.E.; ABIL'KAEVA, S.A. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots - III. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.2, p. 164-8, 2006a.
- ZHUSUPOVA, G.E.; ABIL'KAEVA, S.A. Flavones from *Limonium gmelinii* - II. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.1, p. 112-3, 2006b.
- ZHUSUPOVA, G.E.; ARTAMONOVA, N.A.; ABILOV, ZH.A.; ORAZBAEVA, ZH.K. Lipophilic pigments and fattyacid from the aerial parts of certain plant species of the genus *Limonium* – VII. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.5, p. 512-4, 2006a.
- ZHUSUPOVA, G.E.; ARTAMONOVA, N.A.; ABILOV, Z.A. Fatty-acid composition of roots of certain plant species of the genus *Limonium* – VIII. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.5, p. 602-3, 2006b.

ANEXOS



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Condução Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 7/14/2009

Parecer nº 030/2009

Pesquisador: João Carlos Palazzo de Mello

Setor: DFF

Título:

Protocolo nº 051/2008

Avaliação farmacognóstica, atividade antioxidante in vitro e farmacológica in vivo de Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) - Baicuru.

Entrada: 10/12/2008

Início: 1/4/2009

Término: 31/10/2009

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final: **Aguarda finalização do projeto**

ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.

Considerações e Parecer:

Conforme relatado originalmente os proponentes pretendem fazer um amplo estudo sobre as raízes de *Limonium brasiliense* (baicuru). Este amplo estudo envolve isolamento, caracterização e identificação de componentes da raiz (fitoquímica), assuntos que não envolvem este comitê. Mas, haverá também testes em animais (ratos e camundongos), daí o projeto estar sob exame deste comitê. É um projeto amplo, que pretende examinar de modo sistemático alegados efeitos da planta a fim de confirmá-los ou não.

O projeto ficou pendente por dois motivos:

- (a) A descrição dos grupos experimentais não ficou clara. Foi possível deduzir das tabelas preenchidas o número total de animais, mas é impossível saber quantos animais seriam utilizados em cada um dos 21 grupos.
(b) O segundo problema dizia respeito à recuperação cirúrgica das ratas ovariectomizadas. A operação seria feita, certamente, sob anestesia. Surgiram dúvidas, no entanto, sobre a necessidade de analgesia durante as primeiras horas ou dias da recuperação e sobre as possibilidades de acompanhamento veterinário durante a recuperação cirúrgica.

À questão (b) os proponentes responderam alterando o protocolo experimental no qual o ensaio com ratas ovariectomizadas foi substituído pela realização de testes similares em ratas imaturas. Desta forma a questão (b) torna-se irrelevante.

Quanto à descrição dos grupos experimentais foi apresentada uma nova tabela, agora com 18 grupos de 5 animais cada. Portanto, serão utilizados 80 animais.

Conclui-se que os proponentes responderam satisfatoriamente aos questionamentos que foram levantados pelo relator. Como em relação aos demais procedimentos não foram constatadas violações à ética experimental, somos de parecer que se aprove o referido protocolo, tomando como base a nova tabela de grupos experimentais apresentada na resposta aos questionamentos deste Comitê.

Dr. Pádua Antunes

Artigo 10 da Resolução nº 030/2008-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no item II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado.