



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**Departamento de Farmácia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA *IN VIVO* DO  
EXTRATO BRUTO DOS RIZOMAS DE *Limonium brasiliense***

**TÂNIA MARA ANTONELLI USHIROBIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello

MARINGÁ, 2015

**TÂNIA MARA ANTONELLI USHIROBIRA**

**Avaliação etnofarmacológica e toxicológica pré-clínica *in vivo* do extrato bruto dos rizomas de  
*Limonium brasiliense***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello

MARINGÁ, 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Ushirobira, Tânia Mara Antonelli  
U959a Avaliação etnofarmacológica e toxicológica pré-clínica *in vivo* do extrato bruto dos rizomas de *Limonium brasiliense* / Tânia Mara Antonelli Ushirobira. - Maringá, 2015.  
112 f. Il. Color.; tab.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.  
Co-orientadora: Profa Dra Eneri Vieira e Souza Leite Mello.

Tese (Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmacia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Atividade farmacológica - Toxicidade pré-clínica.  
2. Avaliação etnofarmacológica. 3. Atividade hormonal - Avaliação uterotrópica. 4. Morfoanatomia - *Limonium brasiliense*. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Mello, Eneri Vieira de Souza Leite. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmacia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

21.ed. 615.4

**TÂNIA MARA ANTONELLI USHIROBIRA**

**AVALIAÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA  
PRÉ-CLÍNICA *IN VIVO* DO EXTRATO BRUTO DOS RIZOMAS  
DE *Limonium brasiliense***

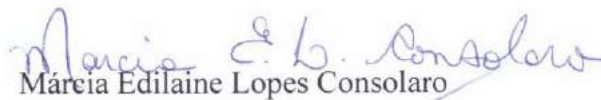
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 22 de setembro de 2015

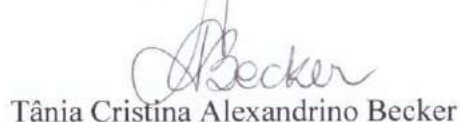
**BANCA EXAMINADORA**

  
João Carlos Palazzo de Mello

  
Isabel Cristina Cherici Camargo

  
Márcia Edilaine Lopes Consolaro

  
Paulo Roberto Dalsenter

  
Tânia Cristina Alexandrino Becker

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito e Laboratório de Toxicologia de Fitoterápicos (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello), no Laboratório de Histologia (Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello), no Laboratório de Patologia (Profa. Dra. Tânia Cristina Alexandrino Becker), no Laboratório de Metabolismo Hepático (Profa. Dra. Clairce Luzia Salgueiro-Pagadigorria), no Laboratório de Botânica (Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez) e empregando também equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), da Universidade Estadual de Maringá e do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina (Profa. Dra. Helena Kaminami Morimoto). Agradecimentos à CAPES e ao INCT\_if (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica) pelas bolsas de estudos, no desenvolvimento deste trabalho.

**Partes deste trabalho foram apresentadas em Congressos:**

Ethnopharmacological study of *Limonium brasiliense*. Antonelli-Ushirobira TM, Blainski A, Constantino, FV, Leite-Mello EVS, Mello JCP. In: 10th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Resumos..., Ribeirão Preto, Brasil, 04 a 09 de setembro de 2015.

Evaluation of the potential toxicity of crude extract of roots of *Limonium brasiliense*. Antonelli-Ushirobira TM, Blainski A, Krzyzaniak LM, Fernandes HG, Leite-Mello EVS, Mello JCP. In: 14th International Congress of Ethnopharmacology, Resumos..., Puerto Varas, Chile, 23 a 26 de setembro de 2014.

Acute toxicological evaluation and induces oxidative stress in livers of rats treated for 90 days with crude extract of roots of *Limonium brasiliense* (baicuru). Antonelli-Ushirobira, T.M., Blainski, A., Fernandes, H.G., Campos, L.B., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Leite-Mello, E.V.S., Mello, J.C.P. In: Brazilian Conference on Natural Products, Resumos..., Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 28 a 31 de outubro de 2013.

Análise físico-química de raízes de *Limonium brasiliense*. Antonelli-Ushirobira, T.M., Godoy, G., Mello, J.C.P. In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Resumos..., Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil, 18 a 21 de setembro de 2012.

## BIOGRAFIA



Tânia Mara Antonelli Ushirobira possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM (1993). Atuou como farmacêutica responsável técnica em farmácia de dispensação em Maringá, e posteriormente como farmacêutica proprietária de farmácia de dispensação também em Maringá até 1999. Atuou como farmacêutica pela empresa Bionatus Laboratório Farmacêutico de Fitoterápicos, realizando estudos toxicológicos pré-clínicos sob supervisão e orientação do Prof. Dr. Luis Carlos Marques. Em 2001 iniciou o mestrado em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Biologicamente Ativos pela UEM, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, concluindo-o em 2003. Atuou como docente da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus de Maringá, no período de 2004 a 2007, onde ministrou as disciplinas de Farmacologia para Enfermagem e Imunologia, Parasitologia e Microbiologia Básica para os cursos de Enfermagem e Nutrição. Em 2005 iniciou os trabalhos como docente na Instituição de Ensino Superior Ingá (UNINGÁ), onde ministrou as disciplinas de Farmacognosia, Estágio Supervisionado em Unidade Básica em Saúde e Estágio Supervisionado em Programa Saúde da Família, permanecendo até Julho de 2011. Desde 2011 realiza o curso de doutorado pela Universidade Estadual de Maringá

*“Sem o reino vegetal nada existiria sobre a terra. Um campo sem plantas não tem beleza, chama-se estéril, e para nada presta! Todos os bens de que se goza são devidos ao reino vegetal, o mais rico dos reinos, e criador do animal. Por esta consideração cumpre que o viajante traga sempre nas algibeiras os germens delas para quando achar terreno, e estação própria, semear em proveito do país onde se achar, e do seu próprio.”*

Antônio Moniz de Souza (1843)

## RESUMO

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M. 2015. **Avaliação etnofarmacológica e toxicológica pré-clínica *in vivo* do extrato bruto dos rizomas de *Limonium brasiliense***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá.

A terapia com plantas medicinais tem sido a escolha de muitas mulheres para o alívio das desordens menstruais. *Limonium brasiliense* está entre as plantas da biodiversidade brasileira utilizada popularmente para o tratamento da tensão pré-menstrual e como regulador dos períodos menstruais. Estudos apontam o uso popular de suas raízes, no entanto, as descrições botânicas recentes confirmam tratar-se de rizomas. Considerando a importância etnofarmacológica dessa espécie, o presente trabalho objetivou realizar estudo morfo-anatômico dos rizomas de *L. brasiliense*, bem como avaliar *in vivo* a segurança de uso e a atividade hormonal de seu extrato bruto (EB). Para o estudo morfo-anatômico cortes histológicos do tecido vegetal foram observados sob microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. O material vegetal foi caracterizado como sendo rizoma pela presença de entrenós nas brotações laterais nos tecidos jovens, presença de periderme multiestratificada, raios parenquimáticos, presença de aerênquima, feixes vasculares dispostos radialmente e grupos de esclereides dispersos pelo córtex e medula. A avaliação da toxicidade aguda foi realizada em camundongos machos e fêmeas Swiss, a qual determinou uma DL<sub>50</sub> de 4,8 g/kg. A avaliação da toxicidade crônica mostrou que o EB, mesmo em doses acima da considerada terapêutica, mantém-se seguro ao uso. A avaliação da mutagenicidade, pelo teste do micronúcleo, demonstrou potencial mutagênico em doses acima de 2,0 g/kg. A avaliação da atividade hormonal foi realizada em ratas Wistar imaturas. Os resultados mostram retardo na idade de abertura do canal vaginal nos animais tratados com EB nas doses de 12,5, 25, 50, 100 ou 200 mg/kg, quando comparados ao grupo CP. Quando analisados em conjunto: aumento do peso relativo do útero, dosagens de progesterona e estrogênio relacionadas com a fase do ciclo estral, predominância da fase diestro durante o tratamento, bem como a análise histológica dos órgãos útero, ovários e vagina, os resultados com o EB nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg indicam uma tendência da ação da progesterona por uma possível interferência na ação do estrogênio. Os resultados determinam ser rizoma o órgão da planta usado na medicina popular, e que o extrato bruto de *L. brasiliense* é seguro para uso na espécie animal e doses avaliadas, e apontam para um possível efeito sobre o sistema reprodutor feminino.

**Palavras-chave:** *Limonium brasiliense*, rizoma, toxicidade pré-clínica, atividade hormonal, avaliação uterotrópica.



## ABSTRACT

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M. 2015. **Ethnopharmacological assessment and toxicology pre-clinical *in vivo* of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense***. Ph.D. Thesis. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá.

The herbal therapy has been the choice of many women to relieve menstrual disorders. *Limonium brasiliense* is among the plants of Brazilian biodiversity popularly used for the treatment of premenstrual syndrome and as a regulator of menstrual periods. Studies suggest the popular use of its roots however recent botanical descriptions confirm its as rhizomes. Considering the approach ethnopharmacological of this species, this study aimed to perform morphological and anatomical study of rhizomes of *L. brasiliense*, and to evaluate *in vivo* the security of the use and hormonal activity of its crude extract (CE). For the morphological and anatomical study histological sections of plant tissue were observed under light microscopy and scanning electron microscopy. The plant material was characterized as rhizome with the presence of internodes from buds in young tissues, presence of multilayered periderm, parenchyma rays, presence of aerenchyma, vascular bundles arranged radially and sclereids groups scattered throughout the cortex and pith. The assessment of acute toxicity was conducted in male and female Swiss mice, which determined a LD<sub>50</sub> of 4.8 g/kg. The evaluation of the chronic toxicity showed that CE, even above the considered therapeutic doses, remains secured to use. The evaluation of mutagenicity with the micronucleus test showed mutagenic potential in doses above 2.0 g/kg. The evaluation of the hormonal activity was carried out in immature female rats. The results show delayed age to opening the vaginal canal in animals treated with CE at doses 12.5, 25, 50, 100 or 200 mg/kg when compared to PC group. The obtained results: the increase of the relative uterus weight, progesterone and estrogen dosage analyzed with the estrous cycle phase, predominance of the diestrus phase during treatment, as well as histological examination of the uterus, ovaries, and the vagina organs, the data with CE at doses 25, 50 or 100 mg/kg demonstrated a tendency of the progesterone action by a possible interference of estrogen action. The results determined as rhizome the organ of the plant used in folk medicine and demonstrate the crude extract of *L. brasiliense* is safe for using in the animal species and the tested doses, and indicated to an effect on the female reproductive system.

**Key-words:** *Limonium brasiliense*, rhizome, preclinical toxicity, hormonal activity, uterotrophic evaluation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	<i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze, partes aéreas.....	23
2	Exemplos de estruturas químicas encontradas em <i>L. brasiliense</i> . (A) ácido gálico; (B) ácido elágico; (C) catequina; (D) epicatequina; (E) galocatequina; (F) epigalocatequina.....	24
3	Estruturas químicas dos hormônios estrogênicos (A: 17 $\beta$ -estradiol; B: estriol; C: estrona) e progesterona (D).....	26
4	Sistema de retroalimentação negativa no aparelho reprodutor feminino.....	28
5	Ciclo menstrual feminino.....	29
6	Comparação entre os ciclos estral de ratas e ciclo menstrual das mulheres quanto às alterações hormonais.....	30
7	Fases do ciclo estral e a relação com a citologia vaginal. CN: Células nucleadas; CEC: células epiteliais cornificadas.....	30

### ***CAPÍTULO 1***

1	Amostras secas de <i>Limonium brasiliense</i> . Rizoma longo e calibroso (setas fechadas) (A) com ramos laterais mais delgados e envoltos pelas bases peciolares avermelhadas (setas abertas) (B); detalhes da periderme (C) e dos tecidos internos (D).....	42
2	Periderme do rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> . Aspecto geral das estrias superficiais (A) e das células da periderme (B e C); cortes transversais da periderme (D e E) e detalhe de suas células (F). A, B e D: sob MEV; C, E e F: sob MO.....	42
3	Rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> . Aspecto geral (A) e detalhes do aerênquima (B) em secções tangenciais sob MEV. co: córtex, fv: feixes vasculares, pe: periderme.....	43
4	Estratos mais superficiais do córtex do rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> . Detalhe em secção transversal (A) e radial (B), sob MO. As setas indicam pequenas projeções braciformes. sc: esclereíde.....	43
5	Grupo de esclereídes presentes no rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> , em secção radial (A e C) e detalhes da parede secundária em secção transversal (B) com múltiplas camadas (D). A e B sob MO, C e D MEV. sc: esclereídes.....	44

6	Aspecto geral dos feixes vasculares (em destaque) de diferentes amostras do rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> em secções transversais. Mais curtos, sob MEV (A) ou mais longos, sob MO (B). co: córtex, sc: esclereídes, fv: feixe vascular. As setas indicam feixes vasculares solitários no córtex e na medula.....	44
7	Detalhe de alguns feixes vasculares do rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> sob MO, indicando aspecto geral da organização em delta do floema (A), detalhe dos raios parenquimáticos (B) e células floemáticas C). c: câmbio vascular, ph: floema, pr: raio parenquimático, ve: elemento de vaso, xy: xilema.....	45
8	Xilema do rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> . Aspecto geral dos elementos de vaso desalinados (A); detalhes dos fibroesclereídes que acompanham os elementos de vaso (B), ambos em secções radiais; detalhe dos elementos do xilema em secção transversal (C e D) e dos elementos de vaso em secção tangencial (E e F). es: esclereídes, el: elemento de vaso, fes: fibroesclereíde, ra: raio parenquimático. A, B, C e F sob MO; D e E sob MEV.....	46
9	Tecidos internos (protoxilema e medula) do rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> sob MO (A) e detalhes dos feixes vasculares presentes na medula sob MEV (B). pt: medula, pxy: protoxilema, sc: esclereídes, vb: feixe vascular. As setas indicam pequenas projeções brachiformes no parênquima medular.....	46
10	Fragmentos observados no pó reidratado do rizoma de <i>Limonium brasiliense</i> sob MO. Células corticais (A), esclereídes (B) e elementos de vaso (C).....	47

## ***CAPÍTULO 2***

1	Avaliação do estado redox do fígado pela medida do conteúdo de GSH e pelo método de TBARS.....	57
A.1	Fotomicrografia do esfregaço de medula óssea (1000 ×) no ensaio de mutagenicidade do EB de <i>L. brasiliense</i> . Legenda: M – eritrócito policromático micronucleado; Barra de calibração - 40 µm.....	66

## ***CAPÍTULO 3***

1	Avaliação ponderal dos animais tratados por 28 dias com EB de <i>L. brasiliense</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Os valores estão expressos em média±dp.....	73
---	---	----

- 2 Fotomicrografia de cortes histológicos de 7 µm de útero (A e D), vagina (B e E) e ovário (C e F), coradas com HE, de ratas CN (A, B, C) e CP tratadas com 17β-estradiol (D, E, F). GL: glândulas, EP: epitélio endometrial, Qu: queratina, CL: corpo lúteo..... 76
- 3 Fotomicrografia de cortes histológicos de 7 µm de útero (A, D, G, J, M), vagina (B, E, H, K, N) e ovário (C, F, I, L, O), coradas com HE, de ratas tratadas com EB de *L. brasiliense* nas doses de 12,5 mg/kg (A, B, C), 25 mg/kg (D, E, F), 50 mg/kg (G, H, I), 100 mg/kg (J, K, L), 200 mg/kg (M, N, O). GL: glândulas, EP: epitélio endometrial, Qu: queratina, CL: corpo lúteo..... 77

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Fases do ciclo estral de ratas e citologia vaginal.....	31
----------	---	----

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
---------------	--	---------------

### ***CAPÍTULO 2***

A.1	Peso corporal final de ratos machos e fêmeas tratados por 90 dias com 50, 100, e 200 mg/kg de EB de <i>L. brasiliense</i> .....	64
A.2	Peso relativo dos órgãos dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento crônico com EB de <i>L. brasiliense</i> .....	65
A.3	Teste do campo aberto (mov/5 min) de ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento crônico com EB de <i>L. brasiliense</i> .....	65

### ***CAPÍTULO 3***

1	Consumo de ração dos animais tratados por 28 dias com EB de <i>L. brasiliense</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média (g)±dp [cv (%)].....	73
2	Idade e peso no dia de abertura do canal vaginal dos animais tratados por 28 dias com EB de <i>L. brasiliense</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média±dp [cv (%)].....	74
3	Peso relativo do útero dos animais em fase estro e fase diestro tratados por 28 dias com EB de <i>L. brasiliense</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média±dp.....	74
4	Dosagens hormonais dos animais tratados por 28 dias com EB de <i>L. brasiliense</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média±dp.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
cm	centímetro
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
cv	Coefficiente de Variação
DL <sub>50</sub>	Dose Letal capaz de matar 50% dos animais
dp	Desvio padrão
EB	Extrato Bruto
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GGT	Gama Glutamil Transferase
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GSH	Glutathiona reduzida
HE	Coloração Hematoxilina Eosina
LH	Hormônio Luteinizante
mov	Movimentos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
nm	Nanômetros
PT	Polifenóis Totais
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TPM	Tensão Pré-Menstrual
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
v/v	Volume/volume
p/v	Peso/volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	20
2.1.1 Família Plumbaginaceae.....	20
2.1.2 Gênero <i>Limonium</i> .....	20
2.1.3 <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze.....	23
2.2 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA ENDÓCRINO .....	25
2.2.1 Aspectos fisiológicos do aparelho reprodutor feminino.....	26
2.2.1.2 <i>Hormônios Sexuais Femininos</i> .....	26
2.2.1.2 <i>Ciclo menstrual e ovulação</i> .....	27
2.3 ASPECTOS HORMONAIS EM RATAS.....	29
2.4 PLANTAS MEDICINAIS COM PROPRIEDADES HORMONAIS.....	31
2.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> .....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>CAPÍTULO 1 – Avaliação morfo-anatômica do material vegetal</b> .....	37
Resumo.....	38
1. Introdução.....	39
2. Material e Métodos.....	40
2.1 Material botânico.....	40
2.2 Análise morfoanatômica.....	40
3. Resultados e Discussão.....	41
4. Conclusão.....	47
Referências.....	48
<b>CAPÍTULO 2 – Avaliação <i>in vivo</i> da toxicidade pré-clínica</b> .....	50
Resumo.....	51
1. Introdução.....	52
2. Material e Métodos.....	53
2.1 Matéria-prima vegetal.....	53
2.2 Preparação do extrato.....	53
2.3 Animais.....	53

2.4 Toxicidade aguda.....	54
2.5 Toxicidade crônica.....	54
2.5.1 Avaliação do estado redox do fígado.....	55
2.5.2 Análises laboratoriais.....	55
2.5.3 Avaliação histopatológica.....	55
2.6 Mutagenicidade.....	55
2.7 Análise estatística.....	56
3. Resultados.....	56
3.1 Toxicidade aguda.....	56
3.2 Toxicidade crônica.....	56
3.2.1 Avaliação ponderal e comportamental.....	56
3.2.2 Avaliação do estado redox do fígado.....	56
3.2.3 Análises laboratoriais.....	57
3.2.4 Avaliação histopatológica.....	57
3.3 Mutagenicidade.....	58
4. Discussão.....	58
5. Conclusão.....	60
Referências.....	61
<b>CAPÍTULO 3 – Avaliação <i>in vivo</i> da atividade hormonal.....</b>	<b>67</b>
Resumo.....	68
1. Introdução.....	69
2. Materiais e Métodos.....	70
2.1 Material botânico.....	70
2.2 Preparo do extrato.....	70
2.3 Animais.....	71
2.4 Avaliação Hormonal.....	71
2.4.1 Metodologia.....	71
2.4.2 Avaliação da abertura do canal vaginal e citologia da secreção vaginal.....	71
2.4.3 Avaliação uterotrópica.....	72
2.4.4 Análise histológica.....	72
2.4.5 Dosagem hormonal.....	72
2.4.6 Análise estatística.....	72
3. Resultados.....	72
4. Discussão.....	78
5. Conclusão.....	80



Referências.....	80
<b>4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>84</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

O uso de plantas medicinais ainda é uma atividade em evidência no Brasil, e remonta desde o período de colonização. Desde então, os conhecimentos advindos dos povos nativos tem sido passados de forma contínua até os dias atuais. O interesse em produtos naturais, como fonte de prováveis produtos farmacêuticos, tem sido cada vez mais constante. Isto demonstra a importância em desenvolver estudos que possam promover o uso racional e a conservação dessas espécies (SEIDL, 2002; VEIGA et al., 2005; SANTOS, 2008; BOLSON et al., 2015; FAGG et al., 2015).

A Organização Mundial da Saúde reconhece a importância do conhecimento tradicional no uso das plantas, como fonte de pesquisa para novos fármacos no combate a diversas doenças (OMS, 2002). O uso dos conhecimentos tradicionais encurta o percurso no desenvolvimento da pesquisa científica, uma vez que, o pesquisador, inicia os trabalhos com provável indicação de atividade biológica. Esta estratégia visa, também, diminuir as chances de toxicidade com os uso de plantas medicinais (FUNARI & FERRO, 2005).

O conceito do estudo etnofarmacológico tem seguido, por vezes, o mesmo princípio indiano da farmacologia reversa. Por esse princípio, o caminho seguido em uma pesquisa científica seria da clínica para o laboratório ao invés do laboratório para a clínica. Por essa metodologia, busca-se aumentar as chances de segurança de uso de futuros medicamentos (PATHWARDAN & MASHELKAR, 2009).

No entanto, para que uma pesquisa científica envolvendo planta medicinal seja completa, deve ter como base inicial a comprovação da identidade botânica dessa espécie, composição química definida com isolamento, identificação e análise dos compostos isolados e a determinação de suas propriedades farmacológicas e tóxicas (DAVIENNE, 2004). O estudo desenvolvido a partir de extratos de plantas colocam alguns desafios ao pesquisador, uma vez que são misturas complexas de substâncias ativas, parcialmente ativas e inativas, e a atividade, muitas vezes, não ocorre sobre um único órgão-alvo (KLEIN et al., 2009; HEINRICH, 2010).

No Brasil, a Portaria nº 116/96 estabelece que todos os medicamentos devem apresentar estudos toxicológicos para fins de registro e comercialização (BRASIL, 1996). Para os fitomedicamentos a legislação estabeleceu normas complementares dispostas na RDC nº 26 de 13/05/2014 (BRASIL, 2014). Os estudos toxicológicos pré-clínicos são padronizados pelo “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (BRASIL, 2013), que prevê a realização de estudos para toxicidade aguda e crônica, bem como testes de carcinogenicidade e mutagenicidade da droga vegetal em estudo.

Nos países em desenvolvimento, a prática do uso da medicina tradicional representa a principal fonte de medicamentos para cerca de 80% da população. Entre os fitomedicamentos encontram-se as plantas com atividade sobre o sistema reprodutor feminino. As ações dessas plantas tem sido pautadas na existência de compostos químicos denominados fitoesteroides, os quais

apresentam atividade semelhante aos hormônios fisiológicos humano (OMS, 2002; LEMBÈ et al., 2012; VAN DIE, 2013; VAN ANDEL et al., 2014).

Diversos distúrbios do sistema reprodutor feminino tem encontrado auxílio de tratamento em terapias alternativas, como no uso de plantas medicinais, muitas vezes em associação à terapia tradicional (VAN DIE, 2013; VAN ANDEL et al., 2014). As desordens menstruais, que incluem amenorreia, polimenorreia, oligomenorreia, hipomenorreia, menorragia, dismenorreia e tensão pré-menstrual (TPM), encontram-se entre os distúrbios que mais acometem as mulheres. Os sintomas e desconfortos, que são considerados de moderados a severos, gerados pelo quadro menstrual, afetam diretamente a qualidade de vida de muitas mulheres em idade reprodutiva (YONKERS et al., 2008; YASIN et al., 2012; SADEGHI & MAHMOOD, 2014; BATHIA et al., 2015).

Na literatura há diversos relatos de plantas que são usadas em distúrbios menstruais, entre elas aparecem constantemente descritas a *Vitex agnus-castus* L., óleo de prímula (*Oenothera biennis* L.), *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., *Glycine max* (L.) Merril, (TESCH, 2002; GIRMAN et al., 2003; DENNEHY, 2006; YOUNKERS et al., 2008; SILVA et al., 2013). No entanto, os estudos que se encontram disponíveis nem sempre comprovam ou explicam suas ações farmacológicas ou, ainda, não exclui ações toxicológicas (VAN ANDEL et al., 2014; BATHIA et al., 2015).

Entre as plantas que apresentam relato de uso como regulador hormonal, encontra-se o *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, pertencente à biodiversidade brasileira e nativa da região sul do Brasil, sendo encontrado também no Uruguai e Argentina. Seus rizomas são empregados popularmente em diversas desordens menstruais (MOURA, 1985, MURRAY et al., 2004; ZAPPI, 2015).

Alguns estudos envolvendo a atividade biológica dessa espécie vegetal tem sido descritos, entre as atividades estudadas encontram-se: atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral e antioxidante (ROSITO, 1975; MURRAY et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2011; FARAL-TELLO et al., 2012), e somente um estudo envolvendo possível efeito tóxico (MOURA et al., 1985).

Embora não se encontre na literatura estudos relacionando sua efetividade e segurança de uso, que são exigidos aos fitomedicamentos, essa espécie vegetal apresenta grande potencial e perspectiva para o desenvolvimento de um possível medicamento fitoterápico

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2.1 ASPECTOS GERAIS

### 2.1.1 Família Plumbaginaceae

A família Plumbaginaceae é um dos maiores grupos dentro das Angiospermas. Apresenta duas subfamílias: Plumbagineae e Staticeae nas quais se encontram distribuídos 24 gêneros que incluem cerca de 2340 espécies, sendo 635 nomes de espécies aceitos e 630 consideradas sinónimas e, as outras espécies listadas consideradas não resolvidas ou, ainda, não aceitas (THE PLANT LIST, 2015). As espécies pertencentes a essa família estão distribuídas em regiões semiáridas, litorâneas e salgadas, principalmente das Ásia Central e Mediterrâneo (HARBORNE, 1967).

A família é composta de ervas perenes e arbustos, sendo suas plantas caracterizadas por folhas simples e alternas, sem estípulas. As flores são vistosas, de coloração azul, bissexuais e simetria radial (JOLY, 2005; BRITANNICA, 2015). Apresenta plantas com interesse econômico como ornamentais em jardins (BRITANNICA, 2015).

Plumbaginaceae não é uma família endêmica no Brasil, encontrando domínio fitogeográfico na Amazônia, caatinga e Mata Atlântica. No Brasil são encontrados dois gêneros, *Plumbago* na região Nordeste e Leste, e *Limonium* na região Sul. No entanto, somente duas espécies são representativas desses gêneros, *Plumbago scandens* e *Limonium brasiliense*, respectivamente (JOLY, 2005; FLORA DO BRASIL, 2015).

### 2.1.2 Gênero *Limonium*

O gênero *Limonium*, sinónima *Statice*, pertencente à família Plumbaginaceae, compreende cerca de 770 espécies, sendo que destas 163 espécies são aceitas e 113 são sinónimos (KUNITAKE et al., 1995; THEPLANTLIST, 2015). É considerado o mais rico da família Plumbaginaceae, podendo ser encontrado nas regiões litorâneas da América do Norte, Sul da África e da América do Sul, além da Austrália (MOBOT, 2015). As espécies de *Limonium* vivem geralmente como plantas halófitas, inclusive em regiões alpinas (CHANT, 1993).

As plantas do gênero *Limonium* têm se destacado no cenário mundial de produção e comercialização de flores de corte, fresca e/ou desidratada para utilização em floriculturas no preparo de arranjos (KUNITAKE et al., 1995; LOPES, et al., 2003).

A composição química deste gênero tem sido reportada como muito rica, apresentando entre seus componentes aminoácidos, flavonoides, taninos, polissacarídeos, alcaloides, entre outros (ZHENFA & LIANG, 1991; LIN; CHOU, 2000 apud EREN & OZATA, 2014).

A partir do extrato hidroetanólico das raízes de *L. gmelinii* foram isolados e identificados os flavan-3-óis, galocatequina e epigalocatequina, e duas protoantocianidinas diméricas (2*R*,3*R*,4*R*-epigalocatequina-(4β→8)-2*R*,3*R*-epigalocatequina-3-*O*-galato e 2*R*,3*R*,4*R*-epigalocatequina-(4β→8)-2*R*,3*R*,3,5,7,3',4',6'-hexahidroxiflavana) (ZHUSUPOVA; ABIL'KAEVA, 2006a e 2006b).

Kurul'kina et al. (2004) isolaram e identificaram em *L. gmelinii* e *L. popovii* ácido gálico, quercetina, miricetina, miricetrina, epigallocatequina-3-*O*-galato, 3-*O*- $\beta$ -D-(6"-galoila)-galactopiranosídeo, miricetina 3-*O*- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, 3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 3-*O*- $\beta$ -D-(6"-galoila)-glucopiranosídeo, 3,5,7,3',4',6'-hexahidroxiflavona, miricetina 3-*O*- $\alpha$ -L-(2'-galoila)-arabopiranosídeo, sendo as duas últimas inéditas na literatura.

Diversos estudos envolvendo espécies do gênero *Limonium*, entre elas *L. meyeri* Kuntze, *L. aureum* (L.) Hill, *L. sinuatum* e *L. bicolor* (Bunge) Kuntze demonstram a presença de flavonoides, tendo sido isolados e identificados miricetina e seus derivados, quercetina e seus derivados, naringenina, homoeriodictiol, eriodictiol e canferol (ROSS, 1984; ZHANG & ZOU, 2004; MOVSUMOV & GARAEV, 2005; YE & HUANG, 2006).

Diferentes espécies de *Limonium* da região do Cazaquistão (*L. gmelinii* (Willd.) Kuntze, *L. otolepis* (Schrenk) Kuntze, *L. popovii* Kubansk., *L. myrianthum* (Schrenk) Kuntze, *L. leptophyllum* Kuntze, *L. suffruticosum* (L.) Kuntze) foram estudadas quanto à composição de ácidos graxos. Verificou-se que a composição qualitativa de ácidos graxos saturados e insaturados era a mesma porém, houve diferenças quantitativas entre as espécies. Ainda, verificou-se que a concentração de ácido graxo insaturado foi de duas a quatro vezes maiores que de saturado nas partes aéreas (ZHUSUPOVA et al., 2006a; ZHUSUPOVA et al., 2006b).

Estudo com *Limoniastrum guyonianum* Durieu ex Boiss., espécie do Norte da África utilizada para tratar desinterias, demonstrou a presença de polifenóis, flavonoides e taninos condensados em suas folhas e galhos (TRABELSI et al., 2012). Mais recentemente foi isolado dessa espécie dois monômeros (*N-E*-cafeoil tiramina e *N-E*-feruloil tiramina) e um dímero (limoniastramida) de amida fenólica ácida, sendo esse dímero isolado pela primeira vez neste trabalho. Nesse mesmo estudo essas substâncias foram testadas *in vitro* quanto às propriedades antioxidantes, os quais apresentaram promissores resultados, com efetiva atividade antioxidante e capacidade de eliminação de radicais livres (TRABELSI et al., 2014).

Em um estudo envolvendo 17 espécies de *Limonium*, foi encontrado, pela primeira vez nessa família, fitoecdisteroides 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) (WHITING et al., 1998).

Estudos relacionados à atividade biológica do gênero *Limonium* tem sido reportados por muitos autores. O extrato etanólico das raízes secas de *L. sinense* (Girard) Kuntze demonstrou ser efetivo contra o vírus 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). Em outro estudo, diferentes extratos (etanólico, metanólico, hexânico e diclorometano) de *L. densiflorum* Kuntze foram testados quanto à atividade antiviral frente ao HSV-1 e vírus influenza (H1N1), apresentando melhor resultado com o extrato etanólico contra vírus HSV-1 o qual exibiu potente ação inibitória. Esses extratos foram analisados por cromatografia

em camada delgada (CCD), demonstrando a presença de flavonoides e saponinas como a classe de produtos naturais majoritários (MEDINI et al., 2014a).

O extrato das raízes de *L. sinense* apresentou efeito hepatoprotetor em modelo de injúria hepática, tendo sido observado o bloqueio significativo do aumento da atividade sérica da aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase (TANG et al., 2007). A atividade hepatoprotetora foi confirmada com novos ensaios, a qual foi relacionada a um mecanismo de proteção mitocondrial (TANG et al., 2008).

Tang et al. (2012) testaram também a atividade antitumoral e imunomodulatória de polissacarídeos de raízes de *L. sinense*, e verificaram a inibição do crescimento de tumores em ratos e efeito sinérgico significativo da atividade antitumor quando combinado com 5-fluorouracil (5-FU).

Em um estudo *in vitro* envolvendo tanto extrato etanólico das partes subterrâneas de *L. sinense*, como a substância isolada ácido gálico, foi observado que ambos apresentaram potente atividade em suprimir a infecção dos hepatócitos pelo vírus da hepatite C, bloqueando a entrada do vírus na célula (HSU et al., 2015).

Estudos relacionando a atividade antioxidante de várias espécies do gênero *Limonium* têm sido descritos. Aniya et al. (2002) testaram o extrato aquoso de *L. wrightii* (Hance) Kuntze o qual demonstrou forte ação antirradicais livres *in vitro* pelos métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e ânion superóxido e moderada ação para radicais 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 antirradicais livres *in vivo*. Essa ação foi relacionada principalmente com a presença de ácido gálico no extrato.

A atividade antioxidante de 10 extratos de *L. delicatulum* Kuntze em diferentes estágios fisiológicos (5 extratos para o estágio de floração e 5 extratos para o estágio vegetativo) foi avaliada frente ao radical DPPH. Os extratos mais polares, acetona, metanol e etanol, do estágio de floração, apresentaram maior eficiência como antioxidante quando comparados aos extratos aquosos e hexânicos. Estes extratos também apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra 7 patógenos humanos Gram positivos e Gram negativos. Foram identificados nesses extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) compostos fenólicos, sendo os principais o ácido *p*-cumárico e ácido clorogênico os quais foram associados ao melhor desempenho desses extratos (MEDINI et al., 2014b).

Medini et al. (2015) testaram extratos hexânico, diclorometano, metanólico e etanólico de *L. densiflorum* para a atividade antioxidante pelo método de capacidade de absorvância do radical oxigênio (método ORAC), atividade de eliminação do ânion superóxido e atividade em células. A avaliação da atividade anti-inflamatória ocorreu por quantificação do óxido nítrico (NO). Em ambos os testes o extrato metanólico exibiu melhores resultados. No entanto, o extrato diclorometano apresentou a maior atividade anticancerígena contra carcinoma pulmonar humano e adenocarcinoma de cólon.



Em um screening realizado com plantas halófitas da região central dos Balcãs (Sérvia), a atividade antioxidante foi determinada pela técnica do DPPH e *Statice gmelinii* Willd. apresentou um alto potencial antioxidante (STANKOVIC et al., 2015).

A pesquisa de compostos com atividade antioxidante em *L. aureum* (L.) Hill foi realizada utilizando-se um método otimizado, on line-HPLC com DPPH, para detecção da capacidade de eliminação de radicais livres. Foram identificados sete flavonoides incluindo miricetina-3-*O*-β-D-(6"-*O*-galoil)-glucopiranosideo, miricetina-3-*O*-glucosideo, miricitrina, eriodictiol-7-*O*-glucosideo, miricetina, eridictiol e homoeridictiol (GENG et al., 2015).

### 2.1.3 *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze

Espécie inicialmente designada por *Statice brasiliense* Boiss. (DE CANDOLLE, 1848), e posteriormente designada *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (KUNTZE, 1891) (Figura 1), apresenta duas sinónimas – *L. brasiliense* var. *brasiliense* e *L. brasiliense* var. *patagonicum* (Speg.) Burkart (THE PLANT LIST, 2015).



Figura 1: *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, partes aéreas.  
Foto: Claudimar Sidnei Fior. ([http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=7334](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7334))

É conhecida popularmente como baicuru, guaicuru ou guaicurá, sendo uma erva perene, comum na zona litorânea de restinga. Encontra-se distribuída pela Argentina, Uruguai e Sul do Brasil – Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul – preferencialmente em terrenos baixos e sujeitos à maré (solo salino) e, às margens do Rio da Prata (MOURA, 1985, MURRAY et al., 2004). Segundo Zappi (2015), pode ser encontrado do Sul do Brasil até o Rio de Janeiro.

A primeira descrição botânica de *L. brasiliense* encontra-se na Flora brasiliensis (MARTIUS, 1840-1906). A descrição morfoanatômica minuciosa foi realizada por Dias da Silva e encontra-se somente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira como sendo raízes (SILVA, 1926). Recentemente, Antonelli-Ushirobira et al. (2015) determinaram ser rizomas e não raízes a parte da planta utilizada pela população como medicinal, dissipando, assim, as dúvidas geradas pela literatura, e contribuindo dessa forma, com a avaliação farmacognóstica de *L. brasiliense*.

Quimicamente a planta foi descrita inicialmente por Rosito (1975), o qual analisou um extrato hidroetanólico (95%) e verificou a presença de taninos hidrolisáveis, condensados, ácido 4-metóxi-gálico,  $\beta$ -sitosterol e saponinas triterpênicas. Posteriormente foi descrito 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). Cardoso (1990) verificou a presença de ácido gálico, epicatequina e taninos condensados por CCD. De um extrato metanólico das raízes de *L. brasiliense* foram isolados miricetina-3-*O*- $\alpha$ -raminopiranosídeo, ácido gálico, epigalocatequina, galocatequina, e epigalocatequina-3-*O*-galato (MURRAY et al., 2004). Também foi verificado a presença de ácido-4-metóxi-gálico, benzoato de benzila, sacarose, flavona, isoflavona, flavonona e cumarina (Figura 2) (MOURA et al., 1985; MURRAY et al., 2004).

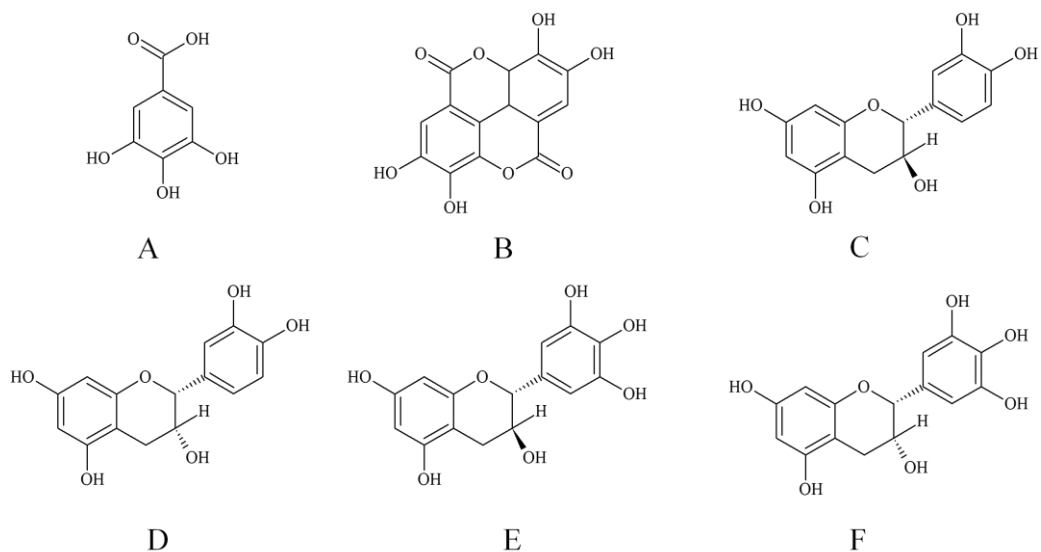


Figura 2: Exemplos de estruturas químicas encontradas em *L. brasiliense*. (A) ácido gálico; (B) ácido elágico; (C) catequina; (D) epicatequina; (E) galocatequina; (F) epigalocatequina.

O conteúdo de polifenóis totais (PT) do extrato acetona:água (7:3 v/v) das raízes de *L. brasiliense* foi determinado por método espectrofotométrico UV/VIS. O método desenvolvido e validado por Blainski et al. (2013) determinou 23,5% de PT no extrato, expressos em porcentagem de pirogalol.

Na medicina popular *L. brasiliense* tem sido utilizada como antisséptico nas infecções geniturinárias, adstringente, depurativo e, principalmente, no tratamento de cólicas menstruais e como regulador dos períodos menstruais (MOURA et al., 1985). Há relatos de uso também no tratamento de hemorragia, reumatismo e, acredita-se ainda ter propriedades cardioprotetoras (MURRAY et al., 2004). Em um estudo etnobotânico realizado por Fenner et al. (2006) *L. brasiliense* foi uma das espécies citadas pela população e usada no tratamento de úlceras e leucorreias, estando seu uso relacionado a uma potencial atividade antifúngica.

Alguns estudos de avaliação biológica de extratos de *L. brasiliense* tem sido relatados. Rosito (1975) verificou a atividade do extrato hidroetanólico (95%) das raízes de baicuru frente *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. A atividade bacteriostática e anti-inflamatória também foi demonstrada em extratos alcoólicos (extrato fluido) por Jahns e Crescente (1976). Faral-Tello et al. (2012) demonstraram interessante atividade antiviral de extrato etanólico (70%) de *L. brasiliense* frente ao vírus herpes simples tipo I (HSV-1), o qual inibiu a replicação *in vitro*, com EC<sub>50</sub> de 185 µg/ml.

Moura et al. (1985) demonstraram ação anti-inflamatória do extrato etanólico (100%), por via i.p, na dose de 250 mg/kg no teste do edema de pata induzido por carragenina. No teste de toxicidade excessiva, o extrato, na dose de 2,0 g/kg, por meio da administração intravenosa (veia caudal), apresentou sinais expressivos de toxicidade.

Rodriguez et al. (2011) testaram *in vitro* a atividade anti-inflamatória de extrato semipurificado de *L. brasiliense* e do composto isolado miricetina-3-*O*-ramnosídeo frente à superprodução de óxido nítrico pela linhagem de células RAW 264.7 estimuladas por LPS, sendo que o composto isolado apresentou o melhor resultado.

A atividade antioxidante de frações semipurificadas das raízes foi avaliada pela determinação do IC<sub>50</sub> através da habilidade de quelar radicais livres usando o método de DPPH. O extrato metanólico das raízes de *L. brasiliense* e o composto isolado miricetina-3-*O*- $\alpha$ -raminopiranosídeo apresentaram IC<sub>50</sub> de 20,0 µM e 40,0 µM respectivamente, quando comparados ao composto quercetina com IC<sub>50</sub> de 20,7 µM (MURRAY et al., 2004).

## 2.2 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA ENDÓCRINO

As funções do organismo humano são reguladas pelo sistema nervoso e pelo sistema hormonal ou endócrino. Entre as funções reguladas pelo sistema endócrino encontra-se a reprodução (GUYTON & HALL, 2006).

Os hormônios são substâncias químicas sintetizadas por uma célula ou por um grupo de células para exercer um controle fisiológico sobre outras células do organismo (GUYTON & HALL, 2006). Quando o hormônio é sintetizado por uma célula muito próxima da célula-alvo, ele chega ao destino através de difusão pelo espaço intersticial, o que caracteriza o efeito *parácrino*. Quando esse

efeito ocorre na própria célula sintetizadora do hormônio tem-se o efeito *autócrino*, e ao efeito exercido em células distantes da célula sintetizadora, onde o hormônio é levado pela corrente sanguínea, tem-se o efeito *endócrino* (MACHADO, 2012).

Os hormônios produzidos no organismo humano são denominados hormônios locais quando exercem efeitos locais específicos, ou hormônios gerais quando secretados por glândulas endócrinas específicas e exercem ação em diversas partes do organismo induzindo muitas reações diferentes (GUYTON & HALL, 2006).

## 2.2.1 Aspectos fisiológicos do aparelho reprodutor feminino

### 2.2.1.1 Hormônios Sexuais Femininos

O sistema hormonal feminino constitui-se de hormônios liberados pelo hipotálamo, hipófise anterior e ovários (GUYTON & HALL, 2006). Os principais hormônios envolvidos no sistema endócrino sexual feminino são o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrogênio e progesterona. Esses hormônios são divididos, quimicamente, em dois grupos, os hormônios esteroides, em que a estrutura química é baseada no núcleo esteroide e são derivados do colesterol (estrogênio e progesterona); e os hormônios proteicos ou peptídicos, em que os hormônios são proteínas, peptídeos ou derivados destes (GnRH, FSH e LH). Hormônio estrogênio é um termo usado para designar um grupo de hormônios, sendo que os três principais são os hormônios 17 $\beta$ -estradiol, estrona e estriol (Figura 3) (FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2012; LEHNINGER et al., 2006).

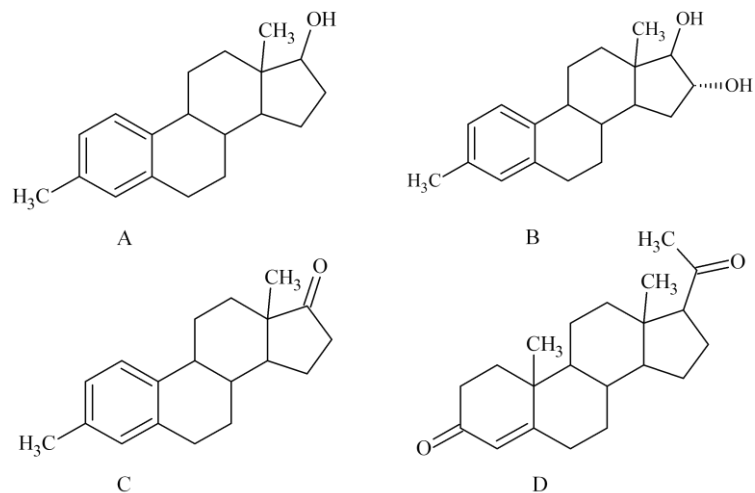


Figura 3: Estruturas químicas dos hormônios estrogênicos (A: 17 $\beta$ -estradiol; B: estriol; C: estrona) e progesterona (D).

Os hormônios proteicos são formados pelo retículo endoplasmático granular das células glandulares a partir da proteína inicial denominada de pré-pró-hormônio. Esta é clivada em uma

proteína menor, o pró-hormônio, que é transportado para o aparelho de Golgi onde sofre nova clivagem originando o hormônio ativo. Após é armazenado no citoplasma da célula endócrina até que um sinal específico (nervoso ou hormonal) provoque sua secreção. Os hormônios esteroides formados a partir de moléculas do colesterol e vários intermediários são sintetizados por enzimas presentes nas células glandulares após estímulo apropriado. A conversão nos hormônios finais ocorre em poucos minutos e é seguida pela imediata secreção (VANDER et al., 1981; GUYTON & HALL, 2006).

Os hormônios liberados na corrente sanguínea são transportados por proteínas transportadoras, principalmente albumina, e exercem seus efeitos após a ligação com receptores-alvo nas células teciduais. Esses receptores localizam-se na superfície da membrana celular, no citoplasma ou no núcleo. A combinação desses hormônios com seus receptores desencadeiam alterações na célula, como alteração da permeabilidade da membrana, ativação de enzimas intracelulares ou ativação de genes pela ligação a receptores intracelulares (GUYTON & HALL, 2006).

A secreção dos hormônios pela glândula endócrina é controlada por um mecanismo de *feedback* negativo, isto é, a estimulação da liberação de um determinado hormônio provoca a inibição do hormônio estimulador. Nesse mecanismo a própria glândula tem capacidade de monitorar a intensidade do efeito biológico causado pelos seus hormônios. Assim, o fator importante a ser controlado não é a velocidade de secreção do hormônio, mas o grau de atividade do órgão-alvo. (MACHADO, 2012; GUYTON & HALL, 2006).

#### 2.2.1.2 Ciclo menstrual e ovulação

Uma das características mais significativas do processo de amadurecimento sexual da mulher é o aparecimento da primeira menstruação, ou menarca, que aparece entre 9 e 17 anos de idade. Nessa fase, denominada puberdade, ocorrem modificações orgânicas e comportamentais decorrentes de alterações de secreção de hormônios. A puberdade ocorre devido a modificações do funcionamento no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, ocorrendo aumento de produção de gonadotrofinas (LH e FSH) levando ao início dos ciclos sexuais femininos (ciclo menstrual) (GUYTON & HALL, 2006; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2012).

O ciclo menstrual caracteriza-se por alterações mensais na velocidade da secreção dos hormônios femininos e tem duração média de 28 dias. Pode ser dividido em duas fases: proliferativa (ação predominante do estrogênio) e secretora ou progestacional (ação do estrogênio e progesterona). Entre essas fases ocorre a ovulação (GUYTON & HALL, 2006; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2012).

Durante cada mês do ciclo sexual feminino os níveis de FSH e LH aumentam e diminuem, constituindo variações cíclicas os quais provocam alterações ovarianas. Resumidamente esse período pode ser descrito da seguinte maneira: após a secreção do hormônio GnRH pelo hipotálamo, o mesmo atinge a circulação porta-hipofisária estimulando a secreção de FSH e LH pela adeno-hipófise. Esses

hormônios promovem *feedback* negativo sobre o GnRH, atingem a corrente sanguínea e chegam aos ovários estimulando essas células-alvo. O FSH promove o crescimento dos folículos ovarianos primordiais, os quais passam a liberar estrogênio. O LH é necessário para a fase final do crescimento folicular e para a liberação do ovócito pelo folículo ovariano maduro (ovulação). Atua também na transformação das células da granulosa em células luteínicas (formação do corpo lúteo) que secretam progesterona. Os hormônios, estrogênio e progesterona, exercem acentuado efeito de *feedback* negativo sobre a adeno-hipófise, essa ação leva ao declínio dos níveis séricos de FSH e LH (Figura 4). (NUNES, 2012; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2012; GUYTON & HALL, 2006).

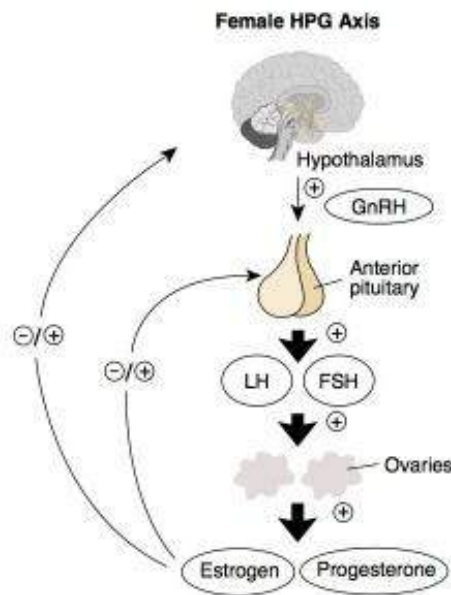


Figura 4: Sistema de retroalimentação negativa no aparelho reprodutor feminino.

Fonte: UNSW Embryology ([https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGD\\_Lecture\\_-\\_Endocrine\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGD_Lecture_-_Endocrine_Development))

A diminuição dos hormônios FSH e LH marca o fim da fase folicular ou proliferativa, ocorre então a ovulação, que consiste no rompimento do folículo maduro e liberação do óvulo. Inicia-se, portanto, a fase progestacional, onde ocorre aumento dos níveis de progesterona secretada pelo corpo lúteo formado. A diminuição da secreção pela adeno-hipófise dos hormônios FSH e LH, fazem com que os níveis séricos desses hormônios caiam para níveis muito baixos, ocasionando, portanto, a degeneração completa do corpo lúteo. Em consequência, os níveis dos hormônios ovarianos, estrogênio e progesterona, diminuem acentuadamente, o que resulta na menstruação pelo útero. Essa diminuição dos hormônios ovarianos cessará o efeito inibitório da liberação de GnRH pelo hipotálamo, sendo o mesmo novamente liberado iniciando novo ciclo ovariano (Figura 5) (NUNES, 2012; FRANCI & ANSELMO-FRANCI, 2012; GUYTON & HALL, 2006).

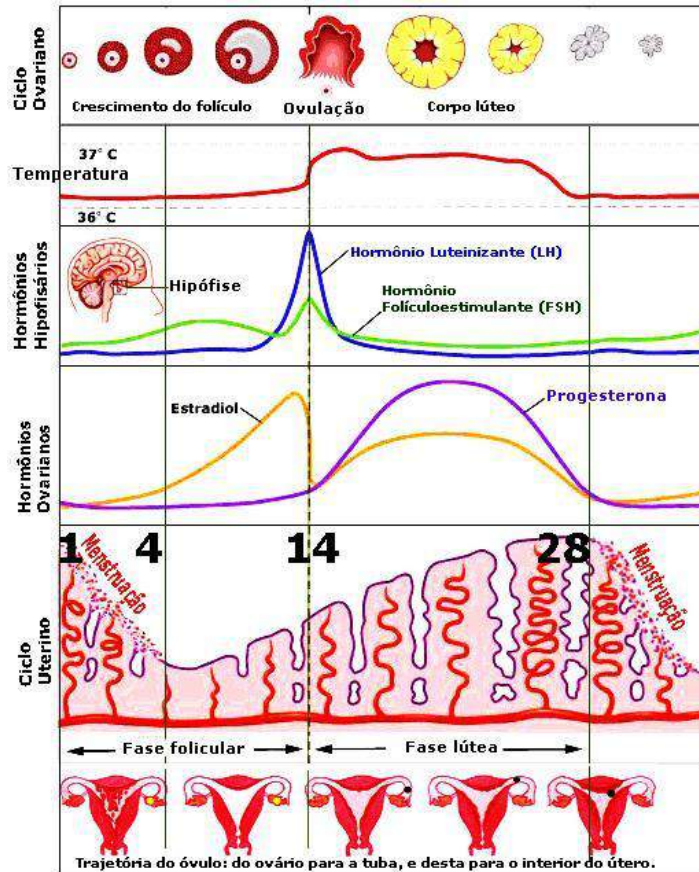


Figura 5: Ciclo menstrual feminino (Fonte: [http://www.drcarlos.med.br/cicl\\_mentr\\_1gif.gif](http://www.drcarlos.med.br/cicl_mentr_1gif.gif))

### 2.3 ASPECTOS HORMONAIS EM RATAS

O uso de roedores em pesquisas científicas deve-se, principalmente, ao fato de ser um animal pequeno, muito prolífero (8 a 15 filhotes), ter período de gestação curto (20 a 23 dias), ser de fácil domesticação e manutenção e a alta possibilidade de procriação com expectativa de vida de 2,5 anos (GUIMARÃES; MÁZARO, 2004; CHORILLI et al., 2007).

As ratas, assim como na fisiologia humana, apresentam integração de sistemas neuroendócrino, nervoso central e ovários, constituindo o eixo hipotálamo-hipófise-ovário. As ratas tornam-se aptas à reprodução rapidamente ( $50 \pm 10$  dias de idade), sendo que os efeitos hormonais já estão presentes em torno de 30 dias de vida, quando pode ser observada a abertura do canal vaginal. O ciclo hormonal (ciclo estral) regular inicia-se após cerca de uma semana (GUIMARÃES & MÁZARO, 2004; CHORILLI et al., 2007).

O ciclo estral típico é do tipo poliéstrico com ovulação espontânea, e é caracterizado por duas fases fundamentais: a fase proliferativa ou folicular, e a fase progestacional ou secretora. Na rata não há uma fase progestacional típica (a menos que haja fecundação ou coito) (FRANCI & ANSELMO-



FRANCI, 2012; MARCONDES et al., 2002). As variações hormonais das ratas comparadas às variações que ocorrem em mulheres estão demonstradas na figura 6.

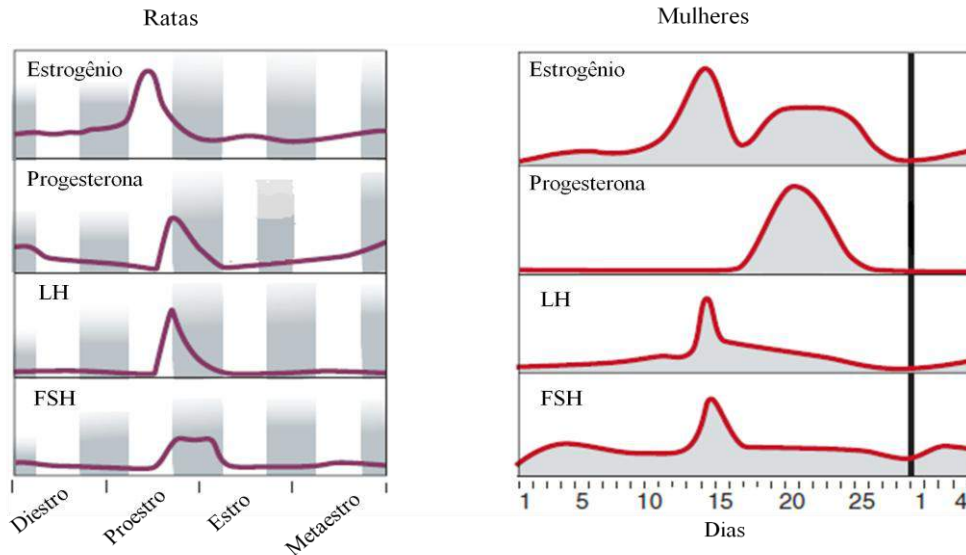


Figura 6: Comparação entre os ciclos estral de ratas e ciclo menstrual das mulheres quanto às alterações hormonais. Fonte: Staley & Scharfman, 2005 (Adaptado)

O ciclo estral dura de 4 a 5 dias, divididos em fase proestro, estro (com atuação do estrogênio), metaestro e diestro (com atuação da progesterona). O proestro começa com a fase folicular do ovário onde ocorre predomínio de células epiteliais nucleadas e arredondadas (em esfregaço vaginal), que culmina no estro, onde o predomínio é de células queratinizadas anucleadas. As fases metaestro e diestro caracterizam a fase luteínica do ovário. Na fase diestro observa-se predomínio de leucócitos e na fase metaestro encontra-se os três tipos celulares em iguais proporções (Figura 7) (MARCONDES et al., 2002; CHORILLI et al., 2007).

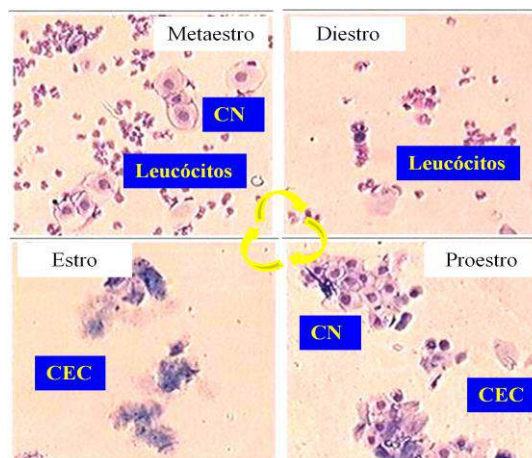


Figura 7: Fases do ciclo estral e a relação com a citologia vaginal. CN: Células nucleadas; CEC: células epiteliais cornificadas. Fonte: Adaptado de (<http://137.222.110.150/calnet/Ovarian/page2.htm>)



Os estudos iniciais de Long e Evans (1922 apud MARCONDES et al., 2002) revelaram a relação entre os hormônios ovarianos e a citologia vaginal. Esta relação entre as fases do ciclo estral e a citologia vaginal encontra-se descrita no Quadro 1.

Quadro 1: Fases do ciclo estral de ratas e citologia vaginal (LONG & EVANS, 1922 apud MARCONDES et al., 2002).

<b>Metaestro</b>	<b>Diestro</b>	<b>Proestro</b>	<b>Estro</b>
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 PROGESTEROGÊNICO		EFEITO ESTROGÊNICO	

#### 2.4 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADES HORMONAIIS

A terapia com plantas medicinais tem sido a escolha de muitas mulheres para o alívio dos sintomas da tensão pré-menstrual (TPM), cólicas menstruais, mastalgia cíclica, infertilidade, sintomas da menopausa (ondas de calor, insônia, sudorese, mudanças de humor, depressão, irritabilidade) e saúde óssea (GIRMAN et al., 2003; TESCH, 2003; DENNEHY, 2006).

Embora essas condições patológicas envolvam diferentes fisiologias hormonais, acarretando diversos sintomas e disfunções, os mecanismos biológicos propostos relacionam a atuação dos hormônios gonadais, seus metabólitos e a interação com neurotransmissores e o sistema neurohormonal (HALBREICH, 2003; VAN DIE et al., 2013). Essas variações hormonais são responsáveis pelas alterações de humor, característico nas mulheres em idade reprodutiva no período de TPM e em mulheres na menopausa (RUBINOW & SCHMIDT, 2006).

Diversas plantas apresentam em sua composição fitoestrógenos, que são substâncias químicas que imitam ou modulam a ação do estrogênio endógeno por terem grande afinidade pelos receptores de estrogênio  $\beta$  (RE- $\beta$ ). Os fitoestrógenos estão agrupados em quatro categorias principais: isoflavonas, cumestanos, lignanas e flavonoides. Dessa forma essas plantas tornam-se alternativas de tratamento para as disfunções hormonais em mulheres (DENNEHY, 2006; MICHEL et al., 2013; SILVA et al., 2013).

*Glycine max* (L.) Merrill (soja) tem sido frequentemente consumida como alternativa à terapia hormonal por mulheres no climatério. Apresenta como principais componentes genisteína e daidzeína

(isoflavonas), os quais se ligam e ativam RE- $\beta$  (DENNEHY, 2006; HAJIRAHIMKHAN et al., 2013; MICHEL et al., 2013; SILVA et al., 2013).

*Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. é considerada a mais popular entre as plantas utilizadas como auxiliar para o alívio dos sintomas da menopausa, TPM e dismenorrea, no entanto, os estudos confirmam a indicação somente para menopausa. Espécie rica em glicosídeos triterpênicos, seu mecanismo de ação não está ainda completamente elucidado, no entanto sabe-se que apresenta efeitos tanto estrogênicos quanto antiestrogênicos (TESCH, 2002; GIRMAN et al., 2003; DENNEHY, 2006; HAJIRAHIMKHAN et al., 2013).

O óleo de primula (*Oenothera biennis* L.), rico em ácido linoleico e ácido gama-linolênico, dois ácidos graxos importantes na formação de uma das prostaglandinas anti-inflamatórias (PGE1), tem sido usado por muitas pacientes como auxiliar nos sintomas dolorosos da TPM. Sua efetividade, no entanto, ainda não está devidamente comprovada (GIRMAN et al., 2003; CAMPAGNE & CAMPAGNE, 2007; YOUNKERS et al., 2008).

*Vitex agnus-castus* L. tem sido usada desde a antiguidade para disfunções reprodutivas femininas. Atualmente seu uso tem sido aprovado para o tratamento de irregularidades menstruais e TPM, no entanto popularmente ainda é utilizada para dismenorreas, primária e secundária, e mastalgia cíclica. O mecanismo de ação descrito até o momento indica inibição da secreção de prolactina. Apresenta como constituintes ativos dois glicosídeos iridoides (agnusídeo – 0,6% e aucubina – 0,3%), óleo essencial e flavonoides (TESCH, 2002; GIRMAN et al., 2003; DENNEHY, 2006; YOUNKERS et al., 2008).

Diversas outras espécies vegetais tem sido avaliadas experimentalmente por seus efeitos hormonais, tais como: *Achillea millefolium* L. (DALSENTER et al., 2004), *Eriosema laurentii* De Wild (ATEBA et al., 2013), *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvat. (MALAIVIJITNOND et al., 2004; CHERDSHEWASART et al., 2008; SOOKVANICHSILP et al., 2008), *Tephrosia candida* (Roxb.) DC. (HEGAZY et al., 2011), *Ailanthus excelsa* Roxb. (RAVICHANDRAN et al., 2007), *Punica granatum* L. (SATPATHY et al., 2013), *Michelia champaca* L. (TAPRIAL et al., 2013), *Tribulus terrestris* L. (MARTINO-ANDRADE et al., 2010), *Tropaeolum majus* L. (LOURENÇO et al., 2012), *Lepidium meyenii* Walp. (UCHIYAMA et al., 2014).

## 2.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Os estudos toxicológicos objetivam prever os possíveis efeitos adversos quando da exposição humana a determinadas substâncias químicas ou medicamentos (MEYER, 2003).

O uso tradicional de plantas com finalidades terapêuticas, mesmo que por centenas de anos, não estabelece sua segurança. As formas mais sutis e crônicas de toxicidade, como a mutagenicidade, carcinogenicidade e hepatotoxicidade podem se fazer presentes desde gerações anteriores sem, contudo, terem sido detectadas (WHO, 2000; NEWALL et al., 2002).

O uso indevido ou desconhecido das plantas é preocupante do ponto de vista das intoxicações, sendo considerado um problema de saúde pública (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Segundo dados do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas), no ano de 2012 ocorreram 99035 casos de intoxicações, dos quais 1185 casos foram de pessoas intoxicadas por plantas, tendo ocorrido um óbito. Desses casos 26 foram por uso indevido das plantas e 15 casos por auto medicação (SINITOX, 2012).

Os casos de toxicidade com plantas, muitas vezes consideradas medicinais, representam um risco potencial à saúde humana, reforçando a importância dos testes toxicológicos com as espécies vegetais da flora nativa (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Com o propósito de identificar os potenciais perigos no uso das plantas, os modelos animais são predominantemente utilizados para os estudos toxicológicos (MEYER, 2003; CAZARIN et al., 2004).

Assim, alguns estudos *in vivo* tem sido reportados com espécies nativas, os quais podem ser exemplificados a seguir.

A avaliação da toxicidade aguda da espécie *Aspidosperma subincanum* Mart. Ex A.DC., conhecida como guatambu, prevalente em Goiás e muito utilizada pela população, foi realizada em camundongos com a administração de um extrato metanólico por gavagem. O extrato, mesmo em doses altas (5000 mg/kg), não demonstrou toxicidade aos animais, tendo sido caracterizado praticamente como atóxico (GOLONI et al., 2005).

Sachetti et al. (2009) demonstraram através de testes *in vivo* que o óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) não apresenta toxicidade aguda e efeitos neurotóxicos nas doses testadas, o que confere, segundo os autores, uma relativa margem de segurança no uso do óleo-resina como agente terapêutico.

A toxicidade *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, conhecida como barbatimão, tem sido objeto de estudos de vários autores. Rebecca et al. (2002 e 2003) demonstraram a toxicidade aguda e subaguda do extrato bruto das cascas de barbatimão, bem como a hepatotoxicidade do extrato bruto em altas doses. Costa et al. (2010 e 2013) demonstraram que um extrato semipurificado das cascas de barbatimão não apresentou efeito genotóxico no teste de micronúcleos (medula óssea), e também não houve toxicidade aguda e crônica desse extrato semipurificado nas doses testadas.

Antonelli-Ushirobira et al. (2010) avaliaram *in vivo* a toxicidade aguda e subcrônica de um extrato semipurificado das sementes de *Paullinia cupana* (Mart.) Ducke, popularmente conhecida como guaraná. Esse estudo demonstrou não haver toxicidade do extrato semipurificado em tratamentos prolongados (90 dias) com a menor dose avaliada (30 mg/kg), embora essa dose seja excessivamente maior que a dose previamente determinada como efetiva por Otobone et al. (2005), que foi de 4,0 mg/kg do extrato semipurificado.

A toxicidade aguda e subcrônica do extrato seco da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) foi avaliada em camundongos e coelhos. Em ambas as espécies os resultados demonstraram ser o

extrato seco bem tolerado, uma vez que não promoveu efeitos tóxicos em nenhum dos tratamentos (ANDRADE et al., 2012).

Em um estudo pré-clínico utilizando coelhos, Lonni (2012) avaliou a segurança de uso de formulações contendo extratos de *Trichilia catigua* A. Juss (catuaba), nas concentrações de 0,5 e 1%, para uso cosmético. Avaliou também a permeação cutânea das formulações por espectroscopia fotoacústica. Os resultados obtidos demonstraram que as formulações testadas são seguras para uso e também apresentam permeação tanto em nível de epiderme quanto de derme.

A utilização de modelos animais para as análises toxicológicas de medicamentos tem sido justificada pelas semelhanças estruturais, tanto celular quanto bioquímica, entre os seres humanos e os animais (MEYER, 2003). No entanto, o uso de animais de laboratório tem causado preocupação ética devido ao grande número de animais utilizados e do sofrimento causado em alguns tipos de experimentos, levando os grupos de pesquisa a procurar métodos alternativos que sejam cientificamente comprovados para a substituição dos animais de laboratório (PINTO et al., 2000; MEYER, 2003; CAZARIN et al., 2004).

Entre as várias técnicas alternativas que tem sido propostas e validadas encontram-se técnicas *in vitro* (ex. cultura de células e tecidos) e *in silico* (ex. modelagem computacional) (STOKES, 2002).

Os métodos *in vitro* são importantes na avaliação da segurança de medicamentos, pois são sensíveis, reprodutíveis, fáceis de estabelecer e gerenciar e apresentam menores custos, podendo ser uma alternativa na redução do número de animais utilizados nos testes *in vivo*, podendo também auxiliar na extinção do uso de animais em alguns dos ensaios propostos (KÖETE, 1993; PINTO et al., 2000; STOKES, 2002; CONCEA, 2015).

No entanto, Butterweck e Nahrstedt (2012), reportam que o uso de bioensaios *in vitro* para avaliar extratos botânicos, torna-se um desafio por serem os mesmos misturas complexas de substâncias, que na maioria das vezes, não apresenta boa solubilidade na água. Isso obriga o uso de outro solvente, o qual pode interferir no teste. Outro inconveniente, segundo os mesmos autores, são as nanopartículas maiores ou micropartículas presentes no extrato que, sedimentam rapidamente e entram em contato com as células, desenvolvendo reações de estresse oxidativo ou efeitos tóxicos indesejáveis. Dessa forma, os autores alertam para a necessidade de normas claras para os testes *in vitro* de extratos vegetais.

Esse inconveniente, no entanto, não descarta a necessidade de adequação dos ensaios toxicológicos ao programa internacionalmente reconhecido denominado de 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*), que tem por objetivo diminuir o uso de animais de experimentação nas pesquisas, diminuir o sofrimento e a substituição dos testes *in vivo* (FESTING, 1994; FLECKNEL, 1994; BALLS, 1994).

### **3. OBJETIVOS**

---

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetivou realizar estudo etnofarmacológico com o extrato bruto dos rizomas secos de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Baicuru) por meio de ensaios para avaliação da atividade hormonal e avaliação da toxicidade aguda e crônica *in vivo*.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a descrição morfo-anatômica dos rizomas de *L. brasiliense* por meio de cortes histológicos do tecido vegetal com observação sob Microscopia óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Realizar análises histoquímicas no material vegetal.

Comprovar o uso popular com avaliação da atividade hormonal *in vivo* do extrato bruto de *L. brasiliense*.

Avaliar abertura do canal vaginal e citologia da secreção vaginal em ratas.

Realizar avaliação uterotrópica e análise histológica do ovário, útero e vagina.

Quantificar os hormônios estrogênio e progesterona pela técnica de quimioluminescência.

Realizar estudos de toxicidade pré-clínica aguda e crônica *in vivo* do extrato bruto de *L. brasiliense*.

Realizar avaliação ponderal e comportamental dos animais.

Avaliação da mutagenicidade e do estado redox do fígado.

Análise histológica dos órgãos, urinálise e análise bioquímica do sangue.

**Dessa forma a tese foi organizada em três capítulos na forma de artigos, a saber:**

- Capítulo 1: “Avaliação morfo-anatômica do material vegetal”
- Capítulo 2: “Avaliação *in vivo* da toxicidade pré-clínica”
- Capítulo 3: “Avaliação *in vivo* da atividade hormonal”

## **CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DO MATERIAL VEGETAL**

---

Este capítulo consiste na descrição morfo-anatômica do material vegetal utilizado como medicinal como contribuição à sua análise farmacognóstica. Este artigo foi aceito para publicação na *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25 (2015) 320-327. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.07.010. (ANEXO 1).

## **Estudo morfoanatômico do rizoma de *Limonium brasiliense***

Tânia Antonelli-Ushirobira<sup>a</sup>, Andressa Blainski<sup>a</sup>, Naiara Gancedo<sup>b</sup>, Fernanda Gaburo<sup>b</sup>, Kátia Cardoso<sup>c</sup>, Eneri Leite-Mello<sup>d</sup>, João de Mello<sup>a\*</sup>, Maria Milaneze-Gutierrez<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>b</sup>Estudante de Farmácia, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>c</sup>Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>e</sup>Departamento de Biologia e Museu Dinâmico Interdisciplinar, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

\*Autor para correspondência: Tel: +55-44-3011-4816

E-mail: [mello@uem.br](mailto:mello@uem.br)

Avenida Colombo, 5790,

BR-87020-900 – Maringá – Paraná – Brasil

### **RESUMO**

*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, é uma erva popularmente conhecida por guaicuru, guaicurá e baicuru que habita regiões alagadas por águas salinas; podendo ser encontrada na região litorânea do Sul do Brasil, incluindo também o Rio de Janeiro, além de estar presente no Uruguai e Argentina. Embora muito utilizada na medicina popular no estado do Rio Grande do Sul para o tratamento de infecções do trato geniturinário e para normalizar períodos menstruais, poucos estudos envolvendo essa espécie vegetal são encontrados. A existência de dúvidas quanto à parte da planta usada para fins medicinais, evidente em trabalhos de diferentes autores, determinou a necessidade do estudo morfoanatômico dessa espécie, a fim de dissipar a dúvida entre rizoma ou raiz. A análise das características morfoanatômicas foi realizada sob microscopia óptica (MO) e eletrônica de varredura (MEV). O material botânico analisado caracteriza-se como caule do tipo rizoma, com entrenós não evidentes nas porções mais velhas, ao contrário das mais jovens. As análises microscópicas evidenciaram a presença de periderme multiestratificada; córtex, raios parenquimáticos e medula, formados por tecido colenquimatoso com abundância de espaços intercelulares nas porções mais externas do córtex, mas responsável pela rigidez do órgão, e cujas paredes encontram-se impregnadas com compostos fenólicos. Os feixes vasculares são colaterais de formato elíptico-alongados, com escassos elementos de condução e de esclerênquima. Grupos de esclereídes foram



evidenciados dispersos pelo córtex e pela medula. Assim, as características morfoanatômicas descritas determinam ser rizoma o material botânico utilizado pela população nativa.

**Palavras-chave:** Baicuru, Guaicuru, *Limonium brasiliense*, Compostos fenólicos, Rizoma.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Limonium* Mill. inclui cerca de 350 espécies de ervas, sendo considerado o mais rico da família Plumbaginaceae, e estando melhor representado nas regiões mediterrâneas da Europa e Ásia, podendo também ser encontrado nas regiões litorâneas da América no norte, Sul da África e da América do Sul, além da Austrália (Mobot, 2015). Em geral, as espécies de *Limonium* vivem como plantas halófitas, inclusive em regiões alpinas (Chant, 1993).

*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze é uma erva popularmente conhecida por guaicuru, guaicurá ou baicuru (Dias da Silva, 1920), que no estado do Rio Grande do Sul é cultivada e comercializada por pequenos agricultores em regiões estuarinas da bacia do rio da Prata. Segundo Simões et al. (1998) é uma espécie comum na zona litorânea de restinga no sul do Brasil, do Paraná ao Rio Grande do Sul, no Uruguai e na Argentina, mas de acordo com Zappi (2015), *L. brasiliense* pode ser encontrado da região Sul do Brasil até o Rio de Janeiro. Em outros países, como a China, caules e raízes de diversas espécies de *Limonium* também são usadas na medicina popular, por vezes similares morfoanatomicamente, o que dificulta a identificação com o uso de métodos tradicionais (Ding et al., 2012).

Embora descrita na 1ª edição da Farmacopeia Brasileira (1929), não mais se encontra na Farmacopeia atual. Popularmente é utilizada no tratamento de inflamações uterinas, ovarianas, corrimento e dismenorrea (Moura et al., 1985), sendo útil, para normalizar períodos menstruais (Lifchitz, 1981), além de ação antimicrobiana (Rosito, 1975). Segundo Murray et al. (2004) cinco compostos antioxidantes foram isolados de extratos das raízes de *L. brasiliense*. Sua composição química inclui a presença de taninos hidrolisáveis, ácido 4-*O*-metilgálico, sitosterol, saponinas triterpênicas de estruturas ainda não elucidadas e taninos condensados (Rosito, 1975).

A primeira descrição botânica de *L. brasiliense* encontra-se na Flora brasiliensis, (Martius, 1840-1906). A descrição anatômica minuciosa foi realizada por Dias da Silva (1920), bem como suas características organolépticas enquanto frescos, com odor ativo e desagradável, que desaparece pela dissecação, e com sabor picante e adstringente. Martius (1840-1906) o denominou *Statice brasiliensis* Boiss., uma erva portadora de rizoma mais ou menos escamoso. Entretanto, em 1920, Dias da Silva ao descrever a espécie, referiu-se inicialmente à presença de rizoma cilíndrico-irregular, curto, grosso, mais ou menos coberto por escamas, mas ao descrever anatomicamente o órgão utilizado medicinalmente, relata que são raízes de 1 a 2 cm de diâmetro, cilíndrico-fusiforme e tortuosas, possivelmente tendo ocorrido um erro conceitual, pois em suas descrições morfológicas, torna-se claro que se trata de um rizoma. Por sua vez, Reitz (1965) caracteriza a espécie como portadora de raízes

grossas com escamas vermelhas, e esse engano, de nominar o rizoma de *L. brasiliense* como raízes, também é encontrado nos estudos de Corrêa (1952), Coimbra (1958), Cruz (1982), Moura et al. (1985), Murray et al. (2004), Fenner et al. (2006) e Blainski et al. (2013).

Perante a possibilidade da exploração da espécie e o engodo entre o órgão a ser utilizado, este estudo teve por objetivo a descrição morfoanatômica da parte da planta usada pela população, contribuindo à análise farmacognóstica de *L. brasiliense*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material botânico**

Para o estudo morfoanatômico foram utilizadas amostras do rizoma de *L. brasiliense* coletadas em maio de 2010 e janeiro de 2013 na Ilha dos Marinheiros (31°59'33"S, 52°10'43"W), pertencente à cidade de Rio Grande, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A coleta do material vegetal está registrada no IBAMA-SISBIO sob o número 11995-3, de 2 de novembro de 2010, com código de autenticação 46367613, sob a responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) registrado sob n. 010252/2015-0. Amostras em fase reprodutiva encontram-se resguardadas no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM) sob números de registro 21151 e 27725, referentes às coletas de 2010 e 2013, respectivamente. O material botânico foi identificado pela Prof. Dra. Lilian Auler Mentz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

### **2.2 Análise morfoanatômica**

A caracterização macroscópica do rizoma de *L. brasiliense* foi realizada com base nos apontamentos de Oliveira et al. (1998). Para a análise anatômica, sob microscópio óptico (MO) e eletrônico de varredura (MEV) foram empregados segmentos do rizoma com diferentes diâmetros (de 0,77 até 1,53 cm). Os segmentos foram reidratados por fervura em água glicerinada (10%) por 15-30 min (2 vezes) e conservados em etanol 70% (Johansen, 1940), com trocas semanais, para eliminação do excesso do pigmento vermelho liberado por seus tecidos. As secções para microscopia óptica foram realizadas à mão livre, nos planos padrões para anatomia vegetal, com auxílio de lâminas de barbear. Após, descoradas com hipoclorito de sódio (30%), submetidas a dupla coloração com azul de Astra (1%) e safranina (1%) e montadas como lâminas semi-permanentes com gelatina glicerinada, segundo indicações de Kraus e Arduin (1997). Mesmo procedimento foi empregado para a preparação de lâminas com o pó reidratado do rizoma de *L. brasiliense*.

Para a análise sob microscopia eletrônica de varredura (MEV), segmentos do rizoma foram seccionados em porções de 0,3 mm nos diversos planos anatômicos, sempre com auxílio de lâminas de barbear, e a seguir fixados em glutaraldeído 1%, em tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7,2 (Kraus and Arduin, 1997). Após 72 h em glutaraldeído, as amostras foram submetidas à série

etanólica crescente (30, 50, 70, 90, 95% v/v) durante 15 min cada, finalizando em etanol absoluto durante 10 min por duas vezes para desidratação, e em seguida secas em ponto crítico com CO<sub>2</sub> (Ponto Crítico da Balzers CPD 30) (Horridge and Tamm, 1969). Em seguida, as amostras devidamente posicionadas nos planos anatômicos, foram fixadas sobre suportes metálicos com fita dupla face de carbono, e submetidas à metalização superficial, com ouro, em aparelho Shimadzu IC-50.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX50, enquanto que as análises ultraestruturais foram realizadas em MEV modelo Shimadzu SS 550 (a 15 kV).

Para os testes histoquímicos foram preparadas secções transversais, conforme acima, das amostras hidratadas em água glicerinada, as quais foram expostas ao lugol para detecção da presença de grãos de amido; cloreto de zinco iodado, detecção de lignina; sudan IV glicerinado, detecção de substâncias lipofílicas; cloreto férrico, detecção de polifenóis e cloral hidratado 60% com ácido sulfúrico 25% para a detecção de cristais de oxalato de cálcio (Berlyn and Miksche, 1976; Johansen, 1940; Kraus and Arduin, 1997; Farmacopeia Brasileira, 2010).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rizoma de *L. brasiliense* mostra-se longo e calibroso, cujas porções mais velhas apresentam-se com diâmetro entre 0,77 a 1,53 cm (Figuras 1A a 1C), com aspecto radial muito evidente quando fraturado (Figura 1D). Nas brotações laterais observam-se mais claramente os entrenós com, em média 0,38 cm de comprimento, parcialmente recobertos com fragmentos da base peciolar, de coloração avermelhados quando seco (Figura 1B), à semelhança da descrição de Martius (1840-1906) e Dias da Silva (1920). A presença de rizoma e tubérculos como órgãos de reserva e reprodução assexuada é comum em espécies herbáceas de locais alagados, conforme concluíram Braendle e Crawford (1999).

A superfície do rizoma de *L. brasiliense* apresenta-se com coloração marrom-escura provida de estrias delicadas dispostas longitudinalmente, e fissuras delicadas ou profundas, dispostas transversalmente (Figuras 1C e 2A). A periderme apresenta-se enegrecida e os tecidos internos de coloração castanha-avermelhada (Figura 1D), à semelhança das descrições realizadas por Dias da Silva (1920). A fratura transversal do rizoma, sob vista desarmada (Figura 1D), é do tipo granulosa na porção cortical e na medular, enquanto que a porção mediana, preenchida pelos feixes vasculares, mostra-se com aspecto raiado. Pela junção das características relacionadas com a coloração, e pelo fato de estar parcialmente enterrado no solo arenoso litorâneo, o rizoma dessa espécie pode ser confundido com uma raiz pivotante tuberosa, conforme verificado nas descrições de Reitz (1965). Não foram observadas diferenças estruturais em ambos os lotes de amostras analisadas.

As análises sob MO e MEV revelaram que a periderme do rizoma de *L. brasiliense* apresenta-se espessa, formada por dezenas de estratos celulares (Figura 2) que reagem positivamente ao Sudan IV. Em vista frontal tais células são poliédricas, relativamente alongadas (Figuras 2B e 2C), enquanto

que em secção transversal apresentam-se quadrangulares até tabulares, de paredes pouco espessadas (Figuras 2D a 2F), tornando-se colapsadas junto à superfície do órgão, mas sempre com conteúdo castanho-avermelhado, que não se descora na presença do hipoclorito de sódio. Tais características divergem daquelas observadas no rizoma de *L. furfuraceum* (Lag.) Kuntze, por Grigore et al. (2014), dotado de epiderme recoberta por cutícula relativamente espessada e com tricomas unicelulares.



Figura 1: Amostras secas de *Limonium brasiliense*. Rizoma longo e calibroso (setas fechadas) (A) com ramos laterais mais delgados e envoltos pelas bases peciulares avermelhadas (setas abertas) (B); detalhes da periderme (C) e dos tecidos internos (D).

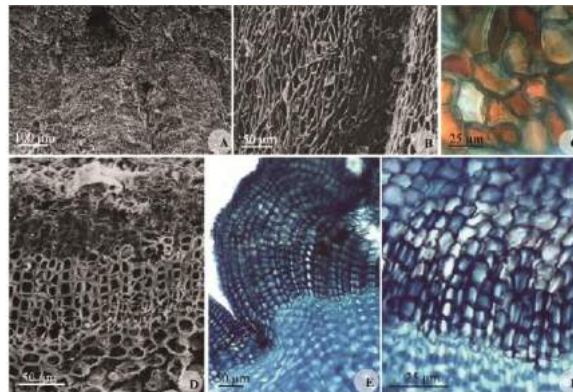


Figura 2: Periderme do rizoma de *Limonium brasiliense*. Aspecto geral das estrias superficiais (A) e das células da periderme (B e C); cortes transversais da periderme (D e E) e detalhe de suas células (F). A, B e D: sob MEV; C, E e F: sob MO.

O parênquima cortical do rizoma de *L. brasiliense* mostra-se bastante desenvolvido (Figura 3A), estando formado por células cilíndricas colenquimatosas com amplos campos de pontoações, as quais, na maioria das vezes, são alongadas tangencialmente na porção mais externa do órgão, e por vezes apresentando pequenas projeções bráquiformes (Figuras 3B, 4A e B), permitindo a formação de amplos espaços intercelulares, configurando um aerênquima. A formação de aerênquima ocorre em

raízes e caules de espécies de locais alagados, ou então de locais secos sob condições adversas, como decorrência de estresse abiótico (Evans, 2003), como nas condições ecológicas sob as quais *L. brasiliense* cresce, em solos alagados e salinos das restingas paranaenses (Zappi, 2015). Macroscopicamente, tal aerênquima confere aspecto friável às amostras secas do rizoma de *L. brasiliense*.

Nas proximidades do floema, o parênquima cortical apresenta células isodiamétricas até alongadas longitudinalmente, colenquimatosas como as da porção mais externa do córtex, e semelhantes às células dos raios parenquimáticos interfasciculares e também àquelas que compõem a medula caulinar, mas sempre permitindo a formação de espaços intercelulares relativamente amplos.

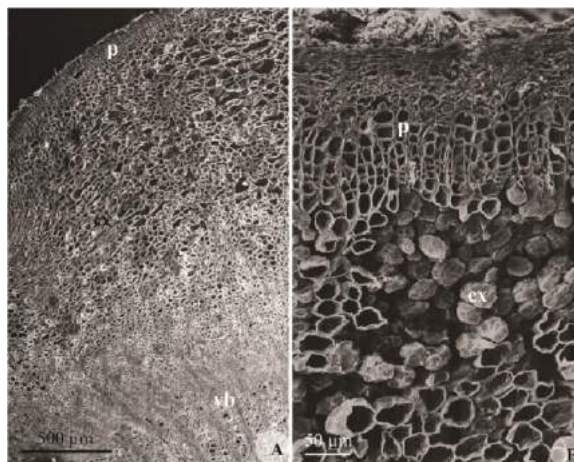


Figura 3: Rizoma de *Limonium brasiliense*. Aspecto geral (A) e detalhes do aerênquima (B) em seções tangenciais sob MEV. co: córtex, vb: feixes vasculares, pe: periderme.

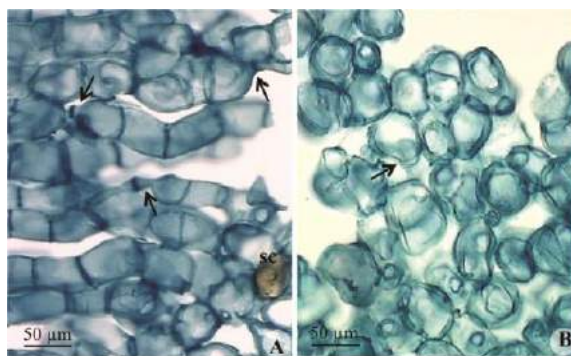


Figura 4: Estratos mais superficiais do córtex do rizoma de *Limonium brasiliense*. Detalhe em secção transversal (A) e radial (B), sob MO. As setas indicam pequenas projeções braciformes. sc: esclereíde.

Dispersos pelo córtex estão esclereídes de dimensões muito variadas, isolados (raros, como na Figura 4A) ou em grupos de 5 a poucas dezenas de elementos, posicionados paralelamente ao maior eixo do rizoma. Essas células apresentam lúmen restrito até volumoso, terminações arredondadas, em

bisel ou anomalias, mas sempre com pontoações ramificadas (Figuras 5A-C), semelhantes àquelas descritas por Metcalfe e Chalk (1950) no córtex dos caules subterrâneos de *L. bellidifolium* (Gouan) Dumort e *L. binervosum* (G.E.Sm.) C.E. Salmon. As múltiplas camadas da parede secundária deste tipo de célula esclerenquimática tornam-se ainda mais evidentes sob MEV (Figura 5D). A presença de grupos de esclereídes também foi verificada por Grigore et al. (2014) no córtex do rizoma de *L. furfuraceum*, mas em grandes grupos. Tais grupos de esclereídes também se encontram na medula do rizoma de *L. brasiliense*.

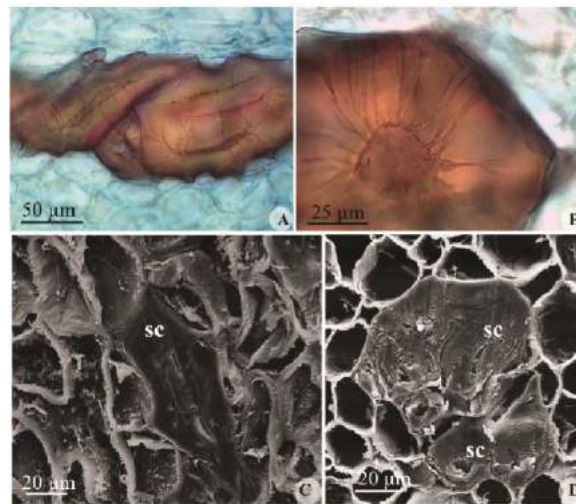


Figura 5: Grupo de esclereídes presentes no rizoma de *Limonium brasiliense*, em secção radial (A e C) e detalhes da parede secundária em secção transversal (B) com múltiplas camadas (D). A e B sob MO, C e D MEV. sc: esclereídes

Os feixes vasculares do rizoma de *L. brasiliense* são colaterais de formato elíptico-alongados, de curtos a muito longos, dependendo da amostra analisada (Figura 6), mas sempre estreitos e dispostos radialmente, conforme já havia descrito Dias da Silva (1920), compostos por pequeno número de elementos condutores em relação às células parenquimáticas. Feixes vasculares solitários, posicionados aleatoriamente foram observados no córtex e na medula (Figura 6A), por vezes transversais ao maior eixo do rizoma.

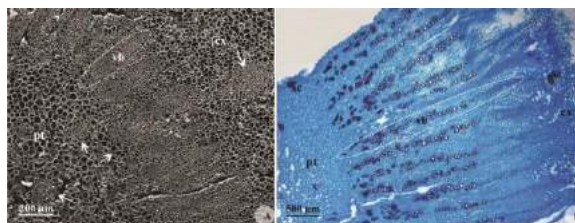


Figura 6: Aspecto geral dos feixes vasculares (em destaque) de diferentes amostras do rizoma de *Limonium brasiliense* em secções transversais. Mais curtos, sob MEV (A) ou mais longos, sob MO (B). co: córtex, sc: esclereídes, vb: feixe vascular. As setas indicam feixes vasculares solitários no córtex e na medula.



O câmbio vascular foi detectado apenas no interior do feixe vascular (tipo fascicular), de aparência delicada e pouco aparente (Figura 7A), a semelhança do rizoma de *Senecio juergensii* Mattf., uma espécie de Asteraceae analisada por Bagatini (2008), a qual, à semelhança de *L. brasiliense*, ocorre em locais alagados. No floema não foram encontradas células esclerificadas (Figura 7), enquanto que no xilema (Figura 8), os elementos de vaso, solitários ou em pequenos grupos podem estar acompanhados apenas por células parenquimáticas ou por fibro-esclereídes curtos, com lúmen amplo e terminações em bisel (Figuras 8B e C). Tais características são muito divergentes daquelas encontradas no caule de espécies de *Plumbago* L. (Plumbaginaceae) nativas da África do Sul (Galal et al., 2013) que apresentam espessos cordões de esclerênquima circundando os amplos feixes vasculares, assim como nas espécies de *Limonium* analisadas por Colombo e Trapani (1992) e no rizoma de *L. furfuraceum* (Grigore et al., 2014), embora o xilema secundário dessa última espécie mostre-se mais rico em esclerênquima que aquele das demais.

Ao ser analisado mais detalhadamente, os elementos do floema arranjam-se na forma de delta (Figuras 7A e B), contando com poucos elementos condutores (Figura 7C). Por sua vez, os elementos de vaso do xilema (Figura 8A) são curtos e desalinhados em relação ao maior eixo do órgão, apresentando paredes secundárias com espessamento escalariforme com pontoações areoladas, além de placa de perfuração simples (Figuras 8B a F).

A medula do rizoma de *L. brasiliense* apresenta-se volumosa, constituída por células colenquimatosas, semelhantes às do córtex, permitindo a formação de amplos espaços intercelulares (Figura 9A). Grupos de esclereídes podem ser visualizados (Figura 9A), à semelhança das três espécies de *Plumbago* analisadas por Galal et al. (2013), *P. auriculata* Lam., *P. indica* L. e *P. zeylanica* L., assim como os feixes vasculares anômalos, conforme acima descrito (Figuras 6A e 9B).

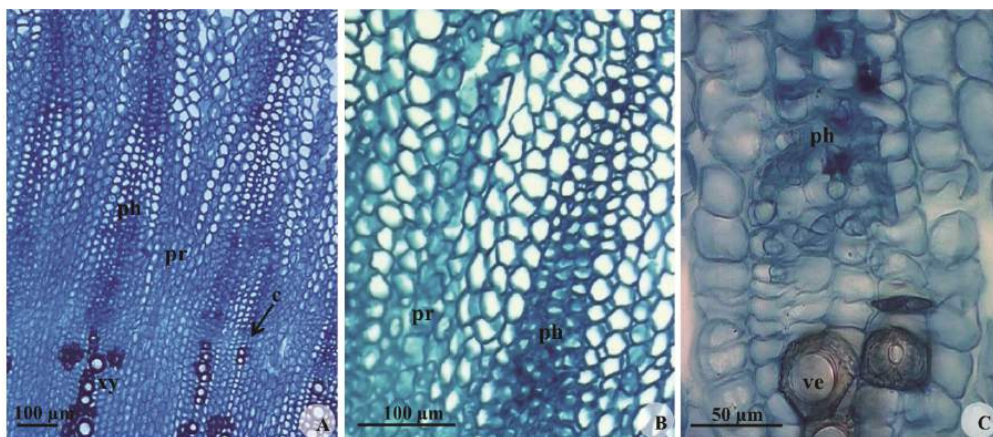


Figura 7: Detalhe de alguns feixes vasculares do rizoma de *Limonium brasiliense* sob MO, indicando aspecto geral da organização em delta do floema (A), detalhes dos raios parenquimáticos (B) e células floemáticas (C). c: câmbio vascular, ph: floema, pr: raio parenquimático, ve: elemento de vaso, xy: xilema.

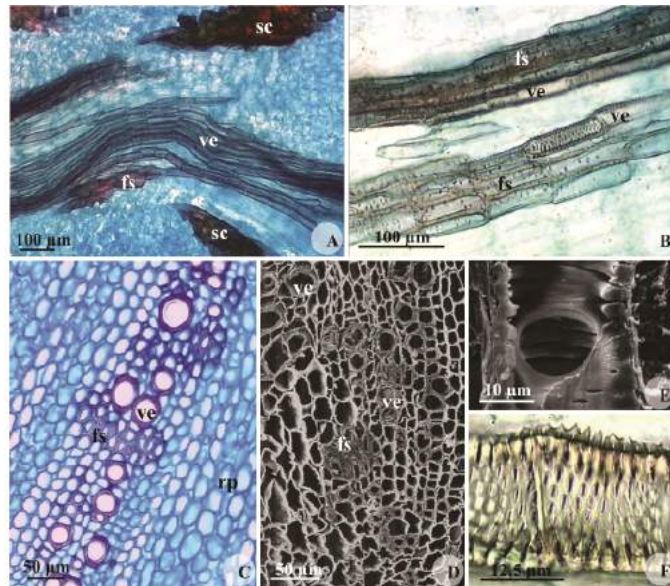


Figura 8: Xilema do rizoma de *Limonium brasiliense*. Aspecto geral dos elementos de vaso desalinados (A); detalhes dos fibroescleréides que acompanham os elementos de vaso (B), ambos em secções radiais; detalhe dos elementos do xilema em secção transversal (C e D) e dos elementos de vaso em secção tangencial (E e F). sc: escleréides, el: elemento de vaso, fs: fibroescleréide, ra: raio parenquimático. A, B, C e F sob MO; D e E sob MEV.

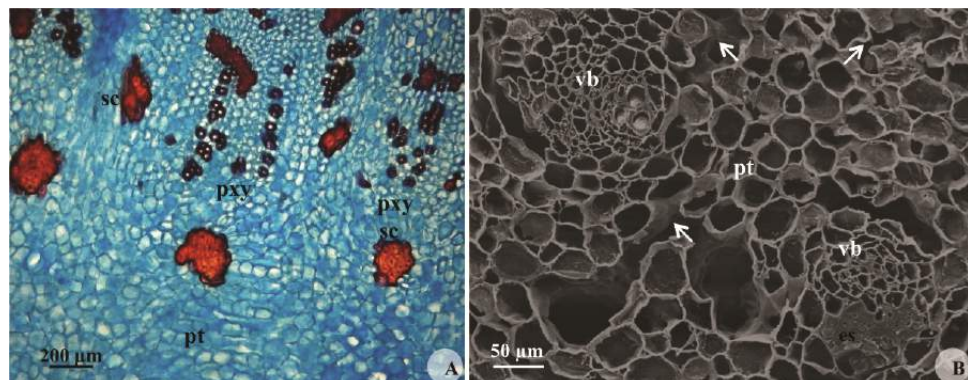


Figura 9: Tecidos internos (protoxilema e medula) do rizoma de *Limonium brasiliense* sob MO (A) e detalhes dos feixes vasculares presentes na medula sob MEV (B). pt: medula, pxy: protoxilema, sc: escleréides, vb: feixe vascular. As setas indicam pequenas projeções brachiformes no parênquima medular.

No pó reidratado do rizoma de *L. brasiliense* (Figura 10) são facilmente identificados fragmentos com células colenquimatosas características do córtex, raios parenquimáticos e medula, assim como os grupos de macroscleréides e de elementos de vaso com suas típicas ornamentações de parede e placa perfurada simples.



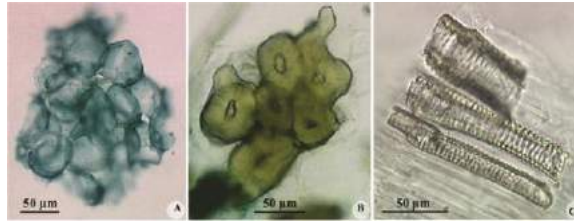


Figura 10: Fragmentos observados no pó reidratado do rizoma de *Limonium brasiliense* sob MO. Células corticais (A), esclereídes (B) e elementos de vaso (C).

Todas as células parenquimáticas do rizoma, da espécie de *Limonium* sob análise, apresentam forte reação ao cloreto férrico, evidenciando a impregnação de suas paredes por polifenóis, à semelhança das observações de Colombo e Trapani (1992) nas três espécies de *Limonium*, *L. albidum* (Guss.) Pignatti, *L. intermedium* (Guss.) Brullo e *L. lopadusanum* Brullo, nativos das ilhas Pelágias (Itália). Por sua vez, Lin e Chou (2000) comprovaram a presença de flavonoides e vinte compostos fenólicos nas folhas e caule de *L. sinense* (Girard) Kuntze, e Grigore et al. (2014) observaram taninos impregnando as paredes das células esclerificadas do rizoma de *L. furfuraceum*. Não foi detectada a presença de grãos de amido ou outras substâncias ergásticas nas células parenquimáticas do rizoma de *L. brasiliense*.

#### 4. CONCLUSÃO

As análises realizadas comprovaram ser rizoma o órgão de *L. brasiliense* utilizado popularmente, embora os entrenós, característicos desse tipo de caule, não estejam evidentes em suas porções mais velhas, ao contrário das mais jovens. Como principais características farmacognóstica que também podem ser observadas no pó da espécie em questão, está o tecido colenquimatoso do córtex com pequenas projeções bráquiformes, cujas paredes celulares encontram-se impregnadas com compostos fenólicos; os feixes vasculares elíptico-alongados com escassos elementos condutores e esclerênquima; e os grupos de esclereídes com paredes muito espessadas e pontoações ramificadas.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. M. H. Miranda Neto pela permissão do uso do fotomicroscópio óptico com câmera, e a A. Arantes pelo suporte técnico. Este trabalho recebeu suporte do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (Capes), Finep e Fundação Araucária. Agradecimentos ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT\_if) pela bolsa de estudos concedida a T.M. Antonelli-Ushirobira (Grant # 573663/2008-4). Agradecimentos a Dr. Janet W. Reid, JWR Associates, Trumansburg, New York, pela revisão do manuscrito em inglês.

#### Contribuição dos autores

TMAU (Dr. Student) auxiliou no trabalho laboratorial, análise, discussão e na escrita e formatação do trabalho. AB (Dr student) coletou e secou o material botânico, preparou a exsicata e auxiliou na escrita do trabalho. NCG e FG desenvolveram os trabalhos no laboratório, preparando o material botânico para análise microscópica e auxiliaram na escrita do trabalho. KAKC contribuiu com as análises no microscópio eletrônico de varredura. EVSLM auxiliou no desenho do projeto e na revisão do trabalho escrito. JCPM responsável em criar o projeto e auxiliou na escrita, revisão e supervisão do trabalho. MAMG supervisionou o trabalho no laboratório, realizou as análises microscópicas e supervisionou a escrita do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Bagatini, K.P., 2008. Ontogênese e anatomia da raiz, anatomia do rizoma e folhas de *Senecio juergensii* Mattf. (Asteraceae) (margaridinha do banhado) dos ambientes lântico gramíneo e lótico, e variações morfoanatômicas dos estádios vegetativo e reprodutivo destes órgãos nos dois ambientes. Curitiba, 105p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná.
- Berlyn, G.P., Miksche, J.P., 1976. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. Ames: Iowa State University.
- Blainski, A., Lopes, G.C., de Mello, J.C.P., 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L. Molecules 18, 6852-6865.
- Braendle, R., Crawford, R.M.M., 1999. Plants as amphibians. Pers. Plant Ecol. Evol. Syst. 2, 56-78.
- Brasil. 2010. Farmacopeia Brasileira. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Chant, S.R., 1993. Plumbaginaceae. In: Heywood, V.H. (ed.) Flowering Plants of the World. London: B. T. Batsford.
- Coimbra, R., 1958. Notas de Fitoterapia. Rio de Janeiro: Silva Araújo.
- Colombo, P., Trapani, S., 1992. Morpho-anatomical observations on three *Limonium* species endemic to the Peladic Islands. Flora Medit. 2, 77-90.
- Corrêa, M.P., 1952. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
- Cruz, G.L., 1982. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: DIFEL.
- Dias da Silva, R.A., 1920. Plantas Medicinaes do Brasil, O Guaycurú. Bol. Ass. Bras. Pharm. 1, 4-14.
- Dias da Silva, R.A., 1929. *Statice brasiliensis* Boissier, Plumbaginaceae. São Paulo: Nacional.
- Ding, G., Zhang, D., Yu, Y., Zhang, B., Zhao, L., 2012. Genetic identification and relationship analysis of medicinal *Limonium* by rDNA ITS sequence, single nucleotide polymorphism (SNP) and amplification refractory mutation system (ARMS). J. Med. Plants Res. 6, 4535-4539.
- Evans, D.E., 2004. Aerenchyma formation. New Phytol. 161, 35-49.

- Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A., Rates, S.M.K., 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Braz. J. Pharm. Sci.* 42, 369-394.
- Galal, A.M., Raman, V., Avula, B., Wang, Y.H., Rumalla, C.S., Weerasooriya, A.D., Khan, I.A., 2013. Comparative study of three *Plumbago* L. species (Plumbaginaceae) by microscopy, UPLC-UV and HPTLC. *J. Nat. Med.* 67, 554-561.
- Grigore, M.N., Ivanescu, L., Toma, C., 2014. Plumbaginaceae. *In: Grigore, M.N. et al. Halophytes: An Integrative Anatomical Study.* Springer International Publishing Switzerland.
- Horrige, G.A., Tamm, S.L., 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. *Science* 163, 817-818.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant Microtechnique.* New York: McGraw-Hill.
- Kraus, J., Arduin, M., 1997. *Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal.* Seropédica: EDUR.
- Lifchitz, A., 1981. *Plantas Medicinales; Guia Practico de Botânica Medicinal.* Buenos Aires: Kier.
- Lin, L.C., Chou, C.J., 2000. Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense*. *Planta Med.* 66, 382-383.
- Martius, K.F.P., 1878. *Flora Brasiliensis.* <http://florabrasiliensis.cria.org.br/opus>, accessed Jan 2015.
- Metcalf, C.R., Chalk, L., 1950. *Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses.* Oxford: Clarendon Press.
- MOBOT, 2015. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, accessed Jan 2015.
- Moura, T.F.A.L., Schenkel, E.P., Schapoval, E.E.S., Simões, C.M.O., Santos, R.I.D., 1985. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). *Cad. Farm.* 1, 45-54.
- Murray, A.P., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A., Mulet, M.C., 2004. Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.* 59, 477-480.
- Oliveira, F., Akisue, G., Akisue, M.K., 1998. *Farmacognosia.* São Paulo: Editora Atheneu.
- Reitz, P.R., 1965. Plumbagináceas. *Flora Ilustrada Catarinense.* Itajaí: Herbário "Barbosa Rodrigues".
- Rosito, J.F., 1975. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). *In: Moura, T.F.A.L., Schenkel, E.P., Schapoval, E.E.S., Simões, C.M.O., Santos, R.I.dos.* 1985. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). Porto Alegre. 37p. Dissertação de Mestrado, Programa de pós graduação em Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Simões, C.M.O., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Irgang, B.E., Stehmann, J.R., 1998. *Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul.* Porto Alegre: UFRGS.
- Zappi, D., 2015. *Limonium* In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12938>, accessed Jan 2015.

## **CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA**

---

Este capítulo consiste na avaliação *in vivo* da segurança de uso do extrato bruto de *Limonium brasiliense*. Este artigo foi aceito para publicação na revista *Journal of Ethnopharmacology*, 174 (2015) 293-298. DOI:10.1016/j.jep.2015.08.022. (ANEXO 2).

**Toxicidade aguda e avaliação da segurança a longo prazo do extrato bruto de rizomas de *Limonium brasiliense* em camundongos e ratos**

Tânia M. Antonelli-Ushirobira<sup>a</sup>, Andressa Blainski<sup>a</sup>, Henrique G. Fernandes<sup>b</sup>, Gislaine F. Moura-Costa<sup>c</sup>, Marco A. Costa<sup>c</sup>, Lilian B. Campos<sup>d</sup>, Clairce L. Salgueiro-Pagadigorria<sup>d</sup>, Edilson N. Kaneshima<sup>b</sup>, Tânia C. A. Becker<sup>e</sup>, Eleri V. S. Leite-Mello<sup>f</sup>, João C. P. de Mello<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

<sup>e</sup>Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>f</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

\*Autor para correspondência: Tel: +55-44-3011-4816

E-mail: [mello@uem.br](mailto:mello@uem.br)

Avenida Colombo, 5790,

BR-87020-900 – Maringá – Paraná – Brasil

**RESUMO**

*Relevância etnofarmacológica:* *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, popularmente conhecida como baicuru, tem sido usada na medicina popular para tratar distúrbios menstruais e para regular períodos menstruais. Entretanto, pouco é conhecido sobre sua segurança. Este estudo avaliou a segurança por meio de testes *in vivo* da toxicidade aguda, longo prazo e do fígado, e a mutagenicidade do extrato bruto (EB) dos rizomas de *L. brasiliense*.

*Material e métodos:* A toxicidade aguda foi testada em camundongos Swiss, e a toxicidade crônica em ratos Wistar. Camundongos machos e fêmeas receberam o EB oralmente em dose única de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ou 5,0 g/kg. Mudanças clínicas e taxa de mortalidade foram usadas como parâmetros para avaliar a toxicidade aguda. Na avaliação a longo prazo, ratos machos e fêmeas Wistar foram tratados oralmente com doses diárias de EB (50, 100 ou 200 mg/kg) por 90 dias. Avaliações de peso, comportamento e ingestão de alimentos, urinálise, análises bioquímicas e hematológicas, assim como observações macro e microscópicas de diversos órgãos foram realizadas. O estado redox do fígado foi avaliado como meio de investigar a toxicidade hepática, e o teste do micronúcleo para avaliar a mutagenicidade também foi realizado.

*Resultados:* Avaliação da toxicidade aguda não indicou mudanças clínicas aparentes nos animais, a  $DL_{50}$  foi de 4,8 g/kg. Avaliação após 90 dias de administração mostrou que o EB, mesmo em doses mais elevadas que a considerada terapêutica, parece ser seguro. O teste do micronúcleo demonstrou um baixo potencial mutagênico para o EB.

*Conclusão:* Nossos resultados mostraram que o tratamento com o EB de *L. brasiliense* causou baixa ou nenhuma toxicidade como avaliado usando estas doses e métodos de avaliação.

Palavras-chave: *Limonium brasiliense*; Toxicidade pré-clínica; Estado redox do fígado; Mutagenicidade; Plumbaginaceae.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Limonium*, pertencente à família Plumbaginaceae, possui 163 espécies aceitas (Kunitake et al., 1995; ThePlantList, 2015). No Brasil, somente é encontrado *Limonium brasiliense* (Boiss) Kuntze, conhecida popularmente como baicuru ou guaicuru. Essa espécie cresce preferencialmente em terrenos baixos e solos salinos e às margens do Rio da Prata, estando distribuída na Argentina, Uruguai e sul do Brasil (Moura et al., 1985; Murray et al., 2004).

Os rizomas de *L. brasiliense* tem sido empregados na medicina popular como anti-séptico nas infecções geniturinárias, adstringente, depurativo e, principalmente, no tratamento de cólicas menstruais e como regulador dos períodos menstruais (Moura et al., 1985). Há relatos de uso também no tratamento de hemorragia, reumatismo e, acredita-se ainda ter propriedades cardioprotetoras (Murray et al., 2004)

Estudos com extratos alcoólicos demonstraram atividade bacteriostática e anti-inflamatória (Jahns and Crescente, 1976). Moura et al. (1985) demonstraram ação anti-inflamatória do extrato etanólico, por via i.p, na dose de 250 mg/kg no teste do edema de pata induzido por carragenina. A atividade antioxidante de frações semipurificadas das raízes foi avaliada pela determinação do  $IC_{50}$  através da habilidade de quelar radicais livres usando o método de DPPH (Murray et al., 2004)

Em um estudo etnobotânico realizado por Fenner et al. (2006) *L. brasiliense* foi uma das espécies citadas pela população e usada no tratamento de úlceras e leucorreias, estando seu uso relacionado a uma potencial atividade antifúngica. Faral-Tello et al. (2012) demonstraram interessante atividade antiviral de extrato etanólico *L. brasiliense* frente ao vírus herpes simples tipo I (HSV-1), o qual inibiu a replicação *in vitro*, com  $EC_{50}$  de 185  $\mu$ g/ml.

Rodriguez et al. (2011) testaram *in vitro* a atividade anti-inflamatória de extrato semipurificado de *L. brasiliense* e do composto isolado miricetina-3-*O*-ramnosídeo frente à superprodução de óxido nítrico pela linhagem de células RAW 264.7 estimuladas por LPS, sendo que o composto isolado apresentou o melhor resultado.

Quimicamente a planta tem sido descrita por apresentar taninos hidrolisáveis e condensados (epigallocatequina, galocatequina e epigallocatequina-3-*O*-galato), leucoantocianidinas, ácido

hidroxicinâmico e ácido elágico (Cardoso, 1990; Murray et al., 2004). Também foi verificado a presença de ácido gálico, ácido-4-metóxi-gálico,  $\beta$ -sitosterol, saponinas triterpênicas, miricetina-3-*O*- $\alpha$ -raminopiranosídeo, benzoato de benzila, sacarose, flavona, isoflavona, flavonona e cumarina (Moura et al., 1985; Murray et al., 2004)

Apesar da existência de diversos estudos demonstrando os efeitos benéficos do *L. brasiliense*, no tratamento de diversas afecções, pouco se sabe sobre sua toxicidade, em especial no fígado. Diversas substâncias ou desordens metabólicas induzem estresse oxidativo, em estágios muito precoces (Berson et al., 1998; Campos et al., 2012; Charlton et al., 2001; Day and James, 1998; Fromenty and Pessayre, 1995; Kowaltowski et al., 2009; Labbe et al., 2008). O dano oxidativo, por sua vez, é considerado o principal fator envolvido na progressão de doenças hepáticas (Day and James, 1998). Por esta razão, foi avaliado, também, o estado redox do fígado. Assim, neste trabalho, foi avaliada a segurança do uso do extrato dos rizomas da espécie vegetal, *in vivo*, como forma de comprovar ou excluir possíveis toxicidades, tanto na fase aguda como crônica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima vegetal

Rizomas de *Limonium brasiliense* foram adquiridos de produtor rural na cidade de Rio Grande, Ilha dos Marinheiros, estado do Rio Grande do Sul, Brasil, (31°59'33"S, 52°10'43"W), em maio de 2010, e uma exsicata encontra-se depositada no Herbarium da Universidade Estadual de Maringá sob número HUEM#21151 e no Herbarium da Universidade Federal do Rio Grande (FURG#5136). A coleta do material vegetal está registrada no IBAMA-SISBIO sob o número 11995-3, de 2 de novembro de 2010, código de autenticação 46367613, sob a responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. O material vegetal foi rasurado e seco em estufa de ar circulante à temperatura de 37 $\pm$ 2 °C, posteriormente moído em moinho de martelos (Tigre ASN-5).

### 2.2 Preparação do extrato

O extrato bruto (EB) dos rizomas (5,6 kg) de *L. brasiliense* foi preparado usando acetona:água (7:3, v/v; 56 L) em Ultra-Turrax (UTC 115 KT, IKA®, Wilmington, NC, USA, 6 x 5 min, t<40 °C) na proporção de 10% (p/v). Após, o extrato foi filtrado, o solvente orgânico removido *in vacuo*, e liofilizado, obtendo-se EB (28,30%). O conteúdo de polifenóis totais encontrado no extrato foi 23,5% de acordo com Blainski et al. (2013).

### 2.3 Animais

Os animais, camundongos Swiss (machos e fêmeas, entre 30 e 45 g) e ratos Wistar [machos (220 a 240 g) e fêmeas (160 a 170g)], foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e mantidos em biotérios aclimatados com temperatura controlada de 22 $\pm$ 2 °C, com

ciclo claro-escuro de 12 h. Receberam ração (Nuvital®, Nuvilab Ltd., Curitiba, PR, Brazil) e água *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer#064/2011- ANEXO 3) e a manipulação dos animais seguiu o padronizado pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA, 2015)

Os experimentos para avaliação da toxicidade aguda e crônica seguiram o padronizado pelo “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (BRASIL, 2013).

#### **2.4 Toxicidade aguda**

O teste foi realizado segundo Brito (1994) com pequenas modificações. Resumidamente, camundongos (36 machos e 36 fêmeas), foram divididos, por sexo, em grupos de 6 animais formando grupos de tratamento e grupos controle. Cada grupo de tratamento recebeu, em dose única, *p.o.*, EB de baicuru nas doses de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ou 5,0 g/kg e um grupo recebeu água (controle). Os animais foram observados quanto a possíveis alterações clínicas (piloereção, respiração, contorção, tremores, convulsões) imediatamente após, a administração do EB, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h e, diariamente até 14 dias, tendo sido pesados nos dias 3, 7, 10 e 14. As mortes ocorridas no período foram consideradas para o cálculo da DL<sub>50</sub>. Após este período os animais foram anestesiados com pentobarbital (0,1 ml/100 g de peso corporal) para a remoção dos órgãos (coração, rins, pulmões e fígado) os quais foram avaliados macroscopicamente, pesados e relacionados ao peso dos animais. Após, com sobredose do anestésico, os animais foram eutanasiados.

#### **2.5 Toxicidade crônica**

Ratos machos e fêmeas Wistar foram pesados e separados em grupos, por sexo, de 10 animais cada. Os grupos tratados receberam, *p.o.*, EB nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e um grupo controle (água) por 90 dias. Durante o período de tratamento os animais foram pesados semanalmente e a ração consumida pesada a cada 4 dias, antes de ser fornecida aos animais. A diferença na pesagem foi considerada e calculada na forma de alimento diário por grupo (g/dia).

Após 60 dias de tratamento os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, (Carlini et al., 1986) como forma de avaliação comportamental, e iniciou-se a coleta de urina.

Ao término do período de tratamento, os animais, em jejum de 12 h foram anestesiados com pentobarbital (0,1 ml/100 g de peso corporal) para a coleta de sangue (aorta abdominal) e remoção dos órgãos, os quais foram pesados e relacionados aos pesos dos animais. Análises hematológicas e bioquímicas do soro também foram realizadas. Adicionalmente, fragmentos (1 g) de fígados das fêmeas foram encaminhados para avaliação do estado oxidativo, conforme descrito abaixo. Em seguida, os animais foram eutanasiados com sobredose do anestésico.



### 2.5.1 Avaliação do estado redox do fígado

Fragmentos de fígados (1 g; ver secção 2.5) de ratas (n=40) foram clampeados em nitrogênio líquido e homogeneizados em homogeneizador Van-Potter para medidas do estado oxidativo. O conteúdo de Glutathiona reduzida (GSH) foi analisado no sobrenadante utilizando-se o *o*-ftalaldeído (OPT) como sonda fluorescente em espectrofluorímetro (excitação, 350 nm; emissão, 420 nm) (Campos et al., 2012; Hissin and Hilf, 1976), e utilizado como um indicador do estado redox do fígado.

Os níveis de peroxidação lipídica também foram avaliados nos fígados destes animais por espectrofotometria direta, através da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), consideradas biomarcadores de peroxidação lipídica e dano oxidativo (Campos et al., 2012; Ohkawa et al., 1979).

### 2.5.2 Análises laboratoriais

Os animais foram individualmente colocados em gaiolas metabólicas por 24 h para coleta da urina, a qual foi analisada quanto aos parâmetros físico, químico e de sedimentoscopia.

Para a coleta de sangue e os exames laboratoriais utilizou-se um protocolo randomizado numérico fechado, de modo a não haver conhecimento, por parte do analista técnico de qual grupo estava sendo analisado. Além das análises hematológicas, os seguintes parâmetros bioquímicos foram avaliados no soro dos animais: ácido úrico, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), amilase, bilirrubina total, creatinofosfoquinase (CPK), colesterol total, creatinina, fosfatase alcalina, g-glutamyltransferase (GGT), glicose, proteínas totais, triglicerídeos e ureia.

### 2.5.3 Avaliação Histopatológica

Para as análises histopatológicas, os órgãos (coração, pulmões, rins, fígado, baço, adrenais e testículos ou, útero e ovários) foram fixados em formol 10% e posteriormente processados, fixados em parafina e seccionados em cortes seriados de 5 µm e corados em sistema HE (hematoxilina e eosina).

## 2.6 Mutagenicidade

Neste ensaio incluiu-se um grupo de animais tratados com ciclofosfamida (controle positivo). Assim, os camundongos Swiss foram divididos em 6 grupos de 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas) e tratados *p.o.*, em dose única. De acordo com o tratamento, estes animais foram assim designados: grupo controle negativo (salina), grupo controle positivo (ciclofosfamida na dose de 50 mg/kg) e os grupos tratados com EB de *L. brasiliense* nas doses de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g/kg. Após 24 h da administração, os animais foram sacrificados e o par de fêmures retirado. Em seguida, as epífises proximais foram limpas e seccionadas e a medula óssea retirada, lavada com soro bovino fetal e centrifugada (3.000 × g, 5 min). Esfregaços de sedimentos secos ao ar foram corados com May-Grunwald-Giemsa e analisados em microscopia de luz (objetiva de 100×). A existência de eritrócitos

policromáticos micronucleados foi determinada após a contagem de 2.000 eritrócitos. O efeito mutagênico foi caracterizado pelo aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao controle negativo (Costa et al., 2010; Schmid, 1975; Vilar et al., 2008).

## **2.7 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistica® (versão 8.0). Os resultados foram expressos como a média±desvio padrão 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. A frequência de eventos para a análise histopatológica foi avaliada pelo Teste exato de Fisher. Foi considerado  $P < 0,05$  como critério de significância.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Toxicidade aguda**

A avaliação pré-clínica da toxicidade aguda não demonstrou diferença estatística para as fêmeas quanto à avaliação ponderal e quanto ao peso relativo dos órgãos. Os machos tratados com 3,0 g/kg apresentaram diferença estatística significativa na evolução ponderal a partir do 3º dia após administração de EB. Entretanto, o grupo tratado com 4,0 g/kg apresentou diminuição no peso relativo do fígado. Nenhuma alteração clínica aparente foi encontrada nos animais durante os 14 dias de observação. A mortalidade produzida nos animais pelo extrato de *L. brasiliense* possibilitou o cálculo da  $DL_{50}$  que foi de 4,8 g/kg.

### **3.2 Toxicidade crônica**

#### **3.2.1 Avaliação ponderal e comportamental**

Durante o período de tratamento ocorreram a morte de uma fêmea e dois machos na dose de 200 mg/kg e um macho na dose de 100 mg/kg. Nenhum sinal clínico de anormalidade foi observado nos animais durante os experimentos em nenhuma das doses, e essas mortes não comprometeram o andamento do trabalho.

O ensaio pré-clínico para toxicidade crônica não demonstrou diferença estatística entre os grupos de animais para a avaliação ponderal (Tabela A.1), no consumo de ração e no peso relativo dos órgãos avaliados (Tabela A.2).

No teste do campo aberto não foi verificado nenhuma alteração com significância estatística, demonstrando a falta de alteração comportamental no período do tratamento (Tabela A.3).

#### **3.2.2 Avaliação do estado redox do fígado**

Apenas as fêmeas tratadas com a maior dose de EB (200 mg/kg) apresentaram discreta diminuição no conteúdo de GSH, a qual, no entanto, não foi significativa. Em concordância com isto,

os níveis de TBARS permaneceram inalterados após o tratamento com todas as doses testadas. Apenas na dose de 200 mg/kg pode ser observado um discreto aumento, o qual, porém, não foi significativo (Figura 1).

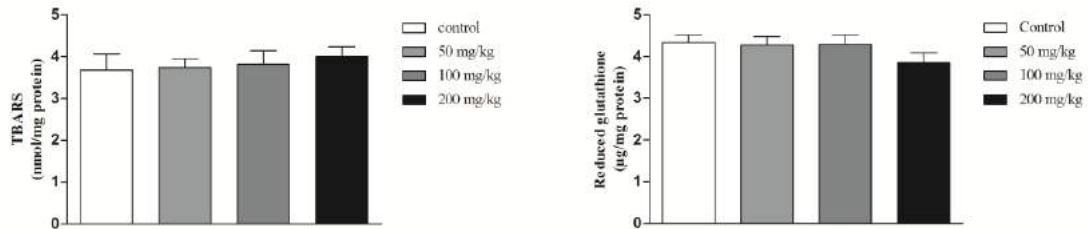


Figura 1: Avaliação do estado redox do fígado pela medida do conteúdo de GSH e pelo método de TBARS.

### 3.2.3 Análises laboratoriais

Para os parâmetros urinários examinados nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados e controle foi observado (Dados não mostrados).

Os exames hematológicos demonstraram diminuição no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito nos machos tratados com a dose de 50 mg/kg ( $9,14 \pm 0,69$ ;  $15,37 \pm 0,14$ ;  $46,70 \pm 2,87$ , respectivamente).

Os exames bioquímicos de sangue mostraram alguns resultados significantes tanto em machos quanto em fêmeas, no entanto, não houve ocorrência concomitante em ambos os grupos de animais. Os machos apresentaram aumento nos níveis de colesterol nos três grupos tratados ( $131,99 \pm 23,77$ ;  $140,22 \pm 20,86$ ;  $138,19 \pm 32,86$ ) e aumento no nível de glicose nos animais tratados com 200 mg/kg ( $203,08 \pm 50,17$ ). As fêmeas tratadas com as doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram aumento nos níveis de albumina ( $4,10 \pm 0,45$ ;  $3,99 \pm 0,54$ ) e de proteínas totais ( $9,85 \pm 0,93$ ;  $9,92 \pm 0,38$ ), e diminuição nos níveis de amilase ( $365,95 \pm 62,05$ ;  $386,54 \pm 80,78$ ) e colesterol ( $80,16 \pm 9,09$ ;  $79,24 \pm 11,65$ ). O grupo de fêmeas tratadas com 100 mg/kg ainda apresentou aumento nas taxas de ácido úrico ( $3,81 \pm 3,01$ ) e glicose ( $157,02 \pm 23,97$ ).

### 3.2.4 Avaliação Histopatológica

A avaliação macroscópica dos órgãos não evidenciou nenhuma anormalidade. A análise histopatológica do fígado, baço, pulmões, testículos ou útero e ovários demonstraram estarem os órgãos sem nenhuma mudança histológica que possa ser indicativo de anormalidade. Tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados de ambos os sexos foram observados pontos hemorrágicos no coração e os rins apresentaram-se com pontos de congestão, porém, em nenhuma dessas alterações houve significância estatística (dados não mostrados).

### 3.3 Mutagenicidade

A análise estatística dos dados não apresentaram variância constante, portanto foi adotada a avaliação pelo teste de Kruskal-Wallis.

A avaliação da mutagenicidade apresentou um aumento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados no grupo tratado com 2,0 g/kg ( $17,9 \pm 4,7$ ) e no grupo controle positivo ( $26,7 \pm 7,0$ ), sendo esses valores significativamente maiores do que o controle negativo ( $7,2 \pm 2,5$ ) (Figura A.1). Nos demais grupos tratados não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo.

## 4. DISCUSSÃO

Os estudos toxicológicos pré-clínicos são realizados seguindo-se protocolos aceitos internacionalmente, ainda que, exigências legais variem de país a país. O teste de toxicidade aguda é uma avaliação preliminar que permite estimar as propriedades tóxicas de uma substância teste, após administração em dose única ou em doses repetidas em um período de 24 h (BRASIL, 2013). Para o *L. brasiliense* o teste de toxicidade aguda demonstrou serem os machos mais susceptíveis aos efeitos do extrato. Nestes animais ocorreu diminuição no peso relativo do fígado na dose de 4,0 g/kg, e no peso corporal foi o grupo tratado com a dose de 3,0 g/kg, indicando não haver uma relação dose-resposta. A ausência de alterações clínicas e a  $DL_{50}$  encontrada de 4,8 g/kg também indicam a baixa toxicidade do extrato testado.

O teste de toxicidade crônica permite avaliar os riscos à saúde relacionados com a administração prolongada de uma substância teste, bem como fornece informações adicionais sobre efeitos cumulativos sobre órgãos alvo (BRASIL, 2013). As mortes ocorridas durante o período de tratamento dos animais (90 dias) não foram significantes e não comprometeram o andamento do tratamento. A avaliação ponderal não evidenciou nenhuma alteração no peso corporal em ambos os sexos, o que pode ser considerado fator positivo na evolução dos animais. Outro fator avaliado, o consumo de ração, também auxilia na observação do desenvolvimento dos animais, e neste item também não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos. A avaliação comportamental com o teste do campo aberto, que permite avaliar a atividade locomotora do animal e estimar se o extrato teste provoca estimulação ou efeito sedativo, também demonstrou não ter havido nenhuma alteração estatisticamente significativa. Esses dados são indicativos de que não houve alterações fisiológicas significativas nos animais.

Exames laboratoriais de sangue são essenciais e auxiliam no entendimento de qualquer alteração no metabolismo animal. Tanto nos machos como nas fêmeas, os exames hematológicos e bioquímicos não mostraram alterações e os valores obtidos mantiveram-se dentro dos níveis normais de variação biológica (Wolford et al., 1986).

No entanto, as fêmeas tratadas com as doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram aumento nos níveis de albumina, proteínas totais e diminuição nos níveis sanguíneos de amilase. Essas alterações bioquímicas podem ser indicativas de alterações na função hepática, no entanto, outros parâmetros avaliados para esta função como bilirrubina, AST, ALT, fosfatase alcalina e GGT não apresentaram alterações em nenhum dos grupos tratados em ambos os sexos. As fêmeas tratadas com a dose de 100 mg/kg também apresentaram valores elevados para ácido úrico que pode indicar alterações na função renal. Contudo, a disfunção renal pode ser melhor avaliada através das dosagens de ureia e creatinina, os quais mantiveram-se com valores normais, diminuindo dessa forma a possibilidade de problemas para este órgão.

A análise histopatológica auxilia a interpretação dos resultados bioquímicos, verificando-se possíveis anormalidades teciduais nos órgãos que possam explicar determinadas alterações ocorridas com os animais. As análises histopatológicas dos rins e do fígado não revelaram nenhuma alteração na estrutura histológica dos mesmos. A avaliação histopatológica do coração apresentou pontos hemorrágicos notados como pontos de extravasamento de hemácias entre as fibras musculares e empilhamento de hemácias nos capilares. Outros estudos de toxicidade envolvendo plantas de uso popular no Brasil também demonstraram resultados semelhantes aos encontrados para *L. brasiliense*, com ausência de mudanças significativas ou de caráter expressivo do ponto de vista toxicológico nos testes bioquímicos, hematológicos e histopatológicos (Andrade et al., 2012; Antonelli-Ushirobira et al., 2010).

Outro parâmetro que não poderíamos prescindir de investigar, ao avaliar a toxicidade do EB, era o impacto que esta poderia exercer sobre o fígado. De fato, este órgão é um alvo frequente da ação de drogas e, as hepatotoxicidades induzidas por drogas (drug induced liver diseases ou DILI), por sua vez, são causas frequentes de insuficiência hepática e da retirada de drogas do mercado (Labbe et al., 2008). Muitas substâncias produzem hepatotoxicidade por induzirem estresse oxidativo, direta ou indiretamente (Berson et al., 1998; Campos et al., 2012; Fromenty e Pessayre, 1995; Labbe et al., 2008). Os resultados referentes à avaliação do estado redox do fígado das fêmeas, no entanto, demonstraram que o extrato não produziu alterações no estado redox do fígado. De fato, estudos realizados com o *L. brasiliense* demonstraram que o mesmo apresenta ação antiinflamatória e antioxidante, sendo essas características atribuídas à presença de polifenóis, já reportados como efetivos antioxidantes (Rodriguez et al., 2011a; Rodriguez et al., 2011b; Tipoe et al., 2010). Em um estudo com extrato das raízes de *L. sinense* o mesmo apresentou-se com atividade hepatoprotetora, o qual foi relacionado a um mecanismo de proteção mitocondrial (Tang et al., 2008).

A avaliação da mutagenicidade pelo teste de micronúcleo é considerada um teste de toxicidade pré-clínica simples e eficaz para detectar mudanças causadas por agentes mutagênicos (BRASIL, 2014). Os resultados encontrados na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados para a ciclofosfamida estão em conformidade com os relatos da literatura (Fagundes et al., 2005; Vilar et al., 2008) demonstrando o efeito mutagênico desta droga.

Os animais tratados com a maior dose de EB (2,0 g/kg) de *L. brasiliense* apresentaram aumento na frequência de micronúcleos, quando comparados ao grupo controle negativo. Este valor encontra-se em conformidade com o encontrado por Moura et al. (1985) em um teste de toxicidade excessiva com extrato etanólico de *L. brasiliense*, o qual na dose de 2,0 g/kg, por meio da administração intravenosa (veia caudal), apresentou sinais expressivos de toxicidade. Dessa forma, pode-se considerar ser o EB testado de baixo potencial mutagênico nas condições experimentais avaliadas. No entanto, seu uso deve ser monitorado a fim de se evitar superdosagem e efeitos danosos ao organismo. Ensaio com algodãozinho do campo (*Cochlospermum regium* Mart.) demonstrou aumento significativo do número de micronúcleos na dose de 38,0 mg/kg (i.p.; 20% da DL<sub>50</sub>) e, relaciona-se esse efeito mutagênico à presença de flavonoides, 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, apresentaram sinais de toxicidade para o extrato metanólico e, esse efeito, foi relacionado à presença de flavonoides. 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**

De acordo com os resultados apresentados nesse estudo observa-se que após o tratamento prolongado com EB de *L. brasiliense*, os machos apresentaram-se mais susceptíveis aos efeitos do extrato. Sendo essa espécie vegetal usada popularmente por mulheres para regular os períodos menstruais, observa-se que o uso prolongado foi tolerado pelas fêmeas nesse estudo. Dessa forma pode-se concluir que o extrato de *L. brasiliense* apresenta-se com baixa ou ausência de toxicidade de acordo com as doses e metodologia avaliadas, nessa espécie animal.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Maristela Gabriel, Admir Arantes e Jailson Araujo Dantas pelo suporte técnico durante os experimentos. Este trabalho recebeu suporte do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP, Fundação Araucária. Agradecemos ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT\_if) pela bolsa de estudos para T.M Antonelli-Ushirobira (Grant#573663/2008-4). Agradecemos a Dr. Janet W. Reid, JWR Associates, Trumansburg, New York, pela tradução e revisão do inglês.

## **Conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses

## REFERÊNCIAS

- Andrade, F.d., Albuquerque, C.A.C.d., Maraschin, M., Silva, E.L.d., 2012. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: Results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 50, 328-334.
- Antonelli-Ushirobira, T.M., Kaneshima, E.N., Gabriel, M., Audi, E.A., Marques, L.C., Mello, J.C.P., 2010. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1817-1820.
- Berson, A., De Beco, V., Lettéron, P., Robin, M.A., Moreau, C., El Kahwaji, J., Verthier, N., Feldmann, G., Fromenty, B., Pessayre, D., 1998. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 114, 764-774.
- Blainski, A., Lopes, G.C., Mello, J.C.P., 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18, 6852-6865.
- BRASIL, 2013. ANVISA. GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Diário Oficial da União, Brazil.
- BRASIL, 2014. ANVISA. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos fitoterápicos. RDC no. 26. Diário Oficial da União, Brazil.
- Brito, A.S., 1994. Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo*. Editora da UNICAMP, Campinas, São Paulo.
- Campos, L.B., Gilgioni, E.H., Garcia, R.F., Brito, M.d.N., Natali, M.R.M., Ishii-Iwamoto, E.L., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., 2012. *Cimicifuga racemosa* impairs fatty acid  $\beta$ -oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 680-689.
- Cardoso, M.L.C., 1990. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento galênico de extratos. MS Thesis. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Carlini, E.A., Contar, J.D.P., Silva-Filho, A.R., Silveira-Filho, N.G., Frochtengarten, M.L., Bueno, O.F.A., 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 17, 37-64.
- Castro, D.B., Santos, D.B., Ferreira, H.D., Santos, S.C., Chen-Chen, L., 2004. Atividades mutagênica e citotóxica de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. *Rev. Bras. Plant. Med.* 6, 15-19.
- Charlton, M., Kasparova, P., Weston, S., Lindor, K., Maor-Kendler, Y., Wiesner, R.H., Rosen, C.B., Batt, K.P., 2001. Frequency of nonalcoholic steatohepatitis as a cause of advanced liver disease. *Liver Transpl.* 7, 608-614.

- COBEA, 2015. [http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_conteudo=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_conteudo=65) (Last accessed 10.01.15).
- Costa, M.A., Ishida, K., Kaplum, V., Koslyk, É.D.A., Mello, J.C.P., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V., 2010. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) for use as a pharmacological agent. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 58, 330-335.
- Day, C., James, O., 1998. Steatohepatitis: a tale of “two hits”? *Gastroenterology* 114, 842-845.
- Fagundes, F.A., Oliveira, L.B.d., Cunha, L.C., Valadares, M.C., 2005. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos (*Annona coriacea* induces genotoxic effect in mice). *Rev. Elet. Farm.* 2, 24-29.
- Faral-Tello, P., Mirazo, S., Dutra, C., Pérez, A., Geis-Asteggianti, L., Frabasil, S., Koncke, E., Davyt, D., Cavallaro, L., Heinzen, H., Arbiza, J., 2012. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *ScientificWorldJournal* 2012, 1-5.
- Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A., Rates, S.M.K., 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev. Bras. Ciênc. Farmacêut.* 42, 369-394.
- Fromenty, B., Pessayre, D., 1995. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 67, 101-154.
- Hissin, P.J., Hilf, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214-226.
- Jahns, R.T., Crescente, A.S., 1976. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluido de *Limonium brasiliense* Boiss, e *N*-acetil-*p*-aminofenol em musculatura lisa. *Trib. Pharm.* 44, 105-111.
- Kowaltowski, A.J., Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333-343.
- Kunitake, H., Koreeda, K., Mii, M., 1995. Morphological and Cytological Characteristics of protoplast-derived plants of *Statice* (*Limonium perezii* Hubbard). *Sci. Hortic.* 60, 305-312.
- Labbe, G., Pessayre, D., Fromenty, B., 2008. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fund. Clin. Pharmacol.* 22, 335-353.
- Moura, T.F.A.L., Schenkel, E.P., Schapoval, E.E.S., Simões, C.M.O., Santos, R.I.d., 1985. Estudos farmacológicos preliminares das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss) Kuntze - Plumbaginaceae (baicuru). *Cad. Farm.* 1, 45-54.
- Murray, A.R., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A., Mulet, M.C., 2004. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.* 59, 477-480.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Rodriguez, S.A., Vina, M.D., Murray, A.P., Leiro, J.M., 2011. Antiflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Planta Med.* 77, 1323-1323.



- 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., 2007. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *J. Ethnopharmacol.* 112, 319-326.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9-15.
- Tang, X.H., Gao, J., Chen, J., Xu, L.Z., Tang, Y.H., Zhao, X.N., Michael, L., 2008. Mitochondrial modulation is involved in the hepatoprotection of *Limonium sinense* extract against liver damage in mice. *J. Ethnopharmacol.* 120, 427-431.
- The Plant List, 2015. [www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Limonium](http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Limonium). Last accessed 02/03/2015.
- Tipoe, G.L., Leung, T.M., Liong, E.C., Lau, T.Y.H., Fung, M.L., Nanji, A.A., 2010. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver injury in mice. *Toxicology* 273, 45-52.
- Vilar, J.B., Ferreira, F.L., Ferri, P.H., Guillo, L.A., Chen, L.C., 2008. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.* 68, 141-147.
- Wolford, S.T., Schroer, R.A., Gohs, F.X., Gallo, P.P., Brodeck, M., Falk, H.B., Ruhren, R., 1986. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J. Toxicol. Environ. Health* 18, 161-188.

## Suplemento

Tabela A.1: Peso corporal final de ratos machos e fêmeas tratados por 90 dias com 50, 100, e 200 mg/kg de EB de *L. brasiliense*.

Dias	Peso corporal (g) (média±dp)			
	Controle	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
<b>Machos</b>				
1	222.85 ± 27.06	222.09 ± 21.14	227.49 ± 20.49	231.49 ± 11.92
7	277.24 ± 21.03	277.33 ± 21.55	276.90 ± 24.53	271.80 ± 26.23
14	309.40 ± 22.42	308.59 ± 27.08	307.00 ± 23.91	304.30 ± 28.83
21	340.27 ± 24.93	337.19 ± 26.95	329.59 ± 17.60	337.00 ± 27.65
28	364.84 ± 27.85	360.86 ± 29.17	357.14 ± 16.85	358.29 ± 24.89
35	378.82 ± 26.92	372.60 ± 34.01	370.47 ± 15.94	370.96 ± 25.02
42	399.95 ± 29.74	388.41 ± 34.93	387.50 ± 20.16	390.43 ± 28.40
49	412.72 ± 30.64	382.80 ± 82.34	401.74 ± 22.49	397.33 ± 35.05
56	425.59 ± 30.93	416.81 ± 38.70	397.99 ± 31.73	407.00 ± 36.40
63	437.88 ± 32.40	424.54 ± 42.08	407.31 ± 36.33	413.69 ± 41.61
70	443.66 ± 34.56	427.99 ± 45.70	413.40 ± 39.90	417.07 ± 43.10
77	452.31 ± 38.14	436.02 ± 42.54	420.59 ± 37.72	424.08 ± 41.52
84	460.50 ± 37.28	432.85 ± 57.57	433.77 ± 39.52	422.88 ± 40.63
91	468.21 ± 39.16	441.28 ± 55.46	429.50 ± 44.73	424.07 ± 54.45
98	474.55 ± 38.22	444.53 ± 61.51	427.27 ± 45.01	430.95 ± 54.45
<b>Fêmeas</b>				
1	166.49 ± 2.57	166.90 ± 5.44	170.44 ± 4.27	169.83 ± 2.74
7	184.54 ± 14.01	184.39 ± 9.40	190.56 ± 5.27	193.23 ± 5.14
14	203.82 ± 14.31	202.79 ± 11.82	207.64 ± 5.70	215.29 ± 8.59
21	218.47 ± 18.28	214.72 ± 11.65	220.43 ± 6.24	228.08 ± 13.02
28	231.86 ± 21.21	226.79 ± 12.38	233.28 ± 7.23	236.71 ± 12.36
35	242.16 ± 19.35	237.75 ± 12.32	242.20 ± 7.27	247.02 ± 13.16
42	253.74 ± 24.28	247.54 ± 11.64	252.23 ± 8.38	257.83 ± 12.55
49	261.05 ± 25.08	252.87 ± 12.27	258.63 ± 8.62	265.55 ± 15.45
56	265.10 ± 25.61	257.65 ± 12.55	261.52 ± 10.19	269.39 ± 15.59
63	270.35 ± 27.97	264.86 ± 13.10	265.78 ± 9.74	273.47 ± 17.12
70	271.48 ± 27.00	266.41 ± 14.42	267.48 ± 12.00	274.34 ± 15.27
77	279.19 ± 30.28	271.15 ± 14.34	268.77 ± 13.56	276.36 ± 20.15
84	281.46 ± 30.74	271.82 ± 14.01	272.92 ± 13.54	276.33 ± 23.97
91	296.26 ± 38.24	275.59 ± 17.29	275.03 ± 14.46	280.65 ± 21.68
98	287.99 ± 33.41	280.68 ± 19.39	279.70 ± 16.61	283.43 ± 16.63

Tabela A.2: Peso relativo dos órgãos dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento crônico com EB de *L. brasiliense*.

Órgãos	Peso relativo (g) (média±dp)			
	Controle	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
<b>Machos</b>				
Fígado	2.92 ± 0.22	2.90 ± 0.23	3.13 ± 0.14	2.88 ± 0.38
Baço	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Coração	0.34 ± 0.03	0.32 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.04
Pulmões	0.49 ± 0.08	0.49 ± 0.07	0.59 ± 0.15	0.62 ± 0.19
Rim D	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.06	0.32 ± 0.02
Rim E	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.34 ± 0.07	0.32 ± 0.02
Adrenal D	0.007 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.009 ± 0.005	0.009 ± 0.003
Adrenal E	0.007 ± 0.002	0.009 ± 0.003	0.009 ± 0.004	0.008 ± 0.002
Testículo D	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.36 ± 0.05
Testículo E	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.37 ± 0.04
<b>Fêmeas</b>				
Fígado	2.68 ± 0.29	2.70 ± 0.25	2.75 ± 0.16	2.69 ± 0.17
Baço	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.02
Coração	0.34 ± 0.04	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.09
Pulmões	0.54 ± 0.06	0.59 ± 0.15	0.53 ± 0.08	0.65 ± 0.23
Rim D	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Rim E	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.01	0.30 ± 0.04
Adrenal D	0.013 ± 0.004	0.014 ± 0.005	0.015 ± 0.008	0.017 ± 0.004
Adrenal E	0.016 ± 0.005	0.013 ± 0.006	0.015 ± 0.006	0.013 ± 0.006
Útero	0.24 ± 0.08	0.22 ± 0.10	0.24 ± 0.08	0.17 ± 0.03
Ovário D	0.019 ± 0.005	0.020 ± 0.004	0.023 ± 0.006	0.018 ± 0.05
Ovário E	0.019 ± 0.005	0.020 ± 0.006	0.025 ± 0.005	0.021 ± 0.008

Tabela A.3: Teste do campo aberto (mov/5 min) de ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento crônico com EB de *L. brasiliense* (média±dp).

	Controle	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
<b>Machos</b>				
Movimento	47.40 ± 11.48	45.90 ± 20.23	38.33 ± 17.45	39.75 ± 21.97
Rearing	23.10 ± 8.07	24.00 ± 10.11	22.66 ± 9.23	20.50 ± 9.53
Limpeza	9.40 ± 3.86	10.00 ± 7.19	12.22 ± 4.29	13.12 ± 8.39
Micção	0.90 ± 1.19	0.60 ± 0.84	0.77 ± 1.39	0.62 ± 1.40
Defecação	4.30 ± 2.90	3.80 ± 2.65	5.33 ± 2.91	3.87 ± 2.99
<b>Fêmeas</b>				
Movimento	77.40 ± 22.04	76.90 ± 20.39	76.10 ± 18.41	70.33 ± 22.22
Rearing	21.20 ± 8.77	20.45 ± 8.47	25.40 ± 9.97	22.33 ± 12.54
Limpeza	12.00 ± 3.74	14.72 ± 4.02	10.70 ± 4.57	13.22 ± 10.02
Micção	0.80 ± 1.54	0.63 ± 0.92	0.70 ± 1.05	0.44 ± 0.88
Defecação	4.30 ± 3.19	4.36 ± 4.71	3.30 ± 3.23	4.33 ± 4.18

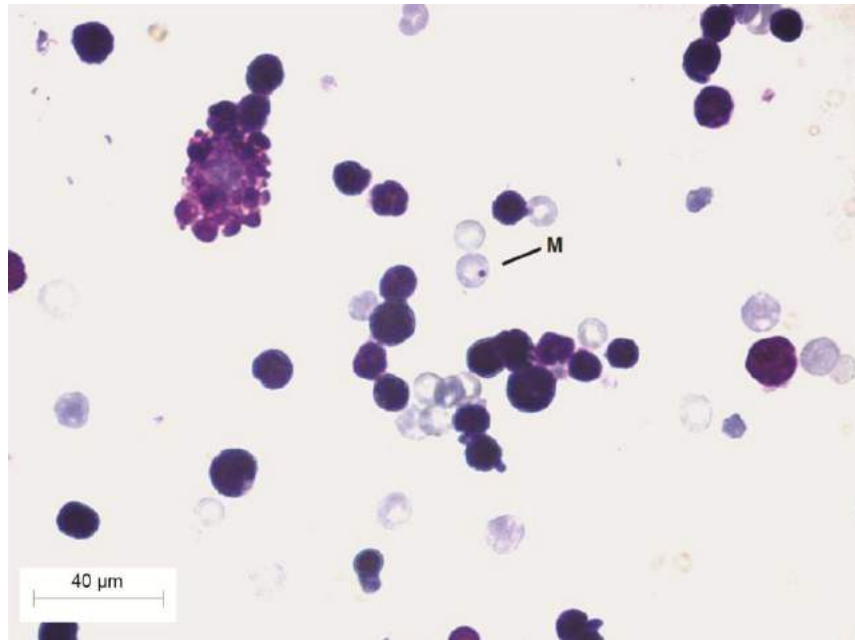


Figura A.1: Fotomicrografia do esfregaço de medula óssea (1000 ×) no ensaio de mutagenicidade do EB de *L. brasiliense*. Legenda: M – eritrócito policromático micronucleado; Barra de calibração - 40 μm.

### **CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE HORMONAL**

---

Este capítulo contém os resultados parciais da avaliação *in vivo* da atividade hormonal do extrato bruto de *Limonium brasiliense*.

## **Avaliação do extrato bruto de *Limonium brasiliense* sobre o ciclo estral de ratas: estudo etnofarmacológico**

Tânia Mara Antonelli-Ushirobira<sup>a</sup>, Andressa Blainski<sup>a</sup>, Flávia Vitorino Constantino<sup>b</sup>, Jairo Amadias Timiro<sup>b</sup>, Helena Kaminami Morimoto<sup>c</sup>, Márcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>d</sup>, Eneri Vieira de Souza Leite-Mello<sup>e</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>b</sup>Acadêmicos de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>e</sup>Departamento de Ciências Morfológicas Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

### **RESUMO**

*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze é uma espécie da biodiversidade brasileira utilizada popularmente no sul do Brasil para tratar distúrbios do ciclo menstrual. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade hormonal do extrato bruto (EB) dos rizomas de *L. brasiliense* em um modelo experimental *in vivo*. Ratas Wistar imaturas, com 21 dias de vida, foram divididas em grupos (n=6) os quais receberam, por gavagem durante 28 dias, água (CN); 400 µg/kg de valerato de 17β-estradiol (CP) ou EB em diferentes doses (12,5; 25; 50; 100 ou 200 mg/kg). Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso corporal, consumo de ração, abertura do canal vaginal, citologia da secreção vaginal para determinação da fase estral, análise uterotrófica e histologia dos órgãos reprodutores, útero, ovários e vagina. Os resultados demonstraram não haver diferença estatística entre os grupos para avaliação ponderal e consumo de ração. Os parâmetros de avaliação da atividade hormonal demonstraram retardo na idade de abertura do canal vaginal em todos os grupos tratados com EB, quando comparados ao grupo CP. O aumento do peso relativo do útero, o ciclo estral com predominância na fase diestro, as dosagens de estrogênio e progesterona relacionadas com a fase do ciclo estral e a análise histológica dos órgãos útero, ovários e vagina demonstram, quando analisados em conjunto, tendência da ação da progesterona por uma possível interferência na ação do estrogênio nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg. Os resultados encontrados apontam para um possível efeito sobre o sistema reprodutor feminino, e poderia estar relacionado com o uso popular dessa espécie vegetal como regulador hormonal.

## 1. Introdução

Com os avanços nas áreas da química farmacêutica e nas tecnologias para bioensaios, observa-se um aumento nas chances de descoberta e produção de novas drogas naturais e sintéticas a partir de estudos etnofarmacológicos, principalmente quando comparados a outros programas de desenvolvimento de novas drogas sintéticas (TELEFO et al., 2011; BUTTERWECK & NAHRSTEDT, 2012; BOLSON et al., 2015).

É inegável que maiores informações e esclarecimentos têm sido apresentados à Ciência a partir do aumento dos estudos sobre a medicina popular. Dessa forma, nota-se um constante aumento no uso de plantas medicinais, os quais têm surgido como uma estratégia terapêutica na profilaxia e/ou tratamento das doenças, sendo usadas para várias finalidades e, por vezes, associadas com medicamentos da terapêutica convencional (VALE, 2002; SILVEIRA et al., 2008; GERTSCH, 2009).

Neste contexto, os tratamentos com plantas medicinais para saúde reprodutiva feminina tem ganhado espaço entre as mulheres que frequentemente recorrem a terapias complementares. Isto se deve ao fato dos tratamentos convencionais, como as reposições hormonais, não serem as opções preferidas para uma parcela das mulheres que apresentam algum problema de saúde reprodutiva, ou ainda, o fato destes tratamentos ainda estarem indisponíveis ou inacessíveis para muitas mulheres de países de baixa renda (VAN DIE, 2013; VAN ANDEL et al., 2014).

Entre os distúrbios relacionados à saúde reprodutiva feminina, aqueles que envolvem as desordens menstruais estão entre os que mais afetam a qualidade de vida de grande parte das mulheres em idade reprodutiva. Esses distúrbios incluem: amenorreia, polimenorreia, oligomenorreia, hipomenorreia, menorragia, dismenorreia e tensão pré-menstrual (TPM) (YASIN et al., 2012; BATHIA et al., 2015).

A menstruação pode ser considerada o aspecto mais incômodo no ciclo reprodutivo feminino. Embora muitas plantas sejam usadas para tratar os distúrbios menstruais, muito poucas espécies foram, até agora, estudadas por suas atividades farmacológicas relacionadas ao tratamento dos distúrbios menstruais (VAN ANDEL et al., 2014; BATHIA et al., 2015).

Entre as plantas da biodiversidade brasileira, encontra-se o *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, conhecido como baicuru, cujos rizomas são empregados popularmente como antisséptico nas infecções geniturinárias, adstringente, depurativo e, principalmente, para tratar distúrbios menstruais como, TPM, cólicas e também como regulador dos períodos menstruais (MOURA, et al., 1985; CARDOSO, 1990).

Estudo morfo-anatômico dos rizomas de *L. brasiliense* com objetivo de auxiliar nas análises farmacognósticas do material vegetal foi realizado por Antonelli-Ushirobira et al. (2015). Análises químicas dessa espécie demonstraram a presença de diversos compostos, entre os quais podem ser relacionados o ácido elágico, ácido gálico, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, saponinas, cumarinas, isoflavonas e flavonoides (ROSITO, 1975; JAHNS & CRESCENTE, 1976; MOURA et al., 1984; MURRAY et al., 2004).

Diversas atividades biológicas foram testadas para *L. brasiliense*, o qual tem sido descritas como positivas e promissoras: atividade antioxidante, atividade bacteriostática, anti-inflamatória e antiviral (ROSITO, 1975; RODRIGUES et al., 2011; FARAL-TELLO et al., 2012). A toxicidade excessiva foi avaliada no trabalho de Moura et al. (1985). A ação farmacológica foi avaliada, em ensaio clínico, por Jahns & Crescente (1976), os quais demonstraram que uma formulação contendo extrato fluido de *L. brasiliense* apresentou ação terapêutica nos casos de dismenorreias, leucorreias, metrorragias e amenorreias secundárias. Estudo de avaliação da atividade hormonal com o EB de *L. brasiliense* por 14 dias em ratas imaturas foi realizado por Blainski (2010). Já a avaliação *in vivo* da toxicidade pré-clínica aguda e crônica, do estado redox do fígado e da mutagenicidade do EB dos rizomas de *L. brasiliense* foi realizado por Antonelli-Ushirobira et al. (2015) como descrito no capítulo 2 deste trabalho.

Tendo em vista os poucos estudos envolvendo essa espécie vegetal, e o uso popular relacionado ao tratamento das desordens menstruais, o presente trabalho objetivou avaliar um possível efeito hormonal do extrato bruto dos rizomas de *L. brasiliense*.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Material botânico*

A matéria-prima vegetal foi adquirida em Maio de 2010 de produtores rurais na cidade de Rio Grande, Ilha dos Marinheiros, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (31°59'33"S, 052°10'43"W). A coleta do material vegetal foi realizada sob a permissão do IBAMA-SISBIO, No. 11995-3, de 2 de Novembro de 2010, código de autenticação 46367613, sob a responsabilidade de J. C. P. Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registrado sob no. 010252/2015-0. Exsicatas encontram-se depositadas nos Herbários das Universidades Estadual de Maringá e Federal do Rio Grande sob no. HUEM#21151 e FURG#5136, respectivamente. Os rizomas foram secos em estufa de ar circulante em temperatura de  $37 \pm 2$  °C, sendo posteriormente moído em moinhos de martelos (Tigre ASN-5).

### *2.2. Preparo do extrato*

O extrato bruto (EB) foi preparado em Ultra-Turrax (UTC 115 KT, IKA®, Wilmington, NC, USA, 6 x 5 min,  $t < 40$  °C) a partir dos rizomas de *L. brasiliense* (5,6 kg) utilizando-se acetona:água (7:3, v/v; 56 L) em uma proporção de 10% (p/v). Em seguida, o extrato foi filtrado e o solvente orgânico retirado *in vacuo* e liofilizado, obtendo-se um rendimento de 28,30% de extrato liofilizado. O conteúdo de polifenóis totais (23,5%) foi determinado no extrato pelo método descrito por Blainski et al. (2013), o qual corresponde a 250,29 mg de pirogalol/g de rizomas.



### 2.3. Animais

Ratas Wistar imaturas com 21 dias de vida (40 a 50 g) foram adquiridas do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Elas foram mantidas em biotério experimental exclusivo no Departamento de Farmácia da UEM, sob condições ambientais controladas ( $22\pm 2$  °C, ciclo claro-escuro de 12 h e umidade relativa de  $50\pm 10\%$ ), e receberam água e alimento *ad libitum*. Os animais foram aclimatados em biotério setorial por dois dias antes do início dos experimentos.

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos de acordo com o padronizado pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA, 2015) e foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação – CEAE da Universidade Estadual de Maringá (Parecer no. 064/2011 – Anexo 3).

### 2.4. Avaliação Hormonal

#### 2.4.1. Metodologia

Para a avaliação hormonal seguiu-se o descrito por Dalsenter (2004) com algumas alterações. Ratas imaturas (42 animais) foram divididas em 7 grupos ( $n=6$ ) e tratadas diariamente por gavagem por período de 28 dias. Os grupos controle negativo (CN) e controle positivo (CP) receberam água e valerato de  $17\beta$ -estradiol (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), respectivamente. Os grupos tratados receberam EB nas doses de 12,5, 25, 50, 100, ou 200  $\text{mg}/\text{kg}$ . Os animais foram pesados no 1º dia do experimento para determinação da dose a ser administrada e posteriormente a cada 4 dias para correção da dose até o 28º dia, quando então as ratas foram anestesiadas com pentobarbital (0,1 mL/100 g de peso do animal), o sangue retirado para dosagem hormonal e útero, ovários e vagina retirados e enviados para avaliação histológica. A ração foi pesada a cada 3 dias, antes de ser fornecida às ratas, e o consumo considerado pela diferença nas pesagens e calculado na forma de alimento diário por grupo ( $\text{g}/\text{dia}$ ). Diariamente as ratas foram submetidas à coleta de secreção vaginal. Os animais do grupo CP foram mantidos em biotério separado dos demais grupos.

#### 2.4.2. Avaliação da abertura do canal vaginal e citologia da secreção vaginal

Diariamente, as ratas foram submetidas à verificação visual da abertura do canal vaginal, onde, a partir da ocorrência do mesmo, todos os dias pela manhã, entre 9:30 e 10:00 h, foram coletadas amostras da secreção vaginal com auxílio de uma pipeta automática contendo de 10 a 20  $\mu\text{L}$  de salina. O material foi colocado em lâminas e avaliado à fresco em microscópio de luz (objetivas de 10 e  $40\times$ ) para monitoramento da fase do ciclo estral das ratas durante o experimento (MARCONDES et al., 2002).

#### 2.4.3. Análise uterotrópica

Após 24 h da administração da última dose, os animais foram anestesiados com pentobarbital (0,1 mL/100 g de peso do animal) e os ovários, útero e vagina foram retirados, livres de toda gordura, e o útero foi pesado. O resultado foi expresso como peso relativo (peso do útero/peso corporal  $\times$  100) (DALSENTER et al., 2004; BOLLE et al., 2007). A morte dos animais foi realizada com sobredose do anestésico (pentobarbital – 120 mg/kg).

#### 2.4.4. Análise histológica

Os órgãos retirados foram fixados em solução fixadora de Bouin por 24 h e, após, mantidos em álcool 70% (HAZARIKA & SARMA, 2006), sendo, posteriormente processados, preservados em parafina e seccionados em cortes semisseriados de 7  $\mu$ m (4 cortes por lâmina; 2 lâminas por rata) e corados com HE (hematoxilina e eosina).

As lâminas histológicas foram analisadas sob microscopia de luz (objetivas de 2 $\times$  para ovário, 20 $\times$  para vagina e 40 $\times$  para útero) acoplada à captura de imagem e a arquitetura histológica dos tecidos foi observada e fotomicrografada.

#### 2.4.5. Dosagem hormonal

Os testes hormonais para determinação quantitativa de estrogênio e progesterona, em soro dos animais, foram realizados empregando-se a técnica de quimioluminescência. Para os ensaios utilizaram-se kits ARCHITECT (Abbott Laboratórios do Brasil, Divisão Diagnósticos). As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina, pela Farmacêutica Mestre Helena Kaminami Morimoto.

#### 2.4.6. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa Statistica® 8.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão e os mesmos foram analisados utilizando-se análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey considerando-se  $p < 0,05$  como critério de significância.

### 3. Resultados

Durante o período de tratamento de 28 dias ocorreu a morte de um animal na dose de 200 mg/kg. A avaliação ponderal demonstrou não haver diferença estatística entre os grupos ao final do tratamento quando comparados ao grupo CN, e mostrou também ganho de peso nos animais. No entanto, o grupo tratado com 100 mg/kg apresentou diferença estatística com relação ao grupo CP e apresentou também um menor ganho de peso relativo quando comparado ao grupo CN (Figura 1). O

consumo de ração avaliado durante o período também não demonstrou diferença estatística entre os grupos. Os dados encontram-se demonstrados na tabela 1

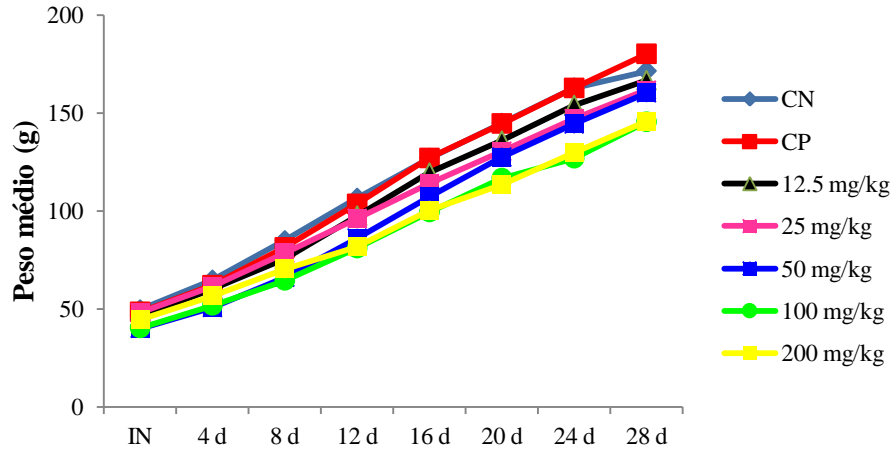


Figura 1: Avaliação ponderal dos animais tratados por 28 dias com EB de *L. brasiliense* nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Os valores estão expressos em média±dp.

Tabela 1: Consumo de ração dos animais tratados por 28 dias com EB de *L. brasiliense* nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média (g) ± dp [cv (%)].

Grupos	Consumo de ração
CN	61,8±5,7[9,2]
CP	64,5±8,8[13,8]
12,5 mg/kg	65,8±6,6[10,09]
25 mg/kg	62,4±9,4[15,1]
50 mg/kg	63,0±11,8[18,7]
100 mg/kg	54,8±10,5[19,1]
200 mg/kg	57,8±6,2[10,7]

Teste ANOVA seguida do Teste de Tukey considerando nível de significância de 5%

Os dados referentes à abertura do canal vaginal apresentaram-se com variação pequena, demonstrando homogeneidade, o que foi confirmado pelo teste Shapiro-Will Test. Neste ensaio foi possível caracterizar a maturação sexual acelerada no grupo CP, no entanto, nos grupos tratados com EB de *L. brasiliense* observou-se retardo na idade de abertura do canal vaginal, que foi maior na dose de 100 mg/kg e estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Idade e peso no dia de abertura do canal vaginal dos animais tratados por 28 dias com EB de *L. brasiliense* nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média±dp [cv (%)]

Grupos	Idade de abertura (dias)	Peso dos animais
CN	29,33±1,75 [5,97] <sup>+</sup>	72,04±7,79 [10,81]
CP	26,29±0,95 [3,62]	56,82±8,31 [14,62]
12,5 mg/kg	32,0±2,45 [7,65]*	82,79±8,44 [10,20]
25 mg/kg	31,0±1,79 [5,77]* <sup>+</sup>	79,90±15,99 [20,01]
50 mg/kg	30,6±1,52 [4,96]* <sup>+</sup>	67,06±5,27 [7,86]
100 mg/kg	34,83±2,48[7,13]*	75,39±13,32 [17,67]
200 mg/kg	33,0±2,92[8,83]*	69,19±8,13 [11,75]

Teste ANOVA seguida do Teste de Tukey considerando nível de significância de 5%; \*p<0,05 estatisticamente diferente do grupo CP; +p<0,05 estatisticamente diferente do grupo 100 mg/kg

A citologia da secreção vaginal determinou a fase estral de cada rata. As ratas do grupo CN submetidas ao tratamento de 28 dias apresentaram ciclos estrais normais. No entanto, as ratas do grupo CP apresentaram células anucleadas, características da fase estro, durante 14 dias de tratamento, e após este período, o ciclo tornou-se irregular, com variações celulares na secreção vaginal. As ratas tratadas com EB também apresentaram ciclo estral irregular, onde se observou predominância celular característica da fase diestro.

O ensaio uterotrópico demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos quando comparados ao grupo CN (Tabela 3).

Tabela 3: Peso relativo do útero dos animais em fase estro e fase diestro tratados por 28 dias com EB de *L. brasiliense* nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média±dp

Grupos	Peso relativo (animais em fase estro)	Peso relativo (animais em fase diestro)
CN	0,26±0,10	0,22±0,03
CP	0,34±0,19	0,4±0,0
12,5 mg/kg	0,27±0,08	0,32±0,08
25 mg/kg	0,35±0,06	0,30±0,24
50 mg/kg	0,31±0,12	0,23±0,0
100 mg/kg	0,28±0,09	0,20±0,0
200 mg/kg	0,45±0,06	

Teste ANOVA seguida do Teste de Tukey considerando nível de significância de 5%

Os valores referentes à dosagem hormonal de estrogênio e progesterona de cada grupo testado encontram-se na tabela 4, demonstrando haver diferença estatística do grupo CP com CN e o grupo tratado com EB na dose de 12,5 mg/kg. A análise desses hormônios também auxiliou na determinação da fase estral de cada animal no momento da morte.

Tabela 4: Dosagens hormonais dos animais tratados por 28 dias com EB de *L. brasiliense* nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média±dp

<b>Grupos</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Estrogênio</b>
CN	24,92±21,26	25,16±3,43*
CP	26,68±37,02	46,28±8,82*
12,5 mg/kg	20,61±7,53	25,66±7,47*
25 mg/kg	25,96±11,58	32,66±8,16
50 mg/kg	22,58±12,12	34,70±11,14
100 mg/kg	17,65±4,98	33,33±12,37
200 mg/kg	12,22±1,08	33,00±8,39

Teste ANOVA seguida do Teste de Tukey considerando nível de significância de 5%; \*p<0,05 estatisticamente diferente do grupo CP.

A análise histológica dos tecidos vaginal, uterino e ovariano, demonstrou características morfológicas distintas entre os grupos testados para avaliação da atividade hormonal. As ratas do grupo CN apresentaram estruturas morfológicas bem características dos órgãos analisados e, para facilitar as análises, foram divididas em dois grupos, as que se encontravam no último dia de experimento na fase metaestro ou diestro e as que estavam na fase proestro ou estro.

As ratas que se encontravam na fase metaestro ou diestro apresentaram o endométrio uterino com aspecto normal, porém, visualmente espesso, com presença de muitas glândulas e lúmen estreito; no corte transversal da vagina não foi observada queratinização das células epiteliais e, os ovários apresentaram vários folículos ovarianos em diferentes estágios de maturação e presença de corpo lúteo (Figura 2A, B e C). As ratas que se encontravam na fase proestro e estro apresentaram o endométrio uterino característico para a fase estando menos espesso, lúmen grande e a presença de glândulas em menor quantidade; o epitélio vaginal apresentou-se queratinizado, com células vacuolizadas e o ovário também apresentou vários folículos e corpo lúteo. Essas características observadas estão em conformidade com o padrão normal do ciclo estral das ratas, bem como a atuação dos hormônios sobre cada fase do ciclo e sobre os órgãos avaliados.

Para as ratas do grupo CP era esperado que as observações histológicas dos órgãos estivessem adequadas às ratas que se encontram na fase estro, uma vez que receberam estrogênio durante todo o período de tratamento. No entanto, como previamente descrito, esses animais mantiveram-se nessa

fase durante metade do tempo de tratamento (14 dias). Assim, o que foi observado nos cortes aproxima-se do padrão de uma rata com ciclos regulares. Foi observada a presença de muitos folículos nos ovários em diferentes fases, mas também ocorreu a presença de corpo lúteo (Figura 2D, E e F).

As ratas que receberam EB de *L. brasiliense* apresentaram características histológicas muito semelhantes entre todos os grupos, equivalentes às observadas nos animais CN nas fases metaestro e diestro. O útero apresentou-se com muitas glândulas, endométrio espesso e lúmen pequeno; nos ovários foi visualizada a presença de muitos corpos lúteos e de folículos ovarianos em menor escala (Figura 3A a O).

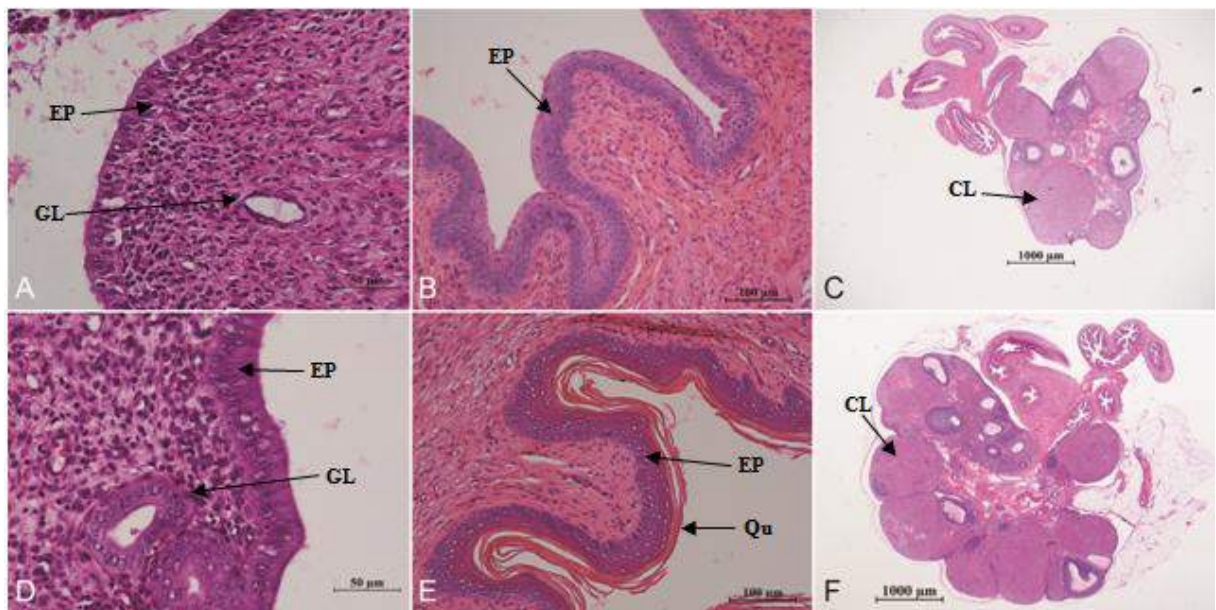


Figura 2: Fotomicrografia de cortes histológicos de 7  $\mu\text{m}$  de útero (A e D), vagina (B e E) e ovário (C e F), coradas com HE, de ratas CN (A, B, C) e ratas CP tratadas com  $17\beta$ -estradiol (D, E, F). CN: controle negativo, CP: controle positivo. GL: glândulas, EP: epitélio endometrial, Qu: queratina, CL: corpo lúteo.



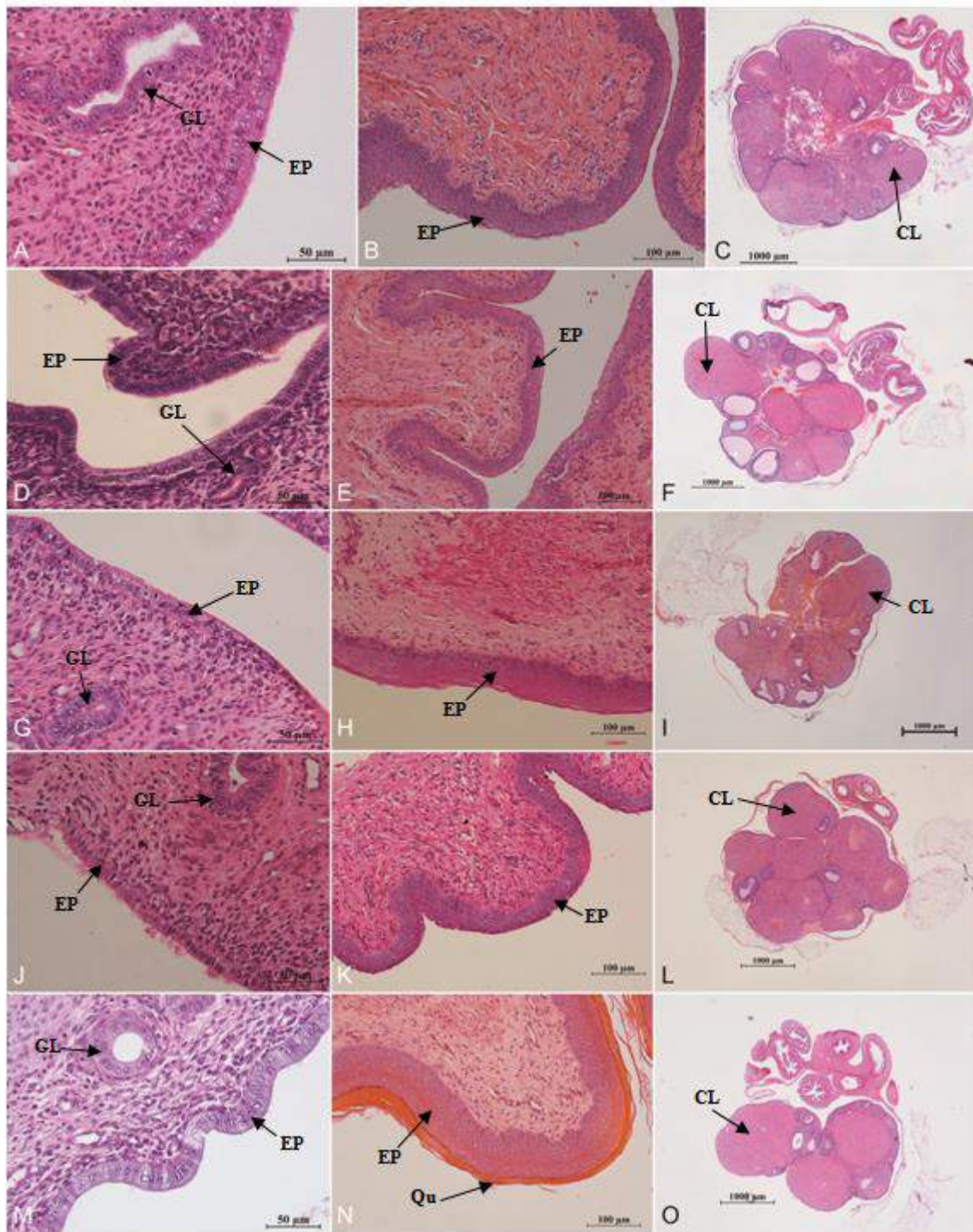


Figura 3: Fotomicrografia de cortes histológicos de 7  $\mu$ m de útero (A, D, G, J, M), vagina (B, E, H, K, N) e ovário (C, F, I, L, O), coradas com HE, de ratas tratadas com EB de *L. brasiliense* nas doses de 12,5 mg/kg (A, B, C), 25 mg/kg (D, E, F), 50 mg/kg (G, H, I), 100 mg/kg (J, K, L) e 200 mg/kg (M, N, O). EB: extrato bruto, GL: glândulas, EP: epitélio endometrial, Qu: queratina, CL: corpo lúteo.

#### 4. Discussão

Durante o período de tratamento nenhuma alteração clínica foi observada nos animais. A morte de uma rata ocorrida na dose de 200 mg/kg, não comprometeu o andamento do experimento e as análises estatísticas. A avaliação ponderal é importante parâmetro indicador do desenvolvimento do animal, assim como o consumo de ração. Nesse estudo as ratas tratadas com EB nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram, a partir do 8º dia, um menor ganho de peso em relação aos grupos CN e CP, entretanto, essa diferença foi dissipada após o 24º dia em relação ao CN. A diferença estatística persistiu somente no grupo de 100 mg/kg em relação ao CP, indicando não haver relação dose-dependente. O consumo de ração não se mostrou alterado em nenhum dos grupos testados.

Para a avaliação do efeito hormonal do EB de *L. brasiliense* a abertura do canal vaginal marca o início da maturação sexual nas ratas, e ocorre por volta dos 30 dias de vida (CHORILLI et al., 2007). No grupo CN pode-se observar que o tempo médio para a abertura do canal vaginal ( $29,33 \pm 1,75$ ) esteve próxima do relatado pela literatura.

No grupo CP observou-se diminuição no tempo médio para a abertura do canal vaginal ( $26,29 \pm 0,95$ ), demonstrando maturação sexual acelerada. Esse resultado demonstra que a administração da substância estrogênica apresentou a ação esperada. Em estudo realizado por Sookvanichsilp et al. (2008) a administração subcutânea de  $17\beta$ -estradiol, por 3 dias, em ratas imaturas (21-22 dias), produziu antecipação na abertura do canal vaginal de 5 ratas ( $n=6$ ), quando comparadas ao grupo controle negativo, no qual nenhum dos animais apresentou abertura do canal vaginal.

Efeito contrário pode ser observado com os animais dos grupos tratados com EB de *L. brasiliense*, os quais apresentaram tendência em aumentar o tempo médio de abertura do canal vaginal. Observou-se, também, que nesses animais houve retardo no aparecimento da primeira fase estro que caracteriza a ação estrogênica. Esses grupos foram estatisticamente diferentes do grupo CP.

As diversas fases do ciclo estral podem ser identificadas pela avaliação citológica da secreção vaginal, a qual pode também informar qual efeito hormonal encontra-se predominante. As ratas do grupo CN apresentaram-se com ciclo estral normal. As ratas do grupo CP era esperado que apresentassem durante todo o período de tratamento células anucleadas, típicas de fase estro, caracterizando efeito estrogênico. Entretanto, esse perfil manteve-se por 14 dias, e após, as ratas começaram a apresentar ciclo estral irregular, com variações celulares na secreção vaginal. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira et al. (2010) em um estudo realizado com dois grupos de ratas virgens e púberes, onde um grupo recebeu água e outro recebeu valerato de estradiol na concentração de  $0,125 \mu\text{g}$  por 28 dias. Durante o período, o ciclo estral foi acompanhado pela avaliação citológica da secreção vaginal, onde os autores observaram que o hormônio não foi capaz de alterar as fases do ciclo estral e manter os animais na fase estro.

Após o tratamento com EB de *L. brasiliense* observou-se que o ciclo estral foi expandido para além de 4-5 dias, com predominância da fase diestro e encurtamento da fase estro. De acordo com



Alberti et al. (2002) a ovulação ocorre na fase de proestro, sendo a fase estro pós-ovulatória, em ratas com ciclo estral normal.

O ensaio uterotrópico é um dos testes mais utilizados para avaliar a atividade estrogênica de uma substância teste, e consiste na habilidade dessa substância em promover o crescimento uterino (ODUM et al., 1997). Os resultados da avaliação uterotrópica demonstraram aumento significativo de peso relativo do útero nos animais que receberam estrogênio em relação ao grupo CN. Este aumento já era esperado uma vez que a administração de estrogênio promove ação uterotrópica positiva (DALSENER et al., 2004; BOLLE et al., 2007). Nos animais que receberam EB de *L. brasiliense* verificou-se uma tendência ao aumento do peso relativo do útero nos animais em fase estro no momento da morte, no entanto, esse efeito não pode ser considerado dose-dependente. Estudo para avaliar a atividade antiovolatória do extrato etanólico de *Portulaca oleraceae* L., ratas não-ovariectomizadas receberam o extrato em doses de 250 ou 500 mg/kg, que promoveu significativo aumento no peso uterino em ambas as doses (LONDONKAR & HANUMANATAPPA, 2013). Lembè et al. (2012) destacam que uma provável explicação para o efeito uterotrópico positivo de alguns extratos vegetais é a presença de fitoestrógenos. De acordo com Johnson et al. (2003 apud OLIVEIRA et al., 2005), o estrógeno além de induzir o aumento no peso uterino e provocar proliferação endometrial, induz receptores para progesterona.

As dosagens bioquímicas dos hormônios estrogênio e progesterona demonstraram que as doses de 25 a 100 mg/kg do EB foram representativas para se determinar a melhor dose de tratamento, no que se refere a um possível efeito da progesterona, ocasionada pelo aumento dos receptores desta pelo EB, possivelmente levando a modulação da ação estrogênica.

Durante o ciclo estral das ratas observa-se fases de atuação do estrogênio (proestro e estro) e fases de atuação da progesterona (metaestro e diestro) (CONCEIÇÃO et al., 2005). Esses hormônios são responsáveis pelas alterações morfológicas nos órgãos sexuais das ratas, útero, ovários e vagina (GOMES et al., 2007). De acordo com Datta et al. (1968 apud CRUZ et al., 2004) o colo uterino de ratas na fase estro e metaestro é revestido externamente por um epitélio estratificado queratinizado, enquanto que na fase diestro e proestro não há presença de queratina. Segundo Nascimento e Santos (2002 apud OLIVEIRA et al., 2005) a parede do útero encontra-se mais espessa nas fases de metaestro e diestro. Todas essas características histológicas foram observadas no grupo CN, estando, portanto os mesmos em conformidade com a literatura. O grupo CP, por não apresentarem constância na fase estro também demonstraram as mesmas características do CN, condizentes com a fase estral no momento da morte do animal. As características histológicas apresentadas pelos animais tratados com EB de *L. brasiliense* seguem o descrito para as características histológicas com predomínio de ação da progesterona.

Em um estudo clínico envolvendo 36 pacientes com diversas queixas associadas a distúrbios menstruais (amenorreia, dismenorreia, leucorreia, metrorragia), Jahns e Crescente (1976), testaram a associação de um extrato fluido de *L. brasiliense* com analgésico usado para aliviar a dor em casos de

dismenorreia. Os resultados encontrados referem-se à capacidade de reduzir total ou parcialmente as queixas das voluntárias. Neste estudo obteve-se 30 casos relatados como efeito excelente, 5 casos de efeito bom e somente um caso apontado como efeito regular. Este estudo demonstra a ação terapêutica dessa espécie vegetal condizente com seu uso popular.

## 5. Conclusão

Todos os parâmetros avaliados para a determinação da atividade hormonal só podem ser considerados válidos quando analisados em conjunto. Dessa forma, o retardo na idade de abertura do canal vaginal, o aumento do peso uterino e o prolongamento da fase diestro no ciclo estral dos animais são indicativos de que o extrato bruto de *Limonium brasiliense* apresenta ação sobre o sistema reprodutor. Este resultado pode ser relacionado com o uso popular de *L. brasiliense* como regulador hormonal.

## Referências

- ALBERTI, L.R.; VASCONCELLOS, L.S.; PETROIANU, A.; NUNES, M.B. Avaliação morfofuncional do auto-implante ovariano no retroperitônio. *Medicina*, v.35, p.30-35, 2002.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.A.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H.G.; MOURA-COSTA, G.F.; COSTA, M.A.; CAMPOS, L.B.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L.; KANESHIMA, E.N.; BECKER, T.C.A.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.174, p.293-298, 2015.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.A.; BLAINSKI, A.; GANCEDO, N.C.; GABURO, F.; CARDOSO, K.A.K.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.25, p.320-327, 2015.
- BHATIA, H.; SHARMA, Y.P.; MANHAS, R.K.; KUMAR, K. Traditional phyto-remedies for the treatment of menstrual disorders in district Udhampur, J&K, India. *Journal of Ethnopharmacology*, v.160, p.202–210, 2015.
- BLAINSKI, A. *Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade in vivo de Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 133 f., 2010.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, v.18, p.6852-6865, 2013.
- 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.262–269, 2007.

- BOLSON, M.; HEFLER, S.R.; CHAVES, E.I.D.; GASPAROTTO JR., A., CARDOZO JR, E.L. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.161, p.1-10, 2015.
- BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. *Planta Medica*, v.78, p.747–754, 2012.
- 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.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, n.1, p.11-23, 2007.
- COBEA, 2015. [http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_conteudo=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_conteudo=65) (Acessado em 11.08.15)
- CONCEIÇÃO, A.P.M.; BATISTA, A.P.C.; ARAÚJO, A.C.C.; SILVA, F.C.A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C. Análise histológica da endometriose em ratas durante as fases do ciclo estral. *Arq. Inst. Biol.* v.72, p.439–443, 2005.
- DATTA, I.C., KARKUN, J.N., KAR, A.B. Studies on physiology and biochemistry of the cervix. Effect of estrogen and progesterone on the rat cervix. *Acta Biol Med Germ*, v.20, p.155–162, 1968 apud CRUZ, F.C.M.; SOARES JUNIOR, J.M.; MOSQUETTE, R.; BARACAT, E.C.; SIMÕES, M.J. Aspectos morfológicos da junção escamo-colunar de ratas em estro permanente e tratadas com associação de estrogênio e glicocorticóide. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.26, p.597–602, 2004.
- 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.819-823, 2004.
- FARAL-TELLO, P.; MIRAZO, S.; DUTRA, C.; PÉREZ, A.; GEIS-ASTEGGIANTE, L.; FRABASILE, S.; KONCKE, E.; DAVYT, D.; CAVALLARO, L.; HEINZEN, H.; ARBIZA, J. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *Scientific World Journal*, v.2012, p.1-5, 2012
- GERTSCH, J. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, v.122, p.177–183, 2009.
- GOMES, R.C.T.; SIMÕES, R.S.; SOARES JÚNIOR, J.M.; NADER, H.B.; SIMÕES, M.J. BARACAT, E.C. Perfil de glicosaminoglicanos sulfatados no útero de camundongas durante o ciclo estral. *Rev Assoc Med Bras.* v.53, n.3, p.261–266, 2007.
- 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.
- 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.
- JONHSON, M. D.; KENNEY, N.; STOICA, A. et al. Cadmium mimics in vivo the effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.*, v.9, p.1081-1084, 2003, apud OLIVEIRA, T.S.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F.; SERAKIDES, R. Histomorfometria e histoquímica da tuba

- uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.448-456, 2005.
- LEMBÈ, D.M.; GASCO, M.; GONZALES, G.F. Fertility and estrogenic activity of *Turraeanthus africanus* in combination with *Lepidium meyenii* (Black maca) in female mice. *European Journal of Integrative Medicine*, v.4, p.345-351, 2012.
- LONDONKAR, R.L.; NAYAKA, H.B. Effect of ethanol extract of *Portulaca oleracea* L on ovulation and estrous cycle in female albino rats. *Journal of Pharmacy Research*, v.6, p.43-436, 2013.
- 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.
- MOURA, T.F.A.L.; SCHENKEL, E.P.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SIMÕES, C.M.O.; SANTOS, R.I.D. Estudos farmacológicos preliminares das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss) Kuntze - Plumbaginaceae (baicuru). *Caderno de Farmácia*, v.1, p.45-54, 1985.
- MURRAY, A.R.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, M.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.*, v.59, p.477-480, 2004.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.22-29, 2002 apud OLIVEIRA, T.S.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F.; SERAKIDES, R. Histomorfometria e histoquímica da tuba uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.448-456, 2005.
- ODUM, J.; LEFEVRE, P.A.; TITTENSOR, S.; PATON, D.; ROUTLEDGE, E.J.; BERESFORD, N.A.; SUMPTER, J.P.; ASHBY, J. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.25, p.176-188, 1997.
- OLIVEIRA, M.; SANTOS, J.; MARCELINO, M.C.L.; SARAIVA, P.P. Avaliação do efeito do valerato de estradiol no ciclo estral e na histologia da veia poplítea de ratas. *Salusvita*, v.29, n.1, p.47-56, 2010.
- RODRIGUEZ, S.A.; VINA, M.D.; MURRAY, A.P.; LEIRO, J.M. Antiflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Planta Medica*, v.77, p.1323-1323, 2011.
- ROSITO, J.F. *Contribuição à análise das raízes de Limonium brasiliense (Boiss.)*. 1975. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 39 f.,1975.
- SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.618-626, 2008
- SOOKVANICHSILP, N.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; BOONLEANG, C. Estrogenic activity of the dichloromethane extract from *Pueraria mirifica*. *Fitoterapia*, v.79, p.509-514, 2008.
- TELEFO, P.B.; LIENOU, L.L.; YEMELE, M.D.; LEMFACK, M.C.; MOUOKEU, C.; GOKA, C.S.; TAGNE, S.R.; MOUNDIPA, F.P. Ethnopharmacological survey of plants used for the treatment of female infertility in Baham, Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.136, p.178-187, 2011.
- VALE, N.B. A Farmacobotânica, Ainda tem Lugar na Moderna Anestesiologia? *Rev Bras Anesthesiol*, v.52, p.368-380, 2002.

- VAN ANDEL, T.; BOER, H.J.; BARNES, J.; VANDEBROEK, I. Medicinal plants used for menstrual disorders in Latin America, the Caribbean, sub-Saharan Africa, South and Southeast Asia and their uterine properties: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, v.155, p.992–1000, 2014.
- VAN DIE, M.D.; BURGER, H.G.; TEEDE, H.J.; BONE, K.M. *Vitex agnus-castus* extracts for female reproductive disorders: a systematic review of clinical trials. *Planta Medica*, v.79, p.562–575, 2013.
- YASSIN, S.A.T.. Herbal Remedy used by Rural Adolescent girls with menstrual disorders. *Journal of American Science*, v.8, p.467–474, 2012.

#### **4.DISSCUSSÃO GERAL**

---

O aumento no uso de produtos a base de plantas por mulheres com distúrbios menstruais, Tensão Pré-Menstrual (TPM) e na menopausa tem sido evidente no mercado farmacêutico. Esse fato demonstra a necessidade de estudos que possam evidenciar a qualidade, segurança e eficácia desses produtos (MASULLO et al., 2015).

Os estudos com plantas, no entanto, devem ser pautados na correta identificação da espécie vegetal para que mereçam confiabilidade e possam, também, tornarem-se reprodutíveis. O trabalho com espécies autênticas é requisito fundamental para a qualidade da medicina com plantas (MENTZ & BORDIGNON, 2010; GOVINDARAGHAVAN et al., 2012).

Dessa forma, os estudos descritos neste trabalho com a espécie vegetal *Limonium brasiliense* foram precedidos de sua identificação botânica, e exsiccatas da espécie estão devidamente depositadas nos Herbários da Universidade Federal do Rio Grande e Universidade Estadual de Maringá. Segundo Maciel et al. (2002) esse cuidado inicial torna-se imprescindível para tornar o trabalho realizado verossímil e futuramente publicável.

A espécie vegetal *L. brasiliense* está entre as plantas da biodiversidade brasileira utilizada por mulheres no sul do Brasil para tratar distúrbios menstruais (MOURA et al., 1985; MURRAY et al., 2004), no entanto, a literatura disponível, por sua vez escassa, demonstra haver contradições sobre o órgão utilizado como medicinal. Embora a descrição botânica inicial de Dias da Silva (1920) o descreva como rizomas, os estudos encontrados sobre o baicuru referem-se ao órgão como sendo raízes (JAHNS & CRESCENTE, 1976; MOURA et al., 1985; MURRAY et al., 2004; FENNER et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2011 e BLAINSKI et al., 2013).

Como descrito no Capítulo 1 a avaliação morfo-anatômica da espécie vegetal em estudo fez-se necessário como requisito para a correta identificação do farmacógeno, sendo fundamental como ferramenta na análise farmacognóstica. Assim, foi possível comprovar ser rizoma a parte da planta utilizada pela população por suas propriedades medicinais e esta avaliação foi determinante para a qualidade do trabalho subsequente realizado.

Embora muitas plantas sejam utilizadas há séculos como medicamento, muitas vezes não se encontra na literatura dados suficientes descritos sobre sua eficácia e/ou segurança de uso (CALIXTO, 2005; VEIGA JR et al., 2005; JORDAN, 2010). Observa-se, no entanto, que a discussão sobre a avaliação da segurança de uso dessas plantas tem aumentado na comunidade científica e principalmente nas companhias farmacêuticas (CALIXTO, 2005; CORDELL & COLVARD, 2005; JORDAN, 2010).

A dificuldade de avaliação de eficácia e/ou segurança das plantas encontra-se no fato das mesmas apresentarem uma infinidade de substâncias químicas (HEINRICH, 2010; JORDAN, 2010). As preparações a base de plantas, as plantas íntegras ou seus compostos isolados demonstram, por vezes, perfis toxicológicos diferentes. Isto tem sido relacionado ao processo de extração e/ou isolamento, onde o solvente utilizado prioriza determinadas substâncias, o que torna a avaliação de segurança complicada. No entanto, esforços estão sendo feitos para que as informações sobre a

toxicidade das plantas estejam cada vez mais disponíveis e seja mais confiável (JORDAN, 2010; WIESNER, 2014).

As plantas comercializadas e consumidas no Brasil, pertencentes à flora nativa, apresentam pouca ou nenhuma informação que comprovem sua eficácia ou segurança (VEIGA JR et al., 2005). No entanto, os medicamentos à base de plantas comercializados pelas indústrias, precisam ter sua qualidade, eficácia e segurança comprovados por informações científicas (CALIXTO, 2000).

Estudos etnofarmacológicos tem provado ser uma boa estratégia de seleção no estudo das plantas com atividades biológicas (ARAÚJO et al., 2008). As informações sobre o uso de plantas pelas populações em todo o mundo apresentam valor inestimável, e o maior cuidado no que se refere à saúde é que a planta usada para fins medicinais seja segura (CORDELL & COLVARD, 2005).

*L. brasiliense* tem sido utilizado pela população do sul do Brasil, Argentina e Uruguai sem que haja estudos suficientes de sua segurança de uso. Dessa forma, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a segurança de uso dessa espécie vegetal a partir de dados etnofarmacológicos, o que se mostrou ser um eficiente caminho para a pesquisa proposta.

Como descrito no Capítulo 2, a avaliação da toxicidade aguda e crônica foi realizada *in vivo*, seguindo o preconizado pela legislação brasileira vigente à época dos experimentos – RDC nº14 de 31 de março de 2010 (BRASIL, 2010). Como forma de complementação das análises toxicológicas realizou-se também avaliação do estresse oxidativo e da mutagenicidade.

O estresse oxidativo que acomete o organismo humano é causado pelas espécies reativas ao oxigênio (ERO) e espécies reativas ao nitrogênio (ERN), provenientes do meio ambiente ou gerada pelo próprio organismo. O excesso dos radicais livres causa preocupação devido aos efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação lipídica de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas (BARREIROS et al., 2006).

Mutagenicidade pode ser definida como a capacidade que uma substância apresenta de causar alterações permanentes detectáveis em um gene ou em um bloco de genes, ou em sua sequência reguladora (WIESNER, 2014).

Os resultados obtidos em nossos estudos de toxicidade pré-clínica, aguda e crônica, demonstraram que o extrato bruto dos rizomas de baicuru não apresenta toxicidade nas doses testadas, bem como mutagenicidade em doses menores que 2 g/kg. Reforçando esses resultados a avaliação do estresse oxidativo também demonstrou não haver alterações hepáticas com o uso crônico do extrato de baicuru. Todos esses dados analisados em conjunto corroboram com a afirmativa de que o extrato apresenta-se seguro ao uso popular nas doses testadas.

Poucos estudos são encontrados comprovando a eficácia farmacoterapêutica de *L. brasiliense*. Em um ensaio farmacológico e clínico Jahns e Crescente (1976) comprovaram ação anti-inflamatória do extrato fluido de *L. brasiliense* e ação terapêutica em casos de dismenorreia, leucorreia, metrorragias e amenorreias secundárias.



Conforme descrito no Capítulo 3, este trabalho objetivou avaliar a atividade hormonal do extrato bruto dos rizomas de *L. brasiliense*, utilizando modelo experimental *in vivo*, de forma a comprovar o uso popular.

O modelo experimental utilizado visa avaliar o ciclo estral de ratas Wistar que tem sido considerado uma importante ferramenta na avaliação dos aspectos reprodutivos e farmacológicos (MARTINS et al., 2005). A avaliação do ciclo estral foi complementada pelo ensaio uterotrópico, que de acordo com Odum et al. (1997) é importante para monitorar a capacidade de determinadas substâncias químicas de estimular o crescimento uterino, conseqüentemente determinando uma possível atividade estrogênica.

Os resultados encontrados em nossos estudos demonstram que o extrato bruto de *L. brasiliense* apresenta ação sobre o sistema reprodutor feminino. Esses dados reforçam a indicação do uso popular dessa espécie vegetal que encontra seu uso relacionado à regulação das desordens menstruais.

Considerando os indícios da ação hormonal do extrato bruto de *L. brasiliense* e a comprovação de segurança de uso atestados em nossos estudos, pode-se afirmar que, essa espécie vegetal apresenta-se promissora para trabalhos futuros que visem o desenvolvimento de um fitoterápico, com indicações de uso nas desordens menstruais, como dismenorreias, e também para Tensão Pré-Menstrual (TPM).

A realização deste estudo a partir de informações do uso popular, o que o caracteriza como um estudo etnofarmacológico, mostrou-se adequado às propostas previstas no início dos trabalhos com a espécie vegetal *L. brasiliense*, demonstrando ser esse um caminho interessante e importante para as pesquisas com plantas medicinais.

## **5. CONCLUSÕES**

---

As contradições encontradas na literatura sobre *Limonium brasiliense*, referentes ao órgão da planta utilizado como medicinal, impulsionou o estudo botânico realizado. Assim, o estudo morfo-anatômico do material vegetal possibilitou definir como sendo rizomas o farmacógeno para essa espécie vegetal. Esta caracterização contribuiu às análises farmacognósticas.

O teste de toxicidade pré-clínica constitui-se em importantes parâmetros de segurança para o uso dessa planta. O teste toxicológico agudo, realizado em camundongos Swiss, demonstrou ser o extrato bruto tóxico em altas doses ( $DL_{50} = 4,8 \text{ g/kg}$ ). No teste de toxicidade crônica, realizado em ratas Wistar, nenhuma anormalidade foi evidenciada nos parâmetros avaliados.

O teste de avaliação do estado redox do fígado, órgão de metabolização de drogas, consequentemente órgão-alvo nos testes de toxicidade, foi importante na confirmação da baixa toxicidade do extrato. Esse ensaio reafirma a segurança no uso popular dessa espécie vegetal.

A avaliação da mutagenicidade complementa as análises toxicológicas realizadas nesse trabalho. Neste ensaio pode-se verificar que o extrato bruto testado apresenta toxicidade em doses acima de 2 g/kg, corroborando com os resultados apresentados pelas demais análises toxicológicas até o momento realizadas.

A avaliação da atividade hormonal apresentou importantes aspectos que justificam o uso popular de *L. brasiliense* como regulador menstrual e para tensão pré-menstrual. Com os resultados obtidos é possível comprovar que existe ação sobre o sistema reprodutor feminino. Contudo, com este ensaio não se pode afirmar se o efeito do extrato está ocorrendo por ação central no eixo hipotálamo-hipófise ou por ação local em nível de gônadas. Novos ensaios são necessários para a comprovação desses resultados, e modelos experimentais apropriados, que possam elucidar o mecanismo de ação envolvido.

Dessa forma conclui-se que, a espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, é segura para o uso popular nas doses relacionadas neste trabalho, e constitui-se em importante e promissora alternativa para a medicina para tratar desordens menstruais.

## REFERÊNCIAS

---

ANDRADE, F.; ALBUQUERQUE, C.A.C.; MARASCHIN, M.; SILVA, E.L. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, v.50, p.328–334, 2012.

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.239–244, 2002.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; KANESHIMA, E.N.; GABRIEL, M.; AUDI, E.A.; MARQUES, L.C.; MELLO, J.C.P. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food and Chemical Toxicology*, v.48, p.1817–1820, 2010.

ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.72–80, 2008.

ATEBA, S.B.; NJAMEN, D.; MEDJAKOVIC, S.; HOBIGER, S.; MBANYA, J.C.; JUNGBAUER, A.; KRENN, L. *Eriosema laurentii* De Wild (Leguminosae) methanol extract has estrogenic properties and prevents menopausal symptoms in ovariectomized Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.150, p.298–307, 2013.

BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Laboratory Animals*, v.28, p.193–211, 1994.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1, p.113–123, 2006.

BHATIA, H.; SHARMA, Y.P.; MANHAS, R.K.; KUMAR, K. Traditional phytotherapies for the treatment of menstrual disorders in district Udhampur, J&K, India. *Journal of Ethnopharmacology*, v.160, p.202–210, 2015.

BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, v.18, p.6852–6865, 2013.

BOLSON, M.; HEFLER, S.R.; CHAVES, E.I.D.; GASPAROTTO JR., A., CARDOZO JR, E.L. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.161, p.1–10, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução *Portaria nº 116 de 08 de agosto de 1996*. Publica norma para estudo de toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. Brasília. ANVISA. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução de Diretoria Colegiada – RDC 14 de 31 de março de 2010*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília. ANVISA. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*. Brasília. ANVISA. GESEF. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução de Diretoria Colegiada – RDC 26 de 13 de maio de 2014*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos fitoterápicos. Brasília. ANVISA. 2014.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. *Resolução Normativa – RN 17 de 03 de Julho de 2014*. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. Brasília. CONCEA. 2014.

BRITANNICA ACADEMIC EDITION. Acessado em 15 de Junho de 2015. Disponível em: <http://www.britannica.com/plant/Plumbaginaceae>.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. *Planta Medica*, v.78, p.747–754, 2012.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, p.179–189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.131–134, 2005.

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.

CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.3, p.289–299, 2004.

CLAUDIMAR SIDNEI FIOR. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. In: *Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: Limonium*. Disponível em: [http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=7334](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7334) (Acessado em 16 de agosto de 2015).

CHANT, S.R. *Plumbaginaceae*. In: Heywood, V. H. *Flowering plants of the world*, 2a. ed. Batsford, London, 1993.

CHERDSHEWASART, W.; SRIWATCHARAKUL, S.; MALAIVIJITNOND, S.; Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. *Maturitas*, v.61, p.350–357, 2008.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, n.1, p.11–23, 2007.

CICLO MENSTRUAL FEMININO. Disponível em: [http://www.drcarlos.med.br/cicl\\_mentr\\_1gif.gif](http://www.drcarlos.med.br/cicl_mentr_1gif.gif). Acessado em 16 de agosto de 2015.

CORDELL, G.A.; COLVARD, M.D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.5–14, 2005.

COSTA, M.A.; ISHIDA, K.; KAPLUM, V.; KOSLYK, A.E.D.; MELLO, J.C.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.58, p.330–335, 2010.

COSTA, M.A.; MELLO, J.C.P., KANESHIMA, E.N.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; AUDI, E.A.; NAKAMURA, C.V. Acute and chronic toxicity of an aqueous fraction of the stem bark

of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in rodents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2013, p.1–9, 2013.

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.819–823, 2004.

DAVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G.; POZETTI, G.L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.6, p.11–14, 2004.

DE CANDOLLE, A. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. Paris, v.12, p.644, 1848.

DENNEHY, C.E. The use of herbs and dietary supplements in gynecology: an evidence-based review. *Journal of Midwifery & Women's Health*, v.51, n.6, p.402–409, 2006.

DIAS DA SILVA, R.A. Plantas medicinaes do Brasil, O Guaycurú. *Bol. Ass. Bras. Pharm.*, v.1, p.4–14, 1920.

EREN, Y.; ÖZATA, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.24, p.51–59, 2014.

FAGG, C.W.; LUGHADHA, E.N.; MILLIKEN, W.; HIND, D.J.N.; BRANDÃO, M.G.L. Useful Brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalist George Gardner (1812–1849). *Journal of Ethnopharmacology*, v.161, p.18–29, 2015.

FARAL-TELLO, P.; MIRAZO, S.; DUTRA, C.; PÉREZ, A.; GEIS-ASTEGGIANTE, L.; FRABASILE, S.; KONCKE, E.; DAVYT, D.; CAVALLARO, L.; HEINZEN, H.; ARBIZA, J. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *Scientific World Journal*, v.2012, p.1–5, 2012.

FASES DO CICLO ESTRAL E A RELAÇÃO COM A CITOLOGIA VAGINAL. Disponível em: <http://137.222.110.150/calnet/Ovarian/page2.htm>. Acessado em: 17 de outubro de 2015.

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.

FESTING, M.F.W. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Laboratory Animals*, v.28, p.212–221, 1994.

FLECKNELL, P.A. Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals*, v.28, p.222–231, 1994.

FLORA DO BRASIL. Acessado em: 15 de Junho de 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB192>.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Sistema Reprodutor Feminino. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*, 4.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1120–1138, 2012.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n.2, p.178–182, 2005.

GENG, D.; CHI, X.; DONG, Q.; HU, F. Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. *Industrial Crops and Products*, v.67, p.492–497, 2015.

- GIRMAN, A.; LEE, R.; KLIGLER, B. An integrative medicine approach to premenstrual syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.188, p.S56–S65, 2003.
- GOLONI, R.; ALVES, N.M.; GARROTE, C.F.D.; PAULA, J.R.; VALADARES, M.C.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C. Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* Martius. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2, n.2, p.89–91, 2005.
- GOVINDARAGHAVAN, S.; HENNELL, J.R.; SUCHER, N.J. From classical taxonomy to genome and metabolome: Towards comprehensive quality standards for medicinal herb raw materials and extracts. *Fitoterapia*, v.83, p.979–988, 2012.
- 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.
- HAJIRAHIMKHAN, A.; DIETZ, B.M.; BOLTON, J.L. Botanical modulation of menopausal symptoms: mechanisms of action. *Planta Medica*, v.79, p.538–553, 2013.
- 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.1415–1428, 1967.
- HEGAZY, M.E.F.; MOHAMED, A.E.H.H.; EL-HALAWANY, A.M.; DJEMGOU, P.C.; SHAHAT, A.A.; PARÉ, P.W. Estrogenic activity of chemical constituents from *Tephrosia candida*. *J. Nat. Prod.*, v.74, p.937–942, 2011.
- HEINRICH, M. Ethnopharmacology in the 21st century – grand challenges. *Frontiers in Pharmacology*, v.1, p.1–3, 2010.
- HSU, W.C.; CHANG, S.P.; LIN, L.C.; LI, C.L.; RICHARDSON, C.D.; LIN, C.C.; LIN, L.T. *Limonium sinense* and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. *Antiviral Research*, v.118, p.139–147, 2015.
- JANHS, R.T.; CRESCENTE, A.S. Ensaio 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.
- JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 13ª. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2005.
- JORDAN, S.A.; CUNNINGHAM, D.G.; MARLES, R.J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.243, p.198–216, 2010.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v.30, n.3, p.241–248, 2009.
- KOËTER, H.B.W.M. Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of in vitro studies. *Reproductive Toxicology*, v.7, p.117–123, 1993.



KUNITAKE, H., KOREEDA, K., MII, M. Morphological and Cytological Characteristics of Protoplast-Derived Plants of *Statice* (*Limonium perezii* Hubbard). *Sci. Hortic.* 60, 305–312, 1995.

KUNTZE, C. E. O. *Revisio Generum Plantarum*. Leipzig, v.2, p.395, 1891.

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. 2854–2864, 2002.

KURUL'KINA, L.M.; SHULT'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.465–471, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 4. ed. Sarvier, São Paulo, p.506–509, 2006.

LEMBÈ, D.M.; GASCO, M.; GONZALES, G.F. Fertility and estrogenic activity of *Turraeanthus africanus* in combination with *Lepidium meyenii* (Black maca) in female mice. *European Journal of Integrative Medicine*, v.4, p.345–351, 2012.

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.

LONNI, A.A.S.G. *Desenvolvimento e caracterização de formulação de uso tópico contendo extrato padronizado de Trichilia catigua para fins cosmético*. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 118 f., 2012.

LOPES, M.S.; STUMPF, E.R.T.; DE CARVALHO, F.I.F. Efeito do substrato na reprodução assexuada da *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Rev. Bras. Agrociência*, v.9, n.4, p.421-424, 2003.

MACHADO, U.F. Introdução à Fisiologia Endócrina. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*, 4ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.986-995, 2012.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p.429–438; 2002.

MALAIVIJITNOND, S.; KIATTHAIPIPAT, P.; CHERDSHEWASART, W.; WATANABE, G.; TAYA, K. Different effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.96, p.428–435, 2004.

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.

MARTINO-ANDRADE, A.J.; MORAIS, R.N.; SPERCOSKI, K.M.; ROSSI, S.C.; VECHI, M.F.; GOLIN, M.; LOMBARDI, N.F.; GRECA, C.S.; DALSENTER, P.R. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.127, p.165–170, 2010.

- MARTINS, R.R.; PEREIRA, N.M.L.; SILVA, T.M.A. Liquid-base cytology: a new method for oestral cycle study in wistar's rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.20, Supl. n.1, p.46–49, 2005.
- MARTIUS, K.F.P.,1840-1906. <http://florabrasiliensis.cria.org.br/opus>. Acessado em 22 de Junho de 2015.
- MASULLO, M.; MONTORO, P.; MARI, A.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Medicinal plants in the treatment of women's disorders: Analytical strategies to assure quality, safety and efficacy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.113, p.189–211, 2015.
- 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.
- MEDINI, F.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; ABDELLEY, C.; KSOURI, R. Antiviral efficacy of *Limonium densiflorum* against HSV-1 and influenza viruses. *South African Journal of Botany*, v.92, p.65–72, 2014a.
- MEDINI, F.; FELLAH, H.; KSOURI, R.; ABDELLEY, C. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for Science*, v.8, p.216–224, 2014b.
- MEDINI, F.; BOURGOU, S.; LALANCETTE, K.; SNOUSSI, M.; MKADMINI, K.; COTÉ, I.; ABDELLEY, C.; LEGAULT, J.; KSOURI, R. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany*, v.99, p.158–164, 2015.
- MENTZ, L.A.; BORDIGNON, S.A.L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação 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. Ed. Universidade /UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre; Florianópolis, cap.9, p.211–228, 2010.
- MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, v.140-141, p.21–30, 2003.
- MICHEL, T.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A.L. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Medica*, v.79, p.514–532, 2013.
- MOBOT, 2015. Acessado em 15 de Junho de 2015. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- MOURA, T.F.A.L.; SCHENKEL, E.P.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SIMÕES, C.M.O.; SANTOS, R.I.D. Estudos farmacológicos preliminares das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss) Kuntze - Plumbaginaceae (baicuru). *Caderno de Farmácia*, v.1, p.45–54, 1985.
- MURRAY, A.R.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, M.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch*, v.59, p.477–480, 2004.
- MOVSUMOV, I.S.; GARAEV, E.A. Flavonoids from *Limonium meyeri*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.41, n.3, p. 348, 2005.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. *Plantas medicinais: Guia para profissional de saúde*. Editoria Premier, São Paulo, 2002.

NUNES, M.T. Hipotálamo endócrino. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*, 4.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1001–1008, 2012.

ODUM, J.; LEFEVRE, P.A.; TITTENSOR, S.; PATON, D.; ROUTLEDGE, E.J.; BERESFORD, N.A.; SUMPTER, J.P.; ASHBY, J. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.25, p.176–188, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *WHO police perspectives on medicines*. Geneva: World Health Organization, 2002.

OTOBONE, F.J., SANCHES, A.C.C., NAGAE, R., MARTINS, J.V.C., SELA, V.R., MELLO, J.C.P., AUDI, E.A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupara* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytotherapy Research*. v.21, p.531–535, 2007.

PATWARDHAN, B.; MASHELKAR, R.A. Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward? *Drug Discovery Today*, v.14, n.15/16, p.804–811, 2009.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. Editora Atheneu, São Paulo, p.298–299, 2000.

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 hydroalcoholic extract of *Ailanthus excelsa* (Roxb): an ethnomedicine used by tribals of Nilgiris region in Tamilnadu. *Journal of Ethnopharmacology*, v.112, p.189–191, 2007.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, 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, n.1-2, p.101–104, 2002.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; KELMER-BRACHT, A.M.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L.; MELLO, J.C.P.; BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology Letters*, v.143, n.1, p.55–63, 2003.

RODRIGUEZ, S.A.; VINA, M.D.; MURRAY, A.P.; LEIRO, J.M. Antiflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Planta Medica*, v.77, p.1323–1323, 2011.

ROSITO, J.F. *Contribuição à análise das raízes de Limonium brasiliense (Boiss.)*. 1975. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 39 f., 1975.

ROSS, S.A. Myricetin-3'-methyl ether-7-glucoside from *Limonium sinuatum*. *Journal of Natural Products*, v. 47, n.5, p.862–864, 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.

- SACHETTI, C.G.; FASCINELI, M.L.; SAMPAIO, J.A.; LAMEIRA, O.A.; CALDAS, E.D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.4, p.937–941, 2009.
- SADEGHI, Z.; MAHMOOD, A. Ethno-gynecological knowledge of medicinal plants used by Baluch tribes, southeast of Baluchistan, Iran. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.24, p.706–715, 2014.
- SANTOS, L.C. Antônio Moniz de Souza, o ‘Homem da Natureza Brasileira’: ciência e plantas medicinais no início do século XIX. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, v.15, n.4, p.1025–1038, 2008.
- SATPATHY, S.; PATRA, A.; PUROHIT, A.P. Estrogenic activity of *Punica granatum* L. peel extract. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, v.2, p.19–24, 2013.
- SEIDL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.74, n.1, p.145–150, 2002.
- SILVA, R.A.D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. 1ª Ed. São Paulo, 1926, p.499–500.
- SILVA, H.C.S.; PRATA, J.N.; REZENDE, L.M.S. Efeitos das isoflavonas de soja sobre os sintomas climatérios. *Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, v.15, n.3, p.239–44, 2013.
- SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. Acessado em 21 de julho de 2015. Disponível em: [http://www.fiocruz.br/sinitox/media/Tabela10\\_2012.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox/media/Tabela10_2012.pdf).
- SOOKVANICHSILP, N.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; BOONLEANG, C. Estrogenic activity of the dichloromethane extract from *Pueraria mirifica*. *Fitoterapia*, v.79, p.509–514, 2008.
- STALEY, K.; SCHARFMAN, H. A woman’s prerogative. *Nature Neurosciense*, v.8, n.6, p.697–699, 2005.
- STANKOVIC, M.S.; PETROVIC, M.; GODJEVAC, D.; STEVANOVIC, Z.D. Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *Journal of Arid Environments*, v.120 p.26–32, 2015.
- STOKES, W.S. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR Journal*, v.43, p.S31–S38, 2002.
- 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* Kuntze root against CCl4-induced liver damage. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, v.8, p. 204–213, 2007.
- TANG, X.H.; GAO, J.; CHEN, J.; XU, L.Z.; TANG, Y.H.; ZHAO, X.N.; MICHAEL, L. Mitochondrial modulation is involved in the hepatoprotection of *Limonium sinense* extract against liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.427–431, 2008.
- TANG, X.H.; YAN, L.F.; GAO, J.; YANG, X.L.; XU, Y.X.; GE, H.Y.; YANG, H.D. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.51, p.1134–1139, 2012.
- TAPRIAL, S.; KASHYAP, D.; MEHTA, V.; KUMAR, S.; KUMAR, D. Antifertility effect of hydroalcoholic leaves extract of *Michelia champaca* L.: an ethnomedicine used by Bhatra women in Chhattisgarh state of India. *Journal of Ethnopharmacology*, v.147, p.671–675, 2013.

TESCH, B.J. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. *Dis. Mon.*, v. 48, p. 671–96, 2002.

THEPLANTLIST, 2015. Acessado em 15 de Junho de 2015. Disponível em: [www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Plumbaginaceae](http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Plumbaginaceae).

TRABELSI, N., OUESLATI, S., FALLEH, H., Waffo-Téguo, P., Papastamoulis, Y., MÉRILLON, J.M.; ABDELLY, C.; KSOURI, R. Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*, v.135, p.1419–1424, 2012.

TRABELSI, N.; OUESLATI, S.; KSOURI, R.; NASSRA, M.; MARCHAL, A.; KRISA, S.; ABDELLY, C.; MERILLON, J.M.; WAFFO-TÉGUO, P. The antioxidant properties of new dimer and monomers of phenolic acid amides isolated from *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*, v.146, p.466–471, 2014.

UCHIYAMA, F.; JIKYO, T.; TAKEDA, R.; OGATA, M. *Lepidium meyenii* (Maca) enhances the serum levels of luteinizing hormone in female rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.151, p.897–902, 2014.

UNSW EMBRYOLOGY. Endocrine development. Disponível em: [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGD\\_Lecture\\_-\\_Endocrine\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/BGD_Lecture_-_Endocrine_Development). (Acessado em 16 de agosto de 2015).

VAN ANDEL, T.; BOER, H.J.; BARNES, J.; VANDEBROEK, I. Medicinal plants used for menstrual disorders in Latin America, the Caribbean, sub-Saharan Africa, South and Southeast Asia and their uterine properties: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, v.155, p.992–1000, 2014.

VAN DIE, M.D.; BURGER, H.G.; TEEDE, H.J.; BONE, K.M. *Vitex agnus-castus* extracts for female reproductive disorders: a systematic review of clinical trials. *Planta Medica*, v.79, p.562–575, 2013.

VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. *Fisiologia Humana*. McGraw-Hill do Brasil, p.557–606, 1981.

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

VICTAL, J.C.; VALÉRIO, L.B.; OSHIRO, M.C.; BAPTISTA, S.C.; PINHEIRO, F. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v.7, n.2, p.36–57, 2014.

WHITING, P. SAVCHENKO, T.; SARKER, S.D.; REES, H.H.; DINAN, L. Phytoecdysteroids in genus *Limonium* (Plumbaginaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 26, p. 695–698, 1998.

WHO - World Health Organization. *General Guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine*. Geneva, 2000.

WIESNER, J. Challenges of safety evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, v.158, p.467–470, 2014

YASSIN, S.A.T.. Herbal Remedy used by Rural Adolescent girls with menstrual disorders. *Journal of American Science*, v.8, p.467–474, 2012.

YE, G.; HUANG, C. Flavonoids of *Limonium aurium*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.2, p. 232–234, 2006.

YONKERS, K.A.; O'BRIEN, S.; ERIKSSON, E. Premenstrual syndrome. *Lancet*, v.371, p.1200–1210, 2008.

ZAPPI, D. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12938>. Acessado em 22 de Junho de 2015.

ZHANG, L.; ZOU, G. Flavanol of *Limonium bicolor*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.40, n.6, p. 602–603, 2004.

ZHUSUPOVA, G.E.; ABIL'KAEVA, S.A. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots - III. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.2, p. 164–168, 2006a.

ZHUSUPOVA, G.E.; ABIL'KAEVA, S.A. Flavones from *Limonium gmelinii* - II. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n.1, p. 112–113, 2006b.

ZHUSUPOVA, G.E.; ARTAMONOVA, N.A.; ABILOV, Z.H.A.; ORAZBAEVA, Z.H.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. 512–514, 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. 602–603, 2006b.

## **APÊNDICE**

---

Estes resultados foram obtidos durante o período de doutoramento os quais foram analisados e auxiliaram no fechamento dos trabalhos.

## CAPÍTULO 2

Tabelas referentes aos resultados encontrados na avaliação da toxicidade aguda e crônica e mutagenicidade.

Tabela A1: Peso relativo dos órgãos no teste agudo de camundongos machos tratados com EB de *L. brasiliense*. Média±dp.

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Coração</b>	<b>Pulmões</b>	<b>Fígado</b>	<b>Rins</b>	<b>Baço</b>
Controle	6	0,43 ± 0,01	0,58 ± 0,01	5,53 ± 0,09	1,25 ± 0,03	0,36 ± 0,02
5,0 g/kg	6	0,42 ± 0,01	0,64 ± 0,01	5,46 ± 0,07	1,20 ± 0,04	0,38 ± 0,01
4,0 g/kg	1	0,49 ± 0,0	0,63 ± 0,0	4,06 ± 0,0*	1,22 ± 0,0	0,31 ± 0,0
3,0 g/kg	4	0,48 ± 0,02	0,71 ± 0,11	5,27 ± 0,17	1,31 ± 0,06	0,45 ± 0,06
2,0 g/kg	5	0,50 ± 0,02	0,64 ± 0,02	5,38 ± 0,20	1,33 ± 0,03	0,35 ± 0,03
1,0 g/kg	6	0,48 ± 0,02	0,70 ± 0,03	6,10 ± 0,18	1,42 ± 0,08	0,40 ± 0,04

\*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey -  $p < 0,05$ );

N: número de animais por grupo.

Tabela A2: Consumo de ração dos ratos machos e fêmeas tratados cronicamente com EB de *L. brasiliense*. Média±dp.

	<b>Média de consumo/dia/grupo</b>			
	<b>Fêmeas</b>	<b>N</b>	<b>Machos</b>	<b>N</b>
<b>Controle</b>	67,05 ± 9,08	10	90,00 ± 16,61	10
<b>50 mg/kg</b>	62,48 ± 9,56	11	87,17 ± 17,35	10
<b>100 mg/kg</b>	60,19 ± 14,00	10	78,80 ± 28,40	9
<b>200 mg/kg</b>	64,00 ± 5,44	9	94,46 ± 14,95	8



Tabela A3: Parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento crônico com EB de *L. brasiliense*. Média±dp.

Parâmetros Bioquímicos	Grupos			
	Controle	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
<b>Machos</b>				
Ácido úrico (mg/dL)	2.67 ± 0.79	2.60 ± 0.45	2.25 ± 0.91	3.11 ± 1.14
Albumina (g/dL)	3.83 ± 0.21	3.30 ± 0.68	3.89 ± 0.91	3.98 ± 0.26
ALT (U/L)	37.07 ± 4.77	40.68 ± 14.50	32.26 ± 4.78	41.0 ± 4.80
AST (U/L)	126.90 ± 28.02	140.17 ± 48.93	122.0 ± 27.41	128.25 ± 33.71
Amilase (U/L)	610.89 ± 52.94	575.54 ± 113.83	576.69 ± 77.03	615.27 ± 154.56
Bilirrubina total (mg/dL)	0.28 ± 0.06	0.26 ± 0.10	0.21 ± 0.07	0.25 ± 0.09
CPK (U/L)	971.83 ± 536.57	950.51 ± 487.45	587.54 ± 456.61	673.75 ± 617.34
CK MB (U/L)	2905.31 ± 1296.66	2630.62 ± 890.53	1970.83 ± 993.62	2190.23 ± 1316.76
Colesterol total (mg/dL)	102.33 ± 16.49	131.99 ± 23.77*	140.22 ± 20.86*	138.19 ± 32.86*
Creatinina (mg/dL)	0.43 ± 0.13	0.29 ± 0.13	0.34 ± 0.14	0.34 ± 0.12
Fosfatase alcalina (U/L)	71.0 ± 10.27	67.82 ± 11.92	67.31 ± 9.73	68.73 ± 14.46
gGT (U/L)	9.50 ± 3.56	8.70 ± 7.39	9.42 ± 1.73	9.06 ± 3.61
Glicemia (mg/dL)	139.94 ± 37.54	159.14 ± 32.18	157.18 ± 22.14	203.08 ± 50.17*
Proteínas totais (g/dL)	9.91 ± 0.56	9.91 ± 0.54	10.01 ± 0.77	9.78 ± 1.37
Triglicérides (mg/dL)	54.81 ± 6.72	58.22 ± 15.63	50.99 ± 8.11	65.29 ± 20.13
Uréia (mg/dL)	42.18 ± 5.30	45.53 ± 8.10	34.48 ± 6.21	42.12 ± 7.29
<b>Fêmeas</b>				
Ácido úrico (mg/dL)	1.29 ± 0.54	2.07 ± 1.14	3.81 ± 3.01*	2.82 ± 0.73
Albumina (g/dL)	2.81 ± 0.31	2.70 ± 0.72	4.10 ± 0.45*	3.99 ± 0.54*
ALT (U/L)	47.73 ± 10.78	45.18 ± 8.99	35.43 ± 21.95	35.54 ± 5.91
AST (U/L)	180.90 ± 42.31	159.52 ± 32.71	189.45 ± 86.92	129.75 ± 28.90
Amilase (U/L)	669.71 ± 139.30	617.50 ± 116.81	365.95 ± 62.05*	386.54 ± 80.78*
Bilirrubina total (mg/dL)	0.36 ± 0.48	0.25 ± 0.11	0.34 ± 0.08	0.33 ± 0.19
CPK (U/L)	812.71 ± 261.16	679.28 ± 436.92	662.40 ± 737.13	784.90 ± 421.16
CK MB (U/L)	2952.18 ± 1078.35	2424.37 ± 1248.60	1705.31 ± 1316.89	2277.08 ± 714.17
Colesterol total (mg/dL)	104.85 ± 17.73	91.73 ± 17.61	80.16 ± 9.09*	79.24 ± 11.65*
Creatinina (mg/dL)	0.47 ± 0.11	0.63 ± 0.26	0.50 ± 0.19	0.46 ± 0.16
Fosfatase alcalina (U/L)	89.43 ± 21.94	75.83 ± 28.70	96.38 ± 87.94	58.07 ± 21.67
gGT (U/L)	9.42 ± 3.88	11.16 ± 7.67	13.85 ± 6.15	11.84 ± 4.34
Glicemia (mg/dL)	115.99 ± 19.63	121.96 ± 47.17	157.02 ± 23.97*	137.87 ± 26.26
Proteínas totais (g/dL)	6.29 ± 0.48	6.50 ± 1.27	9.85 ± 0.93*	9.92 ± 0.38*
Triglicérides (mg/dL)	44.32 ± 9.50	60.98 ± 35.15	50.55 ± 20.61	42.47 ± 8.94
Uréia (mg/dL)	45.91 ± 11.14	42.69 ± 21.86	44.66 ± 10.14	46.39 ± 10.66

Tabela A4 - Número de eritrócitos policromáticos micronucleados por 2000 eritrócitos policromáticos no teste de mutagenicidade do EB de *L. brasiliense*. Média±dp.

<b>Grupo</b>	<b>Nº eritrócitos policromáticos micronucleados</b>
CN	7,2±2,5
CP	26,7±7,0*
0,5 g/kg	11,8±2,8
1,0 g/kg	10,6±3,5
1,5 g/kg	9,7±1,4
2,0 g/kg	17,9±4,7*

\*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguida pelo Teste de Kruskal-Wallis;  $p < 0.05$ ); CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo

### CAPÍTULO 3

Tabelas referentes aos resultados encontrados na avaliação da atividade hormonal.

Tabela A1: Dosagens hormonais das ratas submetidas ao tratamento de 28 dias com EB de *L. brasiliense*.

Grupo/Animal	Hormônios	
	Progesterona (ng/mL)	Estradiol (pg/mL)
CN-1	23,3	23,0
CN-2	7,6	27,0
CN-3	8,5	25,0
CN-4	65,8	30,0
CN-5	23,1	20,0
CN-6	21,2	26,0
T1-1	23,2	35,0
T1-2	17,4	25,0
T1-3	8,4	31,0
T1-4	18,8	29,0
T1-5	26,1	18,0
T1-6	29,8	16,0
T2-1	42,6	23,0
T2-2	25,8	26,0
T2-3	32,5	41,0
T2-4	16,9	39,0
T2-5	28,3	27,0
T2-6	9,7	40,0
T3-1	39,0	18,5
T3-2	11,3	41,0
T3-3	11,4	38,0
T3-4	20,7	47,0
T3-5	30,5	29,0
T4-1	21,9	37,0
T4-2	10,0	33,0
T4-3	23,2	13,0
T4-4	15,1	28,0
T4-5	15,6	50,0
T4-6	20,1	39,0
T5-2	10,7	32,0
T5-3	11,7	41,0
T5-4	13,4	21,0
T5-5	13,1	30,0
T5-6	12,2	41,0
CP-1	16,5	47,0
CP-2	110,4	63,0
CP-3	11,5	37
CP-4	10,7	44
CP-5	11,2	38
CP-6	16,9	44
CP-7	9,6	51

Tabela A2: Sistema de acompanhamento da abertura do canal vaginal e da secreção vaginal para determinação da fase estral

Grupo	Animal	Abertura do canal vaginal / Fase da secreção vaginal																										
		DIAS																										
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	26°	
200 mg/kg	2					D	D	D	D	P	E	E	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	E	M	D*	
	3												D	D	P	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	E
	4						M	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	E	D	D	D	D	P	E	D	D	E	
	5										D	D	P	E	D	D	D	E	E	D	D	P	E	M	D	P	E	
	6								D	D	D	D	D	D	P	E	E	M	D	D	E	D	E	E	E	D	D	E
100 mg/kg	1											D	D	D	D	D	P	E	D	D	D	D	D	D	P	E	E	
	2														D	D	D	P	E	D	D	D	D	E	E	D	D	
	3										D	D	P	E	M	D	D	P	E	E	D	D	D	E	E	D	D	
	4							D	D	D	D	D	D	D	P	E	E	M	D	D	D	D	D	E	E	D	D	
	5									D	D	D	D	D	D	D	P	E	E	M	D	D	P	E	D	D	D	
	6										D	D	P	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	E	D	D	
50 mg/kg	1						D	D	D	D	D	D	P	E	D	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	
	2					M	D	D	D	D*	D*	D	D	D	D	P	E	E	D	D	D	D	P	E	D	D	E	
	3									D	D	D	D	D	D	P	E	E	M	D	D	D	D	D	D	D	D	
	4				D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	E	D	D	D	P	E	D	D	D	E	E	D	D	
	5					M	D	D	D	D	D	D	D	E	E	E	D	D	D	P	E	E	D	D	P	E	E	
25 mg/kg	1						D	D	D	D	D	D	D	P	E	D	D	D	D	E	E	D	D	D	D	D	D	
	2				D	D	P	E	E	E	D	E	D	P	E	E	M	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	
	3						D	D	D	D	D	D	P	E	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	E	
	4									D	D	E	E	E	D	D	D	P	E	D	D	P	E	E	D	D	D	
	5					D	D	D	D	P	E	E	D	D	D	D	P	E	D	D	D	E	E	D	D	D	P	
	6					D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	E	E	D	D	D	P	E	D	D	D	
12,5 mg/kg	1					M	D	D	D	P	E	E	M	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	D	D	E	E	
	2									D	D	D	D	P	E	D	D	D	D	E	E	D	D	P	E	D	D*	
	3												P	E	D	D	D	P	E	E	D	D	P	E	E	D	E	
	4					D	D	D	D	P	E	E	M	D	D	P	E	M	D	D	D	P	E	D	D	D	E	
	5						D	D	E	E	D	D	D	D	E	E	E	D	P	E	E	M	D	D	D	P	E	
	6						D	D	P	E	E	D	D	D	P	E	E	D	D	P	E	E	D	D	P	E	E	

M= metaestro; D= diestro; P= proestro; E= estro.

Grupo	Animal	Abertura do canal vaginal / Fase da secreção vaginal																										
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	26°	
<b>CONTROLE NEGATIVO</b>	<b>1</b>			M	D	D	P	E	D	E	E	E	M	D	D	D	D	D	D	P	E	D	D	D	D	P	E	
	<b>2</b>							D	D	D	D	D	D	D	P	E	E	M	D	D	E	E	E	D	D	E	E	
	<b>3</b>			D	P	E	E	D	D	D	D	D	P	E	E	M	D	D	P	E	D	D	D	E	E	D	D	
	<b>4</b>						D	P	E	D	D	D	P	E	E	E	D	D	D	E	E	D	D	P	E	E	D	
	<b>5</b>			M	D	D	D	D	E	E	D	D	D	D	D	D	E	D	D	D	D	P	E	D	D	P	E	
	<b>6</b>				P	E	M	D	D	D	D	D	E	E	E	D	D	D	P	E	D	D	E	E	D	D	D	E
<b>CONTROLE POSITIVO</b>	<b>1</b>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	E	E	<b>M</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	E
	<b>2</b>			E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	E	<b>M</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
	<b>3</b>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	<b>M</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
	<b>4</b>				E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	E	E	<b>M</b>	<b>D</b>	E	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
	<b>5</b>		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	<b>D</b>	E	<b>D</b>	E	<b>M</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
	<b>6</b>			E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	<b>P</b>	E	E	E	E	<b>M</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	E
	<b>7</b>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	E	E	<b>D</b>	<b>D</b>	E

1°= corresponde ao primeiro dia de abertura do canal vaginal. Período de tratamento= 28 dias.

M= metaestro; D= diestro; P= proestro; E= estro.



## ANEXO 1

Revista Brasileira de Farmacognosia 25 (2015) 320–327



Revista Brasileira  
de Farmacognosia  
BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY  
www.sbfgnosia.org.br/revista



Original Article

Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*

Tânia Mara Antonelli-Ushirobira<sup>a</sup>, Addressa Blainski<sup>a</sup>, Naiara Cássia Gancedo<sup>b</sup>, Fernanda Gaburo<sup>b</sup>, Kátia Aparecida Kern Cardoso<sup>c</sup>, Eneri Vieira de Souza Leite-Mello<sup>d</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>a,\*</sup>, Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

<sup>c</sup> Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Biologia e Museu Dinâmico Interdisciplinar, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 June 2015

Accepted 15 July 2015

Available online 6 August 2015

## Keywords:

Baicuru

Guaicuru

*Limonium brasiliense*

Phenolic compounds

Rhizome

## ABSTRACT

*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, is an herb popularly known as guaicuru, guaicurá or baicuru. The species inhabits salt marshes from the coastal region of southern Brazil, including Rio de Janeiro, to Uruguay and Argentina. Although widely used in folk medicine in the state of Rio Grande do Sul to treat genitourinary infections and to regulate menstrual periods, *L. brasiliense* has been little studied. The present morpho-anatomical study was undertaken to resolve some doubts in the literature as to the nature of the part of the plant that is used for medicinal purposes, a true rhizome or a root. The morpho-anatomical characteristics were analyzed with the aid of light and scanning electron microscopy. The botanical material was characterized as a rhizome with internodes that are evident in the younger but not the older portions. Microscopic analysis revealed the presence of a multilayered periderm with a cortex, ray parenchyma, and pith, formed by collenchyma tissue with abundant intercellular spaces in the outer portions of the cortex, responsible for the rigidity of the body, and with walls impregnated with phenolic compounds. The vascular bundles are collateral with elliptical to elongated cells, and with few conducting and sclerenchymal elements. Groups of sclereids are dispersed through the cortex and pith. These morpho-anatomical characteristics define the structure as a rhizome.

© 2015 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

## Introduction

*Limonium* Mill., the most species-rich in the Plumbaginaceae, includes about 350 species of herbs. The genus is best represented in the Mediterranean regions of Europe and in Asia, and can also be found in coastal regions of North and South America, South Africa, and Australia (Mobot, 2015). In general, species of *Limonium* live as halophytes, including in alpine regions (Chant, 1993). In other countries, such as China, stems and roots of various species of *Limonium* are used in folk medicine, and some of them are similar in morphology and anatomy, making them difficult to identify using traditional methods (Ding et al., 2012).

*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze is an herb popularly known as guaicuru, guaicurá or baicuru (Dias da Silva, 1920) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. It is grown and marketed by small farmers in estuarine regions of the River Plate Basin. According to Simões

et al. (1998), this herb is common in coastal salt marshes in southern Brazil, from Paraná to Rio Grande do Sul, and in Uruguay and Argentina; Zappi (2015) gave the range as extending from southern Brazil to the state of Rio de Janeiro.

Although it was described in the first edition of the Brazilian Pharmacopoeia (1929), *L. brasiliense* is not included in the current Pharmacopoeia. It is popularly used to treat uterine and ovarian inflammation, vaginal discharge and dysmenorrhea (Moura et al., 1985), and is useful to regulate menstrual periods (Lifchitz, 1981), as well as having an antimicrobial effect (Rosito, 1975). Murray et al. (2004) isolated five antioxidant compounds from extracts of *L. brasiliense* roots. Their chemical composition includes hydrolyzable and condensed tannins, 4-O-methyl gallic acid, sitosterol, and triterpenic saponins, the structures of which have not been determined (Rosito, 1975).

The first botanical description of *L. brasiliense* was contained in the *Flora brasiliensis* (Martius, 1840–1906). Dias da Silva (1920) provided a detailed anatomical description, noting the organoleptic characteristics of fresh plants, i.e. a strong unpleasant odor that disappears upon dissection, and a spicy astringent flavor. Martius

\* Corresponding author.

E-mail: mello@uem.br (J.C.P. de Mello).



## ANEXO 2

Journal of Ethnopharmacology 174 (2015) 293–298



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

## Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats



Tânia M. Antonelli-Ushirobira<sup>a</sup>, Andressa Blainski<sup>a</sup>, Henrique G. Fernandes<sup>b</sup>,  
Gislaine F. Moura-Costa<sup>c</sup>, Marco A. Costa<sup>c</sup>, Lilian B. Campos-Shimada<sup>d</sup>,  
Clairce L. Salgueiro-Pagadigorria<sup>d</sup>, Edilson N. Kaneshima<sup>b</sup>, Tânia C.A. Becker<sup>e</sup>,  
Eneri V.S. Leite-Mello<sup>f</sup>, João C.P. de Mello<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 May 2015

Received in revised form

22 July 2015

Accepted 18 August 2015

Available online 20 August 2015

#### Keywords:

*Limonium brasiliense*

Preclinical toxicity

Redox state of the liver

Mutagenicity

Plumbaginaceae

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, popularly known as baicuru, has been used in folk medicine to treat menstrual cramps and to regulate menstrual periods. However, little is known about its safety. This study evaluated the safety through *in vivo* tests of the acute, long-term, and liver toxicity, and the mutagenicity of the crude extract (CE) from rhizomes of *L. brasiliense*.

**Materials and methods:** The acute toxicity was assessed in Swiss mice, and the chronic toxicity in Wistar rats. Male and female mice received the CE orally in single doses of 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, or 5.0 g/kg. Clinical changes and mortality rate were used as parameters to assess the acute toxicity. In the long-term evaluation, male and female Wistar rats were treated orally with daily doses of the CE (50, 100, or 200 mg/kg) for 90 days. Assessments of weight, behavior and food intake, urinalysis, biochemical and hematological analyses, as well as macro- and microscopic observations of several organs were performed. The redox state of the liver was evaluated as a means of investigating the liver toxicity, and the micronucleus test to assess mutagenicity was also performed.

**Results:** Evaluation of acute toxicity indicated no apparent clinical change in the animals; the LD<sub>50</sub> was 4.8 g/kg. Evaluation after 90 days administration showed that the CE, even in higher doses than are considered therapeutic, appeared to be safe. The micronucleus test demonstrated a low mutagenic potential for the CE.

**Conclusion:** Our results showed that treatment with the CE from *L. brasiliense* caused low or no toxicity, as assessed using these doses and evaluation methods.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The genus *Limonium* (family Plumbaginaceae) includes 163 accepted species (Kunitake et al., 1995; The Plant List, 2015). In Brazil, the only member of this genus is *Limonium brasiliense* (Boiss) Kuntze, popularly known as baicuru or guaicuru. This species is widespread in Argentina, Uruguay, and southern Brazil, where it grows preferentially in lowlands and saline soils along

the Rio de la Plata (Moura et al., 1985; Murray et al., 2004).

Rhizomes of *L. brasiliense* have been used in folk medicine as an antiseptic in genitourinary infections, an astringent and depurative, and especially to treat menstrual cramps and to regulate menstrual periods (Moura et al., 1985). There are reports of its use in the treatment of hemorrhage and rheumatism, and it is also believed to have cardioprotective properties (Murray et al., 2004).

Studies with ethanolic extracts (fluid extract, 1:1 v/w) have revealed the existence of anti-inflammatory activity (Jahns and Crescente, 1976). Moura et al. (1985) demonstrated the anti-inflammatory action of the ethanol extract (100% ethanol) injected by the intraperitoneal route at a dose of 250 mg/kg, on test-paw edema induced by carrageenan. The antioxidant activity of the

\* Corresponding author at: Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil.  
E-mail address: [mello@uem.br](mailto:mello@uem.br) (J.C.P.d. Mello).



## ANEXO 3



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: 2 / 8 / 2011 Parecer nº 064/2011

Pesquisador: João Carlos Palazzo de Mello Setor: DEF  
Título: Protocolo nº 012/2011

**Limonium brasiliense (BOISS.) Kuntze (Plumbaginaceae): Avaliação Química e Biológica**

Entrada: 6/4/2011 Início: 1/2/2012 Término: 31/7/2014

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

**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:**

Após análise e discussão do Projeto, e das alterações, feitas pelo Coordenador, sugeridas pelo Comitê, e baseado no fato de que a Metodologia a ser empregada segue os Princípios Éticos na Experimentação Animal, somos de Parecer Favorável que este Comitê Aprove o presente Projeto.



  
Prof. Dr. GENTIL ZANINI DE MORAES,  
Presidente em exercício do CEAE.

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-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 Inciso II do recebimento da comunicação;  
IV - não aprovado