

Estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos de *Bellis perennis* L. (margarida)

Estudios agronómicos, genéticos, morfoanatômicos, fitoquímicos, toxicológicos y farmacológicos de *Bellis perennis* L. (margarita)

Agronomic, genetic, morphoanatomic, phytochemical, toxicological and pharmacological studies of *Bellis perennis* L. (daisy)

Dr. Thiago Henrique Costa Marques, Dra. Antonia Amanda Cardoso de Almeida, Dra. Pauline S. dos Santos, Dr. Cassio Herbert S. Melo, Prof. Rivelilson Mendes de Freitas

Universidade Federal do Piauí, Bairro Ininga, Teresina, Piauí. Brasil.

RESUMO

Introdução: *Bellis perennis* L. (Asteraceae) é conhecida popularmente como margarida, margarita, margarida-vulgar, margarida-menor ou margarida-comum. É uma herbácea perene, amplamente distribuída em toda a Europa e Norte da África.

Objetivo: realizar um levantamento bibliográfico sobre aspectos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, toxicológicos e farmacológicos desta espécie.

Métodos: realizada uma revisão dos artigos completos originais e de revisão disponíveis na literatura, por meio de busca de artigos nos idiomas português, inglês ou espanhol, compreendidos entre os anos de 1962 e 2011 nas seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde, *Science Direct*, *Scielo* e *Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line*. Foram utilizados, para busca dos artigos, os seguintes descritores: *Bellis perennis*, *B. perennis*, Asteraceae, estudos botânicos, estudos químicos, estudos toxicológicos e atividades farmacológicas. Além disso, foram incluídos os resultados

experimentais dos estudos de toxicidade aguda em camundongos tratados com extrato etanólico das flores de *B. perennis*.

Resultados: sua ampla utilização como planta medicinal e devido à ausência de informações sistematizadas sobre sua toxicidade e ações farmacológicas justificam a importância dessa revisão, uma vez que já foram isolados vários constituintes químicos. Em virtude dessas propriedades terapêuticas ainda não serem bem compreendidas, e devido à sua importância na fitoterapia, novos estudos fitoquímicos e farmacológicos devem ser conduzidos.

Conclusão: apesar do seu amplo uso, a literatura não fornece detalhes sobre as suas propriedades toxicológicas e farmacológicas, demonstrando a uma necessidade de novas pesquisas científicas.

Palavras-chave: *Bellis perennis*, agronomia, genética, morfoanatomia, fitoquímica, toxicologia, farmacologia.

RESUMEN

Introducción: *Bellis perennis* L. (Asteraceae) es popularmente conocida como margarita. Es una hierba perenne, de amplia distribución en toda Europa y el norte de África.

Objetivos: realizar una revisión de la literatura sobre los aspectos agronómicos, genéticos, morfológicos y anatómicos, químicos, toxicológicos y farmacológicos de esta especie.

Métodos: se llevó a cabo una revisión de los artículos completos originales, así como de la literatura disponible en portugués, inglés o español, entre 1962 y 2011, en las bases de datos siguientes: LILACS, *Science Direct*, *Scielo* y *Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line*. Se utilizó para buscar artículos, los descriptores siguientes: *Bellis perennis*, *Bellis perennis*, Asteraceae, estudios botánicos, químicos, estudios toxicológicos y actividades farmacológicas. Adicionalmente, se incluyeron los resultados de los estudios experimentales de toxicidad aguda en ratones, tratados con el extracto de etanol de flores de *Bellis perennis*.

Resultados: su amplio uso como planta medicinal y por causa de la falta de información sistemática sobre su toxicidad y acciones farmacológicas, se justifica la importancia de esta opinión, porque ya se han aislado varios componentes químicos. Como estas propiedades terapéuticas aún no se comprenden bien, y por su importancia en fitoterapia, nuevos estudios fitoquímicos y farmacológicos deben realizarse.

Conclusión: a pesar de su uso generalizado, la literatura no proporciona detalles acerca de sus propiedades toxicológicas y farmacológicas, lo que demuestra la necesidad de la investigación científica.

Palabras clave: *Bellis perennis*, agronomía, genética, morfoanatomía, fitoquímica, toxicología, farmacología.

ABSTRACT

Introduction: *Bellis perennis* L. (Asteraceae), commonly known as daisy, is a perennial herb of wide distribution throughout Europe and the north of Africa.

Objectives: conduct a bibliographic review about the agronomic, genetic, morphological and anatomic, chemical, toxicological and pharmacological characteristics of this species.

Methods: a review was carried out of full-text original papers, as well as materials published in Portuguese, English and Spanish between 1962 and 2011 in the

following databases: LILACS, *Science Direct*, *Scielo* and *Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line*. The search terms used were *Bellis perennis*, *B. perennis*, Asteraceae, botanical studies, chemical studies, toxicological studies and pharmacological activities. We also included the results of experimental studies on acute toxicity in mice treated with ethanolic extract of flowers of *Bellis perennis*.

Results: its wide use as a medicinal plant and the scarcity of systematic information about its toxicity and pharmacological actions, justify the relevance of this review, since several chemical components have already been isolated. Given the fact that these therapeutic properties are still not well understood, and in view of their importance for phytotherapy, it is recommended that further phytochemical and pharmacological studies be carried out.

Conclusion: despite the widespread use of this plant, the bibliography on the topic does not offer details about its toxicological and pharmacological properties. Hence the need for further scientific research.

Key words: *Bellis perennis*, agronomy, genetics, morphoanatomy, phytochemistry, toxicology, pharmacology.

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica, que objetivam enriquecer os conhecimentos sobre as plantas medicinais.¹

Até o século XIX, os medicamentos disponíveis eram quase que exclusivamente formulados à base de plantas medicinais. Segundo Oliveira & Akisue,² planta medicinal é todo vegetal que contém em um ou vários de seus órgãos, substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos ou precursores de substâncias para tal fim. De início, o descobrimento das propriedades terapêuticas dos vegetais era meramente intuitivo ou, às vezes, pela observação dos animais, que buscavam nas ervas o alívio para suas afecções.³ Recentemente, as plantas medicinais passaram a ser estudadas de forma criteriosa e sistemática, do ponto de vista científico, com a finalidade de identificar seus componentes químicos e comprovar as suas ações farmacológicas, bem como detectar efeitos indesejáveis. Neste sentido, o Brasil com sua enorme biodiversidade, apresenta grande potencial para a pesquisa e exploração na área de plantas medicinais,³ podendo contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos. Apesar da riqueza da flora brasileira, com cerca de 500.000 espécies, existe consenso sobre a insuficiência de estudos científicos sobre o assunto,⁴ pois dados anteriores revelam que somente 6 % das

plantas existentes foram estudadas quanto a sua atividade biológica^{5,6} e, que apenas 15 % foram avaliadas fitoquimicamente.⁷

A família Asteraceae compreende, aproximadamente, 1 500 gêneros e 2 300 espécies,⁸ incluindo o gênero *Bellis* e a espécie *Bellis perennis*, conhecida como margarida comum ou margarida inglesa.

Esta espécie é utilizada popularmente por suas propriedades expectorantes, cicatrizantes, antiinflamatórias, anti-hemorragicas, anestésicas, antiparasitárias, antifúngicas, antimicrobianas e antioxidantes.⁹⁻¹³ Também foi proposto que células desta planta representam uma ferramenta valiosa para estudos de localização de proteínas em células de plantas vivas.¹⁴

No entanto, a ampla utilização na medicina popular e a considerável ausência de informações sistematizadas disponíveis na literatura justificam a importância de uma revisão sobre os aspectos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos realizados com *B. perennis*.

Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre a *B. perennis*, uma planta medicinal com várias ações farmacológicas descritas na literatura. No entanto, sua toxicidade e atividades farmacológicas sobre o Sistema Nervoso Central e para terapêutica dos transtornos de ansiedade, depressão e epilepsia ainda não foram descritos.

MÉTODOS

Foi realizado levantamento bibliográfico dos artigos completos originais e de revisão disponíveis na literatura sobre os estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos da espécie *B. perennis* (Asteraceae), por meio de busca de artigos nos idiomas português, inglês ou espanhol, compreendidos entre os anos de 1962 e 2011 nas seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), *Science Direct*, *Scielo* e *Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line* (Medline).

Foram utilizados, para busca dos artigos, os seguintes descritores e suas combinações nas línguas portuguesa, inglesa ou espanhola: "*Bellis perennis*", "*B. perennis*", "Asteraceae", "estudos botânicos", "estudos químicos", "estudos toxicológicos" e "atividades farmacológicas". Além disso, foram incluídos os resultados experimentais dos estudos de toxicidade aguda em camundongos tratados com extrato etanólico das flores de *B. perennis* por via oral durante 14 dias. Durante o estudo da toxicidade aguda, foi determinada a dose letal média (DL₅₀), bem como foram avaliadas as alterações durante o período de observação dos animais no peso corpóreo, no consumo de água e ração, na atividade locomotora e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Os critérios de inclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos completos originais e de revisão publicados em português, inglês ou espanhol; artigos na íntegra que retratassem a temática referente à revisão integrativa e artigos publicados e indexados nos referidos bancos de dados nos últimos dez anos.

Foram encontrados 63 artigos por meio da busca com as palavras chaves selecionadas para o estudo nas bases de dados, sendo deste 01 artigo disponível na

base LILACS, 34 artigos na base *Science Direct*, 00 artigos na base *Scielo* e os outros 32 na base MEDLINE, no entanto, foram selecionados para a revisão 24 artigos que atenderam aos critérios de inclusão do estudo.

Os critérios de exclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em outros idiomas; artigos repetidos nas bases de dados, não disponíveis e sem resumo que retratassem a temática referente à revisão de integrativa. Para o estudo foram lidos apenas os artigos selecionados para a elaboração do manuscrito.

RESULTADOS

Aspectos agronômicos, genéticos e morfoanatômicos de Bellis perennis

Bellis perennis L. (Asteraceae) ou margarida comum é uma herbácea perene.⁹ A planta é amplamente distribuída em toda a Europa e Norte da África. Conhecida como uma planta ornamental e suas flores e folhas jovens são usadas na preparação de saladas.¹¹

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico.¹

O grupo *Bellis* foi incluído no subgrupo Asterinae (Astereae), juntamente com outros 117 gêneros, representando mais de 3.000 espécies. Reconstruções filogenéticas indicam que Astereae é um agrupamento monofilético. O grupo *Bellis* é constituído pelos gêneros *Bellis* L. e *Bellium* L., distribuídos na bacia do Mediterrâneo, e *Rhynchospermum* Reinw., distribuído nas regiões oriental e sudeste da Ásia.¹⁵

As análises filogenéticas revelaram que o grupo *Bellis* é um conjunto natural que compreende todas as espécies de *Bellis* e *Bellium*, mas não *Rhynchospermum*. Resultados recentes também sugerem uma diversificação no oeste da bacia mediterrânica de duas linhagens monofiléticas, *Bellis* e *Bellium*. Três grandes grupos podem ser distinguidos entre o gênero *Bellis*: o grupo *B. perennis*, contendo cinco espécies anuais e perenes, com três níveis de ploidia (diplóides, octoplóides e decaplóides), que são distribuídos em toda a bacia do Mediterrâneo; o grupo *B. sylvestris*, com cinco espécies anuais e perenes, localizadas principalmente no Mediterrâneo Ocidental, com cinco níveis de ploidia (decaplóide, diplóides, tetraplóides, hexaplóide, octoplóide) e uma terceira espécie perene que consiste em três diplóides e que apresentam uma diversificação notável de morfologias e características marcantes, como uma forma de vida anual em diferentes áreas geográficas durante a diversificação das espécies *Bellis* no Mediterrâneo ocidental.¹⁵

Estudos fitoquímicos de Bellis perennis

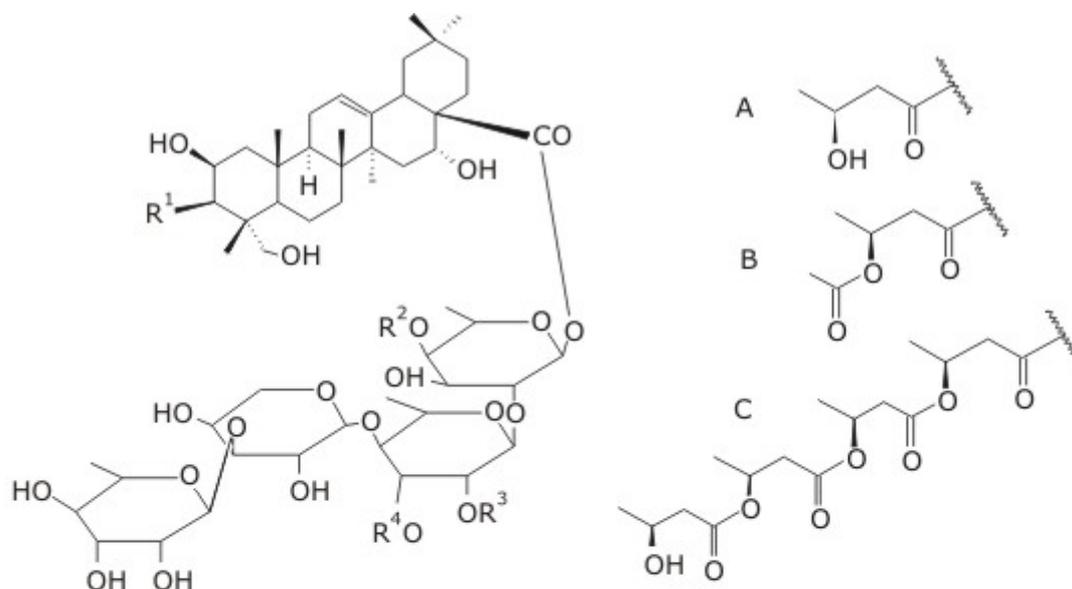
Neste estudo foi realizado o *screening* fitoquímico do extrato etanólico das flores de *B. perennis* segundo a metodologia previamente descrita.^{16,17} Neste *screening* foi

identificada a presença de flavonóides, alcalóides, cumarinas, triterpenos e esteróides. Não se detectou a presença de taninos, saponinas e quinonas.

Um trabalho sobre os constituintes químicos das raízes e flores de *B. perennis* demonstrou a presença de várias moléculas bioativas que explicam a sua ampla utilização farmacológica. Dentre estas biomoléculas pode ser verificada a presença de várias saponinas e flavonóides. A composição química dos óleos essenciais das folhas e flores desta espécie tem sido pouco investigada e há relatos sobre a presença de compostos voláteis a partir desta espécie.⁹

As saponinas são uma classe de compostos estruturalmente diversos que ocorrem em muitas espécies de plantas, que são caracterizados por um núcleo central de óxido de esqualeno. Tradicionalmente, eles são subdivididos em glicosídeos triterpênicos e esteroidais, ou em espirostanol, triterpênicos, saponinas e furostanol. Até cinco principais classes de esqueletos poderiam existir dentro de uma ordem de plantas, mas a distribuição de esqueletos no reino vegetal não parece ser de ordem ou subclasse específica.¹⁸

Foram isoladas das raízes de *B. perennis* as perennisaponinas A (1), B (2), C (3), D (4), E (5) e F (6). A atividade citotóxica destas saponinas, juntamente com uma saponina conhecida, bellissaponina BS2 (7) (Fig. 1), contra células humanas HL-60 de leucemia promielocítica também são relatados.¹⁹



	1	2	3	4	5	6	7
R ¹	Glc	Glc	Rha	Rha	Rha	Rha	Glc
R ²	Ac	Ac	A	B	C	C	H
R ³	Ac	H	H	H	H	Ac	H
R ⁴	H	Ac	H	H	H	H	H

Glc=β-d-glicopiranosil; Rha=α-l-ramnopiranosil; Ac=acetil

Fig. 1. Estruturas das saponinas trierpênicas A (1), B (2), C (3), D (4), E (5) e F (6) e belisaponina BS2 (7). Fonte: Li et al.,19 2005.

Duas outras saponinas aciladas triterpênicas foram isoladas de *Bellis perennis*: belisaponinas BA1 e BA2²⁰ (Fig. 2).

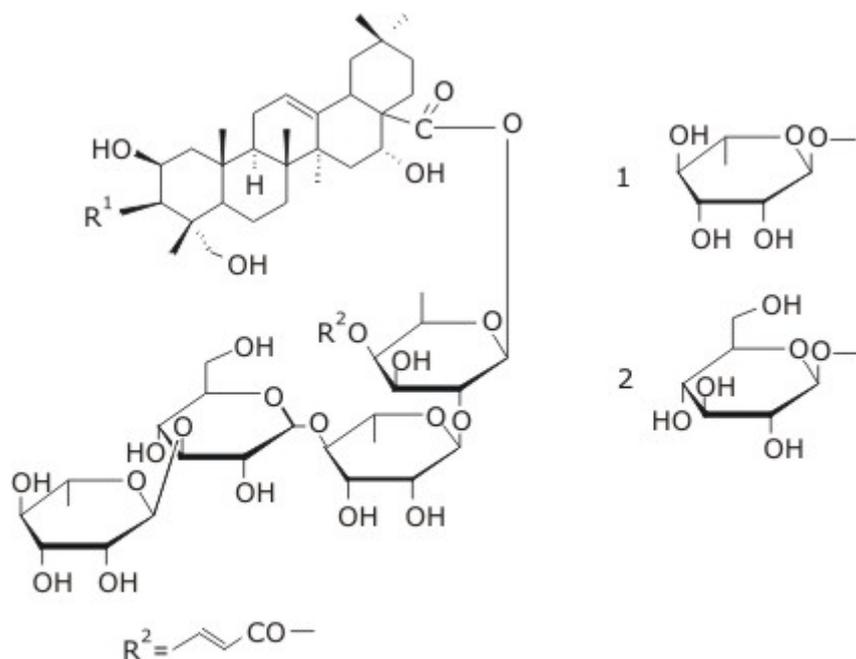


Fig. 2. Belisaponinas BA1(1) e BA2 (2). Fonte: Schöpke et al.,1991.²⁰

O extrato metanólico das flores de *Bellis perennis* mostrou atividade inibitória de lipase pancreática (IC_{50} = 455 μ g/mL). A partir do extrato, sete novas saponinas triterpênicas denominadas perennisaponinas G (IC_{50} = 163 μ M), H (IC_{50} = 137 μ M), I (IC_{50} = 147 μ M), J (IC_{50} = 148 μ M), K (IC_{50} = 223 μ M), L (IC_{50} = 81,4 μ M) e M (IC_{50} = 195 μ M) foram isolados como inibidores da enzima lipase pancreática. As estruturas foram elucidadas com base em estudos fitoquímicos e dos dados espectroscópicos²¹ de RMN H^1 e C^{13} (Fig. 3).

Três 3-glucuronilglicosídeos de cianidina foram isoladas das flores vermelhas de *B. perennis*.²² (Fig. 4).

Continuando a revisão sobre os estudos fitoquímicos, foram isolados três flavonóides glicosilados das flores de *B. perennis*:²³ Isoramnetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo, Isoramnetina 3-O- β -D (6"acetil)-galactopiranosídeo e Caempferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo.

As flores de *B. perennis* cultivadas na Albânia foram extraídas com metanol (extrato metanólico, 25,8 % das flores secas). A fase aquosa foi submetida à cromatografia de camada delgada (CCD) e as frações eluídas em água e metanol (12,5 e 6,4 %, respectivamente).¹¹

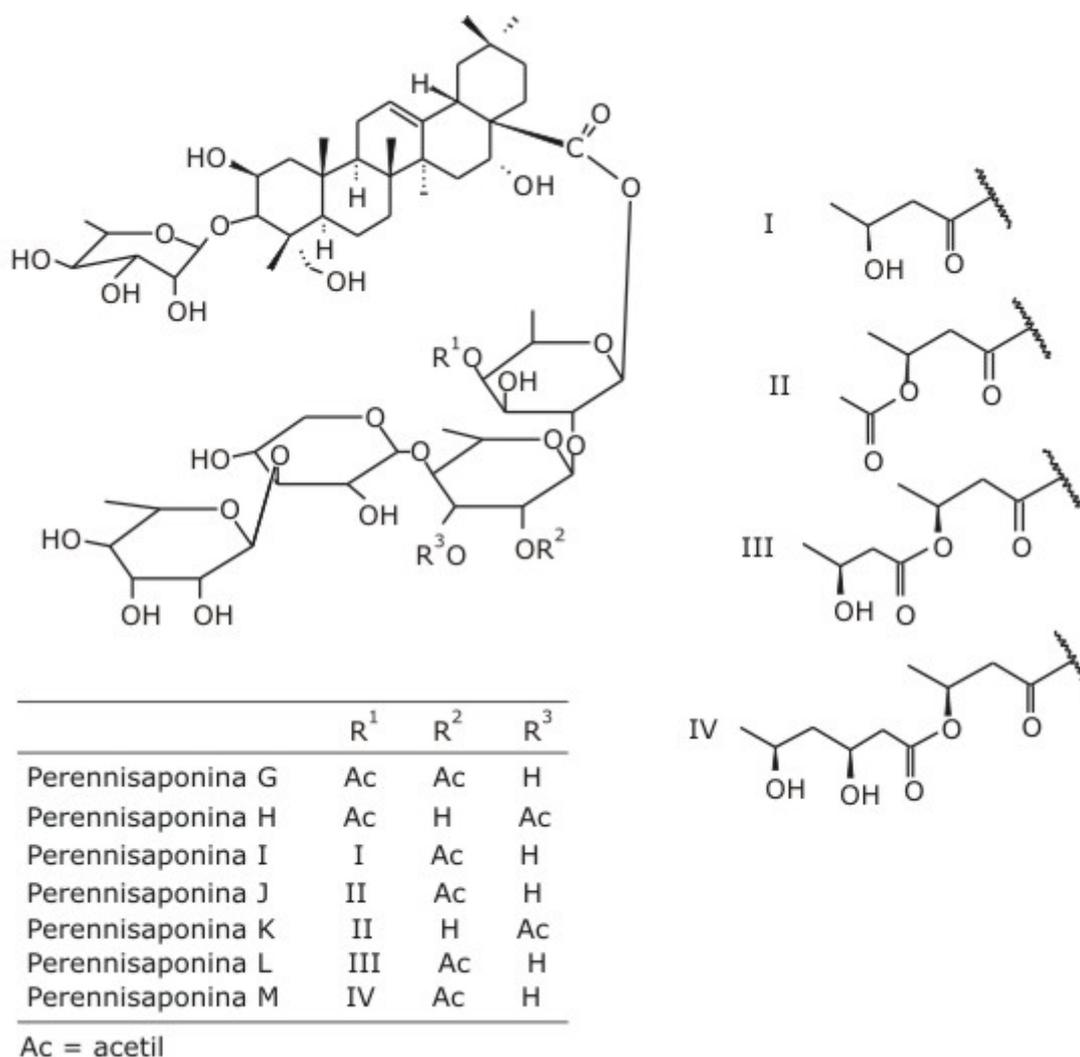


Fig. 3. Perennisaponinas G, H, I, J, K, L e M. *Fonte:* Morikawa et al.,²¹ 2010.

Quatro novas saponinas triterpênicas (I, II, III e IV) foram isoladas a partir do extrato preparado da parte subterrânea de *B. perennis*.²⁴ 3-O-β-D-glicopiranosídeo de 2β,3β,16 α-tri-hidroxi-olean-12-eno-28-óico do ácido-28- α-L-ramnopiranosil (1—2) - [β-D- glucopiranosil (1—6)]-β-D-glicopiranosídeo, 2β, ácido 3β,23-tri-hidroxi-olean-12-eno-28-óico-28-O- β-D-xilopiranosil (1—2) - [β-d glicopiranosil-(1—6)]-β-D-glicopiranosídeo, 2β,3β,23-tri-hidroxi-olean-12-eno-28-óico do ácido-28-O- α-L-ramnopiranosil (1—2) - [β-D-glicopiranosil (1—6)]-β-D-glicopiranosídeo e 3-O- α-L-ramnopiranosil-2β, 3β ,23-tri-hidroxi-olean-12-eno-28-óico do ácido-28-O-β-D-glicopiranosil (1—2)-[β-D-glicopiranosil (1—6)]-β-D-glicopiranosídeo.

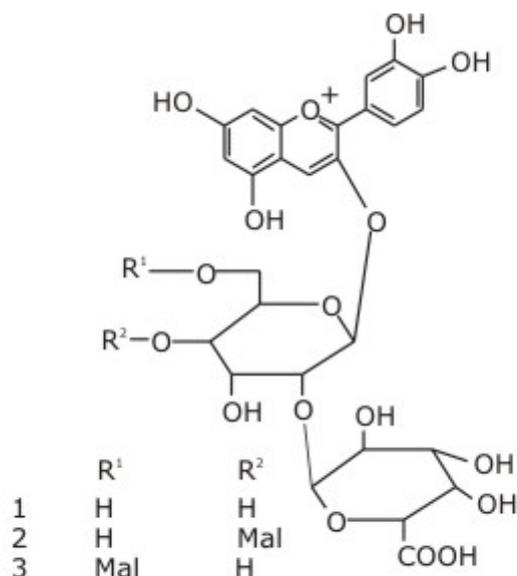


Fig. 4. Três 3-glucuronilglicosídeos de cianidina das flores vermelhas de *Bellis perennis*. Fonte: Toki et al., 22 1991.

Acredita-se que as saponinas triterpênicas, devido à sua intensa propriedade antifúngica, atuam como uma barreira química contra ataques de fungos em plantas. Apesar da importância, o mecanismo real da sua biossíntese e os papéis atuais em vários eventos biológicos ainda não foram totalmente esclarecidos. Uma característica comum nessas saponinas triterpênicas isoladas de *B. perennis* é o compartilhamento por todas as saponinas da presença de um oligossacarídeo ligado à aglicona.²⁵

Os triterpênicos são compostos constituídos basicamente de trinta unidades de carbono e seis isoprenos. A maioria possui em sua constituição hidroxilas que podem ser glicosiladas, produzindo heterosídeos cardiotônicos, importantes agentes terapêuticos para doenças cardiovasculares, e saponinas. Biossinteticamente são derivados de condensação de duas moléculas de farnesilpirofosfato (FPP), produzindo o esqualeno, precursor acíclico desta classe de compostos. A provável ciclização da molécula de esqualeno leva à formação da estrutura básica dos triterpenóides, o ciclopentano-hidrofenantreno, importante precursor dos esteróides vegetais e animais e das saponinas triterpênicas. As saponinas triterpenóides apresentam três tipos de estruturas básicas: oleanos, ursanos e lupanos.²⁵

Dessa forma, extratos metanólicos preparados a partir das flores, folhas e raízes apresentaram eficiência na extração de diversos compostos de *B. perennis*, que foram isolados e estudados quanto às suas propriedades farmacológicas.

Cinco saponinas triterpenóides VIII (1), IX (2), X (3), XI (4), e XII (5) foram isoladas a partir da fração eluída em MeOH do extrato metanólico das flores de *B. perennis*. A fração eluída inibiu o esvaziamento gástrico em ratos tratados com uma dose de 200 mg/kg, por via oral, de óleo de oliva.²⁶

Estudos farmacológicos da espécie Bellis perennis

Esta espécie é utilizada popularmente por suas propriedades expectorantes, cicatrizantes, anti-inflamatórias, anti-hemorragicas, anestésicas, antiparasitárias, antifúngicas, antimicrobianas e antioxidantes.⁹⁻¹²

Tradicionalmente, a espécie *B. perennis* tem sido usada como anti-reumática, expectorante, cicatrizante e anti-hemorragica. Além disso, tem sido demonstrado que essa mesma espécie possui efeito antifúngico.⁹

A espécie, em estudo anterior, foi capaz de reduzir as perdas sanguíneas em pacientes durante partos normais ou cirurgias cesarianas quando comparada ao grupo placebo.¹⁰

A partir do extrato metanólico das flores, sete novas saponinas triterpênicas foram isoladas como demonstrado na figura 3 que apresentaram atividade inibitória da atividade da enzima lipase pancreática.²¹ O extrato metanólico e sua fração de saponinas isoladas das flores de *B. perennis* foram associados com o óleo de oliva para tentar suprimir a elevação de triglicerídeos em camundongos.¹¹ E o estudo demonstrou que a associação foi capaz de diminuir os níveis de triglicerídeos, desta forma podemos especular que essa planta medicinal pode ser usada no tratamento clínico de pacientes com dislipidemias.

Diferentes partes do *B. perennis* foram submetidas à hidrodestilação e os produtos foram posteriormente analisados por CG e CG/EM. Os extratos (aquoso e metanólico) foram preparados a partir das partes aéreas. A redução da atividade antioxidante entre os extratos testados foi observada, uma vez que a formação de peróxidos de ácido linoléico foi maior para o extrato aquoso. As partes de *B. perennis* em diferentes concentrações foram avaliadas em sua atividade antimicrobiana contra uma variedade de agentes patogênicos, mas sem efeito inibitório significativo.¹²

Em nosso laboratório, foi investigado por meios de estudos fitoquímicos e farmacológicos o extrato etanólico dos capítulos florais de *B. perennis*, e já foi possível isolar uma fração aquosa pura que se encontra em fase de identificação. Foi verificado um potencial efeito ansiolítico para o extrato etanólico e fração aquosa em ratos. No entanto, continuam os estudos iniciados para identificar e determinar a estrutura química do composto isolado para publicação posterior, bem como para elucidar o provável mecanismo de ação ansiolítica no Sistema Nervoso Central.

Portanto, em virtude dos compostos isolados, várias atividades farmacológicas foram observadas a partir dessa espécie, destacando a necessidade de mais estudos químicos e farmacológicos para a obtenção de resultados mais significativos e uma possível aplicação clínica desta espécie, como um possível fitoterápico.

Estudos anteriores indicam um significativo efeito anticonvulsivante e neuroprotetor em camundongos adultos pré-tratados de forma aguda com o extrato etanólico das flores de *B. perennis* no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina.²⁷ Devido aos seus efeitos neurofarmacológicos verificados nesse estudo durante a fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina, novos estudos neuroquímicos com a espécie devem ser realizados, para esclarecer seu mecanismo de ação e justificar o potencial uso desta planta medicinal, como agente terapêutico para o tratamento da epilepsia humana.

Como citado anteriormente, a fração eluída em MeOH do extrato metanólico das flores de *B. perennis* inibiu o esvaziamento gástrico em ratos tratados com uma dose de 200 mg/kg, por via oral, de óleo de oliva.²⁶

Diversos autores atribuem o efeito farmacológico observado com extratos e frações isoladas desta espécie à presença de saponinas, entretanto novos estudos ainda são necessários. Neste sentido, essa revisão vem auxiliar e estimular novas investigações com essa espécie, a fim de atribuir uma maior segurança, qualidade e eficácia de possíveis formulações farmacêuticas para fins terapêuticos.

Estudos toxicológicos da espécie Bellis perennis

Foram utilizados camundongos machos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss*, adultos, com 2 meses de idade e peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias-CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Durante todos os experimentos, os animais foram aclimatados a 25 ± 2 °C e mantidos em gaiolas de acrílico apropriadas, com no máximo 6 animais. Os animais foram observados durante 24 h em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro/escuro alternado de 12 h, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA).

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI No. 077/10). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estavam em conformidade com o Parágrafo Único do Artigo 2º da Resolução No. 714, de 20 de Junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária-CFMV.

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). As análises estatísticas foram realizadas através da aplicação do Teste *t*-Student-Neuman-Keuls para amostras não-pareadas. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias, foi utilizada Análise de Variância (ANOVA One-way) seguido do *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando o valor obtido para "*p*" foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism 5.01 (Graph Pad Software, san Diego, CA, E.U.A.).

Durante o estudo da toxicidade aguda, os animais foram divididos em cinco grupos de 10 camundongos. Cada grupo, em jejum de 12 horas, recebeu por via oral doses de 1 000 a 4 000 mg/kg, respectivamente, do extrato etanólico das flores de *B. perennis*. Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas com ração e água *ad libitum* e durante 14 dias foram observados para determinação dos parâmetros comportamentais, segundo o teste hipocrático.²⁸

O número de mortes de cada grupo foi expresso como o percentual do número total de animais que receberam o extrato etanólico das flores de *B. perennis*. A determinação da DL₅₀ foi feita pela interpolação semi-logarítmica, sendo postos no eixo das ordenadas os valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abcissas, as doses administradas do extrato. No estudo de toxicidade aguda, foi determinada que a DL₅₀ por via oral corresponde a 2 310 mg/kg.

Durante os 14 dias de observação os animais foram monitorados quanto a eventuais alterações comportamentais ou de natureza tóxica. Em intervalos de 2 dias os animais foram pesados e, diariamente, tanto água quanto ração, medidos e pesados, respectivamente. Em nossos estudos toxicológicos não foram detectadas alterações no peso corpóreo dos animais, bem como não foi vista nenhuma mudança no consumo de água e ração.

Foi mensurada a atividade locomotora dos animais por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais, baseado no modelo descrito por Archer.²⁹ Após 30 min da última dose dos tratamentos, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto no qual o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea) foram registrados durante o tempo de 5 min. Não foi detectado nenhum sinal clínico de toxicidade aguda.

Após 14 dias de tratamento, os animais que sobreviveram ao período de observação foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) e a coleta do sangue foi realizada por punção do plexo venoso orbital, utilizando-se agulhas e seringas e tubos de microhematócrito. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 (Labtest) com sistemas comerciais da Labtest[®]. Por sua vez, os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio de um analisador automático de células hematológicas Advia 120/Hematology Siemens. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas.

Não se detectaram alterações nos principais parâmetros hematológicos, embora pequenas flutuações na contagem diferencial de leucócitos tenham sido observadas (tabela). No entanto, essas mudanças não apresentam interesse de importância clínica. Por sua vez, em relação aos parâmetros bioquímicos, foi verificada uma redução nos níveis de ácido úrico, creatinina, triglicérides e das transaminases hepáticas, sugerindo que o extrato etanólico pode ser usado de forma segura, uma vez que não foi capaz de induzir nefro e hepatotoxicidade em camundongos adultos, além de possivelmente ser utilizado nos tratamentos de hipertrigliceridemia ou hiperuricemia (tabela).

Tabela. Efeito da administração aguda intraperitoneal do extrato etanólico das flores (EEF) de *Bellis perennis* em parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos

Parâmetros	Controle (n=10)	EEF 50 (n=10)	EEF 100 (n=10)	EEF 150 (n=10)
Hematológicos				
Eritrócitos (mm ³)	8,63 ± 0,03	8,36 ± 0,13	8,46 ± 0,09	8,57 ± 0,10
Hemoglobina (g/dL)	14,17 ± 0,17	13,14 ± 0,34	13,61 ± 0,42	13,69 ± 0,53
Hematócrito (%)	42,90 ± 0,48	41,56 ± 1,41	42,10 ± 1,28	41,57 ± 1,82
VCM (fL)	49,71 ± 0,04	49,71 ± 1,50	49,76 ± 1,79	48,51 ± 1,20
HCM (pg)	16,42 ± 0,03	15,71 ± 1,21	16,09 ± 1,04	15,97 ± 0,94
CHCM (g/dL)	33,03 ± 0,38	31,62 ± 0,67	32,33 ± 0,80	32,93 ± 0,85
Plaquetas (mm ³)	292,4 ± 0,84	301,6 ± 33,36	287,10 ± 15,08	291,90 ± 20,19
Leucócitos (mm ³)	8,53 ± 0,77	8,31 ± 0,31	8,43 ± 0,41	8,38 ± 0,89
Neutrófilos (%)	17,00 ± 0,79	16,38 ± 1,03	16,25 ± 0,88	16,88 ± 0,87
Eosinófilos (%)	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,07	0,37 ± 0,09	0,33 ± 0,05
Linfócitos (%)	78,12 ± 0,31	79,50 ± 3,36	76,75 ± 4,76	78,33 ± 4,87
Monócitos (%)	2,70 ± 0,21	2,62 ± 0,26	2,62 ± 0,37	2,75 ± 0,37
Bioquímicos				
Glicose (mg/dL)	88,73 ± 0,11	87,00 ± 1,59	89,89 ± 1,86	89,63 ± 2,58
Uréia (mg/dL)	54,67 ± 0,30	25,43 ± 1,81 ^a	25,00 ± 3,24 ^a	18,00 ± 2,25 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,04	0,62 ± 0,01 ^a	0,61 ± 0,05 ^a	0,58 ± 0,05 ^a
Ácido úrico (mg/dL)	2,61 ± 0,04	2,43 ± 0,52 ^a	2,62 ± 0,26	2,71 ± 0,04
Triglicérides (mg/dL)	106,7 ± 0,05	92,9 ± 17,9 ^a	98,56 ± 9,4 ^a	97,67 ± 5,1 ^a
Colesterol total (mg/dL)	86,07 ± 0,57	85,63 ± 9,53	85,00 ± 10,72	86,67 ± 10,65
AST (U/mL)	91,40 ± 1,81	36,86 ± 3,48 ^a	32,00 ± 1,93 ^a	33,57 ± 3,55 ^a
ALT (U/mL)	57,83 ± 0,81	32,86 ± 6,92 ^a	40,14 ± 6,70 ^a	24,71 ± 2,75 ^a

O EEF foi administrado em dose única por via intraperitoneal para grupos de camundongos (n= 10 por grupo) com as seguintes doses: 50 (EEF 50), 100 (EEF 100), e 150 mg/kg (EEF 150) por 24 h. Ao controle foi administrado veículo (Tween 80 0,05 %). Os dados são expressos como média \pm E.P.M.; ^ap<0,001 versus grupo veículo (ANOVA e t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

Os estudos agrônômicos, genéticos e morfoanatômicos do grupo *Bellis* demonstram a existência de mais de 3.000 espécies. Estudos fitoquímicos das raízes e flores de *B. perennis* demonstraram a presença de várias moléculas bioativas que explicam a sua ampla utilização farmacológica. Nos estudos fitoquímicos realizados neste trabalho, identificou-se a presença de flavonóides, alcalóides, cumarinas, triterpenos e esteroides para o extrato etanólico dessa espécie.

Dentre estas biomoléculas pode ser verificada a presença de várias saponinas e flavonóides. A espécie, *B. perennis*, tem sido amplamente utilizada devido as suas propriedades farmacológicas para afecções respiratórias, traumas uterinos, inflamação, infecções, bem como por suas propriedades anestésicas. Em virtude dessas propriedades terapêuticas e de outras em investigação pré-clínica, essa espécie pode ter uma grande importância no tratamento clínico de várias patologias, inclusive em doenças neurodegenerativas.

CONCLUSÃO

Apesar do amplo uso de plantas medicinais, a maioria dos artigos publicados não fornece informações suficientes sobre os aspectos químicos e toxicológicos de seus constituintes químicos, demonstrando-se, portanto, como área promissora de novas pesquisas. Corroborando com os estudos anteriores já descritos para espécie, sugere-se que o extrato etanólico das flores de *B. perennis* pode ser usado de forma segura, uma vez que apresentou uma ampla margem de segurança, não induziu toxicidade aguda, bem como não alterou o comportamento motor e maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos após 14 dias de tratamento por via oral.

REFERÊNCIAS

1. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Júnior VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quím Nova. 2002;25(3):429-38.
2. Oliveira F, Akisue G. Fundamentos de Farmacobotânica. 2^a ed. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 178.
3. Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia Júnior A, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(3):367-73.
4. Ferreira, SH. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 2002. p. 132.

5. Shultes RE. The future of plants as sources of new biodynamic compounds. In: Swain T, editor. Plants in the development of modern medicine. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1972. p. 103-24.
6. Tippo O, Stern WL. Humanistic Botany. New York: W.W. Norton; 1977. p. 605.
7. Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. J Pharm Pharmacol. 2000;52(3):253-62.
8. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. Sistemática Vegetal: uma abordagem filogenética. Sunderland: Sinauer; 1999. p. 464.
9. Avato P, Tava A. Acetylenes and Terpenoids of *Bellis perennis*. Phytochemistry. 1995;40(1):141-7.
10. Oberbaum M, Galoyan N, Lerner Geva L, Singer R, Grisaru S, Shashar D, et al. The effect of the homeopathic remedies *Arnica montana* and *Bellis perennis* on mild postpartum bleeding -A randomized, double-blind, placebo-controlled study- Preliminary results. Complement Ther Med. 2005;13(2):87-90.
11. Morikawa T, Li X, Nishida E, Nakamura S, Ninomiya K, Matsuda H, et al. Perennisosides I-VII, acylated triterpene saponins with antihyperlipidemic activities from the flowers of *Bellis perennis*. J Nat Prod. 2008;71(5):828-35.
12. Kavalciöđlu N, Açık L, Demirci F, Demirci B, Demir H, Baser KH. Biological activities of *Bellis perennis* volatiles and extracts. Nat Prod Commun. 2010;5(1):147-50.
13. Karakas FP, Karakas A, Boran Ç, Türker AU, Yalçın FN, Bilensoy E. The evaluation of topical administration of *Bellis perennis* fraction on circular excision wound healing in Wistar albino rats. Pharm Biol. 2012;50(8):1031-7.
14. Jaedicke K, Rösler J, Gans T, Hughes J. *Bellis perennis*: a useful tool for protein localization studies. Planta. 2011;234(4):759-68.
15. Fiz O, Valcárcel V, Vargas P. Phylogenetic position of Mediterranean Astereae and character evolution of daisies (*Bellis*, Asteraceae) inferred from nrDNA ITS sequences. Mol Phylogene Evol. 2002;25(1):157-71.
16. Barbosa WLR. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Rev Científica UFFA. 2004;4(1):12-8.
17. Matos FJA. Introdução à útoquímica experimental. Fortaleza: UFC; 2009. p. 150.
18. Vincken JP, Heng L, Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry. 2007;68(3):275-97.
19. Li W, Asada Y, Koike K, Nikaido T, Furuya T, Yoshikawa T. Bellisosides A-F, six novel acylated triterpenoid saponins from *Bellis perennis* (compositae). Tetrahedron. 2005;61(11):2921-9.
20. Schöpke T, Wray V, Rzazewska B, Hiller K. Bellissaponins BA1 and BA2, acylated saponins from *Bellis perennis*. Phytochemistry. 1991;30(2):627-31.

21. Morikawa T, Li X, Nishida E, Nakamura S, Ninomiya K, Matsuda H, et al. Medicinal Flowers. Part 29. Acylated Oleanane-Type Triterpene Bidesmosides: Perennisaponins G, H, I, J, K, L, and M with pancreatic lipase inhibitory activity from the flowers of *Bellis perennis*. *Helv Chim Acta*. 2010;93(3):573-86.
22. Toki K, Saito N, Honda T. Three cyanidin 3-glucuronylglucosides from red flowers of *Bellis perennis*. *Phytochemistry*. 1991;30(11):3769-71.
23. Gudej J, Nazaruk J. Flavonol glycosides from the flowers of *Bellis perennis*. *Fitoterapia*. 2001;72(7):839-40.
24. Schöpke T, Wray V, Kunath A, Hiller K. Bayogenin and asterogenic acid glycosides from *Bellis perennis*. *Phytochemistry*. 1992;31(7):2555-7.
25. Mandal S, Sharman N, Mukhopadhyay B. Synthesis of a tetrasaccharide related to the triterpenoid saponin Bellisoside isolated from *Bellis perennis* (compositae). *Tetrahedron: Asymmetry*. 2010;21(17):2172-6.
26. Morikawa T, Li X, Nishida E, Nakamura S, Ninomiya K, Matsuda H, et al. Medicinal Flowers. XXXII. Structures of oleanane-type triterpenesaponins, perennisosides VIII, IX, X, XI, and XII, from the flowers of *Bellis perennis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;59(7):889-95.
27. Marques THC, Cardoso KMF, Almeida AAC, Tomé AR, Freitas RM. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with *Bellis perennis* in pilocarpine-induced seizures. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2011;10(4):338-50.
28. Malone MH, Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*. 1962;25(4):320-32.
29. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. *Anim Behav*. 1973;21(2):205-35.

Recibido: 9 de enero de 2013.

Aprobado: 18 de septiembre de 2013.

Thiago Henrique Costa. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Cep: 64.049-550. Fone: +55-86-3215-5870. E-mail: rivellilson@pq.cnpq.br