



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO E  
ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Varronia globosa* Jacq. (BORAGINACEAE)**

**CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2015**

**CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS**

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO E  
ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Varronia globosa* Jacq. (BORAGINACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação de Farmácia da  
Universidade Estadual da Paraíba, em  
cumprimento à exigência para obtenção do  
título de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Maria Fechine**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila de Albuquerque Montenegro**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

D192i Dantas, César Augusto Gonçalves.  
Investigação fitoquímica e avaliação do potencial tóxico e anti-inflamatório de *Varronia globosa* Jacq. (boraginaceae) [manuscrito] / Cesar Augusto Gonçalves Dantas. - 2015.  
63 p. : il. color.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.  
"Orientação: Profa. Dra. Ivana Maria Fachine, Departamento de Farmácia".

1. Etnobotânica. 2. Maria-preta. 3. Flavonoides. 4. Citotoxicidade. I. Título.

21. ed. CDD 580

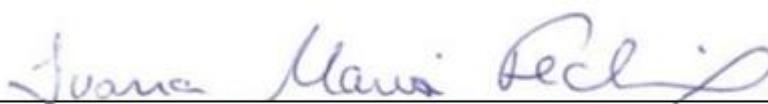
**CÉSAR AUGUSTO GONÇALVES DANTAS**

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO E  
ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Varronia globosa* Jacq. (BORAGINACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação de Farmácia da  
Universidade Estadual da Paraíba, em  
cumprimento à exigência para obtenção do  
título de Bacharel em Farmácia.

Campina Grande – PB, 2015.

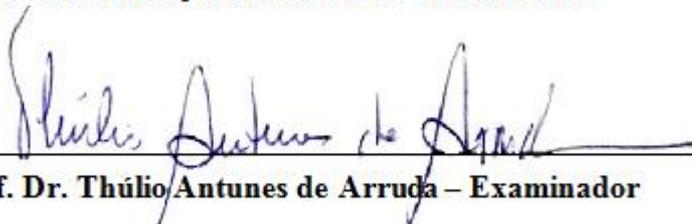
Data da Aprovação: 16/06/2015



**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ivana Maria Fachine – Orientadora**



**Prof. Dr. Harley da Silva Alves – Examinador**



**Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda – Examinador**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por suprir todas minhas necessidades.

Aos meus pais, João Teodoro e Rilvaneide, pelo amor e por não medirem esforços quando mais precisei de ajuda e compreensão.

Aos meus tios, Nelson e Renilda, pelos cuidados e conselhos.

Aos meus amigos, Arthur, Amanda, Samara e Fernanda, pela amizade e conhecimentos compartilhados.

À professora Ivana Fechine, pelo carinho, orientação, dedicação e ensinamentos.

À professora Camila Montenegro, pela amizade, paciência e incentivo.

Às professoras, Lindomar e Rossana, que desde o começo apoiaram-me na jornada científica.

Aos professores, Harley e Thúlio, pela colaboração e por participarem da minha banca examinadora.

Aos colegas do laboratório de Fitoquímica e Farmacologia.

À Unidade Acadêmica de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba.

## RESUMO

*Varronia globosa* Jacq, conhecida popularmente como “Maria-preta” é uma espécie da família Boraginaceae que apresenta ampla distribuição na região Nordeste do Brasil. O infuso ou decocto das folhas desta planta medicinal é utilizado na medicina popular para o tratamento de reumatismo, indigestão e cólicas menstruais. No entanto, para que um material vegetal possa ser utilizado como fitoterápico na prevenção e/ou cura de doenças são necessários estudos prévios relativos a aspectos botânicos, farmacognósticos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. Neste trabalho, foi estudado o extrato etanólico bruto (EEB) obtido das folhas pulverizadas de *Varronia globosa*, tendo como objetivo efetuar uma abordagem fitoquímica, avaliar seu potencial tóxico (*in vivo* e *in vitro*) e sua atividade anti-inflamatória. Foi realizado inicialmente um *screening* fitoquímico qualitativo, seguido da quantificação de flavonoides. Posteriormente foram estabelecidos alguns parâmetros físico-químicos de qualidade utilizando metodologias farmacopéicas. Foi efetuada uma análise toxicológica aguda em camundongos para cálculo da DL50, com triagem comportamental e finalizada por avaliação da evolução ponderal, consumo de água e ração, além de análise macroscópica dos principais órgãos. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através da análise da atividade hemolítica e anti-hemolítica (teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária - FOE). Por fim, o teste de potencial anti-inflamatório foi realizado segundo o modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos. A prospecção fitoquímica preliminar sugeriu a presença de flavonoides e saponinas. A quantificação de flavonoides revelou uma concentração de 19,85 µg/mL. Com relação aos parâmetros físico-químicos determinados, a granulometria classificou o pó como moderadamente grosso, a densidade apresentou um valor de 0,125 g/mL, o fator de *Hausner* encontrado foi superior a 1,25, foi observado um pH de 5,54, a perda por dessecação ficou entre 8-14% e o teor de cinzas foi de 5,87%. O ensaio de toxicidade aguda na dose única de 2000 mg/kg do EEB das folhas de *V. globosa* não provocou sinais de alterações no Sistema Nervoso Central e Autônomo, no entanto, promoveu aumento no consumo de ração pelos machos e induziu alterações discretas nos pesos relativos dos rins para ambos os grupos quando comparado com seu respectivo grupo controle. No estudo citotóxico o extrato etanólico bruto das folhas de *V. globosa* não causou hemólise significativa dos eritrócitos em nenhum dos grupos sanguíneos testados, mas também não protegeu as células eritrocitárias quando expostas a soluções hipotônicas de NaCl. No ensaio de peritonite induzida por carragenina o EEB diminuiu significativamente a migração leucocitária nas doses de 250 e 500 mg/kg em comparação ao grupo controle. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, torna-se possível concluir que a espécie *V. globosa* possui interessante perfil fitoquímico, com baixa toxicidade *in vivo* e *in vitro* e potencial anti-inflamatório, garantindo uma boa margem de segurança para dar-se continuidade aos estudos com esta espécie.

Palavras-chaves: Etnobotânica. Maria-preta. Flavonoides. Citotoxicidade.

## ABSTRACT

*Varronia globosa* Jacq, popularly known as "Maria-preta" is a specie from Boraginaceae family that is widely distributed in northeastern Brazil. The infusion or decoction of the leaves is used in folk medicine for rheumatism, indigestion and menstrual cramps. However, for a vegetal material can be used as a herbal medicine for the prevention and/or treatment of disease are needed previous studies of botanical aspects, pharmacognostic, phytochemicals, pharmacological and toxicological. In this work, we studied the crude ethanolic extract (CEE) obtained from the leaves of *Varronia globosa*, aiming a phytochemical analysis, assess its toxic potential (*in vivo* and *in vitro*) and its anti-inflammatory activity. The phytochemical screening was initially performed, followed by the quantification of flavonoids present, later some physico-chemical parameters of quality were established using pharmacopoeial methodologies. An acute toxicological analysis in mice to calculate LD50 with behavioral screening and finished by evaluation of weight gain, consumption of water and food as well as macroscopic analysis of the principal organs was performed. Cytotoxicity assays were performed by analysis of the hemolytic activity and anti-hemolytic (Erythrocyte of Osmotic Fragility test - EOF). Finally, the anti-inflammatory potential test was performed according to the model of peritonitis induced by carrageenin in mice. The preliminary phytochemical suggested the presence of flavonoids and saponins, the quantification of flavonides revealed a concentration 19,85 µg/mL. With respect to certain physical and chemical parameters, the powder grain size classified as moderately thick, the density showed a value of 0.125 g / ml, the Hausner factor was bigger than 1.25, a pH of 5.54 was observed, the loss on drying was between 8-14% and the ash content was 5.87%. Acute toxicity test on the single dose of 2000 mg/kg of the CEE of *V. globosa* leaves, caused no changes of signals in the central nervous and autonomic nervous system, however, promoted increase in feed intake by males and induced mild changes in relative weights of the kidneys in both groups compared to their respective control group. In the cytotoxic study the CEE of *V. globosa* leaves did not cause a significant hemolysis of erythrocytes in any of the blood groups tested, but did not protect the erythrocyte cells when exposed to hypotonic solutions of NaCl, in peritonitis test induced by carrageenan the CEE decreased significantly leukocyte migration at doses of 250 and 500 mg/kg compared to the control group. From the results obtained in this study, it is possible to conclude that the species *V. globosa* has interesting phytochemical profile. With low toxicity *in vivo* and *in vitro* and anti-inflammatory potential, ensuring a good margin of safety to give continuity to the studies of this species.

Keywords: Ethnobotany, Maria-preta, Flavonoids, Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Espécie <i>Varronia globosa</i> .....	20
<b>Figura 2</b> - Núcleo fenil-benzopirano.....	23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resultados do <i>screening</i> fitoquímico das folhas de <i>V. globosa</i> .....	41
<b>Tabela 2</b> – Resultados da quantificação de flavonoides do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	43
<b>Tabela 3</b> – Resultados dos parâmetros físico-químicos do pó das folhas de <i>V. globosa</i> . .....	43
<b>Tabela 4</b> – Efeito do tratamento agudo do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> na avaliação ponderal e consumo de água e ração dos camundongos (n=6).....	49
<b>Tabela 5</b> - Efeitos do tratamento agudo do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> no peso dos órgãos de camundongos (n=6).....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Curva de calibração para a quantificação dos flavonoides do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	42
<b>Gráfico 2</b> – Efeito hemolítico do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> em eritrócitos humanos do tipo A.....	45
<b>Gráfico 3</b> – Efeito hemolítico do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> em eritrócitos humanos do tipo B.....	46
<b>Gráfico 4</b> – Efeito hemolítico do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> em eritrócitos humanos do tipo O.....	46
<b>Gráfico 5</b> – Atividade anti-hemolítica do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> frente a eritrócitos do tipo sanguíneo A .....	47
<b>Gráfico 6</b> – Atividade anti-hemolítica do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> frente a eritrócitos do tipo sanguíneo B .....	48
<b>Gráfico 7</b> – Atividade anti-hemolítica do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> frente a eritrócitos do tipo sanguíneo O .....	48
<b>Gráfico 8</b> – Avaliação da atividade Anti-inflamatória do EEB das folhas de <i>Varronia globosa</i> a partir do modelo experimental <i>in vivo</i> de Peritonite Aguda.....	51

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Classificação taxonômica da espécie <i>Varronia globosa</i> .....	20
-------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**AA** – Ácido aracdônico

**AIEs** - Anti-inflamatórios esteroidais

**AINEs** - Anti-inflamatórios não esteroidais

**AMPc** - Monofosfato cíclico de 3'5'-adenosina

**CLAE-EM** - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

**COX-2** - Ciclooxigenase

**DL 50** - Dose letal 50

**D.P.** - Desvio padrão

**E.P.M.** - Erro padrão da media

**EEB** - Extrato Etanólico Bruto

**Et al.** - Entre outros autores

**FOE** - Fragilidade osmótica eritrocitária

**GMPC** - Guanosina monofosfato cíclico

**LAFIT** - Laboratório de Fitoquímica

**LTC** - Leucotrienos

**NOS** - Sintetase do óxido nítrico

**OMS** - Organização mundial de saúde

**PAF** - Fator ativador plaquetário

**PG** - Prostaglandina

**PGHS** - Prostaglandina Sintetase

**PNPIC** - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

**PNPMF** - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

**RMN** - Ressonância Magnética Nuclear

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**TX** - Tromboxanos

**V. globosa** - *Varronia globosa*

**v.o.** - Via Oral (Gavagem)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1 Etudo etnobotânico.....	18
2.1.1 Família Boraginaceae, espécie <i>Varronia globosa</i> .....	18
2.2 Análise fitoquímica .....	21
2.3 Análise de toxicidade aguda.....	24
2.4 Avaliação do potencial citotóxico .....	26
2.5 Inflamação .....	27
3 OBJETIVOS .....	30
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 METODOLOGIA .....	31
4.1 Coleta e identificação das folhas de <i>V. globosa</i> .....	31
4.2 Secagem e trituração do material de vegetal de <i>V. globosa</i> .....	31
4.3 Preparação do Extrato Etanólico Bruto das folhas de <i>V. globosa</i> .....	31
4.4 <i>Screening</i> fitoquímicoEEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	31
4.4.1 Metabólitos solúveis em metanol .....	32
4.4.1.1 Heterosídeos flavônicos .....	32
4.4.1.2 Flavonoides .....	32
4.4.1.3 Catequinas .....	33
4.4.1.4 Alcaloides .....	33
4.4.2 Metabólitos solúveis em água .....	33
4.4.2.1 Polissacarídeos .....	33
4.4.2.2 Fenóis e taninos .....	33
4.4.2.3 Saponinas .....	34
4.4.3 Metabólitos solúveis em clorofórmio .....	34
4.4.3.1 Esteroides e triterpenóides .....	34

4.5	Quantificação de flavonoides do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	34
4.6	Análise físico-química do pó das folhas de <i>V. globosa</i> .....	35
4.6.1	Granulometria .....	35
4.6.2	Teor de cinzas .....	35
4.6.3	Perda por dessecação.....	36
4.6.4	Determinação do pH .....	36
4.6.5	Densidade bruta, de compactação e Fator de <i>Hausner</i> .....	36
4.7	Avaliação da citotoxicidade do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	37
4.7.1	Atividade hemolítica do EEB das Folhas de <i>V. globosa</i> .....	37
4.7.2	Atividade anti-hemolítica ou Fragilidade osmótica Eritrocitária (FOE).....	38
4.8	Animais para os experimentos <i>in vivo</i> .....	38
4.9	Ensaio de Toxicidade Aguda e triagem comportamental .....	38
4.10	Teste de atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> do EEB das Folhas de <i>V. globosa</i> - modelo de peritonite aguda .....	39
4.11	Análise estatística .....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1	Preparação do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	41
5.2	<i>Screening</i> fitoquímico EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	41
5.3	Quantificação de flavonoides do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	42
5.4	Análise físico-química do pó das folhas de <i>V. globosa</i> .....	43
5.5	Avaliação citotóxica do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	45
5.5.1	Atividade hemolítica do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> .....	45
5.5.2	Atividade anti-hemolítica ou Fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) .....	47
5.6	Ensaio de toxicidade aguda e triagem comportamental .....	49
5.7	Teste de atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> do EEB das folhas de <i>V. globosa</i> - modelo de peritonite aguda .....	51

6 CONCLUSÃO .....	53
REFERENCIAS .....	54
ANEXOS .....	63
Anexo A - Parâmetros indicativos de alterações no Sistema Nervoso Central.....	63

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para fins curativos cresceu e se desenvolveu ao longo da história da humanidade. Há muito as civilizações perceberam que as plantas são laboratórios vivos, cujos produtos de seu metabolismo especial são de grande complexidade que, na maioria das vezes, não seriam imaginados para serem sintetizados em laboratórios (AUBLET, 1975). Desde tempos remotos uma grande variedade de plantas é utilizada para o tratamento de diversas doenças (GRUPTA, 1994).

Com o advento da expansão da síntese orgânica e da utilização dos fármacos sintéticos no final do século XIX e no início do século XX relegaram ao segundo plano o uso de produtos vegetais na forma de fitoterápicos. Entretanto, é importante salientar que a maior parte dos fármacos no mercado eram derivados sintéticos de produtos naturais. Por volta da década de 60 houve uma valorização da pesquisa e utilização de produtos naturais e fitoterápicos, diante da necessidade de tratar doenças como câncer, mal de Alzheimer, Leishmaniose, AIDS, entre outras (CALIXTO, 2000; CALIXTO et al., 2000).

Os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros), sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como GMPc, AMPc,  $Ca^{2+}$ , proteínas quinases, etc.), e na expressão de enzimas que levam a produção de mediadores pró-inflamatórios como sintetase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenase (COX-2), citocinas (IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , etc.), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO et al., 2003).

A utilização de plantas medicinais por populações em todas as faixas de renda em diversas localidades, desde tribos indígenas até os grandes centros urbanos, merece atenção no contexto da incessante pesquisa de novos medicamentos. Através da etnofarmacologia podem-se identificar espécies com uma indicação já estabelecida, mesmo que baseada no senso comum, como possível fonte de novas moléculas. Porém, apesar do uso popular corriqueiro transmitido por várias gerações, a maioria dessas plantas não têm suas indicações cientificamente comprovadas, podendo provocar, muitas vezes, prejuízos ao invés de benefícios aos usuários (SOUZA, 2012).

Desta forma, nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no

estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz, tendo em vista que o uso popular de uma determinada planta não é suficiente para validá-la como fitoterápico. Deste modo, o emprego de técnicas modernas de Farmacologia, Bioquímica, Toxicologia e Biologia Molecular renovaram o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2000).

Considerando essas ideias, a análise fitoquímica e a validação experimental de plantas empregadas na medicina popular constitui importante tarefa da academia para as comunidades que as utilizam, além de fornecer subsídios para a descoberta de novas moléculas.

A espécie *Varronia globosa* teve sua constituição química elucidada por SILVA (2010) que descreve a presença de flavononas, sendo a única da família Boraginaceae a produzir tais metabólitos. Diante disso, a análise foi direcionada a quantificação e estudo dos flavonoides desta espécie, análise físico-química, caracterização da toxicidade *in vitro* e *in vivo*, e avaliação do seu potencial anti-inflamatório.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A contribuição de drogas vegetais ao arsenal terapêutico do mundo inteiro foi e é ainda de muita importância para as Ciências Farmacêuticas. O uso de reserpina, pilocarpina, papaverina, codeína, morfina, atropina, hiosciamina, rutina, cafeína, e de muitos outros, vem comprovar quão necessário tem sido à humanidade as drogas de origem vegetal (MATOS, 1989).

O Brasil é um país de grande biodiversidade vegetal. Nesse contexto inúmeras plantas medicinais são utilizadas por grande parte de nossa população, na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos. Também na extração de matéria-prima como extratos, óleos essenciais, substâncias químicas puras as quais podem servir de modelos para obtenção de análogos sintéticos ou material de partida no preparo de moléculas semi-sintéticas (CARVALHO, 2011).

As propriedades medicinais utilizadas por várias culturas cobrem aproximadamente 80% da população mundial, tornando-se necessário o estudo para novas descobertas de componentes bioativos em plantas, contribuindo para o desenvolvimento de fármacos, onde estes podem ajudar no tratamento de doenças, tais como tumores, diabetes, doenças cardíacas e distúrbios do sistema nervoso central (GURIB-FAKIM, 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2006; WAGNER, 2009).

Quando se trata de um material pouco conhecido, há necessidade de uma abordagem química, isto é, um exame rápido e superficial que forneça uma visão sincrética da composição química da droga ou da planta. Isto é feito através de testes preliminares ou abordagem fitoquímica (MATOS, 1989).

Desde o ano de 2006, o governo federal tem desenvolvido projetos para incentivar a pesquisa e o desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicos. Entre eles, a Portaria Ministerial MS/GM nº 971, de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) e o Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e dá outras providências. Essas políticas preconizam o incentivo à pesquisa e o desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país (CARVALHO, A. C B, 2008).

## 2.1 Estudo Etnobotânico

Os conhecimentos etnobotânicos são utilizados em diversas práticas e por diversas culturas; no entanto, como ciência é um campo de estudo relativamente novo. Ao longo desse tempo diversas conceituações já lhe foram atribuídas; Borges et al (2008), conceituam a Etnobotânica como sendo a ciência que “compreende o estudo das sociedades humanas, passadas e presentes, bem como, as interações ecológicas, genéticas, evolutivas, simbólicas e culturais destas sociedades com as plantas”.

A principal proposta desta ciência é a sistematização do conhecimento popular. No Brasil, a miscigenação de etnias e culturas é um fator que contribui diretamente na diversidade de saberes, cada um com suas particularidades. São comunidades que depositam conhecimentos milenares e únicos, que precisam ser preservados, e que podem desaparecer em meio às modificações antrópicas no ambiente (FONSECAKRUEL, SILVA e PINHEIRO, 2005).

O crescimento dos trabalhos etnobotânicos apresentou um expressivo aumento nas últimas décadas, principalmente em países da América Latina. No Brasil é evidente tamanha ascensão no número de pesquisadores ou de trabalhos nesta área. Destas publicações, aproximadamente 64% enfocam estudos sobre plantas medicinais (OLIVEIRA et al., 2009).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (Etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (Química Orgânica: Fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (Farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (Química Orgânica Sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (Química Medicinal e Farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MARCIEL et al., 2002).

### 2.1.1 Família Boraginaceae, espécie *Varronia globosa*

Na região Nordeste do Brasil, o bioma Caatinga é o principal ecossistema. Ele se estende numa área de 73.683.649 ha, que equivale a 6,83% do território nacional. É um bioma unicamente brasileiro que está localizado em um domínio de climas semiáridos e

que apresenta grande variedade de paisagens e relativa riqueza biológica (IBAMA, 2011). A caatinga compreende cerca de 80% do território paraibano, constituindo-se o principal componente vegetacional do Estado. Caracteriza-se por um clima quente e seco, semiárido, com chuvas de verão, que alcançam os índices mais baixos de precipitação, do estado, o que condiciona a uma vegetação, fortemente xerofítica (ANDRADE-LIMA, 1981).

Este bioma é rico em plantas da família Boraginaceae que possui cerca de 130 gêneros e 2.500 espécies, com ampla distribuição nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais do mundo (STEVENS, 2001). Podem ser encontrados desde ervas, subarbustos, arbustos, lianas até árvores. Suas folhas são simples, alternas, espiraladas ou não, subopostas ou mais raramente opostas ou verticiladas. As flores são gamopétalas, diclamídeas, pentâmeras, súpero-ovariadas e, apresentam-se reunidas em inflorescências paucifloras ou multifloras ou, menos frequentemente ocorrem isoladamente, na região axilar ou supra-axilar, compondo monocásios folhosos. O fruto é drupáceo ou esquizocárpico, com duas ou quatro núculas e representa um importante elemento para delimitação dos seus representantes (MELO, 2006). São plantas predominantemente polinizadas por insetos (HEYWOOD, 1996).

Quimicamente, a família caracteriza-se pela presença de flavonoides, lignoides, quinonas, triterpenos e alcalóides (BRITO, 1986). Farmacologicamente, diversas atividades biológicas foram comprovadas com extratos de espécies da família Boraginaceae, tais como: anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, entre outras (SERTIE et al., 1991).

As Boraginaceae apresentam grande importância econômica, possuindo várias espécies que são cultivadas como ornamentais, principalmente dos gênero *Heliotropium*, *Mertensia*, *Myosotis* e *Borago*. A família também apresenta espécies usadas na fabricação de cosméticos e na culinária como também algumas que são reconhecidas pelo seu valor medicinal, como por exemplo, *Symphytum officinale* L., *Borago officinalis* L., algumas espécies de *Varronia*, *Cordia* e *Heliotropium* (HEYWOOD, 1996).

Nesta família temos a espécie *Varronia globosa* (Figura 1) que encontra-se dispersa do sudeste da Flórida ao nordeste da América do Sul, incluindo Antilhas (MILLER 1988). No Brasil, ocorre apenas na região Nordeste (CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA). Está associada à vegetação de caatinga hipo-xerofítica e hiper-xerofítica. Coletada com flores em janeiro, fevereiro, de maio a julho e setembro e com frutos em

fevereiro.

**Figura 1.** Espécie *Varronia globosa*



Fonte: davesgarden. Disponível em <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/92175/#b>. Acessado em 01/06/2015.

A espécie *Varronia globosa* possui as seguintes características botânicas: Arbusto, ca. 1-2m alt.; ramos com lenticelas, vilosos. Folhas alternas; lâmina 5,3-6,7x1,8-2,6mm, discolor, membranácea, elíptica a lanceolada, ápice agudo, margem serrado-denteada, base oblíqua, face adaxial vilosa, face abaxial tomentosa, venação craspedódroma; pecíolo 0,5-0,6mm compr., viloso. Inflorescência glomérulo-globosa, congesta, axilar e supra-axilar; pedúnculo 1,8-4cm compr. Flores ca. 4,5mm compr., sésseis; cálice ca. 3mm compr., campanulado, lacínios 1-1,2mm compr., ovados, de ápice cirroso, com curtos tricomas ferrugíneos nas margens; corola ca. 4,5mm compr., infundibuliforme, alva a amarelada, vilosa internamente e externamente, lobos ca. 1mm compr., orbiculares; estames subsésseis, anteras ca. 0,7mm compr., oblongas, divaricatas, dorsifixas; ovário 1-1,2mm compr., cônico; estilete ca. 3mm compr., viloso na porção superior; ramos estigmáticos ca. 0,5mm compr., estigmas-4, ca. 0,7mm compr., foliáceos, pubescentes. Drupa não observada (MELO, 2005). Sua classificação taxonômica encontra-se no Quadro 1.

**Quadro 1:** Classificação taxonômica da espécie *Varronia globosa*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Superdivisão</b>	Spermatophyta
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta

<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Subclasse</b>	Asteridae
<b>Ordem</b>	Lamiales
<b>Família</b>	Boraginaceae
<b>Gênero</b>	<i>Varronia</i>
<b>Espécie</b>	<i>Varronia globosa</i> Jacq.

A espécie *Varronia globosa*, antigamente denominada de *Cordia globosa*, é popularmente conhecida como “Maria Preta”. O infuso ou decocto das folhas são utilizados contra reumatismos, indigestões e cólicas menstruais, em países como Jamaica, porém, em Cuba é reconhecida como uma espécie tóxica (ASPREY et al., 1955; LIZAMA et al., 1998). Foi detectado em cobaias atividade espasmolítica e vasodilatadora do extrato etanólico 95% (FENG et. al, 1962 *apud* AGRA et al., 2004).

## 2.2 Análise Fitoquímica

Desde os tempos antigos as plantas vêm sendo utilizadas nas sociedades humanas com propósitos terapêuticos, sendo que suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas pelo homem, principalmente, enquanto este buscava por alimento. De fato, o conhecimento etnobotânico farmacológico acumulado ao longo de gerações tem servido como base para o desenvolvimento de fármacos de grande importância (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Todas as plantas produzem constituintes químicos, os quais fazem parte de suas atividades metabólicas normais. Estes podem ser divididos em metabólitos primários, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos, encontrados em todas as plantas, e em metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Metabólitos secundários não têm uma função óbvia no metabolismo primário vegetal (crescimento, fotossíntese, reprodução, ou outra função primária da célula vegetal). Eles podem possuir um papel ecológico, como atrativos de polinizadores, representando adaptações químicas ao estresse do meio ambiente, ou serem

responsáveis pela defesa química da planta contra microrganismos, insetos e predadores maiores, ou mesmo outras plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os estudos destas substâncias foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, devido às suas diversas aplicações (TAIZ; ZEIGER, 2009). O homem utiliza muitos destes compostos como alimentos de alto valor nutritivo (nutracêuticos), temperos, aromas e fragrâncias, óleos vegetais, resinas, inseticidas, matérias-primas agrícolas, bem como medicamentos e outros fins industriais. Estes usos se refletem diretamente sobre os metabólitos secundários que são utilizados comercialmente como compostos biologicamente ativos (produtos farmacêuticos, temperos, fragrâncias, etc.), gerando produtos de alto valor em pequena quantidade quando comparados aos metabólitos primários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Além disto, os metabólitos secundários, em contraste com os primários, são conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando sua extração e purificação mais trabalhosa. Estes constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero e espécie produzem uma categoria química característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários são os seguintes: sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento; temperatura; disponibilidade hídrica; radiação ultravioleta; nutrientes; altitude; poluição atmosférica; indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Dessa forma, a pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundários relevante da mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a

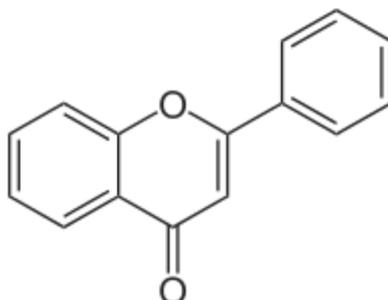
elucidação estrutural da mesma (FALKENBERG et al., 2004).

As reações químicas realizadas para a triagem fitoquímica (*screening* fitoquímico) permitem verificar a presença de classes de substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas. Classicamente, a caracterização dos principais grupos de substância vegetais de interesse tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001).

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (FILHO; YUNES, 1997; MUNDO, 2007).

Os flavonoides constituem uma classe de produtos naturais que se encontra distribuídas largamente no reino vegetal. Mais de 4000 diferentes compostos são conhecidos nas formas naturais ou de seus glicosídeos. E tem sido demonstrado a presença de flavonoides em quantidade significativa na espécie *Varronia globosa* (SILVA et al., 2004). A palavra flavonoide deriva do latim “flavus” que significa amarelo e se aplica a uma larga gama de compostos naturais vulgarmente conhecidos como “pigmentos das flores”, por participarem na coloração das pétalas. Estes compostos possuem um esqueleto carbônico básico C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> e possuem um núcleo benzopirano ou cromano, ligado a um anel aromático, formando o núcleo fundamental dos flavonóides “fenil-benzopirano” (figura 2).

**Figura 2.** Núcleo fenil-benzopirano



São conhecidas treze diferentes subclasses de flavonoides, e estas são diferenciadas pelas substituições que ocorrem na estrutura base (TRUEBA, 2003;

HEIM, 2002). Entre elas, encontram-se flavonas, flavonóis, chalconas, isoflavonas, flavanonas e auronas.

Dentre as diversas funções dos flavonoides nos vegetais, podemos citar: efeito fotoprotetor, controle de hormônios vegetais, proteção contra insetos dentre outras (RICE-EVANS et al., 1996). Estes compostos também possuem grande importância farmacológica como: atividade antioxidante, amplamente estudada, uma vez que se pode atribuir uma terapêutica baseada na ingestão de vegetais nos quais são abundantes (MARÍN et. al., 2002). Atividade anticancerígena, também tem sido alvo de estudo dos flavonoides (HOLLMAN et. al., 1996). Atividades anti-inflamatórias, antialérgicas, antiulcerogênicas e antivirais também são atribuídas aos flavonoides (SIMÕES, 2002).

A busca por compostos biologicamente ativos é um pouco complicada em produtos naturais. Os flavonoides estão presentes em extratos de plantas e o isolamento de grandes quantidades desses metabólitos além de sua determinação estrutural é uma tarefa complicada, requerendo na maior parte das vezes uso de técnicas analíticas avançadas combinadas (por exemplo, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de massas, raios-X) e grandes quantidades de amostras (FOSSSEN, 2003).

Atualmente, com o intuito de facilitar o isolamento e a identificação de produtos naturais, entre eles derivados flavonóicos, técnicas combinadas tais como CLAE-EM vem sendo utilizadas. Tais metodologias representam uma alternativa rápida, de elevada sensibilidade e que utiliza pequena quantidade de amostra, sendo muito bem empregada para a elucidação estrutural de diversos metabólitos de plantas (ELIPE, 2003).

### **2.3 Análise de toxicidade aguda**

O uso de plantas medicinais sobre várias formas de apresentação é bastante comum em várias camadas da população brasileira. Tal hábito parte do pressuposto de que as plantas medicinais, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos. Este aspecto é importante se considerarmos que o conhecimento sobre plantas medicinais é de domínio popular e em países em desenvolvimento, contém um forte componente social e cultural, pois estas plantas muitas vezes representam o único recurso terapêutico de muitas comunidades (ASSEMI, 2001).

Assim, embora os produtos naturais tenham amplos espectros terapêuticos e baixa incidência de efeitos colaterais, não são considerados como substâncias inócuas, sendo extremamente necessária a realização de ensaios toxicológicos para fornecer a

comunidade dados científicos sobre segurança ou toxicidade das plantas (ASSEMI, 2001).

Para o desenvolvimento de novos medicamentos, é necessária a realização de estudos pré-clínicos que consistem de testes em animais de laboratório e uma fase clínica ou testes clínicos, quando os medicamentos são testados nos seres humanos. A fase pré-clínica tem por objetivo principal o fornecimento de informações suficientes acerca da farmacologia e toxicologia da substância em análise para que, assim, possam ser realizados estudos clínicos com uma margem de segurança razoável e pré-estabelecida (PIVETTA, 2006).

A avaliação toxicológica é realizada com ensaios biológicos em animais e os resultados são extrapolados para humanos. Nestes casos, os exames hematológicos, bioquímicos, a autópsia geral, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para fins de comparação devem ser realizados, bem como a avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (LIMA, OLIVEIRA, NAGEM, 2003).

Os efeitos tóxicos observados no homem encontram-se geralmente, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. Soma-se ainda o fato de que a exposição de animais a agentes tóxicos em doses elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis perigos para a espécie humana que é exposta a doses muito menores (KLAASSEN, 2006; BARROS, DAVINO, 1996).

A análise toxicológica de produtos em organismos vivos pode envolver a avaliação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade sub-crônica e crônica) (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005).

A avaliação de toxicidade aguda tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL50 (dose letal mediana). Este parâmetro é útil para se identificar a toxicidade relativa da substância frente a uma população de animais de experimentação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda como o potencial tóxico em órgãos específicos, indicativos sobre a toxicocinética e mecanismos de ação, além do estabelecimento das doses para estudos complementares de toxicidade entre outros (VALADARES, 2006).

Como opção para a investigação da presença de possíveis agentes tóxicos nos extratos vegetais, o método de toxicidade aguda em dose simples representa uma avaliação estimada e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações iniciais acerca dos riscos sobre a saúde, resultante de uma exposição de

curta duração pela via de administração selecionada. Após a administração da substância teste, pela via escolhida, é feita uma observação clínica dos sintomas produzidos pela administração do fitoterápico nos animais. A anotação das respostas é efetuada em 30 minutos, 1, 2, 4, 12 e 24 horas após a administração e a partir deste tempo, uma vez ao dia durante o período de observação de 2 semanas, sendo as mais importantes: alterações de pelo, pele e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistemas nervoso central e periférico, atividade somatomotriz e comportamento. Especial atenção é dada a comportamentos tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Os resultados do estudo podem demonstrar a necessidade de estudos de média e longa duração (BRITO, 1994).

## **2.4 Avaliação do potencial citotóxico**

A detecção da atividade citotóxica é uma das medidas primordiais, visto que vários compostos químicos podem ter a capacidade de causar efeitos tóxicos e modificar a informação genética contida no DNA. Portanto, a obtenção de dados sobre a toxicidade desses agentes deve ser assegurada por experimentos que forneçam, com uma razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização (BENIGNI, 2005).

A avaliação citotóxica através da quantificação da hemólise é um modelo simples para estudar o efeito tóxico ou protetor de uma grande variedade de substâncias (LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; EISELE et al., 2006). O eritrócito é um tipo de célula que contém alta concentração de ácidos graxos polinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991) o que faz com que sua membrana celular seja muito vulnerável a reações envolvendo radicais livres e muito susceptível a hemólise. A ocorrência de hemólise pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO et al., 2006).

Os testes citotóxicos são recomendados pela Organização Mundial de saúde (OMS) em seu manual de controle de qualidade de derivados de plantas, está também inserido no guia para avaliação de segurança de cosméticos como parte dos testes toxicológicos recomendados (ANVISA, 2003).

A capacidade de resistência à hemólise é caracterizada pelo teste de fragilidade osmótica eritrocitária – FOE, que avalia a influência qualitativa de substâncias sobre os eritrócitos (MOUSINHO et al., 2008) e expressa a habilidade das membranas

manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, SAUNDERS, 2006).

## 2.5 Inflamação

Um simples organismo unicelular, como as bactérias e o mais complexo mamífero, como os humanos, possuem mecanismos que respondem a estímulos hostis e apresentam um sistema que busca manter o equilíbrio homeostático do organismo agredido. Nos vertebrados, a resposta deste sistema envolve a fisiologia, bioquímica e imunologia do organismo e é denominada de inflamação (VOLTARELLI, 1994).

A inflamação é um processo fisiológico que ocorre em decorrência da ativação de alguns mecanismos que provocam alterações nos componentes humorais e celulares após injúria tecidual. A exposição a um patógeno gera uma migração de células circulantes, que são direcionadas pela presença de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. A resposta na área da lesão caracteriza a área inflamada que apresenta sinais clínicos como rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (CRUVINEL et al., 2010).

Os mediadores da inflamação (leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos) são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (PAF), leucotrienos, citocinas, etc). Os mediadores estão envolvidos na gênese e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e se ligam a receptores específicos nas células-alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ZHOU et al., 2007).

O tempo de duração e a intensidade do agente inflamatório determinam diferentes graus ou fases de transformação nos tecidos. Categoricamente, a resposta inflamatória é dividida em três distintas fases, sendo que cada fase é mediada aparentemente por diferentes mecanismos. Inicialmente, é evidenciada uma fase aguda, caracterizada por ser de duração variável e alterações vasculares (fluxo e calibre vascular, aumento da permeabilidade vascular), seguida de uma fase subaguda, em que nota-se, predominantemente, a infiltração leucocitária e de outras células fagocíticas (quimiotaxia, adesão, transmigração e fagocitose) e, posteriormente, ocorre a fase

crônica, onde a proliferação é fato de destaque, em que ocorre a regeneração tecidual e fibrose (SANTOS JUNIOR, 2003).

A inflamação aguda em indivíduos normais é normalmente um mecanismo de proteção localizada em resposta a invasão microbiana, trauma/injúria ou estímulo químico. Quando a resposta inflamatória é excessiva e prolongada pode levar a diversas desordens que formam as patologias mais prevalentes, como as doenças reumáticas, diabetes, doença de Alzheimer e aterosclerose (SERHAN & CHIANG, 2004).

Na inflamação aguda os neutrófilos aderem ao endotélio e migram para o local da injúria através de fatores quimiotáticos, conhecido como diapedese (CARMAN, 2009). Moléculas de adesão são expressas de forma a facilitar a migração leucocitária, entre elas, as selectinas (sub-tipos P, E e L), de expressão primária, que desaceleram o fluxo sanguíneo, promovendo um aumento da viscosidade com estase vascular. As de expressão secundária são as integrinas, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 e VCAM-1). Esta fase é considerada definitiva para o extravasamento dos leucócitos nos sítios de inflamação (ARNAUT, 1997; SKARE, 1999; MOREIRA & CARVALHO, 2001).

Ao mesmo tempo, ocorre a ativação da fosfolipase A2 que transforma os fosfolípídeos de membrana em ácido araquidônico (AA), sendo substrato inicial para a cascata enzimática, que alimenta a inflamação. O AA ou 5,8,11,14-ácido eicosatetraenóico, é oriundo de fontes alimentares e da conversão do ácido linoléico (Ômega 6), não se apresenta livremente intracelular (citoplasma), sendo esterificado em fosfolípídeos de membrana. É liberado pela ação da fosfolipase A2 por estímulos mecânicos, químicos, físicos ou ainda por outros mediadores como o sistema complemento (BOZZA et al., 1997).

Quando da ativação da cascata do AA, os seus metabólitos são sintetizados por duas principais vias enzimáticas: as cicloxigenases (COX) ou PGHS (Prostaglandina Sintetase ou Prostaglandina Endoperóxido Sintetase) que geram prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), e as lipoxigenases produzindo leucotrienos (LTC) e lipoxinas. A primeira pode ser inibida por AINEs e a segunda por corticóides que irão inibir toda a cascata do AA, por ação indireta na inibição da fosfolipase A2 (OKUYAMA & AIHARA, 1986).

Mesmo sendo o mecanismo de inflamação indispensável à homeostase corpórea, o desconforto causado por essa resposta exige, em alguns casos, a intervenção com o

uso de medicamentos. Os glicocorticoides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são fármacos capazes de interferir neste processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto (COUTINHO et al., 2009).

Estes medicamentos tem ação eficaz sobre a inflamação, no entanto o uso prolongado destas drogas pode acarretar no aparecimento de efeitos colaterais que chegam a impossibilitar alguns tratamentos. Na corticoterapia, os efeitos estão relacionados ao tempo de tratamento e uso de glicocorticoides de ação mais prolongada. São implicações em uma variedade de sistemas no organismo; no sistema endócrino-metabólico, imunológico, cardiovascular e muitos outros. Os efeitos colaterais causados pelo uso de AINES é também relacionado aos tratamentos mais longos. O uso crônico destes medicamentos pode acarretar em esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal (LONGUI, 2007; HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006).

Atualmente, a principal abordagem terapêutica para a inflamação acontece com o uso destes fármacos; desta forma, a grande incidência de efeitos colaterais por estes medicamentos se torna um estímulo para a procura de novas alternativas terapêuticas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar o perfil fitoquímico, toxicológico e farmacológico do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *Varronia globosa*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Produzir o extrato etanólico bruto das folhas de *V. globosa*.
- Realizar o *Screening* fitoquímico qualitativo do EEB das folhas de *V. globosa*;
- Quantificar os flavonoides do EEB das folhas de *V. globosa*;
- Efetuar uma caracterização físico-química do pó seco de *V. globosa*;
- Avaliar a citotoxicidade do EEB das folhas de *V. globosa* em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O;
- Avaliar a fragilidade osmótica eritrocitária em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O;
- Avaliar a toxicidade do EEB das folhas de *V. globosa* por meio de ensaios toxicológicos pré-clínicos agudos (investigação da DL50, triagem farmacológica comportamental, perfil do consumo de água, alimento, evolução ponderal e características macroscópicas dos órgãos de camundongos);
- Investigar a atividade anti-inflamatória do EEB das folhas de *V. globosa*.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta e identificação das folhas de *V. globosa***

As folhas de *V. globosa* foram coletadas na zona rural no município de Santa Luzia - PB (S 06° 52' 20"/ W 36° 55' 07"), no dia 31.05.2013. . O material vegetal foi processado na cidade de Campina Grande – PB no Laboratório de Fitoquímica (LAFIT) na Universidade Estadual da Paraíba. A exsiccata encontra-se no Herbário da Universidade Federal da Paraíba sob a inscrição *Varronia globosa* Jacq. Brasil: Paraíba: Santa Luzia, M. F. Agra 6561- 01/03/2006 (JPB 36075).

### **4.2 Secagem e trituração do material vegetal de *V. globosa***

A planta coletada foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar, à temperatura de 40° C, por aproximadamente duas semanas. As folhas secas foram submetidas à trituração em um moinho de facas. Após a moagem foi obtido 111,09 g do pó das folhas que foi direcionado a preparação do EEB.

### **4.3 Preparação do Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa***

O pó seco e pulverizado das folhas foi submetido à maceração exaustiva em etanol, na qual, a solução alcoólica foi retirada a cada 3 dias e o líquido extrativo armazenado em recipientes de vidro âmbar devidamente etiquetados. Realizou-se um total de 12 extrações, obtendo-se 8 litros de solução extrativa etanólica das folhas de *V.globosa*. O solvente foi evaporado com auxílio de um rotaevaporador utilizando no banho uma temperatura de aproximadamente 45°C, nos fornecendo um peso seco do extrato no valor de 9,51 g.

### **4.4 *Screening* fitoquímico do EEB das folhas de *V. globosa***

O *screening* tem por objetivo a detecção e prospecção preliminar dos diferentes constituintes químicos de plantas, com base na extração destes com solventes apropriados e na aplicação de testes de coloração, ocorrendo algumas vezes a formação de precipitados, de espuma, gás ou fluorescência. Para a realização deste teste foi

utilizado o Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *Varronia globosa*. Os metabolitos secundários analisados foram: flavonoides, polissacarídeos, catequinas, fenóis, taninos, esteroides, triterpenóides, saponinas e alcalóides. Analisados de acordo com sua solubilidade em diferentes soluções.

Foi preparado inicialmente 3 soluções mãe:

- Solução de metanol; foi pesado 120 mg do EEB que em seguida foi dissolvido em 24 mL de metanol.
- Solução aquosa; pesou-se 140 mg do EEB que posteriormente foi dissolvido em 30 mL de água.
- Solução de clorofórmio; foi pesado 75 mg do EEB e dissolvido em 15mL de clorofórmio.

Com o objetivo de facilitar a dissolução, as preparações foram submetidas a banho-maria e ultrassom. Posteriormente foram preparadas outras duas soluções aquosas, uma de vanilina e outra de cloreto férrico, ambas a 1%.

#### **4.4.1 Metabólitos solúveis em metanol**

##### **4.4.1.1 Heterosídeos flavônicos**

Uma alíquota da solução mãe de metanol foi colocada em um tubo de ensaio, em seguida adicionou-se a este 5 gotas de Ácido Clorídrico (HCl) concentrado e raspas de Magnésio. O surgimento de uma coloração rosa na solução indica reação positiva.

##### **4.4.1.2 Flavonoides**

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL da solução metanólica. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou-se e levou-se novamente à secura. Ao resíduo adicionou-se 5 mL de éter etílico e o transferiu para um tubo de ensaio para verificação de fluorescência. A reação oxalo-bórica determina aparecimento de fluorescência amarela esverdeada para flavonóis; flavanonas e isoflvanonas não apresentam fluorescência e os compostos antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

#### 4.4.1.3 Catequinas

Inicialmente foi transferido 3 mL da solução aquosa de vanilina a 1% para um tubo contendo 3 mL da solução mãe de metanol. Em seguida acrescentou-se 1 mL de HCl. O aparecimento de uma coloração avermelhada indica reação positiva.

#### 4.4.1.4 Alcaloides

Para a identificação de alcaloides foram realizados 3 testes, utilizando reagentes específicos para esta determinação:

- 1º tubo: adicionados 2 mL da solução mãe de metanol, 1 mL de HCl e 4 gotas do reativo de Mayer. A turvação ou formação de precipitado branco confirma a presença deste metabólito secundário.
- 2º tubo: adicionados 2 mL de solução mãe de metanol, 1 mL de HCl e 4 gotas do reativo de Bouchardat (iodo/iodeto de potássio). A formação de precipitados de coloração alaranjada indica reação positiva;
- 3º tubo: adicionados 2 mL de solução mãe de metanol, 1 mL de HCl e 4 gotas do reativo de Dragendorff. A formação de precipitados de coloração tijolo confirma a presença de alcaloides.

#### 4.4.2 Metabólitos solúveis em água

##### 4.4.2.1 Polissacarídeos

Em um tubo de ensaio foi depositado 5 mL da solução aquosa mãe, e foi adicionado 2 gotas de lugol. O surgimento de uma coloração azul indica reação positiva.

##### 4.4.2.2 Fenóis e taninos

Foram efetuados dois testes para a pesquisa de tanino:

- 1º Teste: em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL da solução aquosa mãe e posteriormente 5 gotas de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). A mudança de

coloração ou a formação de precipitado azul-verde é indicativo de reação positiva.

- 2º Teste: foi depositado 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL da solução aquosa para 3 diferentes tubos de ensaio. Logo em seguida foi adicionado em cada um destes tubos 2 mL de solução aquosa de gelatina 0,5%. O surgimento de precipitados é indicativo de reação positiva.

#### **4.4.2.3 Saponinas**

Um volume de 5 mL de solução aquosa mãe foi adicionado a um tubo e este foi agitado continuamente durante dois minutos. A formação de espuma com altura superior a um centímetro (1cm) é sinal da presença de saponinas.

#### **4.4.3 Metabolitos solúveis em clorofórmio**

##### **4.4.3.1 Esteróides e triterpenoides**

Em um tubo de ensaio foi adicionado 10 mL da solução mãe de clorofórmio (esta alíquota foi previamente filtrada em carvão ativado). Em seguida adicionou-se 1mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Posteriormente foi acrescentado 3 gotas de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado e novamente foi agitado.

Esta reação é denominada de Liberman-Bouchard e a observação da mudança de coloração que vai desde azul a verde é indicativo de reação positiva.

#### **4.5 Quantificação dos flavonoides do EEB das folhas de *V. globosa***

Para a quantificação dos flavonoides presentes, foi necessário inicialmente construir a curva de calibração, utilizando como substância-padrão a quercetina e como reagente uma solução de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) a 2% em metanol. A solução padrão de quercetina a 100  $\mu g/mL$ , foi preparada pela dissolução de 10mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30  $\mu g/mL$ .

Para as medições das soluções do extrato vegetal, transferiu-se 5mL de cada solução do extrato para tubos de ensaios (foram preparados três tubos para cada solução), aos mesmos foi acrescentado 5 mL da solução de cloreto de alumínio a 2% em metanol e homogeneizou-se. A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado a 415nm, contra um branco composto pela solução de  $AlCl_3$  (Meda et al, 2015).

#### **4.6 Análise físico-química do pó das folhas de *V. globosa***

##### **4.6.1 Granulometria**

A granulometria foi determinada com o auxílio de tamises padronizados superpostos, acoplados a um agitador mecânico, montados de forma que o tamis com maior abertura de malha ficasse por cima daquele com a menor. Uma porção de 25 g do pó foi colocada no tamis de maior abertura de malha e submetida à tamisação durante 30 minutos. Em seguida, com ajuda de um pincel foi removida toda a amostra retida na superfície superior de cada malha e transferiu-se para um papel impermeável, procedendo a pesagem separadamente. Por fim, foram realizados cálculos para a determinação do percentual retido em cada tamis (Farmacopeia Brasileira, 2010).

##### **4.6.2 Teor de cinzas**

Para a determinação do teor de cinzas, foi necessário inicialmente aquecer os cadinhos de porcelana em mufla a temperatura de 450 °C, durante 30 min. Posteriormente foram resfriados no interior de um dessecador (15 minutos). Este pré-tratamento dos cadinhos foi importante para eliminar qualquer partícula presente com o objetivo de evitar erros na pesagem dos mesmos, então os cadinhos tiveram suas respectivas massas registradas.

Pesou-se 3 g das folhas de *V. globosa* pulverizadas que, em seguida foi transferido para o cadinho previamente tarado. Posteriormente, foi incinerado e submetido à calcinação em mufla aquecida a 450° C durante 2 h. Por fim, o cadinho foi resfriados em dessecador (15 minutos) e foi realizada a determinação da massa de sua amostra e calculada a porcentagem das cinzas totais em relação à massa da droga vegetal. Esta análise foi realizada em triplicata (Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.6.3 Perda por dessecação

Primeiramente pesou-se 3 g do pó das folhas de *V. globosa*, transferiu-se para pesa-filtro previamente dessecado e tarado. Em seguida, a amostra foi aquecida em estufa a 105 °C por um período de 2 h, posteriormente foi resfriada em dessecador e pesada (Farmacopeia Brasileira, 2010). A operação foi repetida até obtenção de peso constante. Esta análise foi realizada em triplicata e os resultados das três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação:

$$\% \text{ perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde:  $P_a$  é o peso da amostra;  $P_u$  é o peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação e  $P_s$  é o peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g).

#### 4.6.4 Determinação do pH

Para a determinação do pH do pó das folhas de *Varronia globosa*, foi inicialmente preparada uma solução a 1% (p/v) deste pó em água destilada, em seguida foi aquecida até ebulição em chapa-elétrica por 5 min. Após este tempo foi realizada uma filtração em funil contendo algodão como elemento filtrante. Após resfriamento, foi analisada em um pHmêtro devidamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de 3 determinações (Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.6.5 Densidade bruta, de compactação e fator de Hausner

A amostra foi colocada em provetas previamente pesadas. A densidade de compactação foi determinada com auxílio de volúmetro de compactação. O pó foi submetido a 1250 quedas. Após essa determinação calculou-se o fator de Hausner determinado através do quociente entre as densidades compactada ( $dc$ ) e bruta ( $db$ ).

$$FH = \frac{dc}{db}$$

Onde: dc: densidade de compactação (g/mL); db: densidade bruta (g/mL);

#### **4.7 Avaliação da citotoxicidade do EEB das folhas de *V. globosa***

As amostras de sangue humano (A, B e O) foram coletadas de três voluntários adultos e aparentemente saudáveis no Laboratório de Análises Clínicas – LAC da UEPB. Estas amostras foram manipuladas e descartadas de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade.

Foram testadas quatro concentrações (10, 100, 500 e 1000 µg/mL) de cada extrato (EEB e FCHCl<sub>3</sub>) das folhas de *V. globosa*.

##### **4.7.1 Atividade hemolítica do EEB das folhas de *V. globosa***

Para obtenção dos concentrados de eritrócitos dos sangues A, B e O foi necessário inicialmente realizar a coleta de 5 mL de sangue humano e transferir para tubos de ensaio contendo EDTA. Posteriormente os eritrócitos foram submetidos a 3 lavagens consecutivas com solução salina 0,9 % e centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, para separar o plasma.

Após a obtenção do concentrado de eritrócito, preparou-se uma suspensão 0,5 (v/v) em solução salina 0,9 %. Em seguida foram transferidos 2 mL desta suspensão de eritrócitos para tubos de Falcon e acrescentou-se a estes alíquotas da amostra. Os tubos foram incubados a temperatura de  $25 \pm 2$  °C por 1 h e novamente centrifugados. Para averiguar o provável processo de hemólise o sobrenadante foi submetido à espectrofotometria (540 nm). A hemólise total (controle positivo – 100% de hemólise) foi obtida pela adição do Triton X-100 na suspensão de eritrócitos e para o controle negativo (0 % de hemólise) foi utilizado apenas as soluções de eritrócitos. Esta análise foi efetuada para os três tipos sanguíneos. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em % da média de hemólise em comparação ao grupo controle negativo.

#### **4.7.2 Atividade anti-hemolítica ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)**

Dando sequência ao procedimento anterior, desprezou-se o sobrenadante de todos os tubos, ressuspenderam-se os eritrócitos em 2 mL de NaCl na concentração de 0,24 %. Os tubos foram incubados a  $25 \pm 2$  °C por 1 h e centrifugados novamente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria (540 nm) para caracterizar a atividade anti-hemolítica. A hemólise total (controle positivo – 100 %) foi obtida com solução hipotônica (NaCl 0,24%). Foram utilizados os valores obtidos a partir do controle negativo (0 % de hemólise) da atividade hemolítica, e a porcentagem de anti-hemólise foi calculada em relação ao controle positivo. Este experimento foi realizado em triplicata, igualmente para os três tipos sanguíneos e os resultados foram expressos como % da média aritmética simples.

#### **4.8 Animais para os experimentos *in vivo***

Foram utilizados 48 camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 25 e 30 g de ambos os sexos. No período de adaptação, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com serragem, a temperatura ambiente e longe da umidade e do sol, recebendo ração padrão tipo pellets e água filtrada à vontade. Somente na fase inicial de experimentação é que os animais ficaram em jejum, submetidos a um jejum de 24 horas para a realização do protocolo de toxicidade aguda e 12 horas, para o ensaio de atividade anti-inflamatória. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais, sob o protocolo 06/09.

#### **4.9 Ensaio de toxicidade aguda e triagem comportamental**

O estudo pré-clínico para avaliação da toxicidade aguda, seguiu a metodologia de modelo animal preconizado pela ANVISA/2010, assim, utilizou-se 24 camundongos da linhagem *swiss*, 12 machos e 12 fêmeas não grávidas, sendo divididos em 4 grupos compostos por 6 animais cada, 2 grupos contendo apenas fêmeas e os outros dois apenas machos, um grupo de cada sexo foi selecionado para representar os controles negativos tratados com solução salina 0,9% v.o. e os outros 2 grupos representaram o controles positivos tratado com o EEB das folhas de *V. globosa* na concentração de 2000 mg/Kg, v.o..

Foi realizada uma triagem comportamental nas primeiras 72 h quanto a determinados parâmetros indicativos de alterações no sistema nervoso central e autônomo que constam no anexo A, de acordo com o método descrito por Almeida et al. (1999). Posteriormente, avaliou-se o consumo de água e ração durante 14 dias. Ao término desse período os animais foram eutanasiados e tiveram seus órgãos removidos e avaliados macroscopicamente. Além disso, o número de mortes foi contabilizado para a determinação da dose letal 50 % (DL<sub>50</sub>), segundo o método de Litchfield e Wilcoxon (1949).

#### **4.10 Teste de atividade anti-inflamatória *in vivo* do EEB das folhas de *V. globosa* – modelo de peritonite aguda**

Para avaliar o potencial anti-inflamatório do EEB das folhas de *Varronia globosa* foram utilizados 24 camundongos da linhagem *swiss*, estes foram divididos em 4 grupos contendo 6 animais cada:

- Grupo controle negativo, que recebeu solução salina 0,9% v.o.;
- Grupo controle positivo, no qual foi administrado dexametasona na concentração de 5 mg/Kg v.o.
- Grupo teste 1, que recebeu o EEB das folhas de *V. globosa* na dose de 250 mg/Kg
- Grupo teste 2, no qual, foi administrado o EEB das folhas de *V. globosa* na dose de 500 mg/Kg

Após 30 minutos deste pré-tratamento, de acordo com metodologia de Vinegar et al. (1973), foi induzida a inflamação por meio da administração de carragenina a 1 % no peritônio dos animais. Passadas 4 horas da injeção de carragenina, os animais foram anestesiados com ketamina 2% e xilazina 5%. Posteriormente, para coleta dos fluidos peritoneais foi injetado 2 mL de EDTA em solução salina, massageando-se suavemente o peritônio. Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Com o líquido coletado foi realizada contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. Para tal 20 µL do lavado peritoneal foram diluídos em 380 µL da solução de Turk.

#### **4.11 Análise estatística**

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade, toxicidade aguda e atividade anti-inflamatória foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m), estes dados foram submetidos ao teste t para citotoxicidade e toxicidade aguda, seguido pelo pós-teste de Dunnett para o protocolo de peritonite, analisados com o software GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, EUA, considerando-se o nível de significância mínimo  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Preparação do EEB das folhas de *V. globosa*

Dos 111,09 g de pó da folha de *V. globosa* foram obtidos 9,51g de EEB, com um rendimento de aproximadamente 8,56 %.

### 5.2 *Screening* fitoquímico do EEB das folhas de *V. globosa*

O conhecimento do perfil qualitativo dos constituintes do extrato é uma etapa essencial para o direcionamento das investigações, e também para o estabelecimento de possíveis relações entre a composição e o efeito biológico apresentado pelo extrato. Seguindo esta afirmação, foi realizada uma prospecção qualitativa preliminar do extrato em estudo. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos após os ensaios efetuados a partir do EEB das folhas de *Varronia globosa*.

**Tabela 1.** Resultados do *screening* fitoquímico do EEB das folhas de *V. globosa*.

Metabólito Secundário	Teste de Identificação
Alcaloides	Bouchardat (-)/ Mayer (-)/ Drangendorff (-)
Esteroides e triterpenos	Reação de Liberman-Bouchard (-)
Fenóis e taninos	FeCl <sub>3</sub> (-) /Gelatina 0,5% (-)
Heterosídeo flavônico	++
Flavonóis	++
Saponina – Espuma	+
Catequinas	-
Polissacarídeos	-

Legenda: ( - ) negativo; (++) positivo.

Foi possível detectar a presença de flavonoides tanto na forma de heterosídeos como de flavonóis, além de saponinas. Em contra partida, os ensaios para alcalóides, taninos, polissacarídeos, catequinas, esteroides e triterpenos deram negativo, no entanto, podem não implicar na ausência desses constituintes, sendo possível que tenha ocorrido interferência de outros constituintes na formação de cores ou precipitados, ou mesmo

que as quantidades destes metabolitos analisados tenham sido insuficientes para o desenvolvimento das reações.

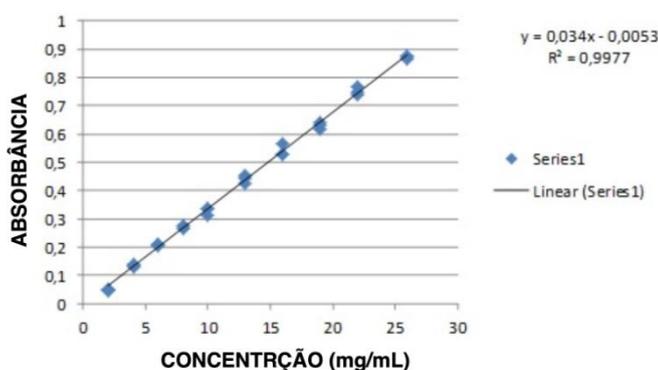
Os metabólitos secundários detectados dão suporte ao seu uso medicinal, destacando-se os flavonoides, pois foram os metabólitos secundários que reagiram mais fortemente. De modo geral, alguns estudos mostram que os flavonoides, entre outras atividades biológicas, tem uma boa ação anti-inflamatória, que foi relacionada, principalmente, a inibição de mediadores inflamatórios (DI CARLO, 1999). Portanto, esta etapa do estudo foi bastante importante na escolha dos testes seguintes, no qual foi realizada a quantificação de flavonoides e o ensaio de atividade anti-inflamatória.

### 5.3 Quantificação de flavonoides do EEB das folhas de *V. globosa*

O teor de flavonoides foi determinado para amostra do EEB das folhas de *V. globosa*, utilizando o ensaio com solução de cloreto de alumínio, segundo metodologia descrita por MEDA et al., 2005.

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que quase sempre acompanham os flavonoides. Nessas condições, o complexo flavonoide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonoide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com  $AlCl_3$ , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências na absorbância (MARCUCCI et al, 2005).

**Gráfico 1.** Curva de calibração para a quantificação dos flavonoides do EEB das folhas de *V. globosa*.



A curva de calibração (Gráfico 1) foi construída a partir da média das leituras das absorbâncias e apresentou coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) de 0,9977, sendo considerada linear suficiente para ser usada com confiança na determinação do teor de flavonoides totais no EEB. A partir do valor médio das absorbâncias obtidas para as soluções dos extratos e da equação da reta fornecida pela curva de calibração ( $y = 0,034x - 0,0053$ ) a concentração de flavonoides foi obtida, e registrada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados da quantificação de flavonoides do EEB das folhas de *V. globosa*.

Conc. solução ( $\mu\text{g/mL}$ )	Flavonoides ( $\mu\text{g/mL}$ )	D.P. ( $\pm\mu\text{g/mL}$ )	Flavonoides (%)	D.P. ( $\pm \%$ )	Flavonoides (mg/g)	D.P. ( $\pm \text{mg/g}$ )
<b>500</b>	<b>19,85</b>	<b>0,58</b>	<b>3,97</b>	<b>0,11</b>	<b>39,70</b>	<b>1,15</b>

Devido a presença de quantidade significativa de compostos flavonóicos, o EEB das folhas de *Varronia globosa* despertou curiosidade para pesquisa de possíveis atividades biológicas em especial a atividade anti-inflamatória bem como sobre seu potencial de proteção contra hemólise. No entanto, antes destes ensaios foi necessário analisar sua toxicidade, fator bastante importante para futuras pesquisas em humanos.

#### 5.4 Análise físico-química do pó das folhas de *V. globosa*

Vários ensaios foram realizados com o objetivo de controlar a qualidade do material botânico. As análises físico-químicas envolveram a perda por dessecação, determinação da densidade bruta e de compactação, análise granulométrica, determinação do pH e determinação do teor de cinzas. Os resultados destes ensaios estão expressos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados dos parâmetros físico-químicos do pó das folhas de *V. globosa*.

<b>Densidade Bruta</b>	0,125 g/mL
<b>Densidade de Compactação</b>	0,222 g/mL
<b>Fator de Hausner</b>	1,77
<b>pH</b>	5,54
<b>Granulometria</b>	Moderadamente Grosso
<b>Teor de Cinzas</b>	5,87 %
<b>Perda por dessecação</b>	10,75 %

A avaliação granulométrica do material moído é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Pós constituídos por partículas muito grandes irão dificultar o processo de extração, uma vez que a superfície de contato entre o material e o solvente é pequena. No entanto, uma granulometria reduzida e consequente aumento da superfície de contato dos grãos possibilitam eventuais problemas de estabilidade, devido à adsorção de umidade (OLIVEIRA et al., 1996). O material em estudo foi classificado como moderadamente grosso, sugerindo uma matéria-prima com boa perspectiva de conservação no que se refere à embalagem e ao armazenamento, caso venha a se tornar um fitoterápico.

A densidade é uma propriedade física importante e pode ser utilizada para distinguir um material puro de um impuro. Pode ser utilizada na identificação e no controle de qualidade de um determinado produto industrial, bem como ser relacionada com a concentração de soluções (ANDRÉ, 2013). A determinação da densidade aparente e de compactação foi usada para a previsão das características de compressibilidade dos materiais utilizados. Foi obtido um valor de 0,125 g/mL para a densidade bruta e 0,222 g/mL para a densidade de compactação. A Farmacopeia Brasileira 5ªed. não determina valores máximos e mínimos de densidade aparente para espécies vegetais. Posteriormente o Fator de *Hausner* foi determinado, obtendo um valor de 1,77 o que classificou o material como não facilmente compressível, pois o valor foi superior a 1,25, indicando uma certa dificuldade na compactação dos grânulos e, portanto, necessitando de uma maior quantidade de solvente a ser utilizada no processo de extração para evitar a flutuação das partículas (AMARANTE, 2010).

O pH ( $5,54 \pm 0,19$ ) sugere o caráter ácido das substâncias contidas no pó das folhas de *Varronia globosa*. Esse dado é fundamental no processo de extração, pois o valor do pH é responsável por selecionar e determinar as substâncias a serem extraídas, de acordo com suas características químicas e de polaridade. O pH ácido ainda evita o ataque de alguns microrganismos contaminantes atuando como sensor da estabilidade do medicamento, pois é sinalizador de prováveis alterações químicas que possam estar ocorrendo no meio extrativo (LONGHINI et al, 2007).

Os resultados da determinação de cinzas totais nas amostras das folhas apresentaram-se abaixo de 14%, conforme os limites estabelecidos nas monografias de diversas drogas vegetais descritas na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010), indicando que as mesmas não possuem excesso de terra e/ou areia, pois as cinzas totais

incluem aquelas derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e derivadas de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não fisiológicas) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2000).

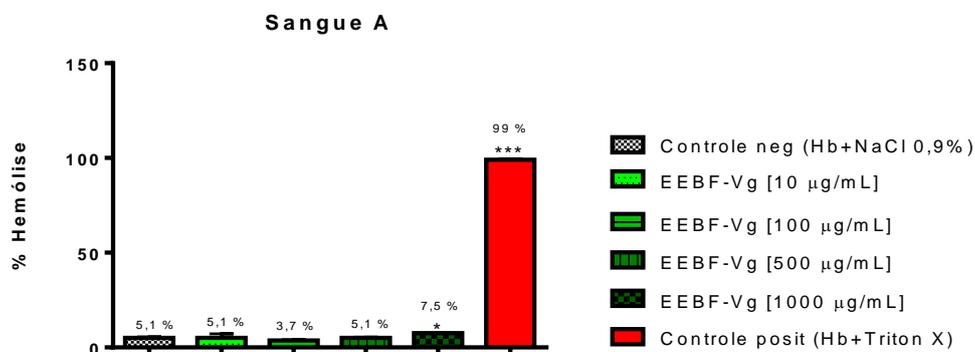
O valor encontrado para a análise de perda por dessecação em estufa está dentro dos limites máximos encontrados no código oficial brasileiro (8 a 14% de umidade), com relação à maioria das drogas vegetais (FARMACOPEIA, 2000). Este parâmetro auxilia a caracterização da droga e está relacionado à estabilidade microbiológica da droga, como expressão de sua susceptibilidade ao desenvolvimento de bactérias e fungos, e estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise (WHO, 1992).

## 5.5 Avaliação citotóxica do EEB das folhas de *V. globosa*

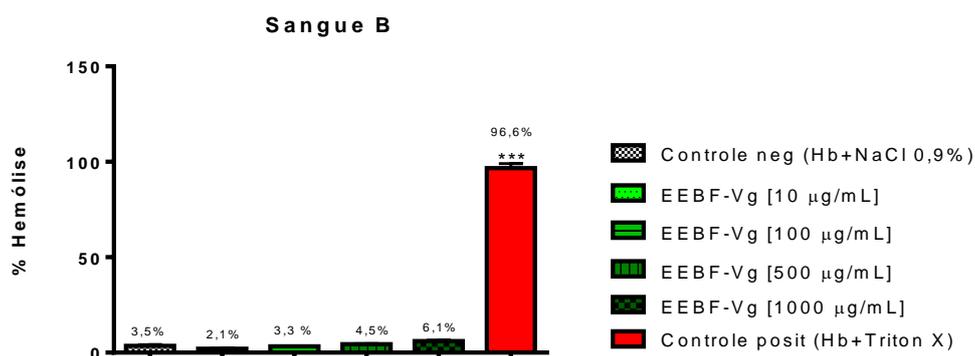
### 5.5.1 Atividade hemolítica do EEB das folhas de *V. globosa*

Ao analisar os dados obtidos, foi demonstrado que o EEB das folhas de *V. globosa* não possui a capacidade de causar danos na membrana eritrocitária para os sangues do tipo A e O até a concentração de 500 µg/mL, quando comparados com seu respectivo controle negativo, e até a concentração de 1000 µg/mL para o sangue B, que provoque o rompimento e conseqüente morte da célula. Resultado bastante satisfatório pelo fato destas células serem responsáveis pelo transporte de oxigênio (O<sub>2</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) no organismo. Os resultados desta análise para os tipos sanguíneos ABO estão expressos nos gráficos de 2 a 4.

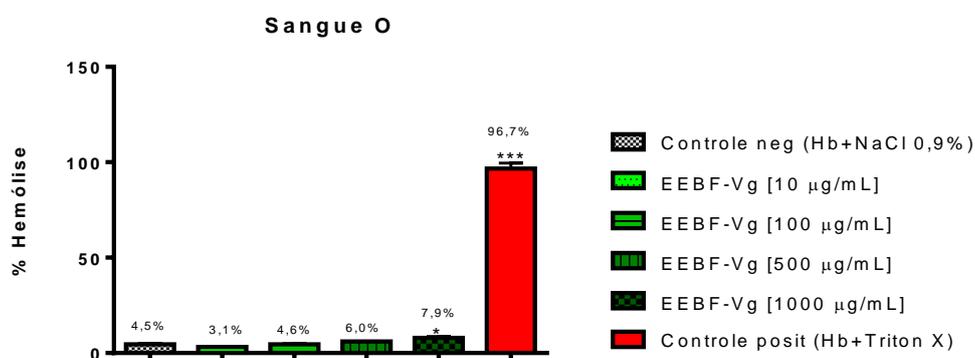
**Gráfico 2.** Efeito hemolítico do EEB das folhas de *V. globosa* em eritrócitos humanos do tipo A.



Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Análise por teste t \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p< 0,001 (n=3). Sendo, EEBF-Vg: Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa*.

**Grafico 3.** Efeito hemolítico do EEB das folhas de *V. globosa* em eritrócitos humanos do tipo B.

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por teste t \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (n=3). Sendo, EEBF-Vg: Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa*.

**Grafico 4.** Efeito hemolítico do EEB das folhas de *V. globosa* em eritrócitos humanos do tipo O.

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por teste t \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (n=3). Sendo, EEBF-Vg: Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa*.

Foi observado que a hemólise variou de acordo com o tipo sanguíneo, podendo ser decorrente dos diferentes antígenos expressos na membrana dos eritrócitos de cada grupo sanguíneo. No tipo B está presente a galactose, sendo provavelmente o responsável pela maior resistência desses eritrócitos ao extrato. O Sorotipo A apresenta o antígeno N-acetilgalactosamina, o sorotipo AB possui ambos os antígenos e o sorotipo O não tem nenhum dos antígenos (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). O percentual de hemólise pode ainda, ter sido decorrente da presença de saponinas no extrato, pois este metabólito secundário possui a capacidade de desestabilização da membrana eritrocitária.

Os eritrócitos têm sido utilizados como modelo para avaliar o efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias permitindo obter informação sobre os efeitos destas sobre a membrana celular. A ocorrência de hemólise após a exposição ao

produto teste pode ser diretamente correlacionada com a sua citotoxicidade e utilizada como o primeiro passo na triagem toxicológica *in vitro* (SCHIAI et al., 2007).

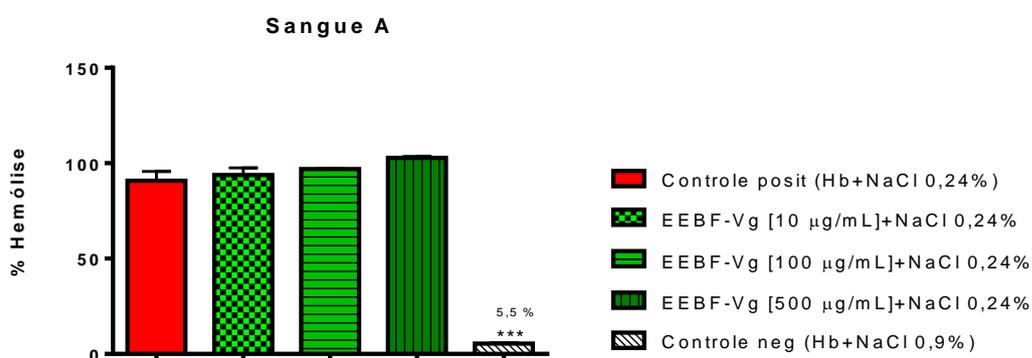
A partir destes resultados pode-se conferir que o EEB das folhas de *V. globosa* apresenta baixa citotoxicidade, pois todas as concentrações estudadas obtiveram um baixo grau de hemólise, visto que de acordo com Rangel e colaboradores (1997), o percentual de hemólise entre 0 a 40% é considerado baixo, 40 a 80% moderado e maior que 80% alto. Garantindo desta forma uma boa margem de segurança, caso este venha a se tornar um fitoterápico.

### 5.5.2 Atividade anti-hemolítica ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)

Foi possível atribuir, a partir dos resultados obtidos, que as concentrações analisadas do EEB das folhas de *V. globosa* não apresentaram atividade anti-hemolítica significativa frente a eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B e O diante de estresse osmótico causado pelo meio hipotônico, quando comparados com seu correspondente grupo controle positivo. As respectivas doses de 1000 µg/mL para o sangue do tipo A e O não foram analisadas, pois as mesmas demonstraram potencial hemolítico no estudo anterior.

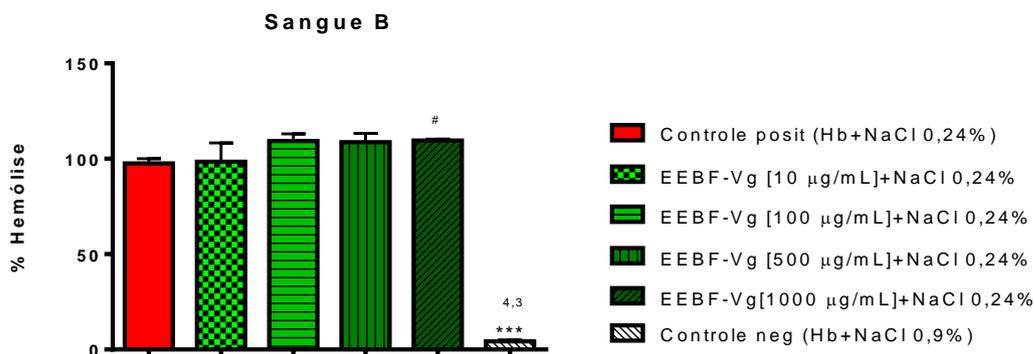
Os resultados deste ensaio para os tipos sanguíneos ABO estão expressos nos gráficos de 5 a 7.

**Gráfico 5.** Atividade anti-hemolítica do EEB das folhas de *V. globosa* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo A.



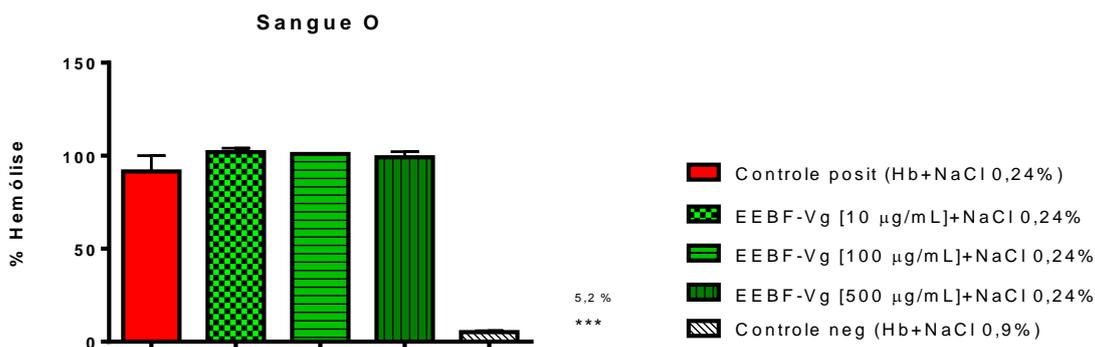
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por teste t \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (n=3). Sendo, EEBF-Vg: Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa*.

**Gráfico 6.** Atividade anti-hemolítica do EEB das folhas de *V. globosa* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo B.



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por teste t \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (n=3). Sendo, EEBF-Vg: Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa*.

**Gráfico 7.** Atividade anti-hemolítica do EEB das folhas de *V. globosa* frente a eritrócitos do tipo sanguíneo O



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por teste t \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (n=3). Sendo, EEBF-Vg: Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa*.

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) avalia a influência qualitativa de substâncias sobre os eritrócitos (MOUSINHO et al., 2008) e expressa à habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006). Alguns autores têm descrito que algumas drogas assim como alguns fitoconstituintes são capazes de induzir alterações na forma e fisiologia dos eritrócitos (AMMUS; YUNIS, 1989; OLIVEIRA et al., 2005).

A partir do exposto, o EEB das folhas de *V. globosa* não protege os eritrócitos frente a um estresse osmótico, o que acaba interferido na funcionalidade da célula, na fisiologia e no transporte de moléculas. Portanto, o material testado não consegue evitar esses distúrbios de homeostase.

## 5.6 Ensaio de toxicidade aguda e triagem comportamental

O extrato etanólico bruto das folhas de *Varronia globosa* não apresentou toxicidade aguda na dose de 2000 mg/kg de peso do animal, administradas por v.o.. O extrato não induziu mortes nem alterações comportamentais, não sendo, portanto, possível calcular a DL50, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Agência de Vigilância Sanitária, caracterizando desta forma o EEB das folhas de *V. globosa* como de baixa toxicidade, conforme o ministério da saúde, que classifica os agentes tóxicos via oral como altamente tóxicos (DL50 < 200 mg/kg), mediamente tóxicos (DL50 entre 200 e 2000 mg/kg) e pouco tóxicos (DL50 entre 2000 e 6000 mg/kg) (BRASIL, 2004).

Durante o período das 4 horas que se seguiram à administração de 2000 mg/kg do EEB das folhas de *V. globosa*, os animais tratados não demonstraram nenhum sinal de toxicidade evidente, o que também correu durante os 13 dias seguintes do experimento.

O EEB das folhas de *V. globosa* não alterou o peso dos machos e fêmeas após 14 dias quando comparado com o grupo controle. Em relação ao consumo de água, o extrato etanólico modificou significativamente este parâmetro nos camundongos machos e fêmeas em comparação a seu grupo controle, entretanto, alterou significativamente apenas o consumo de ração dos machos em relação ao grupo controle (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito do tratamento agudo do EEB das folhas de *V. globosa* na avaliação ponderal e consumo de água e ração dos camundongos (n=6).

<b>Grupo</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Consumo de água (mL)</b>	<b>Ingestão de ração (g)</b>
<b>Sol. Salina 0,9% (Machos)</b>	29,00 ± 0,86	36,50 ± 0,34	51,07 ± 2,76	29,36 ± 7,20
<b>EEB 2000 mg/Kg (Machos)</b>	28,83 ± 0,65	35,16 ± 0,72	58,50 ± 2,32*	33,42 ± 3,45*
<b>Sol. Salina 0,9% (Fêmeas)</b>	25,50 ± 0,68	28,83 ± 1,12	42,86 ± 1,12	26,08 ± 4,51
<b>EEB 2000 mg/Kg (Fêmeas)</b>	27,94 ± 1,03	29,33 ± 0,88	46,07 ± 0,59*	25,46 ± 1,82

Os dados estão apresentados como média ± d.p.; Test “t” de Student, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Na avaliação da toxicidade aguda de *V. globosa* os animais controles e experimentais ganharam peso durante o tratamento (Tabela 4). Os machos que receberam o EEB das folhas de *V. globosa* ingeriram mais ração, demonstrando provavelmente um efeito da própria planta sobre o apetite dos animais, e também tiveram um maior consumo de água, sugerindo assim, uma maior sensibilidade dos machos aos efeitos do EEB das folhas de *V. globosa* (Tabela 4). De acordo com Hu et al (1993) as drogas podem exercer efeitos predominantemente em um dos sexos do animal, pois podem ser metabolizadas diferentemente de acordo com o sexo (ROFF et al, 1992).

O EEB das folhas de *V. globosa* não provocou nenhuma alteração macroscópica significativa em órgão como coração, fígado, baço e pulmão quando comparados com o grupo controle, porém foi observado um aumento significativo no peso dos rins para machos e fêmeas tratados com o material em análise, em comparação com o grupo controle. Estes dados estão expressos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Efeitos do tratamento agudo do EEB das folhas de *V. globosa* no peso dos órgãos de camundongos (n=6).

<b>Grupo</b>	<b>Coração (g)</b>	<b>Fígado (g)</b>	<b>Rins (g)</b>	<b>Baço (g)</b>	<b>Pulmão (g)</b>
<b>Sol. Salina 0,9%</b>	0,004± 0,002	0,04 ± 0,02	0,015± 0,001	0,014 ± 0,02	0,007± 0,001
<b>(Machos)</b>					
<b>EEB 2000 mg/Kg</b>	0,005± 0,001	0,053± 0,008	0,059± 0,001***	0,012± 0,001	0,007± 0,0008
<b>(Machos)</b>					
<b>Sol. Salina 0,9%</b>	0,005± 0,0004	0,05± 0,01	0,013± 0,001	0,027± 0,031	0,006± 0,004
<b>(Fêmeas)</b>					
<b>EEB 2000 mg/Kg</b>	0,005± 0,001	0,053± 0,007	0,034± 0,053**	0,016± 0,025	0,008± 0,002
<b>(Fêmeas)</b>					

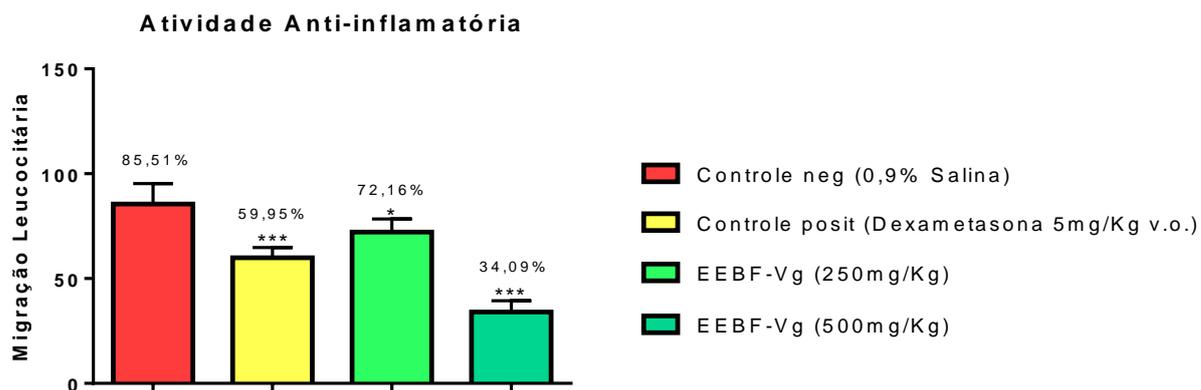
Os dados estão apresentados como média ± d.p.; Test "t" de Student, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Apesar das alterações observadas não é possível inferir toxicidade ao extrato testado sendo necessária a realização de outros protocolos, a exemplo da pesquisa de toxicidade crônica para analisar a continuidade ou exacerbação de tais achados. Diante dos resultados obtidos na análise toxicológica *in vitro* e *in vivo* pode-se atribuir ao extrato uma baixa toxicidade, o que viabiliza a execução de protocolos voltados para a determinação de atividades farmacológicas.

### 5.7 Teste de atividade anti-inflamatória *in vivo* do EEB das folhas de *V. globosa* – modelo de peritonite aguda

No modelo de peritonite induzido por carragenina a maior concentração de leucócitos após 4 horas foi de  $8,8 \times 10^6$  células/mL, o qual foi definido como 100% de migração de leucócitos. Quando os animais foram tratados com EEB das folhas de *V. globosa* (250 e 500 mg/kg v.o.) ou dexametasona (5 mg/kg, v.o.) houve uma diminuição significativa do número total de leucócitos demonstrando inibição no processo inflamatório, reduzindo para 59,95% o número de leucócitos com a administração de dexametasona e para 72,16% e 34,09% para as concentrações de 250 e 500 mg/kg do EEB, respectivamente, como pode-se observar no gráfico 8.

**Gráfico 8.** Avaliação da atividade Anti-inflamatória do EEB das folhas de *Varronia globosa* a partir do modelo experimental *in vivo* de Peritonite Aguda.



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise por teste t \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (n=3). Sendo, EEBF-Vg: Extrato Etanólico Bruto das folhas de *V. globosa*.

Foi observado que a menor concentração (250 mg/kg) do EEB das folhas de *V. globosa* obteve resultado significativo e a atividade foi maior com o aumento da dose, quando comparado ao grupo controle. Confrontando ainda, os resultados do EEB com o

da dexametasona, droga de referencia bastante utilizada, pode-se conferir atividade anti-inflamatória significativa ao extrato, mesmo este sendo administrado em doses bem maiores do que a dexametasona, sendo então, uma espécie bastante promissora em se consolidar como uma boa alternativa na terapêutica de doenças inflamatórias.

Esta atividade pode ser decorrente da presença de flavonoides no EEB das folhas de *V. globosa*. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a ação anti-inflamatória dos flavonoides, incluindo atividade através do sequestro de radicais livres, regulação da atividade de células inflamatórias, modulação do metabolismo do ácido araquidônico, modulação da produção e expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008; GARCIA-LAFUETE et al, 2009).

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, torna-se possível conferir que a espécie *V. globosa* possui interessante perfil fitoquímico e biológico. Portanto, pesquisas futuras são necessárias para contribuir com o isolamento e a elucidação estrutural dos metabólitos secundários presentes nesta espécie. A realização de testes biológicos com frações enriquecidas ou compostos isolados poderá identificar quais são o grupo de metabólitos ou as moléculas responsáveis por cada atividade investigada.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo, observou-se a variedade de metabólitos secundários encontrados nas folhas de *Varronia globosa*. Os componentes majoritários foram os compostos flavonoides e saponinas. O teste de quantificação dos flavonoides nos forneceu um teor bastante significativo, estimulando desta forma a pesquisa de possíveis atividades farmacológicas. Os testes físico-químicos para o pó das folhas de *Varronia globosa* ficaram dentro dos limites esperados, contribuindo assim para a determinação de parâmetros de qualidade do material vegetal.

Os ensaios de toxicidade *in vitro* mostraram um baixo potencial citotóxico para o EEB das folhas de *V. globosa*, pois o mesmo na maior concentração testada induziu menos de 8 % de hemólise para os três tipos sanguíneos. No entanto, não protegeu estes eritrócitos quando submetidos a um meio hipotônico, não possuindo, portanto, atividade anti-hemolítica.

Nas análises toxicológicas *in vivo*, o extrato etanólico na concentração de 2000 mg/Kg não levou a grandes alterações nos parâmetros analisados nos camundongos, desta forma não se pode conferir toxicidade aguda a este.

Foi observado que o material em análise possui um bom potencial anti-inflamatório, pois foi demonstrado que com o aumento da dose a atividade também aumenta, e que na concentração de 500 mg/kg do extrato o efeito anti-inflamatório alcançado foi estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle e com o efeito obtido pela administração de 5mg/kg de dexametasona em camundongos.

A espécie *Varronia globosa* é uma planta pouco explorada, tanto do ponto de vista químico quanto biológico. Portanto, os estudos de fitoquímica e das atividades biológicas desta espécie foram importantes e estão contribuindo para o conhecimento de uma espécie ainda pouco explorada, auxiliando na busca de novos agentes que, futuramente, possam contribuir com a terapêutica.

## REFERENCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, 2003.

AGRA, M. F.; ABRANTES, H. F. L. Boraginaceae ethnomedicinal study from caatinga of the State of Paraíba, Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, v. 85(1), p. 7-12, 2004.

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 26, p. 179 – 182, 2006.

ALMEIDA, R.N., OLIVEIRA, T.M.L.. Triagem Farmacológica Comportamental. Em: Almeida, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 131-137, 2006.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS – JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. **Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.80, p. 72-76, 1999

AMMUS, S.; YUNIS, A. Drug-induced red cell dyscrasias. **Blood Reviews**, v. 3, p. 71-82, 1989.

AMARANTE CB, MÜLLER RCS, DANTAS KGF, ALVES CN, MÜLLER AH, PALHETA DC. Estudo da composição química e avaliação nutricional das folhas e frutos da aninga (*Montrichardia linifera*, Araceae): uma espécie da várzea amazônica utilizada na dieta natural de grandes herbívoros. **Acta Amaz.** v. 40(4), p. 729-736, 2010.

ANDRÉ, A. C. G. M. et al. Caracterização físico-química do material vegetal e dos extratos de *Cestrum laevigatum* S. (Solanaceae). **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde Fits**. Maceió, v. 1 n.2 p. 11-19, maio de 2013.

ANDRADE-LIMA, D. The caatinga dominium. **Revta. Brasil. Bot.** v. 4, p. 149- 153, 1981.

ARNAUT, M.M. Structural diversity of cell adhesion molecules and their role in inflammation. **KELLEY textbook of rheumatology**. v. 1, p.303, 1997

ASPREY, G. F.; THORNTON, P. Medicinal Plants of Jamaica. III. **West Indian Med. J.** v.4, p. 69-82, 1955.

ASSEMI, M. Herbs Affecting the Central Nervous System: Ginkgo, Kava, St. John's Wort, and Valerian. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.44, n.4, p.824-835, 2001.

AUBLET, F. Histoire des plantes de la Guiane Française. **Didit**, Paris, 1975.

- BARBOSA FILHO et al., 2006; Natural Products Inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 02, p. 258-285, 2006.
- BARROS, S.B.M., DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. **OGA, S. Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, p. 61-70, 1996.
- BATISSOCO AC, NOVARETTI MCZ. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.25(1), p.47-58, 2003.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on use and properties of citrus flavonoides: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v.56, p.6185-6205, 2008.
- BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**, vol. 105, p. 1767-1800, 2005.
- BORGES, K. N.; BRITTO, M. B.; BAUTISTA, H. P. Políticas públicas e proteção dos saberes das comunidades tradicionais. **Revista de Desenvolvimento Econômico**. Ano X, n.18, p. 87-92 , 2008.
- BOZZA, P.T.; YU, W.; PENROSE, J.F.; MORGAN, E.S.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **J Exp Med**. v.15: 186 (6), p.909-920, 1997.
- BRAGA T.V. et al. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Rev Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.28(3), p.287-90, 2007.
- BRANDÃO, R.; LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 397-407, 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE Nº 90, de 16 de março de 2004. **Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**.
- BRITO, A. R. M. S. Toxicidade aguda (dose simples). In: Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: UNICAMP; Rio de Janeiro: Editora Três, p.15-22, 1994
- BRITO, N. R. S. Perfil Químico de Famílias de Angiospermas, **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 1986
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CALIXTO, J.B., BEIRITH, A., FERREIRA, J., SANTOS, A.R.S, FILHO, V.C., YUNES, R.A. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. **Phytother. Res.** v.14, p.401-418, 2000.

CALIXTO, J. B., OTUKI, M. F. & SANTOS, A. R. Anti-inflammatory Compounds of Plant Origin. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). **Planta Medica**, v. 69, p. 1-12, 2003.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F, \*, MORAIS, S.M.1, SANTOS, L.F.L.2, ROCHA, M.F.G.1, BEVILAQUA, C.M.L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Rev.Bras.Pl.Med**, Botucatu, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CARDOSO, M.L.C. Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris afrodisiaca* O. Madi. O – *Malpighiaceae*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002,.

CARMAN, CV. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by invadosome-like protrusions. **J Cell Sci.** v.122 (17), p. 3025- 3035, 2009.

CARVALHO, L. S. Alterações clínicas e histológicas decorrentes de neurointoxicação por plantas medicinais. In: SEMINÁRIOS APLICADOS, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Química**, v.1, n. 3, p.241-256, Jul/Set 2009.

CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de; SILVA, N. P. da; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rer. Bras. Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DI CARLO, G.; MASCOLA, N.; IZZO, A. A. e CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, n.4, p. 337-353, 1999.

ELIPE, M. V. S.. **Anal. Chem**, 1, 497, 2003.

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I; SIMÕES, C. M. Introdução à Análise Fitoquímica. SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC. p. 165, 2001

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988, 1996, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5º ed. Brasília: Fiocruz; 2010.

FENG, P. C.; Haynes, L. J.; Magnus, K. E.; Plimmer, J. R.; Sherrat, H. S. A. Pharmacological Screening of Some West Indian Medicinal Plants. **J. Pharmacology**. v. 14, p.556-561, 1962.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; Breve análise da história da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. p. 17-46, 2001.

FONSECA-KRUEL, V. S.; SILVA, I. M.; PINHEIRO, C. U. B. O ensino acadêmico da etnobotânica no Brasil. **Rodriguésia**. v. 56, n. 87, p. 97-106, 2005

FOSSEN, T.; et al. **Food Chem.**,v. 81, p. 433, 2003.

GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTYNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflamm. Res**, Basel, v. 58, p.537-552, 2009.

GAMBETA, R. M. **Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* st. Hilaire**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Erechim, 2008.

GOBBO Neto, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**. v. 30. n. 2. São Paulo. mar/abr 2007.

GRUPTA, S.S. Prospects and perspectives of natural plants products in medicine. **Indian J. Pharmacol**. 26: 1-12, 1994.

GURIB-FAKIM A., Rewiev, Medicine Plants: Traditions yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HEIM, K. E., et al. **J. Nut. Biochem**. v. 13, p. 572, 2002.

HEYWOOD, V. H. Flowering Plants of the World. **Batsford. London**. 336p, 1996

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**. v. 82, n. 5 (supl), p. 206-212, 2006.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAMC, M. B. Analisis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry** 57:43-46. 1996.

HU, J.J.; LEE, M.J.; VAPIWALA, M.; REUHL, K.; THOMAS, P.E.; YANG, C.S.; Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.122, p.16-26, 1993.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2011.

JULKUNEN-TIITTO, r. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.** v. 33, p. 213-217, 1985.

KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11<sup>o</sup> ed. 2006.

LEITE, F.C., **Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do alcaloide Curina em modelos experimentais de inflamação aguda e nocicepção**. Dissertação ( Mestrado em Produtos naturais e Sintéticos bioativos.), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 118 f, 2012.

LEXIS, L.A.; FASSETT, R.G. ; COOMBES, J.S.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A treated rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 68-73, 2006.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, Campinas, vol.16, n.3, jul/set. 2003.

LITCHFIELD, L. T. J. R.; WILCOXON, F. A. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 19, p. 388-397, 1949.

LIZAMA, R. S.; MARTÍNEZ, M. M.; LANTIGUA, R. E. I. Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río. Estudio etnobotánico. **I. Rev Cubana Farm.** v.32, p.57-62, 1998.

LONGUI, C. A. **Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais**. Jornal de Pediatria. v. 83, n. 5 (supl.), p. 163-171, 2007.

LONGHINI R, RAKSA SM, OLIVEIRA ACP, SVIDZINSKI TIE, FRANCO SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. bras. farmacogn.** v.17(3), p. 388-395, 2007.

LUZ, S. M. D. **Atividade analgésica e toxicidade da *Spondia mombin* L. em modelos animais**. Monografia (Bacharelado em farmácia Generalista), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 34f, 2014.

MARCIEL, 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.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A.; Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. 2005.

MARÍN, F. R.; FRUTOS, M. J.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; MARTINEZ-SANCHES, F.; DEL RÍO, J.A. Flavonoids as nutraceuticals related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed) Studies in natural products Chemistry. **Elsevier Science BV**. v. 26, 2002.

MATOS JMD, MATOS MEO. Farmacognosia: curso teóricoprático. Fortaleza: EUFC, 1989.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MELO, J.L.M. Boraginaceae. In: M.R.V Barbosa *et al.* (eds.). Checklist das Plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gimnospermas. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, 2006.

MELO, J.I.M. & SALES, M.F. Boraginaceae A. Juss. na região de Xingó: Alagoas e Sergipe. **Hoehnea** 32(3): 369-380, 2005

MILLER, J.S. 1988. A revised treatment of Boraginaceae for Panama. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 75: 456-521.

MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, C. & CARVALHO, M.A.P. Antiinflamatórios não esteróides in: **Reumatologia diagnóstico e tratamento**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 703-717, 2001.

MOUSINHO, K.C.; CORREIA, M. B. L.; SILVA, J. O.; MAGNATA, S. S. L. P.; SOUZA, I. A.; CATANHO, M. T. J. A. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with technetium-99m and morphology of the cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, p. 1139-1146, 2008.

MUNDO, S.R. CARACTERES MORFOANATÔMICOS DE FOLHA E CAULE DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE USO MEDICINAL: *Calophyllum brasiliense* CAMBESS. (CLUSIACEAE), *Cupania vernalis* CAMBESS. (SAPINDACEAE) E *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL. (LYTHRACEAE). **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 95f, 2007.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. The **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. S201-S205, 1991.

OKUYAMA, S.; AIHARA, H. Hyperalgesic action in mice of intracerebroventricularly administered arachidonic acid, PG E2, PG F2 alpha and PG D2: effects of analgesic drugs on hyperalgesia. **J Pharmacobiodyn.** v.9 (11), p. 902-908, 1986.

OLIVEIRA, F. C. de; ALBUQUERQUE, U. P.; FONSECA-KRUEL, V. da; HANAZAKI, N. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta botânica brasílica**. v.23, n.2, p. 590-605, 2009.

OLIVEIRA F, AKISUE G, AKISUE MK. Farmacognosia. São Paulo: Ateneu, 1996. 412 p.

OLIVEIRA, J. F.; BRITO, L. C.; FRYDMAN, J. N. G.; SANTOS-FILHO, S. D.; BERNARDO-FILHO, M. An aqueous extract of *Pfaffia* sp. does not alter the labeling of blood constituents with technetium-99m and the morphology of the red blood cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15, 126-132, 2005.

PEREIRA, R. L.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 31-37, Jun 1999.

RANGEL M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**. v. 35, p. 305-309, 1997.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROFF, C.F.; PASTOSZYN, A.; STRAUSS, J.F.; BILLHEIMER, J.T.; VANIER, M.T.; BRADY, R.O.; SCALLEN, T.J.; PENTCHEV, P.G. Protein variability in male and female Wistar rat liver proteins. **Journal of Biology Chemistry**, v.267, p.15902-15908, 1992.

SÁ, R.C.S. & Almeida, R.N.. Toxicidade Aguda. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 124-130, 2006.

SANTOS JUNIOR, J. C. M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Revista Brasileira de coloproctologia**, v. 23, n. 3, p. 206-210, 2003.

SKARE, T.L. Reumatologia princípios e prática. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.341, 1999.

SCHIAR, V. P. P.; SANTOS, D. B.; LUDTKE, D. S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M. W.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, B. T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 139-145, 2007.

SERHAN, C. N. & CHIANG N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resolomics. **Rheum Dis Clin North Am**. v. 30, p. 69–95, 2004.

SERTIE, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; OSHIRO T.T.; AZZOLINI, C. P., PENNA S. C. J. **Etnopharmacology**. v. 31, p. 239-248, 1991.

SILVA SAS, RODRIGUES MSL, AGRA MF, DA-CUNHA EVL, BARBOSA-FILHO JM, SILVA MS. Flavonoids from *Cordia globosa*. **Biochem Syst Ecol**. v. 32, p. 359-361, 2004.

SILVA, V.A.; NASCIMENTO, V.T.; SOLDATI, G.T.; MEDEIROS, M.F.T.; ALBUQUERQUE, U.P. Etnobotânica aplicada à conservação da biodiversidade. In:

ALBUQUERQUE, U.P.; LUCENA, R.F.P.; CUNHA, L.V.F.C. Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. NUPPEEA, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002.

SOUZA, R.K.D. Etnofarmacologia de Plantas Medicinais do Carrasco no Nordeste do Brasil, Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular -Biodiversidade), Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. p.79, 2012.

SOUZA-BRITO, A.R.M.. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: Di Stasi, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. **Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. Da Universidade Estadual Paulista, p. 99-108, 1996.

STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 2 August 2001. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Tradução Eliane Romanato Santarém et al. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TRUEBA, G. P. **Ver. Cubana Invest. Biomédicas**, v. 1, p. 22, 2003.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a —Era do Teste DL50l. **Revista Eletronica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, p. 73–80, 2008.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.143, p.711-4, 1973.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. *Medicina*, Ribeirão Preto. v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.

WAGNER H., Pesquisa Fitomédica do novo Milênio: Tendências e mudanças. In: CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A., **Química de produtos Naturais, Novos Fármacos e a moderna Farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: UNIVALI, p. 31-47 , 2009

WANCZINSKI, B.J. et al. Desenvolvimento de comprimidos de AAS 500 mg: influência do Amido 1500® na compressão direta. **Acta Scientiarum**. v.24, n.3, p.649-655, 2002.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin Layer Chromatography in Phitochemistry. **Chromatographic Science Series**. v. 99, 2008.

WHO. Quality control methods for medicinal plants materials. Geneva: WHO, 1992.

ZAKARIA, Z. A.; PATAHUDDIN, H.; MOHAMAD, A. S. et al. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 42-48, Mar 2010.

ZHOU, H. Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG, S.S. & KIM, Y.S. Anti-inflammatory activity of 21 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239-248, 2007.

## ANEXOS

## Anexo A – Parâmetros indicativos de alterações no sistema nervoso central.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 10:30h	11h	12h	13h	14h
<b>1 – SNC</b>					
<b>a – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Outras					
<b>b – Depressora</b>					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
<b>2 - SN AUTÔNOMO</b>					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTE</b>					