



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

NATANAEL TELES RAMOS DE LIMA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO CAULE DE *Varronia*
***globosa* Jacq. (BORAGINACEAE *sensu lato*)**

CAMPINA GRANDE

2017

NATANAEL TELES RAMOS DE LIMA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO CAULE DE *Varronia globosa* Jacq. (BORAGINACEAE *sensu lato*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Fitoquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Maria Fechine

Co-orientadora: Laisla Rangel Peixoto

CAMPINA GRANDE

2017

É expressamente proibido 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 do trabalho.

L732e Lima, Natanael Teles Ramos de.
Estudo fitoquímico e avaliação citotóxica do caule de *Varronia globosa* Jacq. (Boraginaceae *sensu lato*) [manuscrito]
: / Natanael Teles Ramos de Lima. - 2017.
49 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação : Profa. Dra. Ivana Maria Fachine, Departamento de Farmácia - CCBS."

"Coorientação: Profa. Esp. Laisla Rangel Peixoto, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. *Varronia globosa*. 2. Fitoquímica. 3. Citotoxicidade.

21. ed. CDD 615.321

NATANAEL TELES RAMOS DE LIMA

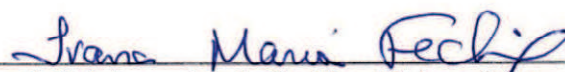
ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO CAULE DE *Varronia*
globosa Jacq. (BORAGINACEAE *sensu lato*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

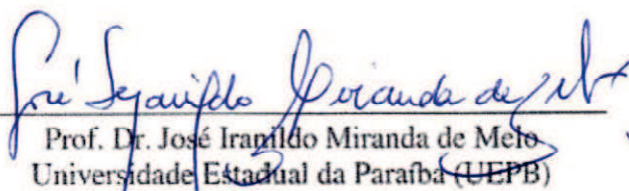
Área de concentração: Fitoquímica

Campina Grande – PB

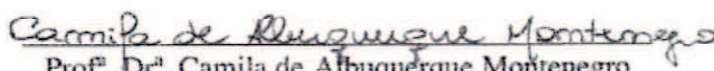
Data de aprovação: 30/11/2017



Prof.^a. Dr.^a. Ivana Maria Fechine (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. José Irani de Melo
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof.^a. Dr.^a. Camila de Albuquerque Montenegro
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Dedico este trabalho a todos aqueles que me incentivaram a evoluir academicamente, profissionalmente e como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a todas as forças e energias positivas que fizeram e farão eu alcançar meus objetivos.

Agradeço imensamente à minha família, principalmente ao meu pai, **Antônio Neto**, e minha mãe, **Maria Helena**, por terem sempre me dado suporte, me alertado, investido na minha educação e por todas as “pequenas grandes” coisas do dia-a-dia, serei para sempre grato a vocês, e aos meus irmãos, **Alik** e **Rafael Teles**: amo todos vocês!!

Aos amigos da minha cidade natal, Iguatu – Ceará, que em meio às saudades e incapacidade de estarmos próximos, alegravam meus dias mesmo na distância. **Alana Lira**, **Bruno Xavier**, **Ítalo Nobre**, **Eliab Oliveira**, **Felipe Rolim**, **Lilian Oliveira**, **Ilana Machado** e **Anderson Arraes**, amo vocês, zumbetes!!!

A **Alisson Farias**, pelo companheirismo, por estar comigo e me apoiar em todos os momentos!!

Adentrando no segmento acadêmico, agradeço aqui, a uma parte, de tantas pessoas maravilhosas que conheci nesse 5 anos (e meio) na universidade.

Sou grato aos amigos da UEPB, **Isabela Motta**, **Sonaly Albino**, **Maria Caroline**, **Eduardo Almeida**, **Renata Nóbrega** e **Fernanda Aguiar**, que me acompanharam em grande parte desses anos, obrigado pelo companheirismo, vocês são 10!! E dentre eles, **Isis Valeska**, que agradeço demais pelo carinho e por todo bem que me fez sem saber!!

A ela, **Thays Thyara**, que era constantemente agredida por mim (com carinho), que esteve sempre ao meu lado em tudo, que me ouvia, que me aconselhava, que me impulsionava e que me aguentava mesmo na minha falta de noção, agradeço por tudo. Sem você não teria conseguido, te amooo!!

A minha orientadora/ amiga/ mãe, **Ivana Fechine**, pela amizade, pelos ensinamentos, oportunidades, pela paciência e puxões de orelha (até hoje elas doem) que me dava, tudo serviu para me colocar em um caminho melhor. A admiração que criei por você transcende a de aluno-professor. Obrigado!!!

A **Camila Montenegro**, outra professora que transcendeu a relação estabelecida no ambiente acadêmico. Sou grato por toda a motivação, todas as lições, oportunidades, e porque não, pela inspiração que nos provocou. Obrigado, Camila!!

Ao professor **Harley Alves** por sempre me auxiliar quando precisei, pela paciência, pela inspiração e por mostrar o quão interessante é o mundo da Fitoquímica. Tenho grande admiração por você!

A minha co-orientadora, **Laisla Rangel**, pela boa vontade, orientação e colaboração.

A **Andressa Lira** e **Hilzeth Pessoa** pela ajuda crucial para execução deste trabalho.

A **Joeliton Cavalcante** pela companhia e ajuda em vários momentos.

Ao professor **Iranildo Melo** por compor a banca examinadora do TCC.

A diversos professores que não participaram diretamente na elaboração deste trabalho mas que com certeza me deram subsídios para construção do mesmo e toda a Universidade Estadual da Paraíba. Obrigado!

E finalmente, a todos que fizeram dos meus dias, bons dias.

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO CAULE DE *Varronia globosa* Jacq.
(BORAGINACEAE *sensu lato*)

¹Natanael Teles Ramos de Lima; ²Ivana Maria Fechine

^{1,2}Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

¹teles.natanael@gmail.com

Nos dias atuais, a procura por medicamentos é majoritariamente destinada aos alopáticos, sendo esta maior do que a busca por outras formas de tratamento, apesar das medidas alternativas de terapia estarem em constante crescimento. Nesse cenário, *Varronia globosa*, pertencente a família Boraginaceae *sensu lato*, conhecida popularmente como maria-preta, é usada como analgésico para cólicas menstruais, resfriados e gripes, sangramentos e inflamação da garganta, reumatismos e indigestões. Diante disso, objetivou-se obter o extrato etanólico bruto (EEB) do caule de *Varronia globosa* e realizar estudos fitoquímicos comparativos e de citotoxicidade com o mesmo, avaliando a capacidade de provocar hemólise ou promover proteção das hemácias em frente ao estresse osmótico. A metodologia adotada foi a de preparo de extratos através de maceração alcoólica, obtendo-se o extrato etanólico bruto. O estudo fitoquímico comparou a presença de metabólitos secundários em extratos etanólicos brutos do caule de *V. globosa* oriundas de locais e épocas distintos, Santa Luzia e Puxinanã, na Paraíba. Com o EEB, foram preparadas soluções em concentrações crescentes (10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µL/mL) e foram usadas amostras de sangue dos tipos A, B e O para os testes de citotoxicidade, avaliando o potencial hemolítico e a Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) causada por uma solução hipotônica de NaCl a 0,24%. O estudo comparativo dos EEB, mostrou que a planta do município de Puxinanã, em 2016, apresentou resultado negativo para presença de flavonoides quando comparada com a procedente de Santa Luzia, em 2013. Quanto a citotoxicidade, observou-se que concentrações mais altas (500 e 1000 µL/mL), causaram hemólise estatisticamente significativa, além de ser notado hemólise mais elevada em sangue do tipo O; o ensaio de Fragilidade Osmótica Eritrocitária demonstrou que a *V. globosa* não apresenta características protetoras de eritrócitos em nenhuma das concentrações testadas. A ausência de flavonoides na coleta mais atual é decorrente da ação de fatores mesológicos sobre *Varronia globosa*, é hemolítica nas concentrações elevadas e não possui atividade anti-hemolítica em nenhuma das concentrações testadas e recomenda-se dar continuidade a investigação toxicológica para, então, avaliar as propriedades farmacológicas para terapia efetiva, sem que haja inconvenientes para uso popular, de modo a ampliar o conhecimento dos efeitos biológicos, farmacológicos e toxicológicos do vegetal, bem como prosseguir com estudos fitoquímicos aprofundados para o isolamento e esclarecimento estrutural de compostos presentes em *V. globosa*.

Palavras- chave: *Varronia*; Fitoquímica; Citotoxicidade.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND CYTOTOXIC EVALUATION OF *Varronia globosa* Jacq. (BORAGINACEAE *sensu lato*) STEM

¹Natanael Teles Ramos de Lima; ²Ivana Maria

Fechine

^{1,2}Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

¹teles.natanael@gmail.com

Nowadays, the demand for drugs is mostly destined to the allopathic ones, which is greater than the search for other forms of treatment, although alternative therapy measures are constantly growing. In this scenario, *Varronia globosa*, belonging to the Boraginaceae *sensu lato* family, popularly known as maria-preta, is used as an analgesic for menstrual cramps, colds and the flu, bleeding and inflammation of the throat, rheumatism and indigestion. Faced with this, the objective was to obtain the crude ethanolic extract (CEE) from *Varronia globosa* stem and perform comparative phytochemical and cytotoxic studies with it, evaluating the ability to cause hemolysis or promote protection of red blood cells against osmotic stress. The methodology adopted was the preparation of extracts by alcoholic maceration, obtaining the crude ethanolic extract. The phytochemical study compared the presence of secondary metabolites in crude ethanol extracts of *V. globosa* stem from different locations and periods, Santa Luzia and Puxinanã, in Paraíba. With the CEE, solutions were prepared in increasing concentrations (10, 50, 100, 250, 500 and 1000 µL / mL) and types A, B and O blood samples were used for cytotoxicity testing, evaluating the hemolytic potential and the Erythrocyte Osmotic Fragility (EOF) caused by a hypotonic NaCl solution at 0.24%. The comparative study of CEE showed that the plant of Puxinanã city, in 2016, had a negative result for the presence of flavonoids when compared to the one coming from Santa Luzia, in 2013. For cytotoxicity, it was observed that higher concentrations (500 and 1000 µL/mL) caused statistically significant hemolysis, besides being noticed higher hemolysis in type O blood; the Erythrocyte Osmotic Fragility test showed that *V. globosa* does not exhibit protective characteristics of erythrocytes in any of the concentrations tested. The absence of flavonoids in the most recent collection is due to the action of mesological factors on *Varronia globosa*; it is hemolytic at high concentrations and has no anti-hemolytic activity at any of the concentrations tested, therefore, it is recommended to continue the toxicological investigation, and then, evaluate the pharmacological properties for effective therapy, without any inconvenience to popular use, in order to increase the knowledge of the biological, pharmacological and toxicological effects of the plant, as well as to continue with detailed phytochemical studies for the isolation and structural clarification of compounds present in *V. globosa*.

Keywords: *Varronia*; Phytochemistry; Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Pág.
Figura 1.	<i>Varronia globosa</i> Jacq.	19
Figura 2.	Estrutura da membrana do eritrócito evidenciando proteínas integrais e periféricas (citoesqueleto)	25
Figura 3.	Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i> em sangue tipo A	36
Figura 4.	Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i> em sangue tipo B	36
Figura 5.	Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i> em sangue tipo O	37
Figura 6.	Avaliação do potencial anti-hemolítico do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i> em sangue tipo A	39
Figura 7.	Avaliação do potencial anti-hemolítico do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i> em sangue tipo B	39
Figura 8.	Avaliação do potencial anti-hemolítico do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i> em sangue tipo O	40

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	Pág.
Tabela 1.	Classificação da espécie <i>Varronia globosa</i> Jacq.	18
Tabela 2.	Resumo dos testes fitoquímicos realizados com <i>Varronia globosa</i> Jacq.	30
Tabela 3.	Comparação dos resultados de triagens fitoquímicas do EEB do caule de <i>V. globosa</i> de diferentes coletas.	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Panorama geral do uso de plantas e derivados para fins medicinais	14
2.2	Produtos naturais: desenvolvimento tecnológico e fármacos introdução	15
2.3	Estudos etnobotânicos	16
2.3.1	Família Boraginaceae	17
2.3.2	<i>Varronia globosa</i> Jacq.	17
2.3.3	Distinção de gêneros: <i>Varronia</i> P. Browne e <i>Cordia</i> L.	20
2.4	Estudo fitoquímico	20
2.5	Estudo toxicológico	22
2.5.1	Testes de citotoxicidade	24
2.5.1.1	Teste de hemólise (sistema RBC – Red Blood Cells)	24
2.5.2	Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Locais da pesquisa	29
4.2	Coleta e identificação do material vegetal	29
4.3	Processamento do material vegetal	29
4.4	Preparação dos EEB do caule de <i>V. Globosa</i>	29
4.5	Avaliação fitoquímica	30
4.5.1	Screening fitoquímico qualitativo do EEB do caule de <i>V. globosa</i>	30
4.5.1.1	Testes que utilizam água como solvente	30
4.5.1.2	Testes que utilizam metanol (MeOH) como solvente	31
4.5.1.3	Testes que utilizam clorofórmio (CHCl ₃) como solvente	31
4.5.1.4	Teste para alcaloides	31
4.5.2	Análise comparativa de triagens fitoquímicas	32
4.6	Avaliação da citotoxicidade do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i>	32
4.6.1	Avaliação do potencial hemolítico do EEB de <i>Varronia globosa</i>	32
4.6.2	Avaliação do potencial anti-hemolítico ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)	33

4.6.3	Análise estatística	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Estudo fitoquímico	34
5.1.1	Obtenção do EEB do caule de <i>V. globosa</i>	34
5.1.2	Análise comparativa de triagens fitoquímicas	34
5.2	Testes de citotoxicidade	35
5.2.1	Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de <i>Varronia globosa</i>	35
5.2.2	Avaliação do potencial anti-hemolítico ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)	38
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país heterogêneo do ponto de vista geográfico e climático, condicionando o estabelecimento de diversos ecossistemas e tipos vegetacionais. Essas características fazem o Brasil um dos países com uma das biotas mais ricas do mundo, sendo estimada entre 170 e 210 mil espécies, cerca de 13,1% da riqueza mundial conhecida. Há mais de 100 anos, a biodiversidade e o potencial econômico da flora brasileira, já eram descritos em inventários, testemunhando a sua riqueza em plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal de várias espécies. Com relação às plantas, o Brasil possui 46.470 espécies catalogadas, incluindo briófitas, samambaias, licófitas, gimnospermas e angiospermas, das quais, 55% são endêmicas do território nacional. Isso faz com que o Brasil seja uma fonte grandiosa de oportunidades para pesquisas científicas e tecnológicas de produtos naturais (JACOBSON et al., 2005; STEHMANN; SOBRAL, 2017).

A mega biodiversidade está distribuída em seis biomas: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e ainda os Pampas (ALVES, 2010). Dentre eles, A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, isso quer dizer que muitos achados biológicos dessa região não são encontrados em nenhum outro lugar do mundo além do território brasileiro. Mesmo com essas características únicas, o bioma ainda é negligenciado quanto à pesquisa e exploração do potencial etnobotânico e farmacológico de suas plantas e apesar da abrangência territorial e grande biodiversidade de fauna e flora, o uso de fitoterápicos é feito predominantemente por comunidades locais na medicina popular (BRASIL, 2002; PEREIRA-JÚNIOR et al., 2014).

A espécie *Varronia globosa* Jacq. é uma planta de uso popular, encontrada em grande parte do Nordeste, é popularmente conhecida como maria-preta, bamburral, pau-prezinho (AGRA et al., 2007). *V. globosa* pertence à família Boraginaceae, recorrente na Caatinga, Al-Shehbaz (1991 *apud* VIEIRA; CONCEIÇÃO; MELO; STAPF, 2013) destaca que a família reúne aproximadamente 130 gêneros e 2.500 espécies. São encontradas em diversos padrões climáticos (tropical, subtropical, temperado e ártico) com centros de dispersão localizados nas regiões mediterrâneas, México e América do Sul.

Maria-preta é usada popularmente como analgésico para cólicas menstruais, além de resfriados e “aperto no peito” (ASPREY et al., 1955); para gripes, sangramentos e inflamações da garganta (ALBUQUERQUE et al., 2007); o infuso ou decocto das folhas contra reumatismos, indigestões e cólicas menstruais (AGRA et al., 2007).

Considerando-se a gama de usos, especialmente para fins medicinais e não se tem registro de sua citotoxicidade, este trabalho teve por objetivo, o estudo toxicológico a fim de sugerir doses seguras para sua utilização. Além disso, seu estudo fitoquímico será útil para engrandecimento científico de pesquisas conduzidas com plantas utilizadas na medicina popular da Caatinga nordestina.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PANORAMA GERAL DO USO DE PLANTAS E DERIVADOS PARA FINS MEDICINAIS

As plantas acompanham a história do homem desde os primórdios, ao longo desse caminho, elas sempre forneceram combustível, vestuário, alimento, abrigo, sempre foram e são usadas como ferramentas em fenômenos culturais e religiosos, e principalmente, no alívio de dores e mazelas servindo como remédios. O uso de plantas pelo homem para amenização de moléstias data desde o período da pré-história; por volta de 5000 anos a.C., os chineses, indianos e egípcios já catalogavam suas plantas medicinais e dominavam essa arte (LAMEIRA; PINTO, 2008; BERNARDES et al., 2017). Esse conhecimento atravessa séculos até os dias atuais, sendo passado oralmente ou de forma escrita, constituindo a sabedoria tradicional do uso de plantas e sendo fonte de estudos de ciências como etnobotânica e etnofarmacologia.

A imensa diversidade biológica e cultural do Brasil faz com que o uso de plantas para fins medicinais reflita grandemente sobre o uso popular; a produção de chás, tinturas, garrafadas, unguentos, banhos e lambedores, bem como a utilização da planta *in natura* são práticas comuns na medicina tradicional. Embora o uso de medicamentos alopáticos seja predominante, os brasileiros estão cada vez mais à procura de tratamentos à base de plantas medicinais e fitoterápicos, o que pode ser visualizado com o aumento de 161% na busca por esses produtos no Sistema Único de Saúde (SUS) entre 2013 e 2015 (MONTELES; PINHEIRO, 2007; MACIEL, 2016).

Observando-se a biodiversidade brasileira, e sabendo-se que entre 2007 e 2013 o Brasil saltou da décima para sexta colocação no mercado farmacêutico mundial; pode-se imaginar que o mercado e desenvolvimento de fitoterápicos no país teria destaque mundial, isso não é o que acontece, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. (PÚBLIO, 2015; DE CASTRO, 2016)

Atualmente, nota-se que é prevalente a produção de medicamentos alopáticos na indústria farmacêutica, mesmo sendo crescente a procura por terapias alternativas para cura das afecções. Mesmo com o domínio de fármacos alopáticos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que a maior parte da população nos países em desenvolvimento faz uso da medicina tradicional e, hoje, 80% da população mundial é dependente de derivados de

plantas como primeira linha de tratamento para alívio humano, no sistema de saúde primário. Nos Estados Unidos da América, por exemplo, 25% das prescrições farmacêuticas contêm pelo menos um componente derivado vegetal. As plantas são as principais fontes utilizadas pela medicina tradicional, com a população de modo geral utilizando um grande número de diferentes espécies, enquanto que no século passado, aproximadamente 121 produtos farmacêuticos foram formulados com base no conhecimento tradicional adquirido de diversas procedências (SOUZA, 2012; NAYANABHIRAMA, 2016).

2.2 PRODUTOS NATURAIS: DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E FÁRMACOS

Com o surgimento de técnicas que favorecem o estudo químico de compostos naturais foi possível promover uma transição na forma do uso de remédios, antes sendo *in natura* e hoje de maneira mais refinada, passando por testes de controle de qualidade.

Os produtos naturais merecem grande mérito, já que através deles foi possível o desenvolvimento de áreas da fisiologia e farmacologia como instrumentos que conduziram à elucidação de rotas fisiológicas, não sendo útil apenas terapeuticamente. Substâncias derivadas de toxinas e venenos animais, fungos, microrganismos, seres de origem marinha e principalmente plantas, nortearam o progresso do desenvolvimento de fármacos e sem esses compostos e pesquisas, a indústria farmacêutica apresentaria uma quantidade diminuta de produtos terapêuticos (BERNARDES et al., 2017).

Mesmo existindo diversas fontes para obtenção de substâncias naturais, o Reino Vegetal é que ocupa principal posição no fornecimento de compostos para tratamento humano e animal. A variedade e complexidade de substâncias biossintetizadas por vegetais permitem sua utilização de diferentes formas, como ingredientes ativos e adjuvantes farmacêuticos (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Inúmeros fármacos existentes são derivados direta ou indiretamente de plantas, por meio de processos extrativos de isolamento, como no caso dos alcaloides vincristina e vimblastina retiradas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; ou por semissíntese, substâncias retiradas de plantas usadas como precursoras para outros fármacos, exemplo de fármacos esteroidais preparados de fitoesteróis de resíduos de soja (BRANDÃO et al., 2010; BERNARDES et al., 2017).

Numericamente, cerca de 50% das substâncias farmacêuticas foram elaboradas com base em compostos primeiramente encontrados ou isolados em plantas, incluindo microrganismos, animais e insetos, onde cerca de 80% dessas, são drogas antimicrobianas, imunossupressoras, cardiovasculares e antineoplásicas (PAN et al, 2013).

2.3 ESTUDOS ETNOBOTÂNICOS

O conhecimento tradicional acerca do uso de plantas medicinais é bastante extenso e muitas vezes, em uma determinada região ou grupo étnico, a presença de plantas medicinais comparada a outras plantas ornamentais é mais pronunciada, pois elas por vezes são a única forma de tratamento dessa população; o que deixa evidente a marcante importância da relação entre o homem e as plantas em uma comunidade (PASA; SOARES; GUARIM-NETO, 2005).

Nesse contexto, observa-se a Etnobotânica, que se ocupa no estudo da inter-relação direta entre pessoas e plantas, e das formas de utilização dos recursos vegetais nas mais diversas camadas da experiência humana. Juntamente com a Etnobotânica, a Etnofarmacologia apoia a busca por novas fontes terapêuticas das plantas medicinais, estudando os preparos tradicionais de forma isolada ou associada a princípios originados de plantas, fungos, animais ou minerais com finalidade terapêutica (BETTEGA et al., 2011).

Segundo Coutinho et al. (2002), estudos etnobotânicos vêm sendo realizados no Brasil e no mundo, procurando conhecer a medicina tradicional e moderna de vários povos, como também a forma de organização desses conhecimentos; revelando novas formas de tratamento com plantas que possuem atividade terapêutica e, conseqüentemente, a descoberta de novos fármacos.

Existem várias formas de abordagem para escolha do material vegetal, porém existem três que são mais empregadas: 1) abordagem randômica, onde a planta é escolhida aleatoriamente, tendo como determinante a disponibilidade da planta; 2) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética, em que se observam a ocorrência de determinadas classes químicas de substâncias presentes em um gênero ou família; 3) abordagem etnofarmacológica, nesta, a espécie é selecionada de acordo com observações do uso terapêutico em uma dada comunidade (MACIEL, 2002).

2.3.1 Família Boraginaceae

De acordo com a classificação tradicional, Al-Shehbaz (1991 *apud* MELO; LYRA-LEMOS, 2008; VIEIRA; CONCEIÇÃO; MELO; STAPF, 2013) aponta que a família Boraginaceae *s.l.* possui aproximadamente 130 gêneros e 2.500 espécies divididas em cinco subfamílias: Boraginoideae Arn., Cordioideae (Link) Cham., Ehretioideae (Mart. ex Lindl.) Arn., Heliotropioideae (Schrad.) Arn. e Wellstedioideae Pilger. As suas espécies se distribuem nas regiões tropicais e subtropicais, sendo a América Central e as regiões Noroeste e Central da América do Sul os principais centros de diversidade de gêneros e espécies, além das zonas temperadas e árticas e a região Turco-iraniana e Mediterrânea.

O Nordeste, especialmente o bioma da Caatinga, é um importante centro de diversificação taxonômica de Boraginaceae *s.l.*; dos 11 gêneros e aproximadamente 137 espécies da família registrados no Brasil, sete gêneros e 43 espécies são encontradas nesta região. Dentre os seus gêneros, *Cordia* L., *Varronia* P. Browne e *Myriopus* Small são os encontradas em maior número (VIEIRA; CONCEIÇÃO; MELO; STAPF, 2013; BFG, 2015).

Quimicamente, a família apresenta flavonoides, lignoides, quinonas, triterpenos e alcaloides pirrolizidínicos (BRITO, 1986). Nesse contexto, Heywood (1996 *apud* ABRANTES; AGRA, 2004) destaca que as Boraginaceae são ainda relevantes economicamente, já que várias de suas espécies são cultivadas para fins ornamentais, a exemplo de *Heliotropium*, *Mertensia*, *Myosotis* e *Borago*; para fabricação de cosméticos, na culinária e para propósitos medicinais, como *Symphytum officinale* L., *Borago officinalis* L. e algumas espécies de *Cordia* e *Heliotropium*.

2.3.2 *Varronia globosa* Jacq.

A espécie *Varronia globosa* Jacq. (= *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth) (Figura 1) é um arbusto conhecido popularmente por maria-preta, bamburral, pau-pretinho, chumbinho, piçarra ou moleque-duro (ALMEIDA et al., 2006; AGRA et al., 2007). Distribui-se em grande parte do Nordeste, no Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Alagoas e em todo o bioma da Caatinga. Fora do Brasil é achada desde o Sul dos Estados Unidos (Flórida), México e América Central, inclusive nas Antilhas, chegando a Venezuela (MELO et al., 2010; VIEIRA; CONCEIÇÃO; MELO; STAPF, 2013).

Varronia globosa Jacq.,

Arbusto, 1,5–3,5 m, ereto; ramos estrigosos a escabrosos, lenticelas esbranquiçadas. Folhas alternas; lâmina 1,5–4,2 × 0,5–2 cm, membranácea, discolor, lanceolada, oval a lanceolada, base cuneada a truncada, ápice agudo, margem serreada, face adaxial estrigosa a escabrosa, face abaxial escabrosa ou tomentosa, pecíolo 0,2–0,8 mm, estrigoso a hirsuto; venação semicraspedódroma. Inflorescência 0,5–1 cm, glomérulo-globosa, terminal e internodal, congesta; pedúnculo 0,5–5 cm, escabroso a hirsuto. Flores 3–7 mm, sésseis; cálice 3–3,5 mm, campanulado, verde, externamente estrigoso a hirsuto, internamente glabro, lacínios 1–1,2 × 1 mm, obovais, ápice filiforme; corola 2,5–5 mm, infundibuliforme, alva, glabra, lobos 1–2 × 1–1,5 mm, truncados; estames 5, epipétalos, livres, pilosos na base, filetes 1,5–2 mm, anteras 0,6–1 mm, oblongas a lanceoladas; ovário ca. 1,5 mm, piriforme, disco nectarífero 0,8–1 mm; estilete ca. 1,2 nas flores brevistilas, 2,4–3,5 mm nas flores longistilas, estigmas 0,5–0,8 mm, clavados. Drupa ca. 3,5 mm compr. × 1,5–2 mm diâm., globosa, vermelha na maturidade, glabra, cálice persistente. Semente 1, ca. 3 mm compr. × ca. 1,5 mm diâm, cônica a ovoide (VIEIRA; CONCEIÇÃO; MELO; STAPF, 2013).

A classificação de *V. globosa* pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação da espécie *Varronia globosa* Jacq.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Boraginales
Família	Boraginaceae
Gênero	<i>Varronia</i>

Figura 1. *Varronia globosa* Jacq.



Fonte: D.D. Vieira. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105525>

Varronia globosa Jacq., maria-preta, é usada tradicionalmente para diversos fins, na forma de infuso ou decocto das folhas, contra indigestões, cólicas menstruais e reumatismo (SILVA et al., 2004). Na Jamaica é usada para os mesmo propósitos, sendo adicionalmente utilizada contra tosses, resfriados e “aperto no peito” (ASPREY et al., 1955). Gripes, sangramentos e inflamação da garganta (ALBUQUERQUE et al., 2007). Martínez Martín e colaboradores (2011) afirma que em Cuba a planta é conhecida como “yerba de la sangre” por seus efeitos benéficos sobre afecções renais e também como anti-hipertensivo; e em estudo conduzido pelo mesmo autor foi comprovado efeito diurético da sua tintura. Também é conhecida por este nome pois segundo Godínez-Caraballo e Volpato (2008) a decocção da parte aérea da planta é administrada internamente como purificador do sangue e como hemostático se aplicado externamente. Utilizada ainda em desordens ósseas e musculares (MATIAS et al., 2015).

2.3.3 Distinção de gêneros: *Varronia* P. Browne e *Cordia* L.

O gênero *Varronia* foi inicialmente descrito por volta dos anos 1700, e era facilmente diferenciado de outros membros do gênero *Cordia* devido à sua morfologia. *Varronia* apresentava duas espécies restritas a Jamaica e posteriormente passou a ser considerado um subgênero de *Cordia* L. No entanto, estudos subsequentes tornaram evidente que *Varronia* é um grupo irmão de *Cordia* e, conseqüentemente, deve ser tratado como um gênero distinto (MILLER; GOTTSCHLING, 2007; STAPF, 2010; MELO; VIEIRA, 2015).

Varronia difere de *Cordia* por reunir espécies que são quase exclusivamente arbustos de multicaulescentes, enquanto as espécies de *Cordia* são árvores, em sua maioria. Além disso, as folhas de *Varronia* também diferem por apresentarem margens serradas e venação craspedódroma, ao contrário de espécies do gênero *Cordia*, que não possuem margem serrada e venação broquidódroma. Outras estruturas se apresentam distintas, como inflorescências e grão de pólen (MILLER; GOTTSCHLING, 2007).

Varronia reúne aproximadamente 100 espécies dispersas no continente americano, do Arizona (Estados Unidos) à Argentina, das quais cerca de 30 ocorrem no Brasil, sendo sete endêmicas da região Nordeste. No território brasileiro, suas espécies distribuíem-se além da Caatinga, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado Pantanal e Pampas (MILLER; GOTTSCHLING, 2007; STAPF, 2010; BFG, 2015; MELO; VIEIRA, 2015).

2.4 ESTUDO FITOQUÍMICO

Segundo a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos:

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2016).

No Brasil, além de serem usadas como substrato para fabricação de medicamentos, as plantas também são usadas como remédios caseiros. Com todo esse potencial para pesquisa e vasto número de espécies, apenas cerca de 8% foram estudadas quanto aos compostos bioativos e 1.100 foram analisadas quanto às propriedades medicinais (BRASIL, 2016).

Por esse motivo a análise fitoquímica se torna importante, já que essa ciência busca verificar a presença de grupos de metabólitos e caracterizar os constituintes químicos das plantas. Essa caracterização pode ser realizada em espécies vegetais onde a constituição

química é desconhecida, na busca por compostos em espécies já caracterizadas previamente e ainda baseada em aspectos entofarmacológicos e/ ou quimiotaxonômicos (REGINATTO, 2017).

Os produtos naturais são fontes incalculáveis de substâncias orgânicas, os processos de biossíntese são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de vários desses compostos presentes no interior de células que compõem os tecidos animais e vegetais. Com isso, a química de produtos naturais tem como objetivo o esclarecimento dessas substâncias resultantes dos metabolismo dos seres vivos, através da isolamento, identificação e elucidação de suas estruturas moleculares (MATOS, 1997).

Os produtos resultantes do metabolismo nos vegetais são divididos em dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários, melhor denominados como metabólitos especiais. O metabolismo primário, denominado ainda metabolismo basal ou de distribuição ubiqüitária é composto pelos produtos: aminoácidos, açúcares, vitaminas, nucleotídeos e ácidos graxos; ou seja, o metabolismo basal das plantas inclui todos compostos e processos que são essenciais para o crescimento, desenvolvimento, reprodução e manutenção da vida de um ser, além de apresentarem semelhanças entre diversos organismos (KREIS; MUNKERT; PÁDUA, 2017).

Os metabólitos especiais tem estrutura complexa, baixo peso molecular e possuem atividades biológicas e farmacológicas marcantes (VON POSER, 2017). O metabolismo secundário é assim chamado pois seus metabólitos são derivados do metabolismo primário, diferindo desse último por seus caminhos biossintéticos serem restritos, na maioria da vezes, a *taxa* específicos (não são universalmente similares). No metabolismo especial são vistas a produção de substâncias e a presença de processos que ocorrem através da inter-relação do indivíduo com seu meio ambiente: sazonalidade, ritmo circadiano, disponibilidade hídrica e de nutrientes, temperatura, radiação ultravioleta, altitude, reações por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Esses fatores ambientais promovem a produção ou alteram a quantidade dos metabólitos presentes nas plantas, e com isso são necessários componentes que garantam a sobrevivência e existência de uma espécie em seu ambiente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; KREIS et al., 2017).

Matos (1997) descreve um roteiro geral para o estudo químico de plantas em seis etapas principais:

- a) Obtenção do material vegetal;
- b) Identificação botânica da planta escolhida;

- c) Prospecção preliminar de sua composição química
- d) Isolamento e purificação dos constituintes;
- e) Determinação estrutural dos compostos isolados;
- f) Levantamento bibliográfico.

A obtenção do material vegetal refere-se a forma de escolha da planta e a coleta. A escolha pode ser baseada no uso popular ou de forma aleatória. Sendo importante observar fatores ambientais que influenciam a biossíntese de metabólitos especiais no momento da coleta: época, clima e tipo de solo, além de data e hora da coleta (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Para prospecção preliminar devem ser realizados a secagem e moagem do vegetal, para então serem preparadas soluções e extratos (com o solvente adequado) do obtido. A triagem fitoquímica se dá por reações químicas envolvendo essas soluções que adquirem coloração e/ ou geram precipitado, dependendo da classe de metabólitos nela presente. Com o desenvolvimento tecnológico, diversas técnicas de extração, isolamento e purificação foram surgindo, classicamente pode-se citar: cromatografia líquida em coluna e cromatografia em camada delgada e como métodos mais modernos a cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O avanço da tecnologia também foi útil para elucidação estrutural de compostos naturais, muitos métodos existem para este fim: espectrometria no ultravioleta (UV), espectrometria no infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono, utilizando métodos uni e bidimensionais (COSY, NOESY, HETCOR, HMBC, etc), técnicas que juntas fornecem a informações necessárias para “montar” a molécula estudada (FALKENBERG et al, 2007).

2.5 ESTUDO TOXICOLÓGICO

A falta de acesso a serviços de saúde, como centros de atendimento hospitalares, exames e medicamentos, juntamente com a fácil obtenção de plantas medicinais e o uso tradicional difundido, contribuem para utilização destas pelas populações em países em desenvolvimento. O uso de plantas para fins medicinais provenientes das medicinas tradicionais ayurvedica (Índia) e chinesa está cada vez mais difundido, sustentadas no senso comum de que “o natural, é seguro”, o que constitui um agravante pois muitas dessas plantas orientais são desconhecidas pelos povos ocidentais. Logo, as supostas propriedades

farmacológicas e toxicológicas de alguns destes vegetais não possuem confirmações científicas, por não terem sido estudadas ou por não terem passado por testes não-clínicos e/ou clínicos (VEIGA-JÚNIOR et al, 2005).

Para Woolley (2008) os objetivos gerais de um estudo toxicológico são:

- a) Estabelecer uma curva da relação quantitativa entre a dose e a resposta;
- b) Garantir a segurança de novos químicos, antes de serem registrados para uso geral. Esse tipo de estudo toxicológico é regulado por diretrizes governamentais e internacionais que determinam como o estudo deve ser conduzido. Os toxicólogos nas autoridades reguladoras são responsáveis em assegurar que a segurança de novos produtos químicos ou a relevância de novos métodos seja investigada antes de permitir a exposição humana significativa;
- c) Estabelecer o modo ou mecanismo de ação para efeitos tóxicos vistos em outros estudos;
- d) Produzir estudos epidemiológicos explicando efeitos observados na população;
- e) Investigar ou validar novos métodos de teste ou investigação, particularmente aqueles realizados “*in vitro*” em vez de em animais.

Na análise toxicológica de plantas, o principal objetivo é identificar os efeitos adversos provocados pelo material e com isso determinar a gravidade desses efeitos, os níveis seguros de exposição e os limites em que surgem os efeitos indesejáveis. Outro objetivo igualmente importante de testes toxicológicos é a detecção de extratos tóxicos de plantas ou compostos deles derivados nos estágios iniciais (não-clínicos) e tardios (clínicos) da descoberta e desenvolvimento de fármacos a partir de fontes vegetais. Isso facilitará a identificação de compostos tóxicos, os quais podem ser descartados ou modificados, a fim de surgir possibilidades de avaliação do candidato a fármaco, em alternativas mais seguras e promissoras. Dependendo do composto, ações como redução da dose ou ajustes na sua estrutura molecular podem melhorar sua tolerabilidade (IFEOMA; OLUWAKANYINSOLA, 2013).

Os métodos “*in vitro*” são ferramentas importantes na avaliação e compreensão dos efeitos perigosos que diversos compostos podem implicar nos seres vivos, ajudando a prevêê-los. Esses sistemas são utilizados para fins de triagem, para gerar perfis toxicológicos mais abrangentes, estudos de efeitos locais ou de tecido e alvo específicos e obtenção de informações derivadas do mecanismo (EISENBRAND et al., 2002). Estes métodos diminuem o uso de animais, compreendendo o princípio dos 3 Rs: substituição (replacement), troca de

experimentos que usam animais por outro que não necessite; redução (reduction) da quantidade de animais e refinamento (refinement), diminuição da severidade dos procedimentos; com isso tem-se uma prévia dos efeitos toxicológicos “*in vivo*”, fazendo uso de bactérias, fungos, algas e crustáceos, frações subcelulares presentes no sistema biológico como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas (BEDNARCZUK et al., 2010).

“Os métodos “*in vitro*” apresentam vantagens em relação aos “*in vivo*” tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto” (ROGERO et al., 2003).

2.5.1 Testes de citotoxicidade

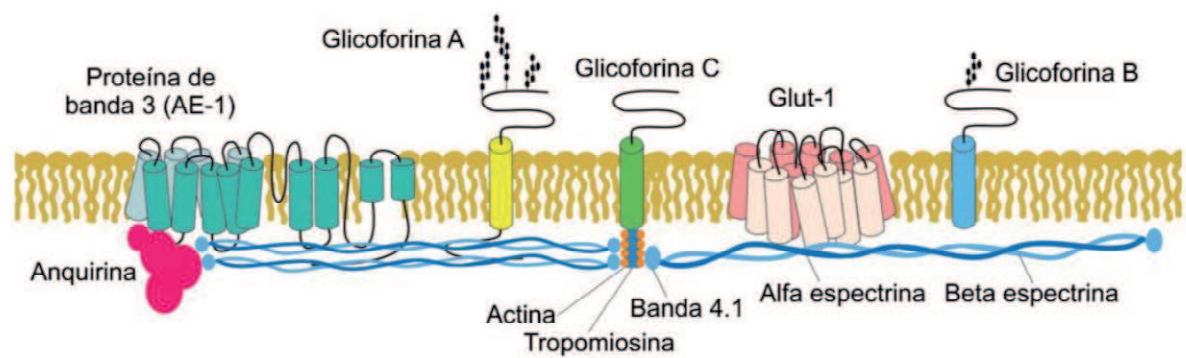
A citotoxicidade se caracteriza, principalmente, pela capacidade de um composto induzir a morte celular. Na avaliação de toxicidade aguda, prevê-se que, na maioria da vezes, um composto tóxico provoque injúria à estrutura e/ou funções celulares; na toxicidade basal, ou seja, a capacidade intrínseca de um composto de causar a morte celular, é possível definir a faixa de concentração para testes “*in vitro*” mais detalhados. Faz-se importante considerar a citotoxicidade basal como ponto de partida, pois fatores cinéticos e de especificidade do órgão alvo quanto ao efeito tóxico, nem sempre permitem a correlação entre animais e humanos. Os parâmetros mais usados nos testes de toxicidade celular baseiam-se no desarranjo da membrana celular, redução da função mitocondrial, alterações na morfologia celular e mudanças na replicação celular (EISENBRAND et al., 2002).

2.5.1.1 Teste de hemólise (sistema RBC – Red Blood Cells)

A membrana eritrocitária é, como várias outras que constituem o organismo humano, formada por uma bicamada fosfolipídica de estrutura complexa (Figura 2) composta por dois tipos de elementos: lipídeos, que formam a porção externa, e proteínas que constituem o citoesqueleto. As proteínas do citoesqueleto (alfa e beta espectrinas, anquirinas, bandas 4.1, 4.2, demantina, actina, aducina, bandas 6 e 7) interagem com componentes presentes na bicamada lipídica e são as responsáveis pela forma, flexibilidade, mobilidade e deformabilidade e transporte de macromoléculas do eritrócito (MURADOR; DEFFUNE, 2007; PINTO et al., 2013).

A membrana da hemácia possui diversos elementos, tais como: os fosfolípídeos fosfatidilcolina (30%), fosfatidiletanolamina (28%), fosfatidilserina (14%), esfingomiélin (25%); proteínas transmembranosas (integradas), que atravessam a camada da célula e proteínas interiores (periféricas) constituem o citoesqueleto e se situam na base interna da bicamada lipídica. A proteína integral AE1 (anion exchanger 1, AE1), ou banda 3, atua na troca de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, elevando a capacidade do sangue transportar CO_2 , garantindo a homeostase e o equilíbrio ácido-básico; possui ainda antígenos eritrocitários, sendo conhecidos mais de 250 tipos diferentes agrupados em 29 sistemas, tendo como mais importantes, AB0, Rhesus, MNS, Lewis, Lutheran, Kell, Duffy, Kidd e Xg (LORENZI, 2006; MURADOR; DEFFUNE, 2007).

Figura 2. Estrutura da membrana do eritrócito evidenciando proteínas integradas e periféricas (citoesqueleto)



Fonte: Pinto et al. (2013)

Agentes caotrópicos são aqueles que promovem o desarranjo da membrana, de acordo com aqueles componentes que possuem mais afinidade, induzindo a desorganização ou caos celular. Dentre os agentes caotrópicos pode-se citar: extremos de pH, estresse mecânico, estresse hipotônico, temperatura elevada e diversos solutos como ureia, etanol e hidrocloreto de guanidina. Contrariamente, a estabilidade de uma membrana pode ser reforçada por pH ideal, isotonicidade, temperatura ótima e solutos estabilizantes com distintos mecanismos de ação. Tanto os lipídeos quanto as proteínas podem sofrer ação de substâncias caotrópicas (SILVA, 2006).

O eritrócitos são bons objetos de estudo das membranas biológicas devido a sua estabilidade, facilidade de coleta e relativa simplicidade na realização de testes. Dado a que hemoglobina é liberada na ocorrência de algum estresse sofrido pela célula, caracterizando hemólise, essa proteína liberada para o meio pode ser quantificada por leitura

espectrofotométrica no comprimento de onda de 540nm, sendo a absorbância resultante proporcional a extensão da lise dos eritrócitos (FIRMINO, 2007).

Esse princípio é utilizado em um dos ensaios aplicados para avaliação da citotoxicidade, o teste de hemólise (sistema RBC – Red Blood Cells), com base na quantificação de proteínas após dano celular, não se detendo apenas a hemoglobina. Segundo o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (2012), esse método, além da quantificação da hemólise, pode subsidiar resultados em avaliação do potencial de irritação ocular, e ainda é usado para quantificar e avaliar os efeitos adversos dos tensoativos empregados produtos de higiene pessoal e cosméticos sobre a membrana plasmática.

2.5.2 Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)

A regulação do volume celular pela eliminação de solutos que para a célula é um dos mecanismo pelo qual o organismo evita a lise das células “*in vivo*”, conservar a concentração de sódio intracelular baixa faz com que o equilíbrio osmótico seja mantido. Contudo, na presença venenos metabólicos ou por certas doenças hemolíticas, o metabolismo energético do eritrócito pode ser interrompido e com isso acarretando em distúrbios na osmolaridade da célula e seu volume (MAKINDE; BOBADE, 1994).

A lise de hemácias por osmose ocorre quando a célula se encontra em ambiente hipotônico, sendo espaço intracelular hipertônico em relação ao meio, com isso observa-se entrada de solvente na célula, aumentando seu volume e, conseqüentemente, provocando seu rompimento.

A FOE pode ser caracterizada como a resistência dos eritrócitos à hemólise, tem sido usada para avaliar a viabilidade da células vermelhas e clinicamente, no diagnóstico da anemia hemolítica e esferocitose hereditária. O método consiste em determinar a fragilidade das hemácias à hemólise numa solução salina hipotônica, ou seja, soluções tamponadas de Cloreto de Sódio (NaCl) em adaptações de concentrações entre 0,85% a 0%. Além de doenças, fatores como pH, temperatura e oxigenação, além da forma, volume e tamanho da célula podem aumentar ou diminuir a fragilidade osmótica (ELIAS et al., 2004; BARROS et al., 2016).

Muitas plantas utilizadas popularmente não possuem seu perfil farmacológico e toxicológico traçados, dessa forma, elas podem causar efeitos indesejáveis se não usadas

corretamente, como repercussões cardiovasculares, distúrbios respiratórios, metabólicos, gastrintestinais e neurológicos (CAMPOS; SILVA; CAMPANA; ALMEIDA, 2016). Nesse cenário, a realização de estudos toxicológicos acerca de produtos de origem vegetal é importante, pois esta promove a utilização segura de plantas medicinais e permite a abertura de novas alternativas para o tratamento de outras enfermidades.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos fitoquímicos e ensaios biológicos com o Extrato Etanólico Bruto (EEB) do caule de *Varronia globosa* Jacq.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato etanólico bruto do caule *Varronia globosa*;
- Realizar procedimentos fitoquímicos com o EEB de *V. globosa* e comparar qualitativamente os metabólitos secundários em coletas de locais e épocas distintos;
- Avaliar o potencial hemolítico do EEB do caule de *V. globosa* em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O;
- Avaliar a Fragilidade Osmótica Eritrocitária do extrato do caule;

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAIS DA PESQUISA

Os procedimentos fitoquímicos foram conduzidos no Laboratório de Fitoquímica (LAFIT) e no edifício do Complexo das Três Marias da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB); e procedimentos fitoquímicos e de citotoxicidade foram realizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Amostras de *V. globosa* foram coletadas no município de Puxinanã, Paraíba em 01/02/2016. O voucher encontra-se depositado no Herbário Lauro Pires Xavier, Departamento de Sistemática e Evolução, Centro de Ciências Exatas e Naturais da UFPB, sob número de tombo JPB 36075, *Varronia globosa* Jacq. Brasil: Paraíba: Santa Luzia, M. F. Agra 6561-01/03/2006.

4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Após a coleta, o material foi conduzido até o LAFIT onde foram separadas as folhas, o caule e as raízes. Em seguida, as partes foram levadas à secagem em estufa de circulação de ar, com temperatura de 50° C, por aproximadamente três dias. As partes secas foram pulverizadas em moinho de facas, obtendo-se 108,538g de droga vegetal do caule, 47,762g de droga vegetal das folhas e 7,060g das raízes.

4.4 PREPARAÇÃO DO EEB DO CAULE DE *V. GLOBOSA*

A droga vegetal do caule (pó) foi submetido à maceração com etanol (EtOH), sendo o solvente substituído diariamente, até a perda da coloração do agente extrator. As soluções obtidas foram armazenadas em recipientes devidamente etiquetados e estocados em geladeira, tais soluções tiveram o solvente evaporado em um rotaevaporador a temperatura de 50°C.

4.5 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

4.5.1 Screening fitoquímico qualitativo do EEB do caule de *V. globosa*

O screening fitoquímico realizado avaliou a presença de fenóis e taninos, polissacarídeos, flavonoides, alcaloides, esteroides/triterpenoides, realizados de acordo com a metodologia descrita por Barbosa (2001) e Peixoto Sobrinho et al. (2012) especificadas na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos testes fitoquímicos realizados com *Varronia globosa* Jacq.

Metabólito secundário	Teste de Identificação	Resultado Positivo
Polissacarídeos	Lugol	Coloração azul
Fenóis	FeCl ₃ 1%	Azul – vermelho
Taninos		Azul e/ou verde
Flavonoides	Reação de Shinoda	Rósea – laranja
Esteroides e triterpenoides	Reação de Liebermann-Burchard	Azul a verde
Alcaloides	Buchardat/Mayer/Drangendorff	Precipitação e/ou turvação

4.5.1.1 Testes que utilizam água como solvente

Foi preparada uma solução-mãe com o EEB do caule de *V. globosa* pesando-se 140 mg do mesmo, que foi dissolvido em 28 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi levada ao banho de ultrassom para dissolver todo o soluto. Filtrou-se a solução papel filtro, sendo o filtrado a solução-mãe final.

Para determinação de **polissacarídeos**, transferiram-se 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio, adicionado de 2 gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indica o resultado positivo.

Para determinação de **fenóis e taninos**, foram transferidos 5 mL da solução-mãe para tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de solução alcoólica de FeCl₃ a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado indica reação positiva, quando comparado com o teste em branco (solvente + reativo). Uma coloração inicial entre o azul e vermelho é indicativa da presença de fenóis. Um precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos, e verde, a de taninos catéquicos.

4.5.1.2 Testes que utilizam metanol (MeOH) como solvente

A solução-mãe do caule de *V. globosa* foi preparada com 120 mg do EEB e dissolvido em 24 mL de MeOH. Posteriormente, esta solução foi levada ao banho de ultrassom para dissolver todo soluto. A solução foi filtrada em papel filtro, obtendo-se a solução-mãe (filtrado).

Para determinação de **flavonoides**, transferiram-se 10 mL da solução-mãe para um tubo de ensaio que foi então, acrescido de 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea-alaranjada indica reação positiva.

4.5.1.3 Testes que utilizam clorofórmio (CHCl₃) como solvente

Foi preparada uma solução-mãe com os EEB do caule de *V. globosa* pesando-se 75 mg do EEB, que foi dissolvido em 15 mL de CHCl₃. Em seguida esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo o soluto. A solução foi filtrada em papel filtro, obtendo-se a solução-mãe (filtrado).

Para a determinação de **esteroides e triterpenoides**, 10 ml da solução-mãe foi filtrada e adicionado 1 mL de anidrido acético, sob agitação suave. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. O rápido desenvolvimento de cores que vão do azul evanescente ao verde persistente indicam resultado positivo.

4.5.1.4 Teste para alcaloides

O EEB do caule de *V. globosa* foi solubilizado em 5 mL de solução de HCl 5% e logo após filtrados. Em seguida, foram divididos três tubos de ensaio contendo 1 mL cada, e neles, foram adicionados gotas dos reagentes de Bouchardat, Dragendorff e Mayer, cada tubo deve conter apenas um reagente. Precipitação e/ou turvação em pelo menos um tubo é indicativo de presença de alcaloides.

4.5.2 Análise comparativa de triagens fitoquímicas

A comparação foi feita a partir de uma coleta realizada por Reis (2014), na zona rural do município de Santa Luzia, Paraíba, em 31/05/2013. Tais resultados foram comparados com uma nova coleta procedida em 01/02/2016 em Puxinanã, Paraíba.

4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EEB DO CAULE DE *VARRONIA GLOBOSA*

O ensaio foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, com número de protocolo: 55007615.6.0000.5187 (ANEXO).

O sangue foi obtido de quatro doadores voluntários na UFPB, as amostras representam foram de três tipos sanguíneos do sistema ABO (A, B e O), sendo estas conservadas em EDTA.

Os ensaios foram realizados com seis concentrações do extrato (10, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

4.6.1 Avaliação do potencial hemolítico do EEB de *Varronia globosa*

Inicialmente, as amostras sanguíneas foram submetidas a lavagens através de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9%. Em seguida, passaram por centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, sendo obtido o concentrado de eritrócitos separado do plasma. Após a centrifugação, preparou-se uma solução a 0,5% com o precipitado de eritrócitos. A solução de eritrócitos foi preparada retirando-se 500 μL do precipitado e depois ressuspendendo-os em 100 mL da solução de NaCl a 0,9%. Esse procedimento foi realizado para cada tipo sanguíneo.

Transferiram-se 2 mL da solução de eritrócitos para tubos e em seguida foram adicionados a eles as amostras com o extrato nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{L}/\text{m}$. Para controle negativo foi usada apenas a solução de hemácias (0% de hemólise) e para controle positivo foi usada a solução de hemácias adicionada de uma solução de Triton X-100 (100% de hemólise). Os tubos foram deixados em repouso a temperatura de 25°C por 1 hora, sendo realizadas leves agitações em certos momentos. Após 1 hora os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante retirado para análise espectrofotométrica (540 nm) (RANGEL et al., 1997). O experimento foi realizado em triplicata para cada tipo sanguíneo.

4.6.2 Avaliação do potencial anti-hemolítico ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)

Após a análise espectrofotométrica, o sobrenadante dos tubos foi descartado e o precipitado de eritrócitos foi ressuspenso em solução hipotônica de NaCl a 0,24% na temperatura de 25°C por 20 minutos. Decorrido o tempo, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 30 segundos e o sobrenadante usado para análise de espectrofotometria (540 nm) (DACIE, 2001).

Tomou-se como controle negativo a solução de eritrócitos (0% de hemólise) e como controle positivo (100% de hemólise) a solução hipotônica de NaCl (0,24%). Este experimento também foi realizado em triplicata.

4.6.3 Análise estatística

Os resultados dos experimentos de citotoxicidade foram analisados com o software GraphPad Prism 7.0®, San Diego, CA, EUA. Seus valores foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e considerados significativos quando $p < 0,05$. Empregando-se o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.1.1 Obtenção do EEB do caule de *V. globosa*

Dos 108,538g de droga vegetal do caule, obteve-se 8,643g de EEB, com rendimento de 7,96%.

5.1.2 Análise comparativa de triagens fitoquímicas

A Tabela 3 mostra um comparativo em relação a resultados alcançados por Reis (2014) a partir de uma coleta realizada na zona rural no município de Santa Luzia - Paraíba em 31/05/2013. Em comparação a coleta realizada em maio/2013, constatou-se a ausência de flavonoides no EEB do caule na coleta de 01/02/2016 em Puxinanã – Paraíba.

Tabela 3. Comparação dos resultados de triagens fitoquímicas do EEB do caule de *V. globosa* de diferentes coletas.

Metabólito secundário	Teste de Identificação	Material obtido em 2013 (Santa Luzia)	Material obtido em 2016 (Puxinanã)
Polissacarídeos	Lugol	(-)	(-)
Fenois	FeCl ₃ 1%	(-)	(-)
Taninos			
Flavonoides	Reação de Shinoda	(+++)	(-)
Esteroides e triterpenoides	Reação de Liebermann-Burchard	(++)	(++)
Alcaloides	Buchardat/Mayer/Drangendorff	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(+)	-----

Legenda: (-) negativo; (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo.

Fatores ambientais como altitude, temperatura, incidência solar, disponibilidade hídrica e quantidade de nutrientes no solo podem alterar grandemente a presença ou concentração de metabólitos secundários nos vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Santa Luzia é um município enquadrado como semiárido, a exemplo dos anos de 2012 e 2013, que apresentaram valores de precipitação bem menores quando comparados com o ano de 2011 (PAULA; ALMEIDA, 2013).

Diferentemente, Puxinanã apresenta períodos chuvosos mais frequentes e pela altitude mais elevada, possui temperatura média menor, sendo esta 24,9°C em 2016, segundo informações colhidas por estações meteorológicas do Aeroporto Presidente João Suassuna (SBKG) (O TEMPO, 2017).

A incidência de radiação ultravioleta e solos de baixa fertilidade química proporcionam maiores níveis de fenóis totais, como flavonoides, taninos, quinonas (JACOBSON et al., 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Com isso, infere-se que a planta oriunda de Santa Luzia, por ter sofrido maior exposição à radiação solar e ter sido sujeita a maiores temperaturas, apresentou maior estímulo para produção de flavonoides, logo, maior probabilidade de possuir tais metabólitos. Contrariamente, a proveniente de Puxinanã, demonstrou resultado negativo para flavonoides pois não se encontrava nas mesmas condições da anterior, estando em um local de maior altitude (menos temperatura) e maior aporte de chuvas.

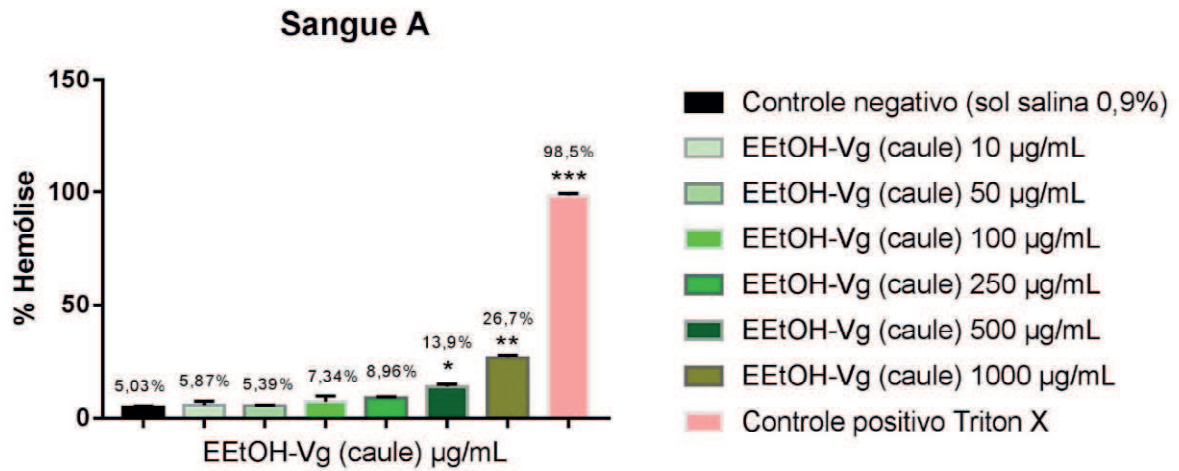
5.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE

5.2.1. Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de *Varronia globosa*

Nas figuras 3, 4 e 5 pode-se perceber que a medida que a concentração do extrato aumenta, a porcentagem de hemólise também se eleva; as concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL demonstraram atividade hemolítica, em comparação com o controle negativo, ou seja, solução salina a 0,9%. Em concentrações mais baixas, 10, 50 e 100 µg/mL, não foi observada indução de hemólise significativamente relevante, causada pelo extrato.

No sangue do tipo A (Figura 3), as concentrações em que se observou hemólise relevante foram as de 500 e 1000 µg/mL. No sangue do tipo B (Figura 4) a concentração de 250 µg/mL apresentou discreta, mas estatisticamente significativa, indução hemolítica, embora concentrações superiores do extrato se mostrem mais evidentes.

Figura 3. Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de *Varronia globosa* em sangue tipo A.

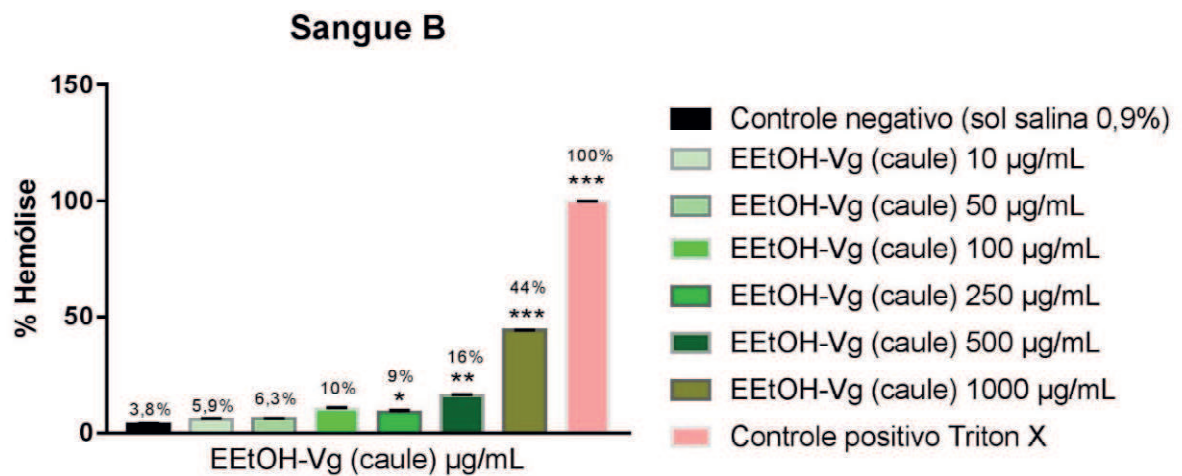


Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3)

Segundo Rangel e colaboradores (1997), o percentual de hemólise quando entre 0 e 40% é caracterizado como baixo, entre 40 e 80% é considerado moderado e acima de 80%, alto.

O sangue tipo A apresentou grau de hemólise significativa de 13,9% na concentração 500 $\mu\text{g/mL}$ e 26,7% na de 1000 $\mu\text{g/mL}$; mesmo em concentrações mais elevadas, a hemólise nesse tipo sanguíneo foi considerada baixa, já que em todas as concentrações do extrato a hemólise foi menor que 40%.

Figura 4. Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de *Varronia globosa* em sangue tipo B.

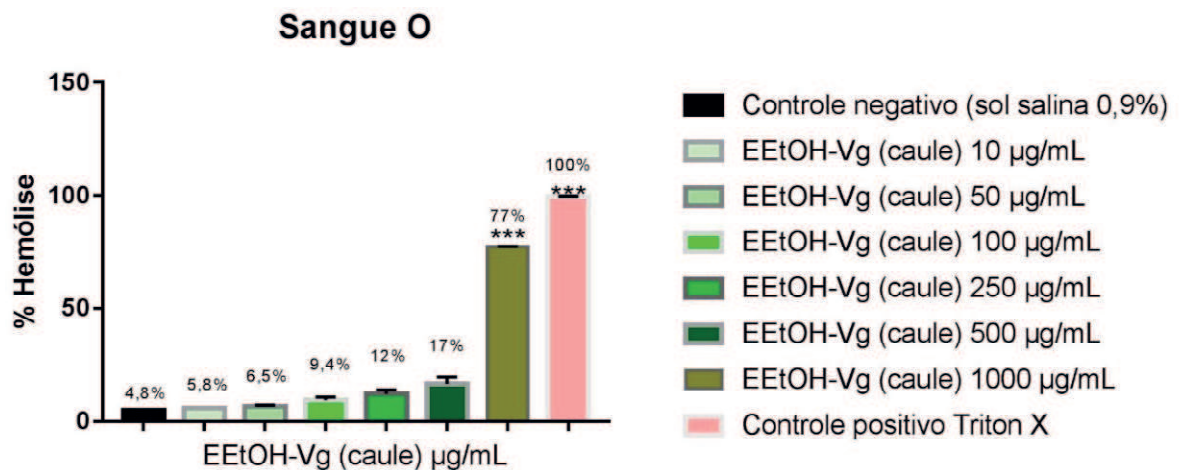


Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

O tipo sanguíneo B apresentou 9% de hemólise (baixa) na concentração 250 $\mu\text{g/mL}$; para as concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ a o percentual de hemólise foi, respectivamente, 16% (baixo) e 44% (moderado).

O tipo sanguíneo O (Figura 5) apresentou hemólise mais expressiva quando comparada com os outros grupos sanguíneos, porém apenas na maior concentração. O percentual de hemólise exibida pelo no sangue tipo O (77%) é considerado moderado, embora se encontre próximo a valores considerados altos.

Figura 5. Avaliação do potencial hemolítico do EEB do caule de *Varronia globosa* em sangue tipo O.



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=3$).

A hemólise mais elevada no sangue tipo O se dá, provavelmente, pela superfície dessas hemácias não apresentarem açúcares específicos para a produção de antígenos do tipo A ou B, apenas o antígeno H, presente nos eritrócitos de todos os grupos sanguíneos, com isso, deixando a membrana das hemácias tipo O mais desprotegidas. Nos tipos sanguíneos A e B são encontrados açúcares, que foram transferidos para o antígeno H presente na superfície dos eritrócitos, por enzimas específicas: a N-acetil-galactosamina transferase e a 3-N-galactosil transferase, respectivamente. (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). A existência desses açúcares na membrana dos eritrócitos A e B sugere que sua presença pode ter causado maior proteção mecânica das hemácias contra a hemólise, o que pode ser visualizado em taxas de hemólise mais baixas.

A hemólise, além de causar perda da função da hemácia, prejudicando o transporte de oxigênio, pode causar problemas renais (nefrotoxicidade) pela hemoglobina livre liberada

com a ruptura da célula. Além disso, a hemoglobina livre tem grande afinidade pelo óxido nítrico (NO) presente no organismo, retirando-o da circulação, causando problemas cardiovasculares (ARRUDA, 2010).

A triagem fitoquímica realizada por REIS (2014), utilizando o EEB do caule de *V. globosa* obteve resultado positivo para flavonoides, saponinas e esteroides presentes no extrato. Saponinas são notadamente lembradas por causarem hemólise em eritrócitos, corroborando com alguns achados dessa pesquisa.

Segal e colaboradores (1973) demonstraram que a aglicona de uma saponina é responsável pela atividade hemolítica, para isso, duas condições devem ser obedecidas: a parte lipofílica da molécula deve ser absorvida pela membrana do eritrócito e a ligação glicosídica deve ser hidrolisada; pressupondo que um saponina é inativa quando não há absorção pela membrana ou não existem enzimas capazes de romper a ligação glicosídica. Kaiser e colaboradores (2010), estudando 20 saponinas das espécies *Aesculus hippocastanum*, *Dolichos lablab* e *Glycine max* verificaram que a atividade hemolítica é promovida pela presença de grupos –OH no carbono 16, CH₂OH em C-17, grupamentos acetila em C-22 e um acila em C-21.

Os resultados do experimento permitiram verificar que, em concentrações mais elevadas, o EEB do caule de *Varronia globosa* causa hemólise moderada e estatisticamente considerável. Os valores do grau de hemólise podem ser usados para estabelecer limites de utilização da planta por populares, e caso torne-se um fitoterápico de produção industrial.

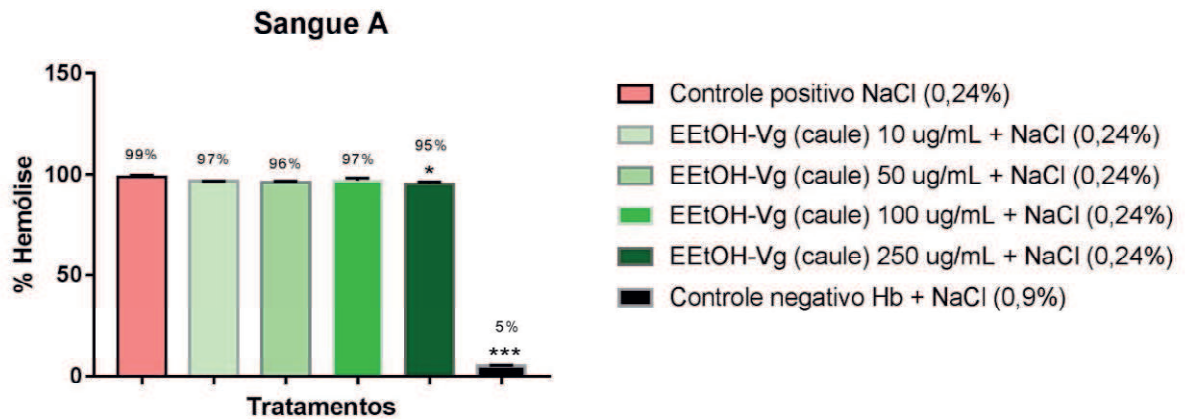
Por outro lado, a hemólise resultante pode servir como base para próximos estudos de citotoxicidade, avaliando o efeito do extrato sobre células tumorais.

5.2.2 Avaliação do potencial anti-hemolítico ou Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)

“*In vivo*”, o volume celular é controlado através da eliminação ativa de solutos, esse é um mecanismo o qual se evita a lise celular nos organismos. Os eritrócitos quando em meio hipotônico aumentam de volume devido a entrada de solvente, o volume aumenta a tal ponto em que ocorre a lise da célula. Dessa forma, a fragilidade celular varia conforme a concentração de soluto e segue uma distribuição normal em organismos saudáveis, havendo diferenças entre espécies (ELIAS, 2004).

Na Figura 6, observam-se os resultados em concentrações em que não ocorreu hemólise considerável (10, 50, 100 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no experimento de avaliação do potencial hemolítico.

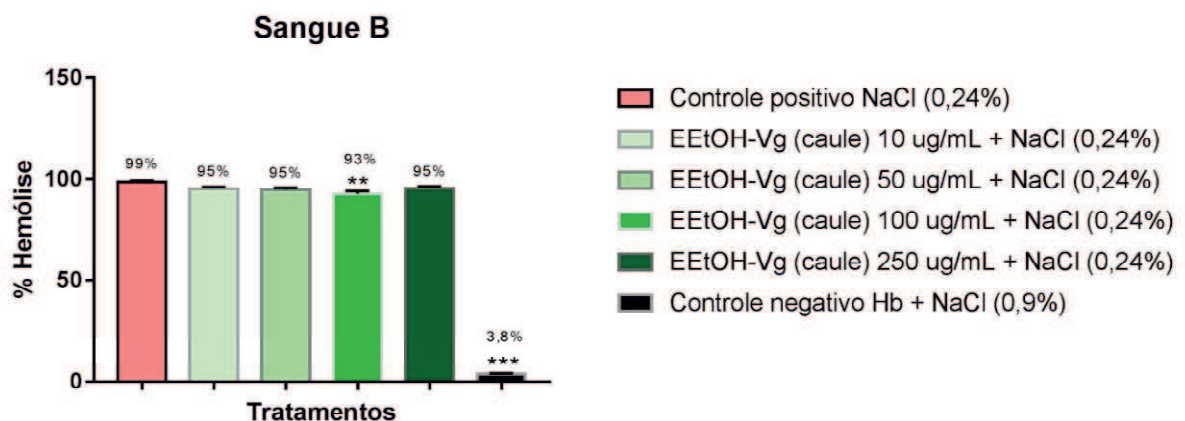
Figura 6. Avaliação do potencial anti-hemolítico do EEB do caule de *Varronia globosa* em sangue tipo A.



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

Na Figura 7, verificam-se os resultados em concentrações onde não ocorreu hemólise considerável (10, 50, 100 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no experimento de avaliação do potencial hemolítico.

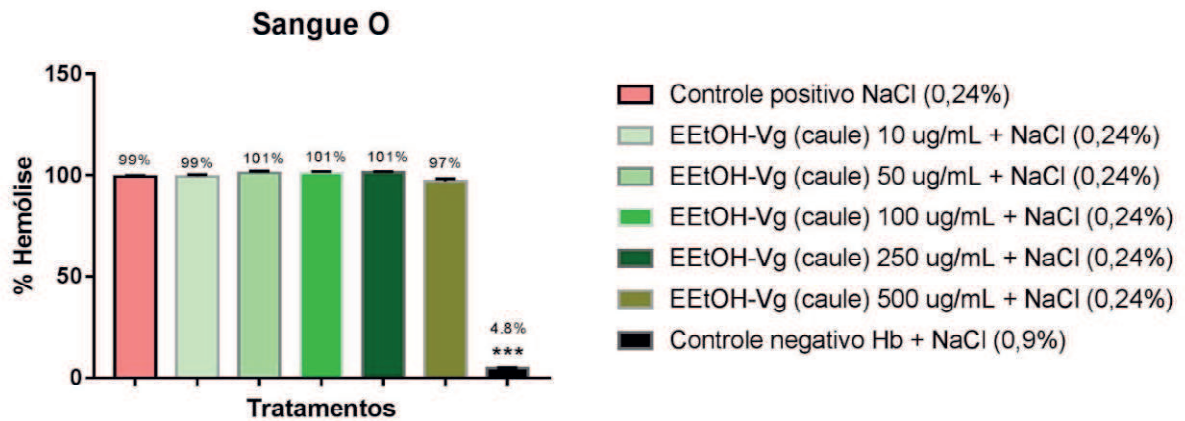
Figura 7. Avaliação do potencial anti-hemolítico do EEB do caule de *Varronia globosa* em sangue tipo B.



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (n=3).

A Figura 8 exibe os resultados em concentrações onde não ocorreu hemólise considerável (10, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) no experimento de avaliação do potencial hemolítico.

Figura 8. Avaliação do potencial anti-hemolítico do EEB do caule de *Varronia globosa* em sangue tipo O.



Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=3$).

Como constatado no ensaio de hemólise, os maiores valores no teste de FOE também pertencem ao sangue do tipo O, possivelmente pelo motivo anterior; a ausência de açúcares de membrana que caracterizem antígenos do tipo O.

Visto que concentrações mais altas causaram hemólise considerável, amostras nessas faixas de concentração não foram utilizadas nos testes de FOE. A partir dos dados obtidos foi possível constatar que o EEB do caule de *V. globosa* não foi capaz de promover atividade anti-hemolítica significativa e conseqüentemente proteção dos eritrócitos contra a hemólise em nenhum dos tipos sanguíneos usados (A, B e O), em comparação com o controle positivo.

6 CONCLUSÃO

O EEB da coleta do município de Puxinanã apresentou resultado negativo para presença de flavonoides, diferentemente da coleta mais antiga, em Santa Luzia; inferindo a interferência de fatores mesológicos no metabolismo de compostos especiais.

O extrato apresenta atividade hemolítica significativa em concentrações mais altas, 500 e 1000 µg/mL; para o tipo A a hemólise observada é caracterizada como baixa nas concentrações testadas; o sangue tipo B apresentou hemólise baixa em concentrações menores e moderada em concentrações acima de 500 µg/mL; o sangue tipo O apresentou efeito hemolítico mais intenso quando comparado com outros tipos sanguíneos, sendo este considerado moderado. O extrato não provocou percentual de hemólise alto em nenhum tipo sanguíneo e em nenhuma concentração testada.

Verifica-se que, como causador de hemólise, o extrato não apresentou efeito protetor contra a ruptura das hemácias em nenhum dos tipos sanguíneos estudados.

Sugere-se a avaliação dos resultados para um uso terapêutico eficiente, sem que haja inconvenientes no para uso popular, de modo a ampliar o conhecimento dos efeitos biológicos, farmacológicos e toxicológicos do vegetal.

São interessantes estudos fitoquímicos aprofundados, com o intuito de isolar compostos presentes na planta e enriquecer o conhecimento químico acerca da espécie, e ainda associá-los com efeitos biológicos provocados pelo extrato bruto, bem como a pesquisa de outros efeitos interessantes para essas substâncias.

REFERENCIAS

ABRANTES, H.F.L.; AGRA, M.F. Estudo etnomedicinal das Boraginaceae na caatinga paraibana, Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, v.85, n.1, p.7-12, 2004.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.**, v.114, n.3, p.325-354, 2007.

ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. Medicinal plants popularly used in Xingó region: a semi-arid location in northeastern Brazil. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.2, n.15, 2006.

AL-SHEHBAZ, I.A. The genera of Boraginaceae in the southeastern United States. **J. Arnold Arb.** Supplementary Series, v.1, p.1-169, 1991.

ALVES, L.F. **Plantas Medicinais e Fitoquímica no Brasil: Uma Visão Histórica**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 354f., 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, 2012.

ASPREY, G. F.; THORNTON, P. Medicinal plants of Jamaica: part I. **West Indian Med. J.**, Mona, v.3, n.1, 1955.

ASPREY, G. F.; THORNTON, P. Medicinal plants of Jamaica: part III. **West Indian Med. J.**, Mona, v.3, n.1, 1955.

BARBOSA, W.L.R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais, Belém – PA: Revista Científica da UFPA, v.4, 2001.

BARROS, F.J. et al. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. **Eur. J. Integr. Med.**, v.8, n.4, p.505-512, 2016.

BEDNARCZUK, V.O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acad.**, v.11, n.2, 2010.

BERNARDES, L.S.C. et al. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. cap. 9, p. 107-128.

BETTEGA, P.V.C. et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Arch. Oral Res.**, v.7, n.1, p.89-97, 2011.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113, 2015.

BRANDAO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, São Paulo, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

_____. Biodiversidade brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002.

BRITO, N.R.S. Perfil Químico de Famílias de Angiospermas, **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 1986.

CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.373-382, 2016.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

COUTINHO, D.F.; TRAVASSOS, L.M.A.; DO AMARAL, F.M.M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão-Brasil. **Visão Acad.**, v.3, n.1, 2002.

DACIE, J.; LEWIS, S. M. Practical Haematology. London: Churchill Livingstone. 2001.

DE CASTRO, R.; ALBIERO, A.L.M. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Rev. Fitos Eletrônica**, v.10, n.1, p.59-72, 2016.

EISENBRAND, G. et al. Methods of *in vitro* toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, v.40, n.2, p.193-236, 2002.

ELIAS, F. et al. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.413-418, 2004.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 229-245.

FIRMINO, C.B. **Influência da idade em doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos**. Dissertação (Doutorado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 89f., 2007.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**. São Paulo, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GODÍNEZ-CARABALLO, D.; VOLPATO, G. Plantas medicinales que se venden en el mercado El Río, Camagüey, Cuba. **Rev. Mex. Biodivers.**, v.79, n.1, p.217-241, 2008.

IFEOMA, O.; OLUWAKANYINSOLA, S. Screening of herbal medicines for potential toxicities. In: **New Insights into Toxicity and Drug Testing**. InTech, 2013.

JACOBSON, T. K. B. et al. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35 n. 3, 2005.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v.20, n.3, p.300-309, 2010.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R.M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. p. 147-166.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P. *Plantas Medicinais: do cultivo, manipulação e uso a recomendação popular*. Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia** – Propedêutica e Clínica. 4 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2006. 722p.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, São Paulo, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MACIEL, V. **Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS**. jun. 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>>. Acesso em: 30 mai. 2017.

MAKINDE, M.O.; BOBADE, P.A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Res. Vet. Sci.**, v.57, n.3, p.343-348, 1994.

MATIAS, E.F.F. et al. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.25, n.5, p.542-552, 2015.

MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2. ed. Fortaleza: UFC, 1997.

MARTÍNEZ MARTÍN, S.M. et al. Efecto diurético de la tintura al 50% de *Varronia globosa* Jacq. (yerba de la sangre) en ratas. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v.16, n.2, p.174-182, 2011.

MELO, J.I.M.; LYRA-LEMOS, R.P. Sinopse taxonômica de Boraginaceae *sensu lato* A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Bot. Bras**, v. 22, n. 3, p. 701-710, 2008.

MELO, J.I.M.; VIEIRA, D.D. A new species of *Varronia* (Cordiaceae) and a checklist of Boraginales for the State of Sergipe, Brazil. *Phytotaxa*, v.231, n.2, p.145-155, 2015.

- MELO, J.I.M. et al. Boraginaceae. In: Forzza, R.C. et al. (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000064>>. Acesso em 08 jun. 2017.
- MILLER, J.S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. Br. **Taxon**, v.56, n.1, p.163-169, 2007.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, v.24, n.1, p.105-111, 2001.
- MONTELES, R.; PINHEIRO, C.U.B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p. 38-48, 2007.
- MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.29, n.2, p.168-178, 2007.
- NAYANABHIRAMA, U. Status on herbal drugs and their future perspectives. **Ann. Phytome**, India, v.5, n.1, p. 1-3, 2016.
- O TEMPO. Disponível em: < <https://www.tempo.pt/puxinana.htm?d=historico> > Acesso em: 19 nov. 2017
- PAN, Si-Yuan et al. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. **J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.**, v. 2013, 2013.
- PASA, M.C.; SOARES, J.J.; GUARIM-NETO, G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v.19, n.2, p.195-207, 2005.
- PAULA, A.C.R.; ALMEIDA, I.C.S. Aspectos hidroclimatológicos e crise no abastecimento de água em Santa Luzia – PB. *In*: I Workshop Internacional Sobre Água no Semiárido Brasileiro, 2013, Campina Grande – PB. Anais Workshop Internacional sobre Água no Semiárido Brasileiro. Campina Grande: Realize, 2013.
- PEIXOTO-SOBRINHO, T.J.S. et al. Phytochemical screening and antibacterial activity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) against standard strains and clinical isolates. **J. Med. Plants Res.**, v.6, n.2, p.3742-3748, 2012.
- PEREIRA-JÚNIOR et al. Caatinga species as an alternative to the development of new phytochemicals. **Floresta e Ambiente**, v.21, n.4, p.509-520, 2014.
- PINTO, W.J. et al. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.** 12, n. 1, p. 106-120, 2013.
- PÚBLIO, R.N. **O Consumo de Medicamentos no Brasil - a tênue linha entre o remédio e o veneno**. Jan. 2015. Disponível em: <<http://fenafar.org.br/fenafar/index.php/component/k2/item/7966-o-consumo-de->

medicamentos-no-brasil-a-t%C3%AAnue-linha-entre-o-rem%C3%A9dio-e-o-veneno-por-rilke-novato*>. Acesso em: 30 mai. 2017

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.

REGINATTO, F.H. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. p. 28.

REIS, M.M.L. Avaliação Fitoquímica e potencial farmacológico do extrato etanólico bruto do caule de *Varronia globosa* (Boraginaceae). 2014. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande. 2014.

ROGERO, S.O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mater. Res.**, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

SEGAL, R.; SHATKOVSKY, P.; MILO-GOLDZWEIG, I. On the mechanism of saponin hemolysis—I: hydrolysis of the glycosidic bond. **Biochem. Pharmacol.**, v.23, n.5, p.973-981, 1974.

SILVA, L.F.G. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 53f., 2006.

SILVA, S.A.S. et al. Flavonoids from *Cordia globosa*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.32, n.3, p.359-361, 2004.

SOUZA, R.K.D. Etnofarmacologia de plantas medicinais do carrasco no Nordeste do Brasil. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, 2012.

STAPF, M.N.S. Nomenclatural notes on *Varronia* (Boraginaceae sl) in Brazil. **Rodriguésia**, v.61, n.1, p.133-135, 2010.

STEHMANN, J.R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. cap. 1, p.8.

THIRUPATHI, K. et al. A review of medicinal plants of the genus *Cordia*: Their chemistry and pharmacological uses. **J. Nat. Rem.**, v.8, n.1, p.1-10, 2008.

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

VIEIRA, D.D.; CONCEIÇÃO, A.S.; MELO, J.I.M.; STAPF, M.N.S. Boraginaceae *sensu lato* in the APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v.64, n.1, p.151-168, 2013.


VON POSER, G.L. A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. p. 23.

WOOLLEY, Adam. **A guide to practical toxicology: evaluation, prediction, and risk**. 2 ed. New York: CRC Press, 2008.

ANEXOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEP/UEPB
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA/
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER DO RELATOR: (25)

Número do Protocolo: 55007615.6.0000.5187

Data da 1ª relatoria PARECER DO AVALIADOR: 11/04/2016

Pesquisadora Responsável: Ivana Maria Fchine

Apresentação do Projeto: O projeto é intitulado: **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE Calotropis procera E Varronia globosa.** *O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetal do mundo e inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico. A partir do histórico da terapêutica percebemos claramente que o tratamento de doenças por meio de drogas vegetais vem desde a antiguidade. O uso de plantas medicinais e seus produtos pode tornar-se um problema, pois algumas das substâncias que as compõem podem desencadear efeitos deletérios que resultam em um quadro clínico severo, algumas vezes, fatal. Assim, a aplicação de testes de avaliação de possíveis efeitos tóxicos, genotóxicos e citotóxicos é extremamente importante. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar as propriedades citotóxica dos extratos de folhas e caules de Calotropis procera e Varronia globosa. Para tanto, serão realizados testes para avaliar o efeito hemolítico.*

Objetivo da Pesquisa: Tem como Objetivo Geral: Avaliar a atividade tóxica dos extratos etanólicos brutos dos vegetais e fases particionadas destes, ampliando as opções que constituam importantes ferramentas farmacológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: A pesquisadora não faz menção a riscos na versão acostada a Plataforma Brasil. Entretanto, em sua versão impressa declara que: “Os riscos são mínimos uma vez que estamos trabalhando seguindo todas as normas de segurança para trabalhar com microrganismos preconizadas pela ANVISA. Os tubos de sangue humano serão obtidas no Laboratório de Análises Clínicas - LAC da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos serão realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade. Benefícios: Investimento na pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos, sejam eles de origem natural ou sintética, constituindo-se assim em fontes promissoras de novas alternativas farmacoterapêuticas”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A referida pesquisa foi cadastrada na Plataforma Brasil em 26 de maio de 2015. Entretanto, os docentes da UEPB deflagaram greve em junho de 2015 e permanecendo assim até o fim do mês de novembro e a referida pesquisadora só veio apresentar o projeto conforme lista de checagem em abril de 2016. A pesquisa apresenta relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória e Parecer do Avaliador: Encontram-se anexados os termos de autorização necessários para o estudo.

Recomendações: Sem Recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto é relevante, e não apresenta inadequações.

Situação do parecer: Aprovado.