



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR E TRIAGEM CITOTÓXICA DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Varronia globosa* Jacq.
(BORAGINACEAE *sensu lato*)**

THAYS THYARA MENDES CASSIANO

CAMPINA GRANDE – PB

2017

THAYS THYARA MENDES CASSIANO

**ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR E TRIAGEM CITOTÓXICA DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Varronia globosa* Jacq.
(BORAGINACEAE *sensu lato*)**

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

Área de concentração: Fitoquímica

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ivana Maria Fechine

Co-orientadora: Laisla Rangel Peixoto

CAMPINA GRANDE – PB

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.

C345e Cassiano, Thays Thyara Mendes.

Estudo fitoquímico preliminar e triagem citotóxica do extrato etanólico bruto das folhas de *Varronia globosa* Jacq. (BORAGINACEAE *sensu lato*) [manuscrito] : / Thays Thyara Mendes Cassiano. - 2017.

41 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. Ma. Laisla Rangel Peixoto, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. *Varronia globosa*. 2. Etnobotânica. 3. Fitoquímica. 4. Toxicidade.

21. ed. CDD 615.321

THAYS THYARA MENDES CASSIANO

**ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR E TRIAGEM CITOTÓXICA DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Varronia globosa* Jacq.
(BORAGINACEAE *sensu lato*)**

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

Área de concentração: Fitoquímica

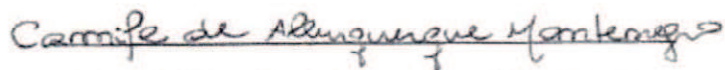
Aprovada em: 30/11/2017.

BANCA EXAMINADORA



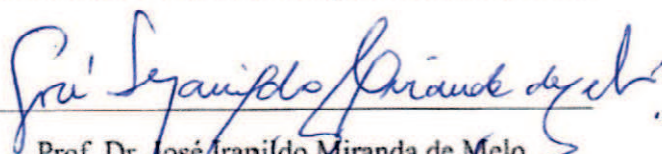
Profª Drª Ivana Maria Fachine (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª Drª Camila de Albuquerque Montenegro

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



Prof. Dr. José Iranildo Miranda de Melo

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedico este trabalho a Deus que me sustentou e não me permitiu desistir deste sonho, e à minha mãe, Joana D'Arc Mendes Costa, pelo seu apoio e amor incondicionais ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Há cinco anos atrás, pude iniciar este sonho, e hoje, cá estou a comemorar esta vitória. Tantos obstáculos foram enfrentados ao longo desta caminhada e nada disto seria possível se não tivesse o apoio daqueles que amo.

À minha mãe, Joana D’Arc, que foi a minha força em todos estes anos, e tudo o que superamos juntas será sempre a nossa força. O seu amor, ao acordar a cada manhã para me auxiliar, me dar força e me fazer acreditar que os dias mais difíceis teriam fim. O seu cuidado até com os que estavam ao meu lado – que dirá comigo – que me permitiu seguir com mais segurança. A sua oração diária assim que eu saio de casa, que me leva sempre aos melhores caminhos. Você me motiva a vencer e nós venceremos.

À minha tia, Jacinta, que tem se mostrado uma segunda mãe, abraçando os meus sonhos como se fossem seus. O tempo nos reaproximou e fez com que o laço ficasse cada dia mais forte. Serei eternamente grata por saber que alguns sonhos seus fossem adiados, para que os meus fossem concretizados.

Ao meu namorado, Fernando Azevedo, que é mais do que um companheiro. O seu abraço protetor e a sua mão e ombro amigos me fortalecem e me fazem acreditar em um futuro melhor. Obrigada por abraçar os desafios que me são propostos diariamente e me dar força para enfrentá-los.

Às minhas amigas fiéis, Raquel Gouveia, Mariana Figueredo e Bruna Alves; e ao meu amigo irmão, Elder Oliveira, que enfrentaram tantos obstáculos junto a mim, de mãos dadas, abraçando-os como se fossem seus. Vocês foram o meu chão em muitos momentos. Obrigada por todo o amparo e amor. Vocês são meus irmãos do coração e da alma.

Ao meu amigo e irmão, Natanael Teles, que não mediu esforços para me estender a mão e estar ao meu lado sempre que precisei. Os dias inteiros no laboratório, feriados e fins de semana por vezes não existiram e lá estava você, me auxiliando e também me enchendo o saco, afinal amigos de verdade são assim, porque “O tempo tudo destrói...”. Que este laço que é firmado a cada dia, seja eterno.

Ao meu amigo, Joeliton, que se dispôs a me ajudar sempre que precisei. Sua amizade e apoio foram muito importantes.

Aos amigos de turma, que tanto me ensinaram sobre limites e convivência, sobre respeito e sobre amizade. Tudo valeu a pena!

À professora Rossana Miranda, que me abriu portas e acreditou sempre no meu potencial, me apresentando ao mundo da Pesquisa e da Extensão. Também à querida companheira de sempre, Rossana Werner, que abraçou por inúmeras vezes os meus problemas, dividindo suas experiências de vida, me ajudando a levantar em momentos que foram difíceis de superar. As nossas energias se abraçam.

À querida professora, Camila Montenegro, que me ensina todo dia sobre determinação e sobre superação. Obrigada por todas as oportunidades, pelas quais serei eternamente grata.

Ao professor Harlley, que próximo ao fim da caminhada da graduação, deu a mim muito auxílio e sem hesitar, me norteou quando precisei.

À minha orientadora, Ivana Fechine, que me deu a oportunidade de trabalhar na área em que eu sempre quis e me abriu portas as quais jamais esquecerei.

À minha co-orientadora Laisla Rangel, que se dispôs a me auxiliar da forma mais generosa possível, me direcionando, e ensinando muito. Seu futuro será muito lindo, não tenho dúvida alguma disto.

Por fim, à todos os professores do Departamento de Farmácia e de Química. Vocês me ensinaram muito e além dos livros, se hoje tenho o desejo de enveredar pelos caminhos da docência, devo muito a vocês.

“Ninguém passa pela nossa vida por engano. Não existem erros nos planos de Deus...” Autor desconhecido.

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR E TRIAGEM CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Varronia globosa* Jacq. (BORAGINACEAE *sensu lato*)

¹Thays Thyara Mendes Cassiano; ²Ivana Maria Fechine

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

¹thaysthyaracg@hotmail.com

Varronia globosa pertencente à família Boraginaceae, é uma planta conhecida popularmente como Maria-preta. A espécie é amplamente distribuída na região Nordeste do Brasil, sendo utilizada a decocção ou infusão das suas folhas para alívio de dores reumáticas, indigestões e cólicas menstruais. Porém, para que sua real atividade seja comprovada e a sua utilização se torne segura, alguns estudos como o botânico, fitoquímico, toxicológico e farmacológico, são de fundamental realização. O objetivo deste estudo foi obter o Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *Varronia globosa*, realizar estudos fitoquímicos qualitativos comparativos, assim como investigar a atividade toxicológica frente à *Artemia salina*, do EEB. As folhas foram coletadas em período com baixa umidade e volume pluviométrico, passaram por processo de secagem e foram trituradas para a obtenção da droga vegetal. Realizou-se a prospecção fitoquímica para obtenção do EEB e um *screening* fitoquímico qualitativo em água, metanol, clorofórmio e solução de ácido clorídrico, comparando a presença de metabólitos secundários em EEB das folhas de *V. globosa* produzidos de plantas oriundas de locais e épocas diferentes (Santa Luzia e Puxinanã, Paraíba). Uma triagem realizada anteriormente serviu como parâmetro de comparação. Realizou-se também a atividade toxicológica do EEB, frente à ensaios com cistos de *Artemia salina*, determinando sua concentração letal média (CL₅₀). A avaliação fitoquímica preliminar sugeriu a presença de esteroides e triterpenoides majoritariamente, diferindo do estudo a qual foi comparado, que apresentou saponinas e flavonoides de maneira significativa. O bioensaio toxicológico apresentou como CL₅₀ o valor de ~ 1.241 µg/mL, não sendo considerado tóxico. Isto mostra que, estes estudos são importantes no direcionamento para o isolamento e identificação de compostos presentes e para caracterização da atividade biológica dessa planta medicinal, bem como, a *Varronia globosa* apresenta um bom perfil fitoquímico, além de mostrar-se como seguro para análises posteriores da espécie.

Palavras-chave: *Varronia globosa*, Etnobotânica, Fitoquímica, Toxicidade.

ABSTRACT

PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND CYTOTOXIC SCREENING FROM CRUDE ETHANOLIC EXTRACT OF *Varronia globosa* Jacq. leaves (BORAGINACEAE *sensu lato*)

¹Thays Thyara Mendes Cassiano; ²Ivana Maria Fechine

^{1,2}State University of Paraiba – UEPB.

¹thaysthyaracg@hotmail.com

The *Varronia globosa*, commonly known as “Maria preta”, is a plant which belongs to the *Boraginaceae* family. It is widely spread in the northeast of Brazil, and the decoction or infusion of its leaves is used to relieve rheumatic pain, indigestion and dysmenorrhea. However, to prove its real activity and safety use, several studies such as botanical, phytochemical, toxicological and pharmacological are required. We aimed to obtain the crude ethanolic extract (CEE) from *V. globosa* leaves, to perform a comparative qualitative analysis, and to investigate its CEE toxicological activity against *Artemia salina*. Leaves were collected during a period of low humidity and rainfall, underwent a drying process and were triturated to obtain the drug. We carried out a phytochemical prospection to obtain the CEE, and a qualitative phytochemical screening in water, methanol, chloroform and hydrochloric acid solution to compare the secondary metabolites presence from the CEE of *V. globosa* leaves produced from plants originated in different places (Santa Luzia and Puxinanã, Paraíba) and periods. There was also a previous screening as a parameter of comparison. The toxicological activity of the CEE was performed to the *Artemia salina* cysts assays to determine its median lethal concentration (LC₅₀). Preliminary phytochemical analysis suggested the presence of steroids and triterpenoids, different than the study which was compared to, where saponins and flavonoids were most found. The LC₅₀ was ~ 1.241 µg/mL, therefore not considered toxic. These studies are important to direct the isolation and identification of compounds and to characterize the biological activity of *V. globosa*. In addition, it shows a good phytochemical profile and safety for following analyses.

Keywords: *Varronia globosa*, Ethnobotany, Phytochemistry, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Varronia globosa</i> Jacq.: ramo reprodutivo	20
Figura 2 – <i>Artemia salina</i>	23
Figura 3 – Fêmea de <i>Artemia salina</i> com ovos	24
Figura 4 – Mapa do Município de Puxinanã, Paraíba.	26
Figura 5 – Mapa do Município de Santa Luzia, Paraíba.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pesquisa de metabólitos secundários em <i>Varronia globosa</i>	28
–		
Tabela 2	Resultados do comparativo do screening fitoquímico do EEB das folhas de – <i>Varronia globosa</i>	32
Tabela 3	- Resultados dos testes realizados com o EEB da espécie <i>V. globosa</i>	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	CL ₅₀ do EEB da espécie <i>V. globosa</i>	33
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
CL₅₀	Concentração letal média
EEB	Extrato Etanólico Bruto
LAFIT	Laboratório de Fitoquímica
µg/mL	Microgramas por mL
PNPIC	Política Nacional de Plantas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Estudos Etnobotânicos	17
2.1.1 Família Boraginaceae sensu lato	18
2.1.2 Espécie <i>Varronia globosa</i>	19
2.2 Análise Fitoquímica	20
2.3 Bioensaio Citotóxico com <i>Artemia salina</i> Leach	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 METODOLOGIA	26
4.1 Coleta do material vegetal	26
4.2 Obtenção do material pulverizado	27
4.3 Preparação do extrato etanólico bruto das folhas de <i>V. globosa</i>	27
4.4 Screening fitoquímico qualitativo do EEB das folhas de <i>V. globosa</i>	28
4.4.1 Testes que utilizam como solvente H₂O	28
4.4.2 Testes que utilizam como solvente MeOH	29
4.4.3 Testes que utilizam como solvente clorofórmio (CHCl₃)	29
4.4.4 Teste para determinação de alcaloides	30
4.5 Atividade toxicológica frente à <i>Artemia salina</i>	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Análise fitoquímica preliminar	31
5.2 Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	32
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Desde muito tempo, a sociedade acumulou e propagou informações acerca de experiências no ambiente em que vivem, para que assim pudessem ser atendidas as suas necessidades e garantida a sua sobrevivência (RANGEL e BRAGANÇA, 2009). Muitas foram as práticas difundidas pela sociedade e, dentre estas, se destaca a utilização de elementos naturais. Desta forma, as plantas sempre demonstraram papel fundamental, trazendo como principal importância as suas potencialidades terapêuticas aplicadas ao longo das gerações (MACIEL et al., 2002, p. 429).

As plantas sempre protagonizaram a história da sociedade e ainda se mostram efetivamente atuantes como: fontes para a terapêutica, modelo para novos medicamentos sintéticos e matéria-prima que origina moléculas semissintéticas com alta complexidade. O Brasil é considerado um dos maiores centros de biodiversidade do mundo, inclusive floristicamente, por abrigar centenas de grupos étnicos distribuídos em diversos lugares. Além do conhecimento das culturas indígenas, outros povos trouxeram as suas contribuições para o surgimento de uma medicina popular rica, a exemplo de escravos e imigrantes (AMORIM et al., 2003).

Neste cenário, a caatinga possui uma enorme variedade de espécies vegetais, em sua grande maioria, as informações disponíveis sobre as espécies medicinais deste local que hoje são conhecidas e estudadas, foram obtidas com o auxílio de levantamentos etnobotânicos. Estes estudos contribuíram de maneira efetiva, visto que, ressaltam as práticas de uso e sugestões hipotéticas sobre a explicação dos sistemas de uso tradicional pelas populações do semiárido do Nordeste (ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE, 2010; ROQUE et al., 2010; ALENCAR et al., 2010; FERREIRA JÚNIOR et al., 2011). A partir disto, é de fundamental importância realizar estudos fitoquímicos, biológicos, químicos, dentre outros, que possam confirmar o seu potencial.

A família Boraginaceae *sensu lato* possui cerca de 134 gêneros e 2.650 espécies. Seus representantes são encontrados em regiões tropicais, subtropicais, temperadas e árticas. Algumas encontradas ainda no Hemisfério Norte, em suas zonas temperadas (AL-SHEHBAZ 1991; JUDD et al., 2009). Dentre as suas representantes, 137 espécies e 11 gêneros ocorrem no Brasil. Destas, *Cordia* e *Myriopus* com maior número de espécies. Na caatinga, *Euploca* está representada por sete gêneros e 43 espécies (BFG, 2015).

A espécie *Varronia globosa* distribui-se na vegetação de caatinga, com registros do Ceará a Bahia. Possuindo hábito arbustivo, com indivíduos bastante ramificados, cálice com lacínios de ápices filiformes e corola de 2,5-5 mm de comprimento (TARODA 1984; MELO et al. 2010, 2012). A decoção ou infusão das folhas de *V. globosa* é utilizada para alívio de dores reumáticas, indigestões e cólicas menstruais. Ensaio farmacológico constataram a atividade espasmolítica e vasodilatadora do extrato etanólico (95%) em cobaias (ASPREY et al.,1955; AGRA, 2004).

Diante do exposto, torna-se necessária a realização de estudos farmacológicos, farmacológicos e toxicológicos de extratos e substâncias de *V. globosa*. Nesta perspectiva, realizou-se o estudo fitoquímico preliminar e o bioensaio das folhas de *Varronia globosa* frente às larvas de *Artemia salina* Leach.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

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, 2011).

A utilização das plantas relaciona-se de tal forma com a história da humanidade que vários povos as têm como elementos que constituem a sua cultura (FIRMO et al., 2011). Vários fatos levam a crer que o cultivo destas, desencadearam eventos marcantes como a sustentação do sistema colonial, sobretudo inglês, como afirma Behal (2010) “A indústria do chá, dos anos 1840 em diante a mais antiga empresa comercial estabelecida pelo capital privado britânico no Vale de Assam”. O caráter ritualístico e a necessidade de cura sempre estiveram vinculados às plantas, desde os primórdios da civilização. A grande riqueza da flora brasileira permitiu que o interesse pela pesquisa científica aumentasse. Também, a busca por novas moléculas bioativas comprova que o empirismo das antigas populações é de fundamental importância como ponto de partida para tal.

É possível observar que, nos últimos anos, ocorreu um grande avanço científico relacionado à descoberta de constituintes químicos de plantas, e estes estudos têm por objetivo, obter novos compostos que apresentem atividade terapêutica (GURIB-FAKIM, 2006).

Quando citamos alguma matéria vegetal pouco conhecida, é necessário que se realize 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). Estes testes preliminares podem indicar o grupo de metabólitos secundários relevantes das mesmas. 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. Desta forma, a pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os

constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença (FALKENBERG et al., 2004; SIMÕES et al., 2002).

A concentração de princípios ativos na planta é dependente do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, a exemplo de fatores edáficos (relacionados com o solo), climáticos, exposições a micro-organismos, insetos, outros herbívoros, poluentes, dentre outros. (BRAZ-FILHO, 2010). 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 um caminho longo e complexo a ser percorrido (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001; MUNDO, 2007).

Ensaio biológicos podem envolver desde os bioquímicos, com enzimas e receptores e cultura de células animais e humanos até organismos inferiores, como microorganismos e microcrustáceos. Dentro esses ensaios mais citados, estão os que utilizam organismos e métodos simples, a exemplo do microcrustáceo *Artemia salina* Leach. Que compõe um teste o qual antecede o estudo de extratos e metabólitos com potencial atividade biológica (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

2.1 Estudos Etnobotânicos

A integração de várias áreas na pesquisa de plantas medicinais é bastante importante e eficaz no que se refere à descoberta de medicamentos que serão inseridos no mercado. Estas áreas 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 Farmacológica) e finalmente, a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. (MACIEL et al., 2002).

A Caatinga apresenta uma vegetação estacional decidual com uma diversidade nos seus conjuntos florísticos e fisionomias (PRADO, 2003; RODAL et al., 2008). Esta, é responsável por cobrir a maior parte do semiárido da região nordeste do Brasil, compreendendo uma área de 844,453 km² ou 11% do território nacional (MMA, 2014). Apresentando-se bastante complexa e diversa, essa região se trata de uma ecorregião de

floresta seca, cercada por florestas úmidas e semiúmidas, e a sua distribuição tem determinação referindo-se ao clima, relevo e embasamento geológico. (BRASIL, 2006).

2.1.1 Família Boraginaceae *sensu lato*

A família Boraginaceae pertence à ordem Lamiales, à sub-classe Asteridae e à classe Magnoliopsida. Distribui-se nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, algumas delas, nas zonas temperadas do hemisfério Norte (AL-SHEHBAZ, 1991).

Várias atividades biológicas, a exemplo de anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, entre outras, tiveram comprovação com extratos de espécies da família Boraginaceae (SERTIE et al., 1991). Quimicamente falando, esta família se caracteriza pela presença de flavonoides, lignoides, quinonas, triterpenos e alcalóides (BRITO, 1986).

A região Nordeste se destaca por concentrar com cerca de 70 espécies distribuídas em 7 gêneros desta família: *Cordia* L., *Euploca* Nutt., *Heliotropium* L., *Myriopus*, *Rotula* L., *Small* e *Tournefortia* L. No Brasil, a família encontra-se representada por 11 gêneros e mais de 130 espécies, sendo *Cordia*, *Heliotropium*, *Varronia* P. Browne e *Tournefortia* os gêneros mais numerosos (FREITAS et al., 2008).

A importância da madeira de algumas espécies de *V. globosa* é reconhecida desde muito tempo. A exemplo dos egípcios que faziam uso extensivo de madeiras de *C. myxa*, uma árvore nativa do Egito, Pérsia, Arábia e Índia. Vários gêneros têm o seu reconhecimento pela população, por causa da sua importância econômica. Alguns ainda são reconhecidos por se destacarem como produtores de madeira de boa qualidade e frutos comestíveis, outros por apresentarem folhas, raízes ou flores com propriedades medicinais (JOLY, 1985). As espécies de Boraginaceae podem ser caracterizadas morfológicamente por reunir:

“Plantas que variam de ervas, subarbustos, arbustos, trepadeiras ou árvores. As folhas são simples, geralmente alternas, raro opostas ou verticiladas, estípulas ausentes. Inflorescência predominantemente de tipos cimosas mais raramente amplas de ramos escorpióides ou helicóides. Flores hermafroditas e unissexuais, por aborto, diclamídeas, actinomorfas ou zigomorfas. Cálice gamossépalo, tubuloso, com lobos curtos ou profundos, corola tubulosa, infundibuliformes, campanulada, hipocrateriforme ou rotácea. Androceu com cinco estames livres, ex certos ou não, com filetes curtos ou longos, antera bilocular, rimosa, com lóculos globosos, ovóides, oblongos. Gineceu composto de dois a quatro carpelos, constituindo ovário súpero, com dois a quatro lóculos, uniovulados, raro, uniloculares, com quatro óvulos anátropos, estilete inteiro ou bipartido no ápice. Fruto indeiscente, carnoso, constituindo uma drupa com dois a quatro lóculos ou pirenado por aborto ou um esquizocarpo com quatro núculas livres ou concrecidas duas a duas, com

estrutura drupácea. Semente com ou sem endosperma. Embrião reto ou curvo, com cotilédones planos ou plicados. (BARROSO, et al, 1991, v.3).”

2.1.2 Espécie *Varronia globosa*

Varronia globosa, que tem *Cordia globosa* (Jacq.) como o mais conhecido sinônimo, é um arbusto chamado vulgarmente de maria-preta, bamburral, pau-pretinho (AGRA et al., 2007), chumbinho, piçarra ou moleque-duro (ALMEIDA et al., 2006). Distribui-se do sul dos Estados Unidos (Flórida), México até o Panamá, incluindo Antilhas, e nordeste da América do Sul (MILLER, 1988).

Na medicina popular da caatinga paraibana são utilizados o infuso ou decocto das folhas contra reumatismos, indigestões e cólicas menstruais (AGRA et al., 2007). Na região de Xingó, em Alagoas, folhas e flores são usadas no tratamento de gripes, hemorragia e garganta inflamada (ALMEIDA et al., 2006). Desta forma, estudos laboratoriais estão sendo feitos visando a validação de tais indicações, flavonoides, atividades antioxidantes e de captura de radicais livres já foram encontrados nesta espécie (DA SILVA et al., 2004; DAVID et al., 2007, DANTAS, 2015). Ensaio farmacológico constataram a atividade espasmolítica e vasodilatadora do extrato etanólico (95%) em cobaias (ASPREY et al., 1955; AGRA, 2004).

No Brasil, *Varronia globosa* (Figura 1) distribui-se apenas na região Nordeste (CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA) (MELO & LYRA-LEMOS, 2008). 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. *Varronia globosa* Jacq.: ramo reprodutivo



Fonte: Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/68587888@N00/2925704571/>. Acesso em: 10/11/2017.

A espécie *Varronia globosa* pode ser reconhecida pelas seguintes características morfológicas: Arbusto, ca. 1-2 m alt.; ramos com lenticelas, vilosos. Folhas alternas; lâmina 5,3-6,7x1,8-2,6 mm, 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 & SALES, 2005).

2.2 Análise Fitoquímica

Os metabólitos primários, como aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e açúcares, são encontrados em todas as plantas. Além disto, as mesmas produzem os metabólitos secundários, tudo isto advindo de seus metabolismos normais (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Os metabólitos secundários 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. Mostrando assim não possuírem funções óbvias no metabolismo primário dos vegetais (crescimento, fotossíntese, reprodução, ou outra função primária da célula vegetal) (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Além disto, os metabólitos secundários, contrastam com os primários, por serem conhecidos na síntese 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).

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. Químicos orgânicos iniciaram esses estudos no século XIX e início do século XX, devido às suas diversas aplicações (TAIZ; ZEIGER, 2009). Isto refletiu diretamente sobre os metabólitos secundários que são utilizados comercialmente como compostos biologicamente ativos (produtos farmacêuticos, temperos, fragrâncias, dentre outros), gerando produtos de alto valor em pequena quantidade quando comparados aos metabólitos primários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Existem alguns fatores que são determinantes no que se refere à quantidade de metabólitos produzidos pelos vegetais, podendo alterar ou regular os mesmos, são estes: nutrientes, poluição atmosférica, disponibilidade hídrica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, sazonalidade, temperatura e altitude, dentre outros (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Na pesquisa fitoquímica, busca-se avaliar a presença dos constituintes químicos ou mesmo conhecê-los. Algumas espécies podem não apresentar estudos químicos, neste caso, 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, direciona-se a investigação para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (FALKENBERG et al., 2004).

Geralmente os compostos que estão presentes em menor quantidade na planta, são responsáveis por apresentar melhores efeitos biológicos. Isto torna a análise complexa e longa, embora centenas de metabólitos secundários estejam presentes, apenas os que estão em maior concentração geralmente serão estudados e isolados pela fitoquímica clássica (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001; MUNDO, 2007).

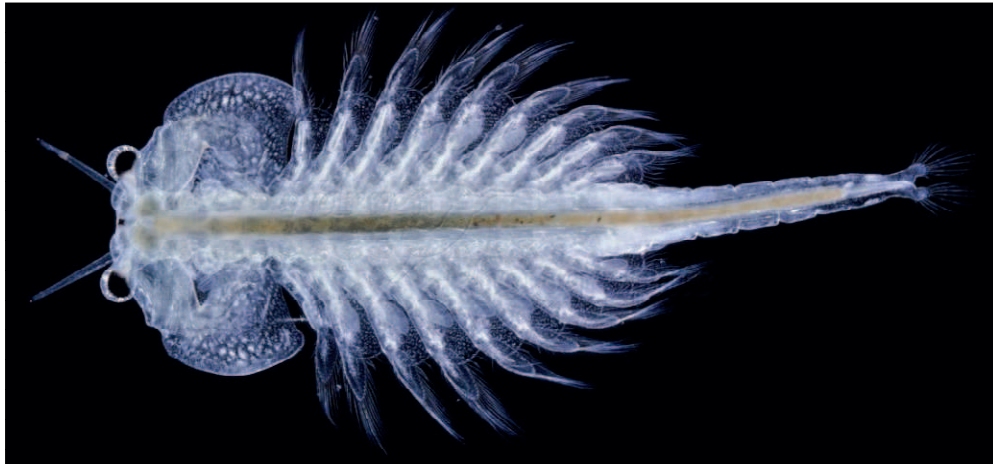
Classicamente, a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. Estas, são realizadas para a triagem fitoquímica (*screening* fitoquímico) permitindo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

2.3 Bioensaio Citotóxico com *Artemia salina* Leach

Diversos ensaios biológicos simples foram desenvolvidos no intuito de serem utilizados no monitoramento de extratos vegetais, dentre esses, a toxicidade sobre *A. salina*, que é um bioensaio rápido e conveniente como “screening” prévio no monitoramento de extratos de plantas. O primeiro trabalho relativo ao uso de *A. salina* em bioensaios foi publicado em 1956 e a partir daí inúmeros artigos têm sido reportados na literatura em estudos ambientais, utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas (CAVALCANTE et al., 2000). Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido esse ensaio biológico dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (MAYORGA et al., 2010).

Artemia salina é caracterizada como um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em água salgada e serve como alimento vivo para peixes (NASCIMENTO et al., 2008). Esta espécie tem a habilidade de produzir cistos e náuplios. Os cistos apresentam diâmetro médio de 250 µm, podem ser armazenados a seco, suportando o vácuo. Os náuplios recém-eclodidos possuem 450 µm de comprimento e uma artemia adulta possui corpo alongado, medindo cerca de 10 mm de comprimento (Figura 2) (IGARASHI, 2008). Os ovos de *A. salina* Leach (Figura 3) são comercializados em lojas de animais a um baixo custo e quando colocados em água marinha, eclodem dentro de 24h gerando quantidade de larvas para o uso experimental (BARREIRO, 2001).

Figura 2. *Artemia salina*.



Fonte: Warren Photographic. Disponível em: <https://www.warrenphotographic.co.uk/04850-brine-shrimp-adult-male>. Acesso em: 10/11/2017.

Figura 3. Fêmea de *Artemia salina* com ovos.



Fonte: Warren Photographic. Disponível em: <https://www.warrenphotographic.co.uk/05378-brine-shrimp-female-with-eggs>. Acesso em: 10/11/2017.

Este método apresenta-se como sendo rápido, seguro e bastante acessível. Embora seja considerada um organismo simples, a espécie *Artemia salina* pode ser utilizada como um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos. Os ensaios de letalidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* são amplamente usados como técnica de triagem para verificar a atividade biológica de toxinas naturais e de extratos vegetais e seus compostos isolados (MOHAMED et al., 2006; LUNA et al., 2005).

Meyer e seus colaboradores (1982) mostram que, para a realização deste bioensaio, é necessário que as amostras vegetais com diferentes diluições, sejam colocadas em incubação

durante 24 horas com a larva do microcrustáceo e, passado este período, são quantificadas a quantidade de *Artemias* vivas. Várias atividades biológicas podem estar relacionadas a este bioensaio, pois parte-se da premissa de que, os compostos tóxicos podem ser potencialmente ativos em relação à dose. Existe boa correlação deste bioensaio com a atividade citotóxica in vitro, atividade larvicida e inseticida (MCLAUGHLIN et al., 1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar qualitativamente o perfil químico da espécie *Varronia globosa* e determinar a toxicidade a partir do Extrato Etanólico Bruto (EEB) da espécie, frente à *Artemia salina*.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar as folhas de *V. globosa*;
- Produzir o extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *V. globosa*;
- Realizar o *screening* fitoquímico qualitativo das folhas de *V. globosa*;
- Avaliar a toxicidade do EEB das folhas de *V. globosa* frente à *Artemia salina* e determinar a CL50.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do material vegetal

Amostras de *V. globosa* foram coletadas em fevereiro de 2016, na zona rural do município paraibano de Puxinanã (07° 08' 62, 1''S, 35° 58' 31, 4''W) (Figura 4), Nordeste do Brasil. O material vegetal foi processado na cidade de Campina Grande, Paraíba, no Laboratório de Fitoquímica (LAFIT) na Universidade Estadual da Paraíba. A exsicata encontra-se no Herbário da Universidade Federal da Paraíba sob o número de tombo JPB 36075 *Varronia globosa* Jacq. Brasil: Paraíba: Santa Luzia, M. F. Agra 6561- 01/03/2006.

Com localização em área de transição entre a zona da mata e a zona das caatingas interioranas, o agreste da Paraíba possui trechos úmidos como no litoral e secos como no sertão (PEREIRA et al., 2002). O clima da cidade de Puxinanã é tropical, possuindo estação chuvosa entre os meses de janeiro a março, com término entre os meses de julho a agosto. Os índices pluviométricos da cidade observados na sede do município, têm sido registrados com uma média de 651 mm/ano, com temperatura máxima de 28°C e mínima de 16°C (AESA 2006). Dantas (2015), coletou as folhas da *V. globosa* no mês de maio de 2013, na zona rural de Santa Luzia – Paraíba (Figura 5), este período apresentou temperaturas que variaram de 27°C a 36°C, com a não ocorrência de chuvas no período que antecedeu e no momento da colheita.

Figura 4. Mapa do município de Puxinanã, Paraíba.



Fonte: Via Michelin. Disponível em: https://www.viamichelin.es/web/Mapas-Planos/Mapa_Plano-Puxinana-58115-Paraiba-Brasil. Acesso em: 10/11/2017.

Figura 5. Mapa do município de Santa Luzia, Paraíba.



Fonte: Google maps. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/Santa+Luzia+-+PB/@-6.9187596,-37.044989,11z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x7af0dba998b7749:0xa440704f68661007!8m2!3d-6.8717978!4d-36.9213101>.

Acesso em: 10/11/2017.

4.2 Obtenção do material pulverizado

As amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (a 40°C), durante aproximadamente duas semanas. As folhas secas foram submetidas à trituração em moinho de facas. Após moagem, obteve-se a droga vegetal das folhas.

4.3 Preparação do extrato etanólico bruto das folhas de *V. globosa*

A droga vegetal das folhas foi submetida à maceração exaustiva, em etanol absoluto, onde, a solução alcoólica foi retirada a cada três dias e o líquido extrativo armazenado em recipientes de vidro âmbar devidamente etiquetados. Realizou-se um total de 10 extrações, obtendo-se 7 litros de solução extrativa etanólica das folhas de *V. globosa*. Seguiu-se com a remoção do solvente em rota evaporador sob pressão reduzida à temperatura de 50°C, obtendo-se um peso seco do extrato no valor de 5,08g, e posteriormente acondicionado sob refrigeração (MATOS, 1982).

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

Para a realização deste teste foi utilizado o Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *Varronia globosa*. Os metabolitos secundários analisados foram: flavonoides, polissacarídeos, fenóis, taninos, catequinas, esteroides, triterpenos, saponinas e alcaloides, descritos na tabela 1. Analisados de acordo com sua solubilidade em diferentes soluções.

Tabela 1. Pesquisa de metabolitos secundários em *Varronia globosa*.

Metabolito Secundário	Reagente
Saponinas	Teste de espuma
Alcaloides	Drangedorf, Mayer, Bouchardat
Esteroides/ Triterpenos	Liebermann - Buchard
Fenóis/Taninos	Solução alcólica de FeCl ₃ a 1%
Flavonoides	Reação de Shinoda
Polissacarídeo	Lugol

4.4.1 Testes que utilizam como solvente H₂O

Foi preparada uma solução mãe com o EEB das folhas de *V. globosa* para realizar os testes que utilizam água destilada como solvente. Para isso, foi pesado 140 mg do EEB, que foi dissolvido em 28 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo o soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo, reservando o filtrado e obtendo-se a solução mãe.

Para determinação das saponinas espumídicadas, transferiu-se 5 mL da solução mãe para o tubo de ensaio, sendo diluída em 15 mL de água destilada. Posteriormente, a solução foi agitada vigorosamente por 2 minutos em tubo fechado. O resultado foi considerado positivo quando a camada de espuma permanecesse estável por mais de meia hora.

Para determinação de polissacarídeos, foi transferido 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, adicionado de 2 gotas de solução alcólica 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 o vermelho é indicativa da presença de fenóis. Um precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos, e verde, presença de taninos catéquicos.

4.4.2 Testes que utilizam como solvente MeOH

Foi preparada uma solução mãe com o EEB das folhas de *V. globosa* para realizar os testes que utilizam MeOH como solvente. Para isso, foram pesados 120 mg de EEB e dissolvido em 24 mL de MeOH. Em seguida, esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo o soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo, reservando o filtrado e obtendo-se a solução mãe.

Para a determinação de flavonoides, foram transferidos 10 mL da solução mãe para tubo de ensaio e, em seguida, adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea indica reação positiva.

4.4.3 Testes que utilizam como solvente clorofórmio (CHCl₃)

Foi preparada uma solução mãe com o EEB das folhas de *V. globosa* para realizar os testes que utilizam CHCl₃ como solvente. Para isso, foram pesados 75 mg de EEB e dissolvido em 15 mL de CHCl₃. Em seguida esta solução foi levada ao banho de ultrassom a fim de dissolver todo soluto. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman qualitativo, reservando o filtrado e obtendo-se a solução mãe.

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

4.4.4 Teste para determinação de alcaloides

25 mg do EEB das folhas de *V. globosa* foram dissolvidos em 5 mL de solução de HCl 5% e filtrados. Foram separadas três porções de 1 mL em cada tubo de ensaio e adicionado em cada tubo gotas dos reativos de Bouchard, Dragendorff, Mayer. Precipitação ou turvação em pelo menos uma cavidade é indicativa de resultado positivo.

4.5 Atividade toxicológica frente à *Artemia salina*

O bioensaio com *A. salina* é baseado na técnica descrita por Meyer e colaboradores (1982). Após a escolha e preparação do extrato, procedeu-se a implantação e padronização da metodologia com *A. salina*.

Inicialmente, preparou-se a solução salina oriunda da solubilização de 19,5 g de sal marinho em 0,5 litros de água destilada. Dessa forma, foi realizado o ensaio e, posteriormente, os cistos de *A. salina* foram colocados na incubadora, junto com a solução salina, em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi recoberta com papel alumínio, para que as larvas após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória.

Após 24 horas, em temperaturas compreendidas entre 22° C – 29° C e sob iluminação de uma lâmpada incandescente (40 W), os cistos eclodiram. Em um béquer mediu-se 0,02 g do EEB de *V. globosa*, que foi dissolvido em 40 µL de Tween[®] (solvente) e 5 mL da solução salina, obtendo-se a solução mãe, no qual a concentração utilizada foi de 0,0039 g mL⁻¹, obtida através da $C = m/v$, onde, $C = 0,02g / 0,04 + 5$. Em seguida, em tubos de ensaio, foram adicionados 480, 960, 1920, 3840 µL da solução mãe e 5 mL da solução salina. Em cada tubo foram adicionadas 10 *Artemias*. Estas, foram coletadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em pelo menos três experimentos.

O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24h e, posteriormente, foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas, para determinação da CL50 (concentração que produz 50% de letalidade).

Os valores de CL50 foram calculados através da expressão dos resultados como uma percentagem dos controles e determinados graficamente a partir das curvas.

Concentração-resposta por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o programa “Graph Pad Prism” 4.04.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise fitoquímica preliminar

Os resultados deste estudo preliminar de identificação de compostos (folhas), não corrobora com os resultados obtidos em 2015, com o mesmo extrato e parte da planta utilizados. O local da coleta e fatores ambientais podem ser responsáveis pela diferença destes, já que os mesmos foram coletados em época e local distintos.

É possível observar que o estudo realizado por Dantas (2015), detectou a presença de quantidade significativa de flavonoides, além de saponinas. Os outros testes para alcalóides, taninos, polissacarídeos, esteroides e triterpenos apresentaram-se negativos. Em contrapartida, o presente estudo demonstrou significativa quantidade de esteroides e triterpenos e negatividade para os outros testes, demonstrando a diferença dos resultados entre os estudos analisados. Vale salientar que, a negatividade dos resultados não justifica a ausência dos constituintes abordados. Existe a possibilidade de que tenha ocorrido interferência de outros constituintes quanto a formação de cores ou precipitados ou ainda, que a quantidade destes metabólitos em análise tenha sido menor que o suficiente para que as reações pudessem ocorrer.

Triterpenos foram também encontrados na mesma espécie anteriormente, estando presentes em *Cordia spinescens* L. (NAKAMURA et al., 1997), *Cordia rufescens* A. DC. (SANTOS et al., 2005), *Varronia curassavica* Jacq. (VINCENT et al., 1982) e *Varronia multispicata* Cham. (KUROYANAGI et al., 2003; KUROYANAGI et al., 2001). Um dos estudos conduzidos com as folhas desta última espécie relata o isolamento de dez triterpenos de esqueleto damarano, estes com atividade anti-androgênica. Outros triterpenos foram isolados das folhas de *C. multispicata*, sendo seis de esqueleto ursano, também apresentando atividade anti-androgênica e mais sete de esqueletos variados: ácido lantanólico, ácido 3-epipomólico, ácido lântico, icterogenina, lantadeno A, lantadeno B, ácido ursômico e ácido pomônico. Diterpenos e sesquiterpenos também foram isolados de espécies de *Cordia*. Sesquiterpenos com atividade anti-inflamatória estão presentes em *C. trichotoma* e *C. verbenacea* (MEDEIROS et al., 2007; MENEZES et al., 2005), também na espécie *C. latifolia* (BINA et al., 2006) foram isolados dois novos diterpenos de esqueleto abietano com atividade nematicida.

A tabela 2 demonstra as mudanças de metabólitos encontrados, comparando o estudo realizado anteriormente e o presente estudo. As classes de metabólitos antes e agora obtidas foram as seguintes:

Tabela 2. Resultados do comparativo do *screening* fitoquímico do EEB das folhas de *Varronia globosa*.

Metabólito Secundário	Teste de Identificação	Dantas (2015)	Presente Estudo
Alcaloides	Bouchardat/Mayer/Drangendorff	-	-
Esteroides e triterpenos	Reação de Liberman-Bouchard	-	+++
Fenóis e taninos	FeCl ₃	-	-
Polissacarídeos	Lugol	-	-
Flavonoides	Reação de Shinoda	++	-
Saponinas	Teste de espuma	+	-

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

5.2 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Após a conversão realizada, a partir das concentrações do EEB de *V. globosa* utilizadas, obteve-se as concentrações de 384; 768; 1536; 3072 µg/ml, como é descrito abaixo:

$$1. C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/ml} \times 480 \text{ µg/ml} = C_2 \times 5 \text{ ml}$$

$$C_2 = 384 \text{ µg/ml}$$

$$2. C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,004 \text{ g/ml} \times 960 \text{ µg/ml} = C_2 \times 5 \text{ ml}$$

$$C_2 = 768 \text{ µg/ml}$$

$$3. C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/ml} \times 1920 \text{ } \mu\text{g/ml} = C2 \times 5 \text{ ml}$$

$$C2 = 1536 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$4. C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$0,004 \text{ g/ml} \times 3840 \text{ } \mu\text{g/ml} = C2 \times 5 \text{ ml}$$

$$C2 = 3072 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

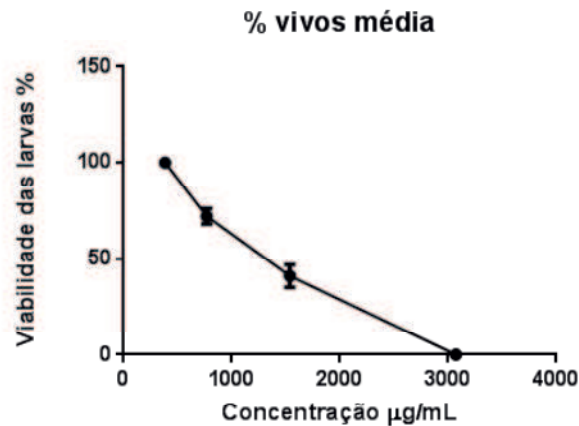
Observou-se que nos ensaios de *A. salina* em que se utilizou o EEB de *V. globosa* os resultados obtidos tiveram uma média de de 0; 27,8; 58,9; e 100% de *Artemias* mortas, respectivamente, como mostra a Tabela 3, representada abaixo:

Tabela 3 - Resultados dos testes realizados com EEB da espécie *V. globosa*.

CONCENTRAÇÕES	<i>Artemias</i> vivas	<i>Artemias</i> mortas	% de <i>Artemias</i> vivas	% de <i>Artemias</i> mortas
Controle	90	0	100%	0%
384 $\mu\text{g/ml}$	90	0	100%	0%
768 $\mu\text{g/ml}$	65	25	72,2%	27,8%
1536 $\mu\text{g/ml}$	37	53	41,1%	58,9%
3072 $\mu\text{g/ml}$	0	90	0%	100%

O valor da CL₅₀ obtido a partir do EEB da espécie *V. globosa* foi de CL₅₀: ~ 1.241 (Longo) $\mu\text{g/mL}$ que está representado no Gráfico 1.

Gráfico 1- CL₅₀ do do EEB da espécie *V. globosa*



Em conformidade com a literatura (MOREIRA, 2013), a determinação da CL₅₀, que foi realizada neste trabalho por meio do uso de metanúplios de *Artemia salina* Leach, fornece um indicativo do nível de toxicidade de uma determinada substância. As curvas de toxicidade obtidas apresentaram o comportamento sigmoide típico das curvas “dose – resposta” (Concentração - Viabilidade das larvas), permitindo o ajuste das mesmas e o cálculo dos valores de concentração letal – 50% (CL₅₀) para os diferentes extratos testados (CASTELLO-BRANCO, 2009; OGA et al., 2008). A determinação da CL₅₀ que é realizada por meio do uso de metanúplios de *Artemia salina* Leach, fornece um indicativo do nível de toxicidade de uma determinada substância. A literatura refere-se que uma CL₅₀ inferior a 1.000 µg/mL, apresenta uma potencial toxicidade para os organismos que possam ser expostos a ela (BARROS et al., 2010). Dessa forma, os resultados encontrados nesta pesquisa revelam que o EEB da espécie *V. globosa* não foi considerado tóxico, por apresentar um valor da CL₅₀ de ~ 1.241 µg/mL.

No que se refere à polaridade, a literatura afirma que produtos naturais mais polares são considerados frequentemente possuidores de maior bioatividade. Entretanto, não se pode estabelecer uma relação entre bioatividade e toxicidade, haja vista que produtos que apresentam toxicidade ainda possam ser considerados bioativos (OLIVEIRA et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

Pôde-se observar no presente estudo que, a variedade de metabólitos secundários encontrados nas folhas de *V. globosa* é bastante significativa. O estudo comparativo entre diferentes locais e épocas de coleta da mesma pôde comprovar isto. Os componentes majoritários foram os esteroides e triterpenos, embora outro estudo recentemente desenvolvido com a espécie tenha evidenciado que, os compostos predominantes foram as saponinas e os flavonoides.

O ensaio de toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* evidenciou-se como uma ferramenta útil e versátil, podendo ser utilizado para a avaliação e fracionamento monitorado de bioatividades, além de proporcionar versatilidade para estudos de toxicidade com alta sensibilidade. Os resultados encontrados para este teste, revelaram que o extrato etanólico bruto de *V. globosa* não foi considerado tóxico, por apresentar um valor da CL₅₀ de ~ 1.241 µg/mL. Desta maneira, a toxicidade apresentada pelo extrato torna-se importante no direcionamento para isolamento e identificação de compostos presentes e na caracterização da atividade biológica da espécie abordada.

De maneira complementar aos estudos fitoquímicos preliminares realizados, a associação do bioensaio de toxicidade com a *A. salina* mostrou-se importante no intuito de monitorar a pesquisa desse extrato vegetal, direcionando-o para a investigação de propriedades farmacológicas.

REFERÊNCIAS

AESA – AGÊNCIA EXECUTIVA DE GESTÃO DAS ÁGUAS DO ESTADO DA PARAÍBA. Boletim de informações climáticas. 2006. Disponível em: <<http://www.aesa.pb.gov.br>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

AGRA, M. F.; ABRANTES, H. F. L. Boraginaceae ethnomedicinal study from caatinga of the State of Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semiarid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P. Implications of ethnobotanical studies on bioprospecting strategies of new drugs in semi-arid regions. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 2, p. 21-23, 2010.

ALENCAR, N. L.; ARAÚJO, T. A. A.; AMORIM, E. L. C.; The Inclusion and Selection of Medicinal Plants in Traditional Pharmacopoeias-Evidence in Support of the Diversification Hypothesis. **Economic Botany**. v. 64, n. 1, p. 68-79, 2010.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of arid Enviroments**. v. 62, p. 127-142, 2005.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIA, M.B.S. Medicinal plants popularly used in Xingó region: a semi-arid location in northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 15, 2006.

AL-SHEHBAZ, I. A. The genera of Boraginaceae in the Southeastern United States. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 1, p. 1-169, 1991.

AMORIM, E. L. C. et al. Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**. v. 15, n. 1, p. 66-69, 2003.

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

BARREIRO, E. J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Química Nova na Escola**, n. 3, p. 4-9, 2001.

- BARROS, J.D. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e determinação da CL50 do extrato bruto seco das folhas da *Vitex agnus castus Linn.* **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 3, p. 62-71, 2010.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, v. 3, 1991.
- BEHAL, R. P. Estrutura de poder, disciplina e trabalho nas plantações de chá em Assam, sob o domínio colonial. **Revista Mundos do Trabalho**, v. 2, n. 3, p. 12-46, 2010.
- BFG. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** Rodriguésia, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.
- BINA S. S.; PERWAIZ, S.; BEGUM, S. Two new abietane diterpenes from *Cordia latifolia*. Tetrahedron, v. 62, p. 10087–10090, 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Conservação e uso sustentável em áreas protegidas e corredores: uma contribuição para a superação da pobreza nos biomas caatinga e cerrado. Brasília: MMA/SBF, 38 p., 2006.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.
- BRITO, N. R. S. Perfil Químico de Famílias de Angiospermas, **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 1986.
- BRUSCHI, M. L.; FRANCO, S. L.; NOVELLO, C. R. Projeto de manipulação e desenvolvimento de medicamentos e correlatos a base de plantas na disciplina de farmacotécnica. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Recife – UFPE, 2000.
- 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.
- CASTELLO, A. C. S. **Avaliação da toxicidade crônica pré-clínica de *Foeniculumvulgaremill.*** 2009. 136f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2009.
- CAVALCANTE, M. F. Síntese de 1,3,5- Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia salina*. Química Nova, v. 23, n. 1, 2000.
- DANTAS, C. A. G.; Investigação fitoquímica e avaliação do potencial tóxico e anti-inflamatório de *Varronia globosa* Jacq. (boraginaceae). Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual da Paraíba. 64 p., 2015.
- DA SILVA, S. A. S.; RODRIGUES, M. S. L.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Flavonoids from *Cordia globosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 359–361, 2004.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M. B.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P. Q.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215–218, 2007.

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

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis, 2004.

FERREIRA JÚNIOR, W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 138, p. 238-252. 2011.

CECHINEL FILHO, V.; 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.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, São Luís, p. 18, 2011.

FREITAS, A. M. M.; MELO, J. I. M.; QUEIROZ, L. P. Boraginaceae A. Juss. do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. **Iheringia**, v. 63, n. 2, p. 257-262, 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.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**. n. 27, p. 1-93, 2006.

IGARASHI, M. A. **Pubvet**, v. 2(31), Ed. 42, Art. 386, 2008.

JOLY, A. B. **Botânica-Introdução a taxonomia vegetal**, 7ª ed., p. 484-487, 1985.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre. 632p., 2009.

KUROYANAGI, M.; SEKI, T.; HAYASHI, T.; NAGASHIMA, Y.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Anti-androgenic triterpenoids from the Brazilian medicinal plant, *Cordia multispicata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 8, p. 954- 957, 2001.

KUROYANAGI, M.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; HAYASHI, T.; TAKASE, Y.; MASUDA, K. Dammarane-type triterpenes from the Brazilian medicinal plant *Cordia multispicata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1307-1312, 2003

- LUNA, J.; DOS SANTOS, A.; DE LIMA, M.; DE OMENA, M.; DE MENDONCA, F.; BIEBER, L.; et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, Jr. V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p.429-38, 2002.
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: EUFC, 1997. p.141
- MATOS, A. Aproveitamento de plantas medicinais da Região Nordeste. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 4, p. 132-140, 1982.
- MATOS J. M. D.; MATOS M. E. O. Farmacognosia: curso teórico prático. Fortaleza: UFCE, 1989.
- MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. 1991. "Bench-top" bioensaios para a descoberta de produtos naturais bioativos: um atualização, p. 383-409. Em: Rahman, A. (Org.). **Estudos em Produtos Químicos**, 9º ed., Elsevier, Amsterdã.
- MAYORGA, P.; PÉREZ, K. R.; CRUZ, S. M. CÁCERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.
- MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618-627, 2007.
- MELO, J. I. M.; & SALES, M. F. *Heliotropium* L. (Boraginaceae - Heliotropioideae) de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rodriguésia**. v. 55, n. 84, p. 65-87, 2004.
- MELO, J. I. M. & SALES, M. F. Boraginaceae A. Juss. na região de Xingó: Alagoas e Sergipe. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 369-380, 2005.
- MELO, J. I. M.; LYRA-LEMOS, R. P. Sinopse taxonômica de Boraginaceae *sensu lato* A. Juss. No estado de Alagoas, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 22, n. 3, p. 701-710, 2008.
- MELO, J. I. M.; SILVA, L. C.; STAPF, M. N. S. & RANGA, N. T. Boraginaceae. *In*: Forzza, R.C. *et al.* (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.
- MENEZES, J. E. A.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Trichotamol, a new cadinenediol from *Cordia trichotoma*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 787-790, 2001.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

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

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Caatinga, 2014. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

MOREIRA, L. A. O. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach. de extrato de duas espécies da família Melastomataceae. Trabalho de conclusão de curso. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. 52 p., 2013.

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.

NASCIMENTO, J. E.; MELO A. F. M.; LIMA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NAKAMURA, N.; KOJIMA, S.; LIM, Y. A.; MESELHY, R.; HATTORI, M.; GUPTA, M. P.; CORREA, M. Dammarane-type triterpenes from cordia spinescens. *Phytochemistry*, v. 4, n. 6, p. 1139-1141, 1997.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos da toxicologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, S. L. et al. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 155-165, 2011.

PEREIRA, O. M.; ANDRADE, L. A.; BARBOSA, M. R. V.; SAMPAIO, E. V. S. B. Composição florística e análise fitossociológica do componente arbustivo-arbóreo de um remanescente florestal no agreste paraibano. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, p. 357-369, 2002.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (Org.) Ecologia e conservação da caatinga. Recife: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, p. 174, 2003.

RANGEL, M.; BRAGANÇA, F.C.R. Representações de gestantes sobre o uso de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Jan-Mar; v. 11, n. 1, p. 100-9, 2009.

RODAL, M. J. N.; COSTA, K. C. C. C.; SILVA, A. C. B. L. Estrutura da vegetação caducifólia espinhosa (Caatinga) de uma área do sertão central de Pernambuco. *Hoehnea*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 209-217, 2008.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

SANTOS, R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES FILHO, E.; VIANA, F. A.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Cordia piauhiensis* – Boraginaceae. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3B, p. 662-665, 2005.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4a ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. p. 15; 125; 165, 2002.

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

TARODA, N. Taxonomic studies on Brazilian species of *Cordia* (Boraginaceae). PhD Thesis. University of Saint Andrews, Saint Andrews. p. 231, 1984.

VINCENT, V. V.; LAVIE, D.; ZELNIK, R.; AMABILE, K.; MATIDA.; PANIZZA, S. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of Chemical Society**, v. 1, p. 2697-2700, 1982.

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