



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

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO EXTRATO
ETANÓLICO BRUTO DO CAULE DE *Varronia globosa* (BORAGINACEAE)**

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

CAMPINA GRANDE - PB

2014

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DO CAULE DE *Varronia globosa*
(BORAGINACEAE)**

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ivana Maria Fechine

Co - orientadora: Prof^ª. MSc. Camila de Albuquerque Montenegro

CAMPINA GRANDE – PB

2014

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

R375a Reis, Malu Maria Lucas dos.
Avaliação fitoquímica e potencial farmacológico do extrato etanólico bruto do caule de *Varronia globosa* (Boraginaceae) [manuscrito] / Malu Maria Lucas dos Reis. - 2014.
40 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.
"Orientação: Ivana Maria Fachine, Departamento de Farmácia".
"Co-Orientação: Camila de Albuquerque Montenegro, Departamento de Farmácia".
1. Maria Preta. 2. Flavonoide. 3. Atividade anti-inflamatória. 4. Toxicidade. 5. Fitoterapia. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

MALU MARIA LUCAS DOS REIS

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DO CAULE DE *Varronia globosa*
(BORAGINACEAE)**

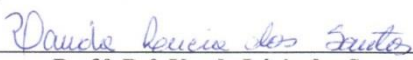
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia Generalista
da Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia Generalista.

Campina Grande – PB, 2014.

Data da Aprovação: 25/11/2014



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



Prof.^a. Dr.^a. Vanda Lúcia dos Santos - Avaliadora



Prof. Dr. Harley da Silva Alves – Avaliador

Dedico este trabalho aos meus maiores ídolos, meus pais, Francisco Marcondes Duarte dos Reis e Maria Idê Neiva Lucas dos Reis, as minhas irmãs Luma e Maria Bruna e aos meus grandes amigos, Alana Gleyce, Allison Ronny, Ana Kelma, Bruna Pereira, Cícera Dandara, Elma Liane, Francisco Tales e Yara Talita.

AGRADECIMENTOS

Desde 01 de Agosto de 2009 eu sonho com este dia. Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, que me deram o suporte para o que está acontecendo hoje. Em cinco anos nossa vida mudou bastante e nós, com todas as dificuldades, contra tudo e contra todos estamos vencendo. A vocês, meus heróis, fica o meu muitíssimo obrigado, por tudo que eu sou hoje, por tudo que me ensinaram, sem vocês eu nada seria. As minhas irmãs, Luma e Maria Bruna, agradeço por sempre estarem ao meu lado. Juntos, família, venceremos!

Passei, primeiramente, na Faculdade Santa Maria (FSM, Cajazeiras – PB), onde conheci as melhores pessoas que alguém poderia conhecer, as minhas melhores amigas Elma Liane e Cícera Dandara (*in memoriam*). Carrego-as até hoje e agradeço pelo companheirismo, amizade, cumplicidade, honestidade e muito amor. Agradeço a Paulo Emmanuel e Paula Denise, pelos momentos de nostalgia, de risadas, de amparo emocional. A vocês, o meu muito obrigada.

Após dois anos cursados na FSM, efetuei a transferência para Universidade Estadual da Paraíba, onde tive a oportunidade de conhecer novos mundos. Agradeço ao André da ProExT que me ajudou a conseguir o Restaurante Universitário, o qual me alimentou durante todos esses anos.

Agradeço aos meus amigos, Tales Pereira, Ana Kelma, Yara Talita que quando ajoelhei cansada, desgastada, acabada, levantaram-me inúmeras vezes. Agradeço a Bruna Pereira por ser minha cúmplice nas mais variadas aventuras possíveis e imagináveis, por perdurar ao meu lado quando estava errada e ajudar a ajustar minha vida estudantil. Agradeço a Alana Gleyce e sua família, por me ampararem inúmeras vezes, por me estimularem a querer sempre mais e por sempre me falarem que iria dar tudo certo. Obrigada, Central!

Aos meus pacientes Mestres, meus estimáveis professores, orientadores, meus grandes amigos. Em especial, Rossana Miranda, por me apresentar as atividades do mundo da Extensão e além de ser professora, se tornou uma mãe, sempre carinhosa e paciente, sempre ajustando tudo para que me engajasse nas atividades extracurriculares. Mutíssimo obrigada, professora!

Ao professor Harley Alves que me apresentou o mundo da pesquisa, que me fez melhorar como pessoa e como estudante, que me mostrou a importância de se trabalhar quimicamente. Muito obrigada, grande mestre, sempre terá meu respeito e admiração.

A professora Ivana Maria Fachine, mulher de garra, força, inteligência e perspicácia, minha estimável orientadora com quem aprendi e aprendo muito, quem me direcionou ao ramo da pesquisa, quem me estimulou a querer sempre mais e quem, apesar do meu jeito, acreditou em mim todos os dias. Muito obrigada mesmo, Ivana!

E, a mais nova integrante do *hall* dos meus professores admiráveis, Camila de Albuquerque Montenegro, que além de ser uma pessoa maravilhosa, é digna do seu potencial e a cada dia me faz aprender a importância do conhecimento analítico e crítico, fica o meu muito obrigada.

Agradeço a professora Vanda, por ter cedido o espaço do Laboratório de Farmacologia Experimental, e estar sempre disponível para ajudar e lembrar das ruas e bairros do meu amado município Crato, o qual sempre fazemos menção em nossas conversas enebriadas de saudade. Obrigada doce professora Vanda.

Por fim, agradeço imensamente a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão desse curso, agradeço a Deus por me propiciar essa imensa experiência que se chama UNIVERSIDADE, entrei menina e saí mulher. A todos, o meu, muitíssimo obrigado!

RESUMO

O uso de plantas medicinais acompanhou o desenvolvimento da sociedade, onde populares realizavam a produção de fitoterápicos afim de remediar/curar enfermidades. Visando consolidar esta prática, o homem percebeu a necessidade de descobrir os constituintes químicos presentes nas espécies vegetais e comprovar os efeitos farmacológicas responsáveis pela atenuação e/ou cura das doenças. Nesse contexto, a espécie *Varronia globosa* (Boraginaceae), popularmente conhecida como “Maria Preta”, se destaca por ser utilizada pela população nordestina no alívio das dores reumáticas e cólicas menstruais. Diante disso, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização fitoquímica e físico-química do pó da planta, investigar a toxicidade aguda e avaliar a atividade anti-inflamatória do Extrato Etanólico Bruto (EEB) do caule de *Varronia globosa*. Inicialmente, foi realizado um *screening* fitoquímico qualitativo que sugeriu a presença de flavonoides, esteroides e saponinas, além de um *screening* quantitativo para flavonoides cuja concentração foi de 10,55 mg/g. Foram determinadas as seguintes propriedades físico-químicas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição: densidade, que apresentou o valor de 0,370 g/mL; índice de Carr, uma forma indireta de medir a capacidade de compactação do pó, sendo este índice no valor de 2; na distribuição granulométrica do pó, este foi moderadamente grosso; o teor de cinzas totais na amostra do material botânico apresentou-se inferior a 14% e a perda por dessecação ficou entre 8-14%. Com relação ao ensaio de toxicidade aguda, a dose única de 2000 mg/kg do extrato etanólico bruto do caule de *Varronia globosa* administrado por via oral, não provocou alterações no Sistema Nervoso Central e Autônomo, no entanto, promoveu aumento no consumo de ração pelos machos e induziu alterações discretas nos pesos relativos dos órgãos coração e rins (sem mudanças macroscópicas) no grupo das fêmeas, em comparação ao controle. Não foram registradas mortes o que impossibilitou a determinação da Dose Letal 50 (DL₅₀). Já no modelo *in vivo* de peritonite, o EEB reduziu significativamente a migração leucocitária nas doses de 250 mg/kg 500 mg/kg, sendo, assim, sugere um possível potencial anti-inflamatório. De acordo com os resultados obtidos, concluímos que o EEB do caule de *Varronia globosa* apresenta baixa toxicidade nas condições avaliadas e possui atividade anti-inflamatória no modelo realizado e que acrescidos dos dados obtidos na análise fitoquímica, pode-se classificar o material botânico como promissor para estudos mais detalhados, vislumbrando um possível fitoterápico.

Palavras-chaves: Maria Preta. Flavonoide. Toxicidade aguda. Atividade Anti-inflamatória.

ABSTRACT

The use of herbal medicines to relieve the various evils which afflict humanity, occurs from the earliest times. To consolidate this practice, the man realized the need to discover the chemical constituents present in plant species and demonstrate responsible actions and pharmacological effects by attenuation and/or cure of diseases. In this context, *Varronia globosa* species (Boraginaceae), popularly known as “Maria Preta“, is known for being used by the Northeastern population in relieving rheumatic pains and menstrual cramps. Thus, this study aimed to carry out phytochemical characterization and physicochemical, investigate the acute toxicity and to evaluate the anti-inflammatory activity of the crude ethanol extract (CEE) stem from *Varronia globosa* (BORAGINACEAE). Initially, a qualitative phytochemical screening suggested that the presence of flavonoids, saponins and steroids and revealed quantitative *screening* flavonoids to a concentration of 10,55 mg/g, and may vary according to regional and seasonal conditions was performed. We determined the following physicochemical properties: density, which showed the value of 0.370 g/mL; Carr index, an indirect way to measure the compressibility of the powder, which is the index value of 2; the particle size distribution of the powder was moderately thick; the total ash content of the sample of plant material was presented less than 14%; loss on drying was between 8-14%. Regarding the acute toxicity test, a single dose of 2000 mg/kg of the crude ethanol extract of the stem from *Varronia globosa* administered orally, caused no signs of change in Central and Autonomic Nervous System, however, led to increased consumption of food by males and induced mild changes in the relative weights of organs heart and kidneys (without macroscopic changes) in the group of females treated with CEE, compared to the control. No deaths were recorded making it impossible to determine the lethal dose 50 (DL₅₀). In the *in vivo* model of peritonitis, the CEE significantly reduced the leukocyte migration in a dose of 250 mg/kg and 500 mg/kg, thus being a potential anti-inflammatory holder. According to the results, we conclude that the stem of the CEE *Varronia globosa* has low toxicity in the evaluated conditions and has anti-inflammatory activity in the model done and added the data obtained in the phytochemical analysis, we can classify the botanical material as promising for more detailed studies, envisioning a possible herbal.

Keywords: Maria Preta. Flavonoide. Phytochemistry. Toxicity agud. Atividade Anti-inflammatória.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Espécie <i>Varronia globosa</i> com inflorescência..... | 17 |
| Figura 2 - Métodos fitoquímicos clássicos para obter princípios ativos..... | 19 |
| Figura 3 - Sinais da inflamação..... | 21 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – <i>Screening</i> fitoquímico qualitativo do caule de <i>V. globosa</i> | 29 |
| Tabela 2 – <i>Screening</i> fitoquímico quantitativo de flavonoides do EEB de <i>V. globosa</i> | 30 |
| Tabela 3 – Dados obtidos da análise físico-química do pó seco do caule de <i>V. globosa</i> | 31 |
| Tabela 4 – Efeito da administração (2000 mg/kg) do EEB do caule <i>V. globosa</i> no consumo de água e ração durante 14 dias..... | 32 |
| Tabela 5 - Efeito da administração (2000 mg/kg) do EEB do caule <i>V. globosa</i> no peso relativo dos órgãos..... | 33 |

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de Calibração obtida para quantificação de flavanoides do EEB do caule de *V. globosa*.....30

Gráfico 2 – Avaliação da atividade anti-inflamatória do EEB do caule *Varronia globosa* a partir do modelo experimental *in vivo* de Peritonite Aguda.....34

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| DL ₅₀ | Dose letal 50 |
| EEB | Extrato Etanólico Bruto |
| Et al. | Entre outros autores |
| LAFIT | Laboratório de Fitoquímica |
| PNPMF | Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| PNPMF | Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| <i>V. globosa</i> | <i>Varronia globosa</i> |
| v.o. | Via oral |
| i.p. | Intraperitoneal |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 | Estudo Etnobotânico | 18 |
| 2.1.1 | <i>Família Boraginaceae, espécie Varronia globosa</i> | 18 |
| 2.2 | Análise de toxicidade aguda | 19 |
| 2.3 | Atividade anti-inflamatória | 20 |
| 3 | OBJETIVOS | 22 |
| 3.1 | Objetivo geral | 22 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 22 |
| 4 | METODOLOGIA | 23 |
| 4.1 | Coleta e identificação do caule de <i>V. globosa</i> | 23 |
| 4.2 | Secagem e trituração do material vegetal de <i>V. globosa</i> | 23 |
| 4.3 | Preparação do Extrato Etanólico Bruto (EEB) do caule de <i>V. globosa</i> | 23 |
| 4.4 | Screening fitoquímico qualitativo do EEB de <i>V. globosa</i> | 23 |
| 4.4.1 | <i>Flavonoides</i> | 24 |
| 4.4.1 | <i>Polissacarídeos</i> | 24 |
| 4.4.2 | <i>Catequinas</i> | 24 |
| 4.4.3 | <i>Fenóis e taninos</i> | 24 |
| 4.4.4 | <i>Esteróides e triterpenóides</i> | 24 |
| 4.4.5 | <i>Saponinas</i> | 25 |
| 4.4.6 | <i>Alcaloides</i> | 25 |
| 4.5 | Screening fitoquímico quantitativo de flavonoides do EEB de <i>V. globosa</i> | 25 |
| 4.6 | Análise físico-química do pó do caule de <i>V. globosa</i> | 25 |
| 4.6.1 | <i>Granulometria</i> | 25 |
| 4.6.2 | <i>Teor de cinzas</i> | 26 |
| 4.6.3 | <i>Perda por dessecação</i> | 26 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.6.4 | <i>Determinação do pH</i> | 27 |
| 4.6.5 | <i>Densidade bruta de compactação e índice de compressibilidade</i> | 27 |
| 4.7 | Ensaio tóxico-farmacológico do EEB do caule de <i>V. globosa</i> | 27 |
| 4.7.1 | <i>Animais para os experimentos in vivo</i> | 27 |
| 4.7.2 | <i>Toxicidade aguda e triagem comportamental (ALMEIDA et al., 1999).</i> | 27 |
| 4.7.3 | <i>Ensaio da atividade anti-inflamatória in vivo – modelo de peritonite aguda (VINEGAR et al., 1973).</i> | 28 |
| 4.7.4 | <i>Análise Estatística</i> | 28 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 5.1 | Preparação do (EEB) do caule de <i>V. globosa</i> | 29 |
| 5.2 | Screening fitoquímico qualitativo do EEB de <i>V. globosa</i> | 29 |
| 5.5 | Screening quantitativo de flavonoides do EEB de <i>V. globosa</i> | 29 |
| 5.3 | Análise físico-química do pó do caule de <i>V. globosa</i> | 30 |
| 5.4 | Toxicidade aguda e triagem comportamental (ALMEIDA et al., 1999) | 31 |
| 5.5 | Ensaio da atividade anti-inflamatória in vivo - modelo de Peritonite Aguda (VINEGAR et al., 1973) | 33 |
| 6 | CONCLUSÃO | 35 |
| | REFERÊNCIAS | 36 |
| | ANEXOS | 40 |
| | Anexo A – Parâmetros indicativos de alterações no sistema nervoso central. | 41 |
| | Anexo B – Protocolo de depósito no Comitê de Ética | 42 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de grande biodiversidade vegetal, o que facilita a utilização de inúmeras plantas medicinais por grande parte da população, seja na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos. Além disso, a extração de matérias-primas como extratos, óleos essenciais e o isolamento de substâncias químicas, servem como material de partida no preparo de moléculas semi-sintéticas ou modelos para obtenção de análogos sintéticos com o intuito de obter um fitomedicamento (CARVALHO, 2011).

As propriedades medicinais utilizadas por várias culturas acobertam aproximadamente 80% da população mundial, o que torna essencial o estudo para a descoberta de novos componentes bioativos em plantas, constituindo alternativas destinadas ao tratamento de doenças, tais como cardiovasculares, diabetes, tumores e desordens do sistema nervoso central (GURIB-FAKIM, 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2006; WAGNER, 2009).

A variedade botânica da Caatinga é extensa, destacando a família Boraginaceae, que reúne cerca de 2.500 espécies em 130 gêneros, com suas representantes distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo poucas delas nas zonas temperadas do Hemisfério Norte (AL-SHEHBAZ 1991). Dentre suas espécies, aproximadamente 130 estão alocadas em 10 gêneros que ocorrem no Brasil, dispersas em todas as regiões. Podem ser encontrados desde ervas, subarbustos, arbustos até árvores. (DE MELO, 2006).

As Boraginaceas apresentam grande importância econômica, possuindo várias espécies que são cultivadas como ornamentais, principalmente aquelas dos gêneros *Heliotropium*, *Mertensia*, *Myosotis* e *Borago*. A família também apresenta espécies usadas na fabricação de cosméticos e na culinária (HEYWOOD, 1996), como também algumas que são reconhecidas pelo seu valor medicinal, como por exemplo, a espécie *Varronia globosa*. A decocção ou infusão das folhas de *V. globosa* é utilizada para alívio de dores reumáticas, indigestões e cólicas menstruais. Ensaio farmacológicos constataram a atividade espasmolítica e vasodilatadora do extrato etanólico (95%) em cobaias (ASPREY et al., 1955; AGRA, 2004.).

A espécie *Varronia globosa* (*Cordia globosa*) teve sua constituição química elucidada por SILVA (2010) que descreve a presença de flavononas, sendo a única da família Boraginaceae a produzir tais metabólitos. Diante disso, esta análise foi direcionada a quantificação e estudo dos flavonoides desta espécie, para, então, caracterizar a toxicidade e, por fim, avaliar o potencial anti-inflamatório desta planta medicinal.

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, pode-se citar 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, valorizando a biodiversidade do país (CARVALHO, et. al. 2008).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo possuindo duas das maiores diversidades do planeta, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica apresentando um valioso arsenal a ser estudado. Cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies. Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996).

O uso de plantas medicinais foi, talvez, uma das primeiras manifestações da humanidade em relação à busca de meios que pudessem aliviar suas dores e enfermidades. Desde os tempos pré-históricos, o homem emprega preparações derivadas de plantas e, embora a crença na origem divina das doenças possa ter adiado um pouco um conhecimento mais profundo desta prática, demonstrações de grande engenhosidade como o reconhecimento das propriedades curativas destas plantas, adquirido de forma totalmente folclórica e transmitido através do tempo, constituiu-se a única forma de conhecimento disponível sobre as plantas e suas propriedades medicinais. A organização sistemática culminou com a elaboração das Farmacopeias chinesa, egípcia, indiana e grega. (ELIZABETSKY, 1986; PACHÚ, 2007.)

Entretanto, o reconhecimento de que as plantas curam ou previnem doenças, pois contêm substâncias que são capazes de interagir com o nosso organismo teve que aguardar a evolução dos pilares científicos, que se deu pelo desenvolvimento da química e das ciências biológicas em geral (FRANSWORTH, MORRIS, 1976).

Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedade terapêutica (FILHO; YUNES, 1997; MUNDO, 2007).

Dessa forma, a pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundários relevante da mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (FALKENBERG et al., 2004)

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

A concentração de princípios ativos na planta depende, naturalmente, do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, como, por exemplo, fatores climáticos, edáficos (relacionados com o solo), exposições a micro-organismos, insetos, outros herbívoros, poluentes, etc. (BRAZ-FILHO, 2010).

2.1 Estudo Etnobotânico

2.1.1 Família Boraginaceae, espécie *Varronia globosa*

A família Boraginaceae engloba cerca de 130 gêneros e 2.500 espécies divididas em cinco subfamílias. Distribuem-se nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (AL-SHEHBAZ, 1991). Podem ser encontrados desde ervas, subarbustos, arbustos, lianas até árvores. Suas folhas são simples, alternas, espiraladas ou não, subopostas ou mais raramente opostas ou verticiladas. (MELO, 2006).

Nesta família temos a espécie *Varronia globosa*, popularmente conhecida como “Maria Preta” (Figura 1). O infuso ou decocto das folhas e caule são utilizados contra reumatismos, indigestões e cólicas menstruais. É considerada uma espécie tóxica em Cuba, segundo Lizama et al. (1998) e Agra (2004).

Com relação à atividade biológica, detectou-se as atividades espasmolítica e vasodilatadora que foram observadas com o extrato etanólico (95%) em cobaias (FENG et al., 1962 *apud* AGRA et al., 2004).



Figura 1. Espécie *Varronia globosa* com inflorescência.

Fonte : <http://benkolstad.net/?p=4186>

2.2 Análise de toxicidade aguda

O estudo toxicológico pré-clínico de uma substância química é uma etapa preliminar importante para o uso seguro dessa substância em humanos, uma vez que, tem como objetivo caracterizar os efeitos toxicológicos a partir de sua administração (EATON, 1996). Além disso, estudos toxicológicos pré-clínicos buscam informações sobre quais doses são capazes de causar efeitos tóxicos em animais (SOUZA-BRITO, 1996). Assim, segundo os princípios básicos da toxicologia, toda substância pode comportar-se como um agente tóxico, dependendo da dose administrada ou absorvida, do tempo e da frequência de exposição, assim como, das vias de administração (BARROS, 2008).

Os produtos de síntese química assim como os naturais, sejam extratos, frações ou fitoconstituintes, devem ser estudados por meio de métodos que avaliem a sua segurança e a eficácia. Desse modo, tais métodos incluem ensaios pré-clínicos e clínicos, sendo este último conduzido de acordo com regulamentações federais (TALALAY, 2001).

Dentre os vários métodos ou testes empregados para avaliar efeitos colaterais e toxicológicos, o teste de toxicidade aguda tem a finalidade de definir a toxicidade intrínseca do composto, identificar órgãos-alvos da substância ou amostras estudadas e selecionar doses para estudo de longa duração (SÁ, 2006).

A Resolução 90 (BRASIL, 2004) determina que para se avaliar os efeitos tóxicos agudos de amostras vegetais, deve-se utilizar a mesma via de administração proposta para o uso do produto, usar mamíferos machos e fêmeas e de idade adulta. Devem ser avaliados sinais de toxicidade durante as primeiras 24 horas e também a variação de peso dos animais e o consumo de água e ração. Além destas recomendações, os animais sobreviventes devem ser

eutanasiados e autopsiados, a fim de realizar procedimentos que permitam estudos histopatológicos dos órgãos acometidos.

A triagem comportamental permite avaliar se uma determinada droga modifica a atividade cerebral, através do registro de alguns sinais ou alterações de comportamento apresentados pelos animais. Assim, esse modelo e a determinação da dose letal para 50% dos animais testados (DL_{50}) permite avaliar se determinada substância, natural ou sintética, apresenta toxicidade, possibilitando que estudos farmacológicos sejam conduzidos com maior margem de segurança (ALMEIDA, 2006).

2.3 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta benéfica e fisiológica do hospedeiro contra um corpo estranho ou lesão tecidual que tem como função eliminar o estímulo patogênico para remover o tecido danificado, restaurando a homeostase (LUZ, 2014).

O primeiro a definir os sintomas clínicos da inflamação foi o médico romano Cornelius Celsus no século I. Estes sintomas vieram a ser conhecidos como os cinco sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor como pode ser visto na Figura 3 (LEITE, 2012).



Figura 3. Sinais da inflamação.

Fonte: <http://s3.amazonaws.com/magoo/ABAAAo8UAI0.jpg> <http://s3.amazonaws.com/mag>

O processo inflamatório é dividido nas fases aguda e crônica. A inflamação aguda possui duração relativamente curta - minutos, horas ou alguns dias - e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido (plasma) rico em proteínas e migração de células para o local da lesão (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A fase aguda inicia-se a partir da ativação de células teciduais (mastócitos, células endoteliais e macrófagos) e migratórias (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos) (LEITE, 2012).

A inflamação crônica é de maior duração e está associada histologicamente à presença de linfócitos e de macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

O Brasil é um país de grande biodiversidade vegetal. Nesse contexto, inúmeras plantas medicinais são utilizadas por grande parte de nossa população, cuja indicação popular é a inflamação, constituindo alvos para o estudo de alternativas terapêuticas para esta área, visando a confirmação por meio de pesquisas científicas daquele uso tradicional (PEREIRA et al., 1999; BEZERRA-SANTOS et al., 2006; ZAKARIA et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar caracterização físico – química e o estudo fitoquímico, toxicológico e farmacológico do extrato etanólico bruto (EEB) do caule de *Varronia globosa* (Boraginaceae).

3.2 Objetivos específicos

- Produzir do extrato etanólico bruto (EEB) do caule de *V. globosa*;
- Realizar do *Screening* fitoquímico qualitativo do EEB do caule de *V. globosa*;
- Realizar do *Screening* fitoquímico quantitativo para flavonoide do EEB caule de *V.globosa*;
- Caracterizar físico-química do pó seco de *V. globosa*;
- Avaliar da toxicidade aguda do EEB do caule de *Varronia globosa* ;
- Analisar do potencial anti-inflamatório do EEB do caule de *Varronia globosa*.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação do caule de *V. globosa*

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

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

A planta coletada foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar, com temperatura de 40° C, por aproximadamente duas semanas. O caule seco foi submetido à trituração em um moinho de facas. Após a moagem obteve-se 180,16 g do pó do caule.

4.3 Preparação do Extrato Etanólico Bruto (EEB) do caule de *V. globosa*

O pó seco do caule foi submetido à maceração exaustiva com etanol. A solução alcóolica foi retirada a cada 3 dias e o líquido extrativo armazenado em recipientes de vidro âmbar devidamente etiquetado. O solvente foi evaporado em um evaporador à pressão reduzida a uma temperatura de 50° C, fornecendo um peso seco do extrato etanólico bruto de 9,39 g.

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

Para testes que utilizam como solvente água destilada foi preparada uma solução mãe com o EEB de *V. globosa*, utilizando 140 mg do EEB dissolvidos em 28 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi levada ao banho de ultrassom e, posteriormente, filtrada em um papel filtro. O filtrado resultante foi utilizado para testes de identificação de compostos secundários como polissacarídeos, catequinas, fenóis e taninos. Para a solução de metanol foi pesado 120 mg de extrato para dissolução em 24 mL de metanol. Para a solução de

clorofórmio foi pesado 75 mg de extrato e dissolvido para 15 mL de clorofórmio (MATOS, 1997). Foram preparadas ainda outras duas soluções, uma de Vanilina e outra de Cloreto Férrico, ambas a 1%.

4.4.1 Flavonoides

Para a identificação da presença de flavonoides foram adicionados 5 gotas de Ácido Clorídrico (HCl) concentrado e raspas de Magnésio em um tubo de ensaio com alíquota da solução mãe de metanol. Coloração vermelho rósea indica positividade.

4.4.1 Polissacarídeos

Foram transferidos 5 mL da solução aquosa para tubo de ensaio, adicionado de 2 gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul indica resultado positivo.

4.4.2 Catequinas

Foi adicionado 3 mL da solução aquosa de Vanilina a 1% a um tubo contendo uma alíquota de 3 mL da solução mãe de metanol. Posteriormente foi adicionado 1 mL de HCl. A revelação da coloração vermelha intensa indica reação positiva.

4.4.3 Fenóis e taninos

Adicionou-se 5 mL da solução aquosa a um tubo de ensaio e a ele foi acrescentado 5 gotas de Cloreto Férrico (FeCl_3). Observar a formação de precipitado azul-verde.

4.4.4 Esteróides e triterpenóides

10 mL da solução-mãe de clorofórmio foi filtrado sobre carvão ativado. O filtrado foi transferido para um tubo de ensaio completamente seco, adicionado 1mL de anidrido acético e agitado suavemente. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de H_2SO_4 concentrado e novamente agitado. Coloração vermelho tijolo indica positividade.

4.4.5 Saponinas

Um volume de 5 mL de solução de metanol foi adicionado a um tubo e este foi agitado manualmente durante 2 (dois) minutos. Se positiva, a reação promoverá um acréscimo de espuma durante um longo tempo.

4.4.6 Alcaloides

Para a identificação de alcaloides foram realizados 3 testes, utilizando reagentes específicos para esta determinação: 1º tubo: adicionados 2 mL da solução mãe de metanol, 1 mL de HCl e 4 gotas do reativo de Mayer; 2º tubo: adicionados 2 mL de solução mãe de metanol, 1 mL de HCl e 4 gotas do reativo de Bouchardat; 3º tubo: adicionados 2 mL de solução mãe de metanol, 1 mL de HCl e 4 gotas do reativo de Dragendorff. A formação de precipitados insolúveis e floculosos sugerem a presença de alcaloides

4.5 Screening fitoquímico quantitativo de flavonoides do EEB de *V. globosa*

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al. (2005). A 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de $AlCl_3$ a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de $AlCl_3$.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 $\mu g/mL$, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu g/mL$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.6 Análise físico-química do pó do caule de *V. globosa*

4.6.1 Granulometria

A determinação da granulometria (tamanho das partículas do pó e distribuição de

tamanho) foi realizada seguindo a metodologia prevista na Farmacopeia Brasileira (2010). O procedimento foi desenvolvido mecanicamente, usando um agitador que possui movimentos horizontais e verticais e empregando-se tamises padronizados superpostos, partindo-se de um maior diâmetro ao menor. Uma porção de 25 g do pó foi colocada no tamis de maior malha e submetida à tamisação durante 15 minutos. Após o término deste tempo, um pincel foi utilizado para remover toda a amostra retida na superfície superior de cada malha para um papel impermeável, procedendo a pesagem separadamente. Por fim, calculou-se o percentual retido em cada tamis, utilizando o cálculo prescrito na metodologia oficial.

4.6.2 Teor de cinzas

O método utilizado para determinação do teor de cinzas totais foi adaptado da Farmacopeia Brasileira (2010). Para este procedimento, primeiramente, os cadinhos de porcelana foram colocados em mufla a 450 °C, durante 30 min. Os mesmos foram resfriados em dessecador e tiveram as respectivas massas determinadas em balança analítica. Foram tomados exatamente 3 g do material vegetal pulverizado, os quais foram transferidos para os cadinhos previamente tarados. Em seguida foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla aquecida a 450° C durante 2 h. Em seguida, os cadinhos foram resfriados em dessecador e foi realizada a determinação da massa dos mesmos. A determinação de massa foi repetida até a obtenção de valores de pesos constantes. Foi calculada a porcentagem das cinzas totais em relação à massa da droga vegetal. A análise foi realizada em triplicata (Farmacopeia Brasileira, 2010).

4.6.3 Perda por dessecação

Exatamente 3 g do pó foram transferidos para pesa-filtro previamente dessecado e tarado. A amostra foi submetida a aquecimento em estufa (Biopar®, modelo S805T) a 105 °C durante 2 h, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem. A operação foi repetida até obtenção de peso constante. Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando a equação:

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

Onde: Pa é o peso da amostra; Pu é o peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação e Ps é o peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g).

4.6.4 Determinação do pH

Para a determinação do pH do pó do caule de *Varronia globosa*, utilizou-se uma solução aquosa deste e foi efetuada a leitura em um pHmêtro devidamente aferido, como preconiza a Farmacopeia Brasileira 5^a Edição.

4.6.5 Densidade bruta de compactação e índice de compressibilidade

Esses ensaios seguiram as metodologias propostas por GUO et al. (1985) e CARDOSO (2002). A amostra foi colocada em provetas previamente pesadas. A densidade de compactação foi determinada com auxílio de volúmetro de compactação. O pó foi submetido a 1250 quedas. Após essas determinações calculou-se o fator de Hausner determinado através do quociente entre as densidades compactada (*dc*) e bruta (*db*) (AULTON, 2005). O índice de compressibilidade (IC) foi determinado segundo equação (dc/db) *dc* (WANCZINSKI, 2002).

4.7 Ensaios tóxico-farmacológicos do EEB do caule de *V. globosa*

4.7.1 Animais para os experimentos *in vivo*

Foram utilizados 40 camundongos Swiss (*Mus musculus*), separados em grupos (machos e fêmeas), colocados em caixas com serragem, à temperatura ambiente e longe da umidade e do sol, sendo alimentados com ração até atingirem o tamanho e peso ideal para realização do experimento. Para realização dos experimentos, os animais foram submetidos a um jejum de 24 h para a realização do protocolo de toxicidade aguda e 12 h, para o ensaio de atividade anti-inflamatória. O projeto foi enviado ao Comitê de Ética e recebeu o número de protocolo que consta no (ANEXO B).

4.7.2 Toxicidade aguda e triagem comportamental (ALMEIDA et al., 1999).

Para avaliar o efeito tóxico do EEB obtido do caule de *Varronia globosa* foram utilizados 12 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos e 12 fêmeas não gravídicas, com peso entre 25 – 30 g, distribuídos em gaiolas, de forma aleatória e separados em grupos controle e teste, compostos por 6 animais, cada, que receberam uma dose 2000 mg/Kg, v.o.

Os animais foram observados comportamentalmente nas primeiras 72 h quanto a determinados parâmetros indicativos de alterações no sistema nervoso central e autônomo que constam no anexo A. Posteriormente, avaliou-se o consumo de água e evolução ponderal durante 14 dias. Ao término desse período os animais foram eutanasiados e tiveram seus órgãos removidos e avaliados macroscopicamente. Além disso, o número de mortes foi contabilizado para a determinação da dose letal 50 % (DL₅₀)

4.7.3 Ensaio da atividade anti-inflamatória in vivo – modelo de peritonite aguda (VINEGAR et al., 1973).

Para avaliação do potencial anti-inflamatório do EEB de *Varronia globosa* (caule), os animais foram divididos em quatro grupos, cada com 6 animais, pesando entre 25 g-35 g, sendo os grupos controle negativo - Salina 0,9%, controle positivo - Dexametasona 5 mg e o EEB nas doses 250 mg/kg e 500 mg/kg. Após 30 min do tratamento, foi induzida a inflamação por meio da administração de carragenina a 1 % no peritônio dos animais. Aguardou-se 4 horas, anestesiou-se os animais com Ketamina 2% e Xilazina 5%, e, em seguida, administrou-se 2 mL de EDTA, massageando-se o peritônio. Eutanasiou-se os animais por deslocamento cervical, colheu-se o exsudato para realizar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

4.7.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda e de atividade anti-inflamatória foram expressos como média \pm desvio padrão (dp) da média. Esses dados foram submetidos ao teste t para toxicidade aguda e análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Dunnett para o protocolo de peritonite, analisados com o software GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, EUA, considerando-se o nível de significância mínimo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do (EEB) do caule de *V. globosa*

Do total de 180,16 g de pó do caule foi obtido 9,39 g do EEB como um rendimento aproximado de 5,21 %.

5.2 *Screening* fitoquímico qualitativo do EEB de *V. globosa*

A partir do *screening* fitoquímico do EEB do caule da *Varronia globosa*, obteve-se os seguintes resultados, listados na Tabela 1.

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

| Metabólito Secundário | Teste de Identificação | Resultado |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| Alcaloide | Buchard/Mayer/Drangendorff | Negativo |
| Esteroides | 0,12 /0,25 / 0,50 | Positivo – 0,50 |
| Taninos | FeCl ₃ /Gelatina 0,5% | Negativo |
| Flavonoides | Fita De magnésio | Positivo |
| Flavonoides | Fluorescencia | Positivo |
| Saponina | Espuma | Positivo |
| Polissacarídeos | | Negativo |
| Catequinas | | Negativo |

Analisando a Tabela 1, foi possível observar que o teste apresentou-se positivo para flavonoides, saponinas e esteroides, metabólitos secundários importantes na busca de composto naturais.

5.5 *Screening* quantitativo de flavonoides do EEB de *V. globosa*

A quantificação foi realizada a partir da curva de calibração que garante a linearidade do método (Gráfico 1), sendo obtida a partir da leitura de absorbância de variadas concentrações de Quercetina, Por meio da delimitação do limite de quantificação (LQ = 0,884) justifica-se o fato da concentração de Quercetina ter sido iniciado em 2 µg/mL. O “R = 0,997 ” indicando linearidade satisfatória do método. Portanto, a técnica aplicada garante resultados confiáveis para quantificação de flavonoides.

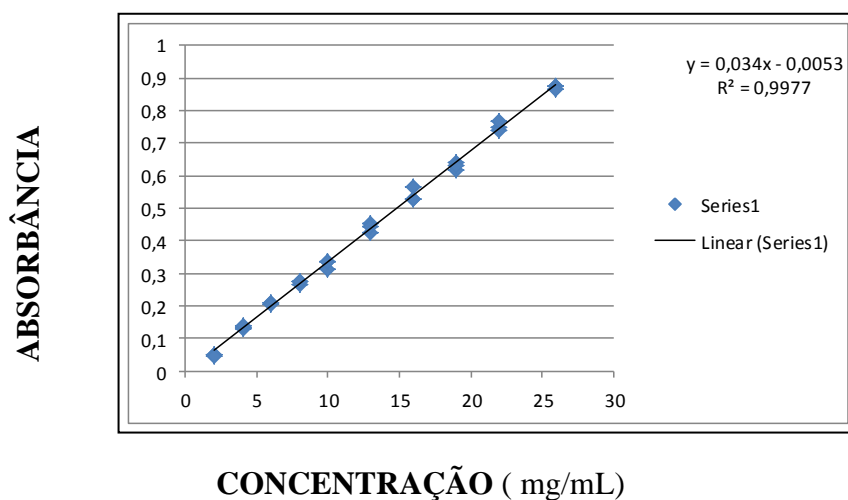


Gráfico 1. Curva de Calibração obtida para quantificação de flavonoides presentes no caule.

Os valores obtidos constam na Tabela 2, como resultado de uma análise espectroscópica a partir da técnica de Meda et al. (2005).

Tabela 2. Resultados oriundos da quantificação de flavonoides

| Conc. (ug/mL) | Flavonoides (ug/mL) | D.P. (±ug/mL) | Flavonoides (mg/g) | D.P. (± mg/g) |
|------------------|------------------------|------------------|-----------------------|------------------|
| 500 | 5,27 | 0,34 | 10,55 | 0,68 |

A partir do uso de uma regra de três simples, pôde-se correlacionar a quantidade de flavonoides obtida a partir da quantificação e a quantidade total do extrato etanólico bruto (9,39 g), fornecendo cerca de 99,09 mg de flavonoides na quantidade total do extrato disponível do caule de *V. globosa*.

5.3 Análise físico-química do pó do caule de *V. globosa*

Baseando-se nas normas exigidas na Farmacopeia Brasileira 5ª ed., foi realizada a análise físico-química do pó da parte vegetal. Os resultados obtidos no estudo constam na Tabela 3.

Tabela 3. Dados obtidos da análise físico-química do pó do caule de *V. globosa*

| Análise | Resultado |
|--------------------------|----------------------|
| Densidade Bruta | 0,370 g/mL |
| Densidade de Compactação | 0,476 g/mL |
| Compressibilidade | 2 |
| pH | 5,73 |
| Granulometria | Moderadamente Grosso |
| Teor de Cinzas | 1,82 % |
| Perda por dessecação | 89,02 % |

Para a densidade bruta, obteve-se o valor de 0,370 g/mL. A Farmacopeia Brasileira 5ªed. não determina valores máximos e mínimos de densidade aparente para espécies vegetais.

Em seguida, foi obtido o índice de Carr (Compressibilidade), que indica uma medida indireta da capacidade de compactação do pó, valores abaixo de 15 indica uma excelente fluidez corroborando com o valor obtido para caule, onde $C = 2$.

Com as especificações da Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), pós de tamanho maior, como os desta classificação, desfavorecem as extrações, pois partículas muitas finas podem aderir às superfícies maiores, aumentando a viscosidade do meio e criando uma barreira que impede a penetração do solvente (VOIG & BORNSCHEIN, 1982).

Os resultados da determinação de cinzas totais na amostra, apresentaram-se abaixo de 14%, conforme os limites estabelecidos nas monografias de diversas drogas vegetais descritas na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), indicando que as mesmas não possuem excesso de terra e/ou areia, sendo $C_t = 1,82\%$.

Sobre o pH, a Farmacopéia Brasileira 5ª ed (2010) não cita em suas monografias, valores máximos e mínimos para drogas vegetais. A solução aquosa do pó seco do caule de *V. globosa* apresentou pH = 5,73, podendo apresentar em uma formulação características ácidas.

5.4 Toxicidade aguda e triagem comportamental (ALMEIDA *et al.*, 1999)

Com a administração da dose única de 2000 mg/kg, v.o. em camundongos de ambos os sexos, extrato do caule de *V. globosa* não promoveu morte, não sendo possível determinar a Dose Letal 50 (DL₅₀).

A partir da triagem comportamental, constatou-se que apenas as fêmeas demonstraram sonolência aos 30 min após a administração do EEB do caule de *V. globosa*.

Os parâmetros avaliados para constatar os sinais de toxicidade sistêmica foram: consumo de água e ração ao longo dos 14 dias de experimento, percentual de ganho de peso e peso relativo dos órgãos.

Não houve alteração significativa no consumo de água por nenhum dos grupos tratados. Já para o consumo de ração, observou-se um aumento na ingesta pelo grupo dos machos tratados com o EEB. Esses dados encontram-se expressos na tabela 4.

Tabela 4. Efeito da administração da dose de 2000 mg/kg do EEB de *V. globosa* no consumo de água e ração durante 14 dias

| Tratamentos | N | Consumo de água (mL) | Ingestão de ração (g) |
|--------------------------|---|----------------------|-----------------------|
| MACHOS | | | |
| Sol. salina 0,9 % | 6 | 51,07 ± 13,47 | 29,36 ± 7,2 |
| EEB 2000 mg/kg | 6 | 51,79 ± 7,74 | 34,43 ± 4,76* |
| FÊMEAS | | | |
| Sol. salina 0,9 % | 6 | 42,86 ± 6,11 | 26,08 ± 4,51 |
| EEB 2000 mg/kg | 6 | 48,57 ± 11,51 | 27,54 ± 4,31 |

Valores são expressos como média ± d.p.; Test “t” de Student, *p<0,05.

Analisando-se os dados expressos na tabela 5, é possível constatar uma diminuição no peso dos órgãos coração e rins das fêmeas tratadas com o EEB na dose de 2000 mg/Kg, v.o., em comparação ao grupo controle.

Tabela 5. Efeito da administração da dose 2000 mg/kg do EEB de *V. globosa* no peso relativo dos órgãos

| Tratamento | n | Coração (g) | Fígado (g) | Rins (g) | Baço (g) | Pulmão (g) |
|--------------------------|---|---------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| MACHOS | | | | | | |
| Sol. Salina 0,9 % | 6 | 0,004 ± 0,002 | 0,04 ± 0,02 | 0,015 ± 0,001 | 0,014 ± 0,02 | 0,007±0,001 |
| EEB 2000 mg/kg | 6 | 0,02 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 | 0,01 ± 0,0004 | 0,020 ± 0,024 | 0,007±0,001 |
| FÊMEAS | | | | | | |
| Sol. salina | 6 | 0,005 ± | 0,05 ± 0,01 | 0,013 ± | 0,027 ± | 0,006 ± 0,004 |

| | | | | | | |
|-----------------------|---|----------|-------------|---------|---------|-----------|
| 0,9 % | | 0,0004 | | 0,001 | 0,031 | |
| EEB 2000 mg/kg | 6 | 0,004 ± | 0,04 ± 0,01 | 0,007 ± | 0,006 ± | 0,02±0,03 |
| | | 0,0003** | | 0,005* | 0,003 | |

Valores são expressos como média + D.P.; Test “t” de Student, *p<0,05; **p<0,01.

Apesar das alterações verificadas não é possível inferir toxicidade ao EEB de *Varronia globosa*, uma vez que, seriam necessários testes toxicológicos mais detalhados e específicos.

Diante dos resultados obtidos, pode-se atribuir uma baixa toxicidade ao EEB de *Varronia globosa*, nas condições em que o experimento foi realizado, o que assegura a continuidade dos protocolos direcionados aos potenciais farmacológicos da espécie em estudo.

5.5 Ensaio da atividade anti-inflamatória *in vivo* - modelo de Peritonite Aguda (VINEGAR *et al.*, 1973)

O resultado obtido está representado no gráfico 2, onde é possível verificar que as doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg do EEB inibiram, significativamente, a migração leucocitária em 41,06% e 64,3%, respectivamente, em comparação ao controle negativo.

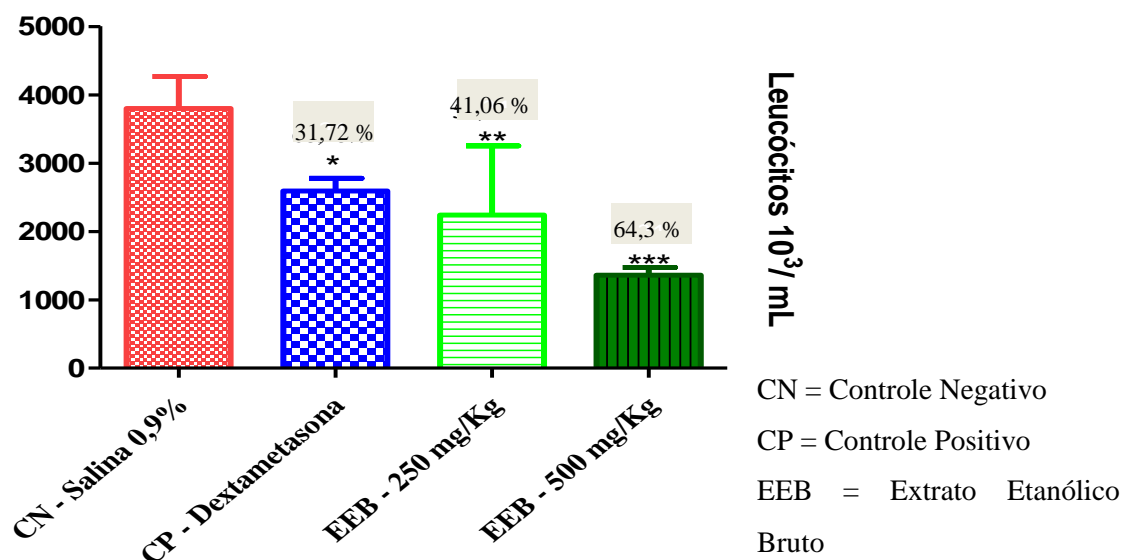


Gráfico 2. Feitos do extrato de *Varronia globosa* na migração leucocitária no modelo experimental *in vivo* de peritonite aguda.

Com este resultado, pode-se atribuir um potencial anti-inflamatório à espécie *Varronia globosa* possivelmente ligado aos flavonoides, metabólitos secundários conhecidos como detentores de efeitos farmacológicos. O seguimento dos protocolos experimentais é bastante promissor, para consolidar a espécie como uma alternativa terapêutica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados fitoquímicos indicaram a presença de saponinas, esteroides e flavonoides, sendo este último o metabólito majoritário no EEB da espécie em estudo.

A análise físico-química do pó do caule, revelou que este possui promissoras propriedades para o desenvolvimento de um fitoterápico a partir dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5^a ed. Além disso, o EEB de *Varronia globosa* mostrou baixa toxicidade na dose de 2000 mg/kg, v.o., o que assegurou a continuidade dos estudos farmacológicos, caracterizando o produto-teste com um potencial anti-inflamatório significativo.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; ABRANTES, H.F.L.; Boraginaceae ethnomedicinal study from caatinga” of the State of Paraíba, Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, 85(1): 7-12, 2004.
- ANDRÉ, A. C. G. M. et al. Caracterização físico-química do material vegetal e dos extratos de *Cestrum laevigatum* S. (Solanaceae). **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde Fits**. Maceió, v. 1 n.2 p. 11-19. 2013.
- ALMEIDA, R.N., Oliveira, T.M.L. Triagem Farmacológica Comportamental. Em: Almeida, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 131-137.2006.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- ASPREY, G. F.; Thor. **Medicinal Plants of Jamaica**. III. West Indian Med. J 4: 69-82.2006.
- BARBOSA FILHO et al., 2006; Natural Products Inibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 02, p. 258-285. 2006.
- BARROS, S.B.M., Davino, S.C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 3a ed., São Paulo: Atheneu, p. 59-70. 2006.
- BRAGA T.V. et al. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Rev Ciênc. Farm. Básica Apl.**;28(3):287-90. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RE Nº 90**. Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. 2004.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.
- BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 7, p. 1152-1160, Jul 2006.
- CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. p. 17-46. 2001.
- CARDOSO, M.LC. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris afrodisiaca* O. Madi. O – *Malpighiaceae***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 128 f. 2002.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S.; Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Braz. J. Pharmacogn.**, Brasil, v.18(2), p.314-319, 2008.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *nasturtium officinale* r. br., brassicaceae.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, 84 f. 2011.

COUTO R.O. et al. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). **Rev. Eletr.Farm.**;6(3):59-69. 2009.

DE MELO, A. S. T. & Silva, N. J. de. O uso do solo e da vegetação atual. **Atlas Geográfico da Paraíba**. p. 32-33. Grafset. João Pessoa. Brasil. 1985.

EATON, D.L., Klaassen, C.D., Principles of toxicology. In: Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Dour, J. Casarett and Doull's Toxicology. **The basic science of poisons**. 5^a ed. New York: Mc Graw-Hill, p. 13-34. 1996.

ELIZABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. **J. Ethno. biol.** 6: 121,1986.

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

FRANSWORTH, R. N.; MORRIS, W. R. Higher Plants the Sleeping Giant of Drug Development. Amer. **J. Pharmacy** . p. 46, 1976.

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

FENG, P. C.; HAYNES, L. J.; MAGNUS, K. E.; PLIMMER, J. R.; SHERRAT, H. S. A. Pharmacological Screening of Some West Indian Medicinal Plants. **J. Pharmacology**. 14:556-561, 1962.

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

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, Jun 2005.

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

GUO, A. et al. A simple relationship between particle shape effects and density, flow rate and hausner ratio. **Powder Technology**, v.43, p.279-284, 1985.

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

KOROLKOVAS, A., BURCKHAL, J.H. **Química Farmacêutica**. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, p. 783, 1994.

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

LIZAMA, R. S.; Martínez, M. M.; Lantigua, R. E. I. 1998. Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río. Estudio etnobotánico. I. **Rev. Cubana Farm.** 32 (1): 57-62.

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

MATOS, F. J. A. **O Formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Mossoró: ESAM, p.222, (Coleção ESAM, ano XX, v. 18). 1987.

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

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.

PACHÚ, C. O. Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos **Tese** (Doutorado em Engenharia de Processos) Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 102f. 2007.

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

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

SILVA, S.A.S. et al. Flavanones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(5): 682-685, Out./Nov. 2010.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6a. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC; 2007.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. Best practice & research. **Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

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

TALALAY, P. & Talalay; P., The importance of Using Scientific Principles in the Development of Medicinal Agents from Plants. **Academic Medicine**. v. 76(3), p. 238-247. 2001.

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

Voigt R; B. M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. 3ª. ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 1982.

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

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

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

ANEXOS

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

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

Anexo B – Protocolo de depósito no Comitê de Ética

SOLICITAÇÃO DE ANÁLISE DE PROJETO
Comprovante de entrega (via do solicitante)

Protocolo Nº: 06.109 Protocolado em: 29.09.14 Recebedor: ARMS

Projeto (Projeto TCC): Análise da Atividade anti-inflamatória e Determinação da Toxicidade Aguda de Varronia Globosa