

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Varronia globosa*

Malu Maria Lucas dos Reis¹; Natanael Teles Ramos de Lima²; Karla Joane da Silva Menezes³; Camila de Albuquerque Montenegro⁴; Ivana Maria Fechine⁵

*Discente de Doutorado da Universidade Federal do Pernambuco – UFPE*¹(malureisduarte@gmail.com); *Discente de Mestrado na Universidade Federal da Paraíba*² (teles.natanael@gmail.com); *Discente de Graduação da Universidade Estadual da Paraíba*³ (menezeskarla5@gmail.com); *Professora Doutora da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)*⁴ (camontenegro2502@gmail.com); *Professora Doutora Associada-Departamento de Farmácia-Universidade Estadual da Paraíba*⁵ (ivana.fechine@gmail.com)

RESUMO

A espécie *Varronia globosa*, popularmente conhecida como “Maria Preta”, destaca-se por ser utilizada pela população no alívio das dores reumáticas e cólicas menstruais. O objetivo do trabalho visa realizar uma quantificação de flavonoides e avaliar a atividade anti-inflamatória do EEB do caule de *V. globosa*. A metodologia adotada foi a usual de preparo do extrato etanólico bruto (EEB) e o teste de ação anti-inflamatória foi realizado de acordo com o modelo de peritonite aguda. Uma exsiccata encontra-se depositada no herbário Lauro Pires Xavier e catalogada com o número (JPB 36075). O pó seco do caule foi submetido à maceração com etanol, fornecendo 9,39 g de EEB. A quantificação de flavonoides foi realizada por espectrofotômetro, as análises foram realizadas em triplicata. Para o ensaio da atividade, camundongos foram divididos em quatro grupos, CN: Salina 0,9%, CP: Dexametasona 5 mg e o EEB nas doses 250 mg/kg e 500 mg/kg. Após 30 min do tratamento, realizou-se a indução da inflamação por carragenina. Aguardou-se 4 horas, anestesiou-se os animais, e, administrou-se 2 mL de EDTA, o exsudato foi colhido para realizar a contagem total de leucócitos. Para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA e pós-teste de *Dunnnett* com GraphPadPrism®. A quantificação de flavonoides mostrou uma concentração de 10,55 mg/g. Diante dos resultados concluiu-se que o EEB reduziu significativamente a migração leucocitária nas doses de 250 mg/kg 500 mg/kg, sugerindo uma possível atividade anti-inflamatória do EEB do caule da espécie estudada.

Palavras-chaves: Maria Preta; Flavonoide; Atividade Anti-inflamatória.

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 semissintéticas ou modelos para obtenção de análogos sintéticos com o intuito de obter um fito medicamento. (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. (WAGNER et al, 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 e 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 farmacológico constataram a atividade espasmolítica e vasodilatadora do extrato etanólico (95%) em cobaias. Agra (2004)

A espécie *Varronia globosa* (*Cordia globosa*) teve sua constituição química elucidada que descreve a presença de flavononas SILVA (2010), sendo a única da família Boraginaceae a produzir tais metabólitos.

Diante disso, esta análise foi direcionada a quantificação e estudo dos flavonoides desta espécie, por fim, avaliar o potencial anti-inflamatório desta planta medicinal, de modo a viabilizar estudos de prospecção para uma futura formulação de fitoterápico.

2. METODOLOGIA

2.1 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"). O material vegetal foi processado na cidade de Campina Grande – PB no Laboratório de Fitoquímica na Universidade Estadual da Paraíba. A exsiccata encontra-se no Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba sob a inscrição *Varronia globosa* Jacq. Brasil: Paraíba: Santa Luzia, M. F. Agra 6561- 01/03/2006 (JPB 36075). O pó seco do caule foi submetido à maceração exaustiva com etanol, fornecendo 9,39 g de extrato etanólico bruto (EEB).

2.2 Análise fitoquímica quantitativa de flavonoides do EEB do caule de *V. globosa*

A determinação do conteúdo de flavonoides MEDA et al (2005) iniciou – se a partir da alíquota de 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de AlCl₃ 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 AlCl₃. A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 µg/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 µg/mL. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

2.3 Ensaios atividade farmacológica do EEB do caule de *V. globosa*

2.3.1 Animais para os experimentos *in vivo*

Foram utilizados 40 camundongos Swiss (*Mus musculus*), separados em grupos (machos e fêmeas). Para realização dos experimentos,

os animais foram submetidos a um jejum de 12 h para a realização do protocolo de atividade anti-inflamatória.

2.3.2 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, com 6 animais cada grupo, 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.

2.3.3 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 *Dunnnett* para o protocolo de peritonite, analisados com o software GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, EUA, considerando-se o nível de significância mínimo $p < 0,05$.

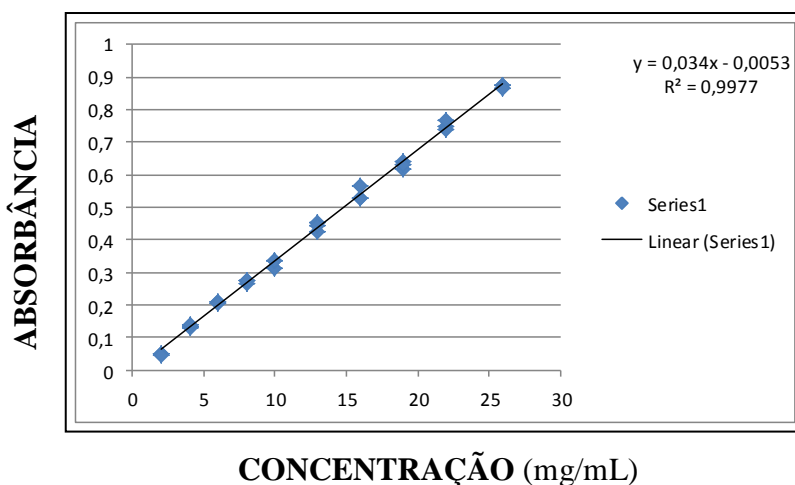
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Do total de 180,16 g de pó do caule foi obtido 9,39 g do EEB como um rendimento aproximado de 5,21 %. O teor de flavonoides foi determinado para amostra do EEB das folhas de *V. globosa*, utilizando o ensaio com solução de cloreto de alumínio, segundo metodologia descrita por MEDA et al., 2005. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em MEOH, ocorrendo na análise em espectrofotômetro uma maior intensidade na absorção e maiores desvios em comprimentos de onda mais altos. Sendo assim, torna-se possível quantificar os flavonoides evitando a interferência de outras substâncias com esqueleto carbônico similar, promovendo assim uma leitura mais específica das amostras a serem analisadas.

A quantificação de flavonoide, foi realizada a partir de uma curva de calibração, que tornou possível verificar a linearidade do método a partir o “R”, o qual se encontra dentro da legislação vigente durante a realização dos testes (RE 899, 2003 ANVISA), esta resolução menciona que é possível garantir a linearidade do método quando o R= 0,99. A partir do gráfico 1, é possível identificar o R= 0,997, O “R = 0,997” indicando linearidade satisfatória do método. Portanto, a técnica aplicada possibilita resultados confiáveis para quantificação de flavonoides.

A curva de calibração foi obtida a partir da leitura de absorbância de variadas concentrações de Quercetina, por meio da delimitação do limite de quantificação (LQ = 0,884) que justifica o fato da concentração de Quercetina ter sido iniciado em 2 µg/mL.

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



Fonte: dados da pesquisa

Logo, a partir do valor médio das absorbâncias obtidas para as soluções dos extratos e da equação da reta fornecida pela curva de calibração ($y = 0,034x - 0,0053$) a concentração de flavonoides foi obtida, e registrada na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados oriundos da quantificação de flavonoides

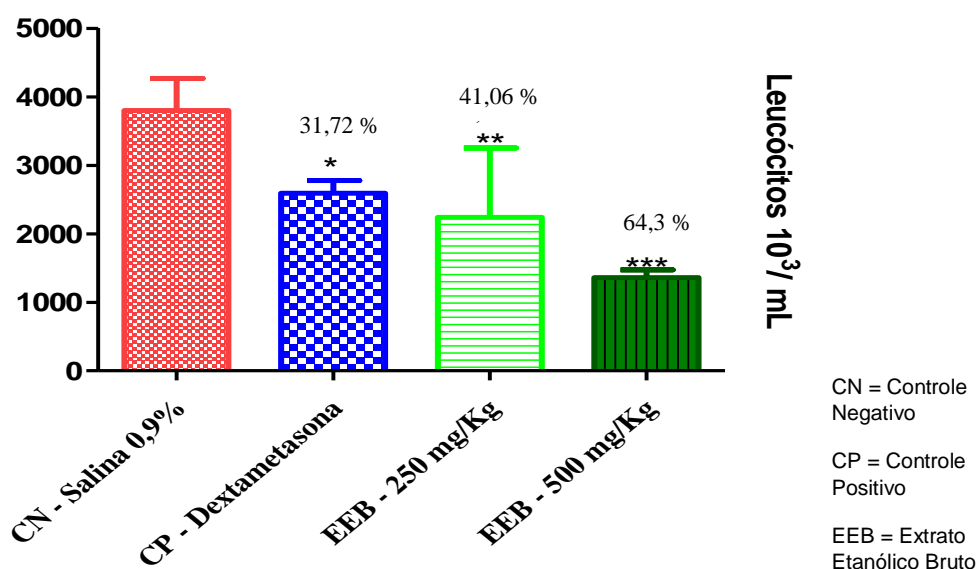
Conc. (µg/mL)	Flavonoides (µg/mL)	D.P. (±µg/mL)	Flavonoides (mg/g)	D.P. (± mg/g)
500	5,27	0,34	10,55	0,68

Fonte: dados da pesquisa

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*. Realizado o teste de quantificação dos flavonoides, revelando uma quantidade significativa desse metabólito e aliado ao uso na medicina tradicional optou-se por realizar a avaliação da atividade anti-inflamatória a partir do modelo de peritonite aguda em camundongo *swiss*, nos fornecendo dados importantíssimos a cerca dessa espécie, até então pouco estudada. Durante o experimento, identificou-se como que o ápice da migração leucocitária ocorreu após o período de 4 horas da administração da carragenina, sendo que o resultado obtido encontra-se representado no gráfico 2.

Gráfico 2. Migração leucocitária no modelo experimental *in vivo* de peritonite aguda.



A partir da análise do gráfico 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. A dexametasona inibiu apenas 31,72%, considerando-se inferior ao potencial anti-inflamatório da espécie estudada.

Portanto, em alusão aos indícios descritos, pode-se atribuir um potencial anti-inflamatório à espécie *Varronia globosa*, sendo que este esteja 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.

CONCLUSÃO

Os flavonoides foram quantificados por um método simples, robusto e eficaz, previamente validado, nos fornecendo a quantidade de flavonoides totais de 10,55 mg/g. A partir do ensaio anti-inflamatório foi possível afirmar que ao aumentar a dose do EEB nos tratamentos, a atividade anti-inflamatória se intensificou e que quando comparado aos grupos controle negativo e controle positivo apresentou-se com resultado significativo.

Através deste trabalho conclui-se que são necessários ainda estudos mais aprofundados dessa espécie para a verificação dos compostos bioativos presentes e o isolamento dos mesmos, para devidos testes biológicos com substância isolada, visto que todos os testes até aqui foram feitos com extrato (EEB).

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.

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.

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 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.

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.

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

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

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.

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.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-indulced 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.

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.