



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E ABORDAGEM
FARMACOLÓGICA DE *Justicia acuminatissima* (MIQ.)
BREMEK. (ACANTHACEAE)**

MARIA CHRISTINA DOS SANTOS VERDAM

Manaus, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL

MARIA CHRISTINA DOS SANTOS VERDAM

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E ABORDAGEM
FARMACOLÓGICA DE *Justicia acuminatissima* (MIQ.)
BREMEK. (ACANTHACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Patologia Tropical da Universidade Federal do
Amazonas para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr.(a). Maria de Meneses Pereira

Co-orientador: Prof. Dr.(a) Débora Teixeira Ohana

Manaus, 2009

Ficha Catalográfica
pela Biblioteca Central da UFAM)

(Catalogação realizada

Verdam, Maria Christina do Santos

V483e

Estudo farmacognóstico e abordagem farmacológica de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. (Acanthaceae) / Maria Christina dos Santos Verdam. - Manaus: UFAM, 2009.

105 f.; il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientadora: Dr^a. Maria de Meneses Pereira

Co-orientador: Dr^a. Débora Teixeira Ohana

1. Farmacobotânica 2. Farmacognosia 3. Plantas medicinais 4. *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek I. Pereira, Maria de Meneses (Orient.) II. Lima, Ohana, Débora Teixeira (Orient.) III. Título

CDU 615.322(043.3)

AGRADECIMENTOS

Talvez essa seja a parte mais difícil de toda a dissertação, isso porque graças a Deus são muitos os nomes que devem constar aqui. As coisas na vida acontecem sem que possamos entender toda a sua dimensão naquele momento...

Começo essa seção agradecendo a duas pessoas fundamentais na minha vida e na minha trajetória: Alberto Japp e Chaiana Wolff. Sempre acreditei que amigos são flores que Deus coloca no nosso jardim para colorir a vida. Minha vida não seria a mesma sem vocês dois, obrigada pelo apoio, pelo carinho, pelas conversas e os cafés que tomamos juntos.

Falando das flores coloridas não poderia deixar de relatar aqui todos do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), local onde meu amor pela ciência começou. Não tenho palavras para expressar todo o meu afeto por todos de lá, em especial Halliny, Livia, Kássia, Ivana, Tati, Paula, Elisangela, Cris, Anne, Ivaldo e os meninos da síntese Daniel, Leandro Sotter, Leandro, Bruno, Samir e Daniel, com quem aprendi muito, não apenas de espectros mas também sobre a vida. E muito, muito, muito carinhosamente mesmo ao professor Ricardo Kuster, uma pessoa a quem admiro muito e que me ensinou a ter humildade sempre.

Mas os anos foram passando e em meio a tantas provas, seminários e cromatografias em coluna, reapareceu em minha vida um amigo de infância... Júnior, que em pouco tempo se tornou mais que meu amigo, se tornou meu anjo, meu namorado, e hoje meu esposo. Obrigada por suas palavras de incentivo, por ser um exemplo de humildade e de serenidade e por sempre acreditar que conseguiríamos ficar juntos mesmo com quase 4500 Km de distância por 7 meses.

Esse amor me trouxe a Manaus, onde Deus me brindou com duas novas flores para meu jardim: Maria Meneses e Débora Ohana. Minhas duas orientadoras, as quais eu admiro

infinitamente. Conviver com as duas me ensinou mais do que a Farmacognosia e a Fitoquímica poderiam ensinar. Foram dois anos de muito crescimento pessoal, escutando seus conselhos e observando suas atitudes sempre corretas frente as situações do dia a dia. Não teria como agradecer por tudo, mas tentarei: obrigada.

Não seria justo e não poderia deixar de relatar o imenso apoio que recebi da linda família Oliveira e da família Maquiné aqui em Manaus. Muito obrigada por todo o apoio, em especial obrigada Brenda por ser uma prima muito querida e amiga de muitos momentos de conversa. Beijos!

O mestrado não apenas trouxe novas metodologias e artigos, trouxe pessoas maravilhosas para meu convívio. Algumas que me deram conselhos, ajudas e dicas, que me atenderam prontamente como podiam e que tornaram possível o trabalho de hoje: Professor Fábio Moroni, Professora Maria Cristina dos Santos (lhe admiro muito mesmo), Professora Gal (aprendi muito na tarde em que lemos as lâminas de botânica), Ressiliane Prado, Professora Maria Silvia de Mendonça e Professor Émerson Silva Lima.

Além desses, minhas amigas queridas Fernanda Guilhon por ser a irmã mais velha do laboratório e ter ido a frente abrindo os caminhos, Alcineide Magalhães por todo o apoio nos experimentos e pelas tardes filosóficas de conversa. A Gleyce Barbosa pelo apoio em todos os testes farmacológicos e também sempre que preciso. Aos alunos do Laboratório de Estresse Oxidativo Aplicado (LEOA) e a Jane e Andréia por fazerem parte do laboratório de Fitoquímica. Gleica e Rodrigo meus dois queridos amigos que compartilharam tardes, fotografias e conversas agradáveis. Amo vocês. Não poderia deixar de citar a querida Luciana Funes, minha amiga querida com a qual partilhei muitos momentos, inclusive preparativos para o meu casamento e o dela.

Mas não teria como terminar sem agradecer as duas pessoas mais engraçadas, divertidas e espetaculares que eu tenho, e que tudo me deram e fizeram sempre – Mamãe e

Papai. Obrigada pai, por sua sabedoria, por me ensinar a ter prudência sempre e aceitar o que vier da vida fazendo o melhor possível para lidar com as situações. E obrigada mãe, por me fazer seguir sempre, não importa o que aconteça e como aconteça, sei que devo seguir em frente.

Obrigada a todos os meus amigos, que são pessoas queridas que me ajudaram nessa mágica trajetória chamada vida.

RESUMO

Justicia acuminatissima (Miq.) Bremek. é um membro da família Acanthaceae, conhecida popularmente como sara tudo e utilizada na Amazônia sobre a forma de chás para tratamento de processos inflamatórios. Apesar do seu uso, não há na literatura informações acerca de seus constituintes químicos, ações farmacológicas, nem mesmo dados toxicológicos. Não há tão pouco, informações que forneçam suporte farmacobotânico permitindo sua correta identificação. Desta maneira, o presente trabalho realizou a abordagem farmacognóstica da espécie fazendo sua caracterização farmacobotânica, traçando um perfil fitoquímico da mesma, avaliando a toxicidade no modelo de toxicidade aguda e abordando farmacologicamente a atividade atribuída ao vegetal, além de atividades correlacionadas, tais como agregação plaquetária, coagulação sanguínea e a capacidade ulcerogênica. A caracterização farmacobotânica forneceu ferramentas para a correta identificação, descrevendo os tipos de tecido e sua organização no vegetal bem como as estruturas presentes, tais como os tricomas e estômatos. O perfil fitoquímico descreveu a presença de cumarinas, esteróides, saponinas, taninos condensados e catequinas, sendo a presença de cumarinas considerada de grande importância, dada a sua raridade na família Acanthaceae. Os ensaios farmacológicos realizados se basearam no conhecimento popular acerca do uso dessa espécie. O extrato empregado utilizou como solvente a água, visando se aproximar daquele feito pela população. O extrato aquoso se mostrou seguro no ensaio de toxicidade aguda e a atividade antiinflamatória foi verificada no modelo da formalina e confirmada no ensaio do edema de pata. Além disso, o extrato testado não apresentou poder ulcerativo, apesar de sua atividade antiinflamatória. Os resultados obtidos nesse trabalho reafirmaram a premissa de que o uso popular serve como triagem para o achado de produtos de origem vegetal, com atividades benéficas ao homem, uma vez que a atividade antiinflamatória está de fato presente no extrato aquoso obtido a partir das folhas deste vegetal. O presente trabalho contribuiu com a caracterização de mais uma espécie da flora amazônica, fornecendo informações que podem auxiliar no correto uso de plantas medicinais e ser ponto de partida para estudos posteriores.

Palavras-chave: *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek., farmacognosia, inflamação.

ABSTRACT

Justicia acuminatissima is a member of Acanthaceae family, known under the name of “sara tudo” and used in Amazonian in different kinds of teas for treatment of inflammatory process. Despite the use, there isn't in the literature information about the chemical constituents, pharmacological action, or toxicological data. There is not information that gives pharmacobotanical support that could help in correct identification. The present work did a pharmacognostical approach of this specie, performing pharmacobotanical characterization, describing a phytochemical profile, evaluating the toxicity in the acute model of toxicity and addressing pharmacological activity attributes to the plant, and correlated the same activities, such as platelet aggregation, blood clotting and ulcerogenic capacity of it. The pharmacobotanical characterization provides tools for the correct identification, describing the kind of issues and this organizations in the vegetable with the structures that are present as if trichomas and stomatas. The phytochemical profile describes the presence of coumarines, steroids, saponins, tannins and catechins. The coumarines presence is considerate very important because this presence is rare in the Acanthacea family. The pharmacological tests were based in the popular knowledge of the use of this specie, thus the extract were done with water as solvent, order to approach the use made by the population. The aqueous extract was safe in the acute toxicity model and the antiinflammatory activity was verify in the formalin model, and were confirmed in the rat paw edema. Besides, the extract don't show ulcerative power despite its antiinflammatory activity. The results in this work reaffirm the premiss that the popular uses serves as screening for the finding of natural products with beneficial activities for man, since the antiinflammatory activity is in fact present in the aquos extract of the leaves oh this vegetable. The present work contribuites with the characterization of one more specie of the Amazonic flora, providing informations that can help in the correct use of medicinal plants and can be starting point for further studies.

Keywords: *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek, pharmacognosy, inflammation.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Dor e inflamação	18
2.2	A família Acanthaceae e o gênero <i>Justicia</i>	22
2.3	<i>Justicia acuminatissima</i> (Miq.) Bremek. – sara tudo	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	METODOLOGIA	38
4.1	Operações preliminares	38
4.1.1	Coleta do material	38
4.1.2	Conservação das amostras	38
4.1.3	Secagem e pulverização	38
4.1.4	Preparo dos extratos	39
4.2	BOTÂNICA	40
4.2.1	Identificação da espécie	40
4.2.2	Descrição botânica macroscópica	40
4.2.3	Descrição botânica microscópica	40
4.2.3.1	Cortes histológicos	40

4.2.3.2	Dissociação da epiderme foliar	41
4.2.3.3	Testes histoquímicos	41
4.3	FITOQUÍMICA	42
4.3.1	Prospecção fitoquímica preliminar	42
4.3.1.1	Teste para investigação de heterosídeos cianogênicos	42
4.3.1.2	Teste para detecção de saponinas	42
4.3.1.3	Teste para detecção de alcalóides	43
4.3.1.4	Teste para cumarinas	43
4.3.1.5	Teste para glicosídeos cardioativos	43
4.3.1.5.1	Reação de Libermann- Burchard	44
4.3.1.5.2	Reação de Kedde	44
4.3.1.5.3	Reação de Legal	44
4.3.1.5.4	Reação de Baljet	44
4.3.1.5.5	Reação de Keller-Kiliani	45
4.3.1.6	Prospecção do extrato hidroalcoólico	45
4.3.1.7	Teste para detecção de esteóides livres e triterpenóides pentacíclicos livres	46
4.3.1.8	Teste para fenóis, taninos hidrolisáveis e taninos condensados ..	46
4.3.1.9	Teste para detecção de antocianinas, antocianidinas flavonóides	47
4.3.1.10	Teste para detecção de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	47

4.3.1.11	Teste para detecção de flavonóis, flavonas, flavononóis e xantonas	48
4.3.2	Dessecação até peso constante	48
4.3.3	Partição Líquido-Líquido	49
4.3.4	A cromatografia	49
4.3.5	Análise espectrométrica do extrato aquoso e das frações	49
4.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	51
4.4.1	Agregação plaquetária	51
4.4.2	Coagulação sanguínea	52
4.4.2.1	Tempo de protrombina (TP)	52
4.4.2.2	Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)	53
4.5	TESTES FARMACOLÓGICOS	53
4.5.1	Animais utilizados nos testes farmacológicos	53
4.5.2	Preparo das soluções utilizadas nos testes farmacológicos ...	54
4.5.3	Toxicidade aguda	54
4.5.4	Teste da formalina	55
4.5.5	Teste do edema de pata	55
4.5.6	Teste da lesão gástrica induzida por Indometacina	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	BOTÂNICA	58
5.1.1	Descrição botânica macroscópica	58

5.1.2	Descrição botânica microscópica	60
5.1.3	Testes histoquímicos	65
5.1.4	Dissociação da epiderme foliar	67
5.2	FITOQUÍMICA	69
5.2.1	Prospecção fitoquímica preliminar	69
5.2.2	Dessecação a peso constante	71
5.2.3	Partição líquido-líquido	73
5.2.4	A cromatografia	74
5.2.5	Análise espectrométrica do extrato aquoso e das frações	75
5.3	TESTES BIOLÓGICOS	82
5.3.1	Agregação plaquetária	82
5.3.2	Coagulação sanguínea	82
5.4	TESTES FARMACOLÓGICOS	83
5.4.1	Toxicidade aguda	83
5.4.2	Teste da formalina	83
5.4.3	Teste do edema de pata	86
5.4.3	Teste da lesão gástrica induzida por Indometacina	90
6	CONCLUSÃO	93
	Referências Bibliográficas	95
	ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Avaliação da variação do volume do edema na pata do animal em pletismômetro	56
Figura 2	Estômagos fixados em parafina observados em lupa	58
Figura 3	Disposição oposta-cruzada das folhas de <i>Justicia acuminatissima</i> (Miq.) Bremek.	60
Figura 4	<i>Justicia acuminatissima</i> (Miq.) Bremek.....	60
Figura 5	Estudo anatômico da lâmina foliar de <i>Justicia acuminatissima</i> (Miq.) Bremek.	62
Figura 6	Pecíolo observado em corte transversal	63
Figura 7	Caule em corte transversal	64
Figura 8	Testes histoquímicos na lâmina foliar de <i>Justicia acuminatissima</i> (Miq.) Bremek.	66
Figura 9	Epiderme adaxial de <i>Justicia acuminatissima</i> (Miq.) Bremek....	68
Figura 10	Epiderme abaxial de <i>Justicia acuminatissima</i> (Miq.) Bremek. ...	68
Figura 11	Resultados positivos encontrados na pesquisa de metabólitos secundários	71
Figura 12	Perfil cromatográfico das frações obtidas na partição líquido-líquido	73
Figura 13	Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração Diclorometano	74

Figura 14	Cromatografia em camada fina, fração C2 6-10	75
Figura 15	Estômagos de animais tratados com Indometacina	91
Figura 16	Estômagos de animais tratados com Extrato	92

INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta dos tecidos às injúrias. Compreende uma série de reações locais e sistêmicas que vão desde o recrutamento de diferentes tipos celulares até a retirada de materiais estranhos do organismo (BARBOSA-FILHO et al., 2006). As reações inflamatórias são caracterizadas por dor, edema, aumento de temperatura e perda de função. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são a classe de medicamentos mais utilizados pelas populações, porém os efeitos colaterais são elevados. No mundo todo, a medicina popular faz grande uso de espécies vegetais para o tratamento de processos inflamatórios. No entanto, sua real eficácia e seus princípios ativos permanecem desconhecidos, sendo de extrema importância estudos que demonstrem suas atividades (FALCÃO et al, 2005). Desta maneira, diferentes abordagens vêm sendo utilizadas na avaliação das atividades antiinflamatórias de produtos naturais (BARBOSA-FILHO et al., 2006).

Sabe-se que a utilização de espécies vegetais com finalidades terapêuticas é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade e que apesar da enorme evolução da medicina alopática, a população carente com baixo acesso aos programas de saúde e dificuldade na obtenção de exames e medicamentos, faz intenso uso das plantas medicinais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, 80% das pessoas dos países em desenvolvimento tem na medicina tradicional seu único apoio, sendo 85% da medicina tradicional o uso de extrato de plantas (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2005). A desarticulação das políticas públicas no atendimento básico de saúde vem gerando um aumento pela busca de alternativas mais viáveis economicamente, aumentando assim o consumo de espécies medicinais (AZEVEDO; SILVA, 2006).

A floresta amazônica apresenta riqueza de espécies vegetais dotadas de princípios ativos que despertam o interesse mundial como fonte para a produção de medicamentos

(PAES; MENDONÇA, 2008). Há ainda muito a se estudar sobre as espécies presentes nessa região, levando em consideração a riqueza de conhecimento acumulado pela população cabocla, dado o seu ecossistema único com vasta flora, com espécies vegetais com aplicações ornamentais, alimentares e medicinais. A escolha do estudo de uma espécie vegetal, baseada no uso populacional, funciona como um caminho para a descoberta de novos fármacos, uma vez que muitos grupos populacionais fazem uso de espécies vegetais de maneira empírica tendo vasto conhecimento acumulado (REZENDE; RIBEIRO, 2005).

O interesse acadêmico pelo conhecimento que estas populações detêm tem crescido. Muitas espécies já apresentam comprovação científica dos benefícios que podem trazer a sociedade e o conhecimento acerca do uso feito com as mesmas permite que sejam pensadas estratégias de consumo sustentáveis a longo prazo (AMOROZO, 2002). A pesquisa de plantas medicinais hoje tem na aplicação de conhecimentos locais uma ferramenta, deixando para trás a subestimação desse conhecimento, sendo necessária uma ciência que priorize as necessidades locais da sociedade e da comunidade científica (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Na região norte do Brasil, uma espécie pertencente a Família Acanthaceae, membro do gênero *Justicia*, é utilizada por grupos populacionais com finalidades terapêuticas antiinflamatórias. Trata-se da espécie *Justicia acuminatissima*, (Mik.) Bremek., popularmente conhecida como Sara Tudo. Esse vegetal é comumente utilizado pelas comunidades do interior do Amazonas com finalidade ornamental e medicinal (SANTOS, 2006). No município do Careiro Castanho, na Comunidade Nossa Senhora de Nazaré – Vila do Purupuru, no Estado do Amazonas, a população faz uso de chás, sob a forma de infusão, decocção e maceração, utilizando para isso as folhas do arbusto, para cura e alívio de processos inflamatórios. Na literatura consultada não foram encontrados estudos feitos com essa espécie, não se tendo, até o momento, nenhum conhecimento sobre sua caracterização

farmacobotânica, nem mesmo as atividades biológicas ou seus constituintes químicos. Desta forma, seu uso ainda não tem base científica comprobatória.

Uma vez que o uso de produtos naturais é uma realidade no mundo todo, para o desenvolvimento de fármacos é essencial o estudo farmacognóstico das espécies, assegurando a correta identificação de produtos de origem vegetal através da caracterização morfo-anatômica, observando a forma de produção, o controle de qualidade, a composição química, a elucidação estrutural, assim como o estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas (RATES, 2001).

O estudo da espécie *Justicia acuminatissima* (Mik.) Bremek virá contribuir para o conhecimento mais detalhado das propriedades farmacológicas de espécies de flora brasileira, justificando ou não o seu uso popular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dor e inflamação

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão. A dor, portanto, é um importante sistema de auxílio na detecção de doenças, pois é uma resposta orgânica protetora que alerta o indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos e que promove respostas reflexas que tentam controlar o dano tecidual, sendo chamada de dor aguda. Quando a dor se sustenta por um período prolongado, é denominada dor crônica (VITOR et al., 2008). A dor pode ser classificada segundo o tipo de lesão e/ou os mediadores envolvidos. A dor nociceptiva é aquela provocada por estímulo excessivo de nociceptores. A dor neurogênica ocorre quando há lesão do tecido neuronal, a dor neuropática ocorre por disfunção de um nervo e a psicogênica está associada a fatores psicológicos (PERAZA et al., 2007). Assim, o sistema nervoso sensorial é capaz de perceber e reagir a estímulos externos, diferenciando estímulos inócuos dos agressores pela expressão de proteínas transdutoras. As histórias de trauma, as infecções virais, as doenças vasculares, os distúrbios endócrinos e metabólicos, a deficiência nutricional e os processos inflamatórios contribuem para a estimulação do sistema nervoso, alterando a expressão de canais iônicos, modificando a expressão de receptores, alterando a distribuição de neurotransmissores e neuromediadores, permitindo que neurônios atinjam mais rapidamente o limiar de despolarização (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006).

A partir do momento de uma lesão, muitos tipos celulares são recrutados ao sítio local, e liberam diferentes substâncias químicas com atividades químicas e biológicas variadas, como por exemplo, monócitos e leucócitos polimorfonucleares são recrutados e

liberam fatores solúveis de regulação da fase aguda, denominados citocinas. Os leucócitos migram ao local da lesão, em um processo que envolve desde a ativação endotelial, até a liberação de moléculas de adesão, quimiocinas e óxido nítrico. Muitas células estão envolvidas no processo, e mesmo células do tecido lesionado liberam radicais oxidantes de oxigênio e nitrogênio, promovendo rompimento de mitocôndrias, liberação de enzimas líticas, destruição de membranas e dano ao DNA, induzem grande número de fatores transcricionais, que promovem transcrição de produtos gênicos que codificam enzimas, citocinas, receptores de superfície celular, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios. Não apenas espécies reativas de oxigênio são formadas, substâncias endógenas que atuam como mediadores da inflamação também são produzidas como, por exemplo: bradicinina, serotonina, produtos da cascata do ácido aracdônico, adenosina, histamina e citocinas liberadas pelas células imunes, como a Interleucina- 1 β (IL-1 β), Fator α de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento do nervo (NGF). Uma vez liberados, os mediadores inflamatórios, promovem conjuntamente alteração na transdução periférica do estímulo nociceptivo, aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores de elevado limiar. Além disso, a estimulação dos nociceptores de aferentes primários, produz reflexo axônico local, resultando na liberação de neuropeptídios contribuindo para uma maior estimulação do processo inflamatório e da hiperalgesia. Os mecanismos de transdução neuroquímica da dor envolvem diversos eventos como interação com canal iônico de membrana, com canais iônicos operados por receptores, receptores associados a tirosina cinase ou ainda a receptores acoplados a proteína G, como os receptores da bradicinina e das Prostaglandinas. A transdução nociceptiva está fortemente associada a atuação em receptores inflamatórios específicos acoplados a proteína G, que quando ativada promove formação de segundos mensageiros como AMP cíclico ou GMP cíclico, que ativam proteínas cinases intracelulares, ou ainda de terceiros mensageiros como o cálcio que interfere em outros mecanismos como a

regulação de canais iônicos. Os principais sistemas efetores dos receptores dos mediadores da inflamação são representados pela adenilciclase, guanilciclase, Fosfolipase C (PLC), fosfolipase A₂ (PLA₂), tirosina cinase e canais iônicos. Assim a ligação com cada receptor desencadeia diferentes vias bioquímicas por diferentes mecanismos podendo levar a hiperalgesia, o que se observa, por exemplo, em uma pequena parcela de nociceptores chamados silenciosos encontrados em vias aferentes que podem ficar irresponsivos a estímulos de grande intensidade, porém ao serem estimulados por mediadores inflamatórios se mostram sensibilizados e responsivos a estímulos sensoriais. Desta forma, há dois grupos de mediadores inflamatórios que são importantes na transmissão nociceptiva, os que promovem sensibilização dos nociceptores (hiperalgesia), como prostaglandinas e citocinas e os que ativam nociceptores sensibilizados, como a bradicinina (CARVALHO, LEMÔNICA, 1998).

Portanto, o tratamento da dor deve se basear na etiologia e fisiopatologia da dor e nas suas repercussões, desta maneira, o uso de fármacos analgésicos e substâncias capazes de diminuir a condução inflamatória são utilizados no tratamento da dor, visando melhorar a qualidade de vida do paciente (VITOR et al., 2008).

O conhecimento da fisiopatologia da dor permite pensar em fármacos analgésicos modernos, que inibam a produção e ou liberação do mediador, ou promovam bloqueio de receptores ativados, ou ainda inibam as enzimas envolvidas na síntese dos mediadores inflamatórios como a Cicloxigenase-2 (COX-2) e a Fosfolipase A₂. Além disso, os inibidores COX-1 e os inibidores COX-2 seletivos são largamente utilizados para tratamento da dor, inflamação e febre (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Sabe-se, que há três isoformas da enzima cicloxigenase (COX) conhecidas, COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é constitutiva e expressa em condições fisiológicas, sintetiza prostaglandinas, garantindo a homeostase, uma vez que muitas delas desempenham funções importantes na fisiologia humana. Na

inflamação, a expressão da COX-2 é induzida, e aumenta a concentração dessas substâncias. (SAKATA; ISSY, 2008), já a COX-3, está possivelmente envolvida no mecanismo primário de redução da dor e da febre pelos fármacos de ação analgésica e antipirética (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004). As prostaglandinas exercem tanto o importante papel na homeostasia como também exercem papel na gênese dos sinais e sintomas do processo inflamatório, como dor, hiperalgesia, destruição dos tecidos, eritema, edema e febre.

Muitas são as espécies vegetais utilizadas no Brasil para cura de processos inflamatórios, tais como a aroeira-do-sertão, *Myracrodruon urundeuva* Fr, ALL, da família Anacardiaceae, utilizada no nordeste (ALBUQUERQUE; RODRIGUES; VIANA, 2004), o confrei, *Symphytum officinale*, membro da família Borraginaceae (RITTER et al., 2002), a calêndula, *Calendula officinales* pertencente a família das Asteraceae (BALDUCCI-ROSLINDO; SILVIO; MALAGOLI, 1999). As virtudes terapêuticas desses vegetais são em geral descritas por observações populares e essas informações foram acumuladas durante séculos (MACIEL et al., 2002), esse conhecimento tradicional do uso de espécies vegetais medicinais funciona como um filtro para a indústria gerando inovações ou sugerindo atividades (REZENDE; RIBEIRO, 2005), já que os produtos naturais vêm sendo reconhecidos como uma importante fonte de medicamentos efetivos terapêuticamente (BARBOSA-FILHO et al., 2006), uma vez que a importância dos produtos naturais para a terapêutica atual parece inestimável. Moléculas naturais tem sido base do surgimento de moléculas protótipo, auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos, além de fornecerem ferramentas importantes no estudo de farmacologia, fisiologia e bioquímica (RATES, 2001).

É importante ressaltar que as plantas produzem substâncias químicas assim como outros seres vivos que podem sim, atuar de maneira benéfica sobre os seres vivos e também de forma tóxica, sendo por isso necessário o estudo químico, farmacológico e toxicológico

para que seu uso seja seguro, em especial das plantas nativas brasileiras, dada a ampla utilização de espécies ditas medicinais (RITTER et al., 2002).

2.2 A família Acanthaceae e o gênero *Justicia*

A família Acanthaceae recebe destaque dentre as muitas famílias vegetais presentes na flora brasileira. Compreende cerca de 40 gêneros e 542 espécies (BRAZ; CARVALHO-OKANO; KAMEYAMA, 2002), apresenta grande quantidade de compostos químicos (PEREZ; 2004), sendo conhecida por apresentar espécies vegetais usadas como medicamento para a febre e para a dor (CHEN et al., 1996).

A maior concentração das espécies no Brasil está na Mata Atlântica e nas formações florestais mesófilas das regiões Sudeste e Centro-Oeste, ocorrendo também em outras formações vegetais (KAMEYAMA, 2006). Em geral, seus constituintes são ervas prostradas ou eretas, subarbustos, arbustos ou trepadeiras e com menor frequência encontramos árvores, com folhas simples e geralmente opostas decussadas e sem estípulas, sendo comum a presença de cristólitos. As inflorescências são variadas ou encontram-se flores solitárias (BRAZ; CARVALHO-OKANO; KAMEYAMA, 2002).

Um dos gêneros da família Acanthaceae de maior riqueza quanto ao número de espécies, é o gênero *Justicia*, não se podendo afirmar ao certo seu número de representantes na flora brasileira. As espécies deste gênero se apresentam como ervas perenes ou subarbustos eretos ou escandentes, com folhas pecioladas de margem íntegra. Assim como na família, os cristólitos estão presentes. As inflorescências apresentam-se em espigas, panículas ou cimpos sendo mais raras as flores solitárias, que são terminais e/ou axilares.

As brácteas e bractéolas são em geral conspícuas, imbricadas. Observam-se sépalas em número de cinco que são concrecidas na base e iguais entre si, raramente um segmento está ausente ou reduzido. A corola apresenta coloração variada, é bilabiada com o lábio

posterior apresentando limbo dividido em dois, e o anterior dividido em três. Verificam-se dois estames que concrecem desde a base até a fauce da corola, com estaminódio ausente. A antera apresenta duas tecas que em geral são desiguais e superpostas, algumas são por vezes oblíquas. A teca inferior algumas vezes se apresenta reduzida, calcarada ou apiculada. O conectivo se apresenta expandido e o ovário é cilíndrico com dois óvulos por lóculo. A cápsula em geral é clavada com porção basal estéril, sólida e desenvolvida. Percebem-se quatro sementes nas cápsulas sendo planas, esféricas e orbiculares, por vezes reniformes ou obcordadas (BRAZ; CARVALHO-OKANO; KAMEYAMA, 2002).

O gênero *Justicia* demonstra ser um gênero rico em metabólitos secundários, tais como lignanas e derivados aminados, (AL-JUAID, ABDEL-MOGIB, 2004), além disso, há presença de cumarinas na espécie *Justicia pectoralis*, amplamente utilizada no norte, nordeste (LINO et al., 1997) e sudeste (MARTINS; SENNA-VALLE; PEREIRA, 2005) do Brasil, com atividade antiinflamatória já bem descrita na literatura (FALCÃO et al., 2005), que apresenta como seus princípios ativos as cumarinas 1,2-benzopirona e umbeliferona (OLIVEIRA et al., 2000).

Muitas espécies vegetais desse gênero vêm sendo estudadas no mundo todo, demonstrando diferentes atividades biológicas e constituintes químicos extremamente interessantes. Estudos revelam que se trata de um gênero rico em substâncias com atividades: antitumorais, antivirais, inseticidas, cardiotônicas, analgésicas, inibidoras da peroxidação lipídica, antiinflamatórias e inibidoras da agregação plaquetária, além da atividade depressora e estimulante do sistema nervoso central (NAVARRO et al., 2001).

No Brasil, duas espécies desse gênero são amplamente utilizadas pela população para tratamento de processos inflamatórios: *Justicia pectoralis* e *Justicia gendarussa*. *Justicia pectoralis* está presente no México, Venezuela, Trindade, Cuba, Jamaica, Oeste do Equador, Norte e Nordeste do Brasil. Já *Justicia gendarussa* predomina a Oeste da África e Índia e no

nordeste brasileiro. Essas duas espécies, por apresentarem semelhanças morfológicas receberam nomes populares iguais, sendo corriqueiramente chamadas de “chambá” e “anador” (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000). Para serem utilizadas com finalidade antiinflamatória são preparados decoctos ou infusões das folhas das espécies. A 1,2-benzopirona e a umbeliferona são os principais constituintes identificados em infusões metanólicas das folhas de *Justicia pectoralis*, sendo ainda identificada a presença de quercetina e camferol, o que reforça seu uso popular. Já na espécie *Justicia gendarussa*, nenhum derivado cumarínico foi detectado, sendo detectados flavonóides glicosilados (OLIVEIRA et al., 2000).

Outras espécies do gênero também apresentaram atividade antiinflamatória, tais como *Justicia prostrata* Gamble e *Justicia spicigera*. *Justicia prostrata* Gamble é utilizada na medicina popular sob a forma de chás como antidepressivo, no entanto, quando testada quanto a sua atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata, demonstrou boa atividade, com máximo de supressão na primeira hora do teste, sugerindo suprimir a liberação dos primeiros mediadores da via bioquímica da inflamação tais como: histamina, serotonina e cininas (SANMUGAPRIYA; SHANMUGASNDARAM; VENKATARAMAN, 2005). *Justicia spicigera* é utilizada como antiinflamatória pela medicina popular mexicana. Estudos com esta espécie demonstraram atividade antiedematogênica de seu extrato metanólico (MECKES et al., 2004). Outras atividades biológicas, além da atividade antiinflamatória, vêm sendo descritas para o gênero *Justicia*, como por exemplo, *Justicia procumbens* é utilizada tradicionalmente na medicina de Taiwan, seu extrato etanólico demonstrou 50% de inibição da agregação plaquetária, quando testado com ácido aracdônico (CHEN et al., 1996). Na África a espécie *Justicia insularis* é utilizada em associação ou sozinha para cura de distúrbios menstruais. Quando testada, associada a *Aloe buettneri* e *Dicliptera verticillata*, demonstrou aumentar a produção de estradiol e progesterona nos ovários de ratos fêmeas

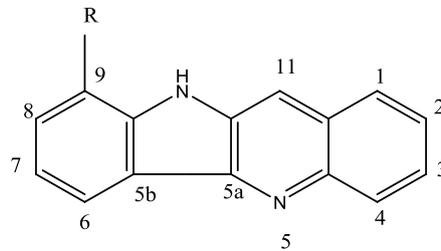
(TELEFO; MOUNDIPA; TCHOUANGUEP, 2004). De uma forma geral, muitas substâncias foram isoladas no gênero *Justicia* e alguns trabalhos com extratos utilizados pelas populações já foram testados. A tabela 1 reúne alguns trabalhos com testes biológicos e farmacológicos realizados com extratos de plantas pertencentes a este gênero. A tabela 2 trata de substâncias isoladas de espécies do gênero *Justicia*, algumas com atividades biológicas testadas e outras não.

Tabela 1. Extratos de espécies do gênero *Justicia* com atividades biológicas testadas

Espécie	Parte do vegetal	Extrato	Atividade Biológica Testada	Referências
<i>Justicia pectoralis</i> Jacq., var	Folhas	Hidroalcolico	Antiinflamatória	LINO et al, 1997
<i>Justicia secunda</i> Valh	-	Aquoso	Antimicrobiana	ROJAS; OCHOA; OCAMPO, 2006
<i>Justicia pectoralis</i>	Folhas	Hidroalcolico	Antinociceptivo, Antiinflamatório e Broncodilatador	LEAL et al., 2000
<i>Justicia gendarussa</i>	Folhas	Aquoso	Inibição da Transcriptase Reversa do HIV-1	WORADULAYAPINIJ; SOONTHORNCHAREONNON; WIWAT, 2005
<i>Justicia simplex</i> (com associações)	Raízes	Aquoso	Redução da natalidade	BADAMI et al., 2003
<i>Justicia prostrata</i> gamble	Planta inteira	Hidroalcolico	Antiinflamatória	SANMUGAPRYA; SHANMUGASUNDARAM; VENKATARAMAN, 2005
<i>Justicia chlorostachya</i> Leonard	Folhas	Etanólico	Antimicrobiana	PINO-BENITEZ; C.CORDOBA, 2007

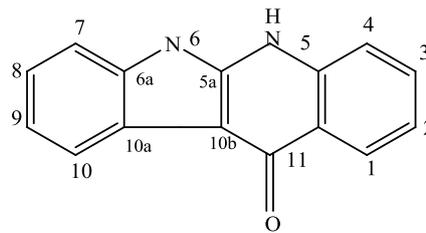
Tabela 2. Principais substâncias isoladas de espécies isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Justicia*

Justicia betonica (SUBBARAJU et al., 2004)

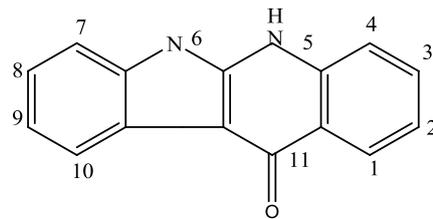


1: R=OGlc Jusbetonina

2: R=H 10-H quindolina

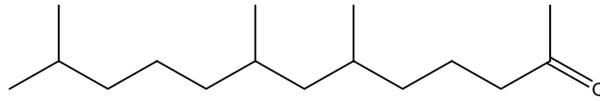


6-H quinindolina

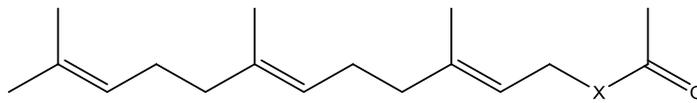


5H, 6H- quindolin-11-ona

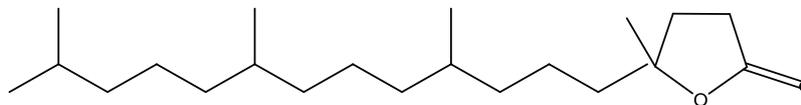
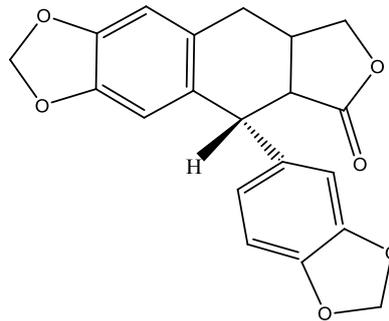
Justicia heterocarpa (AL JUAID; ABDEL-MOGIB, 2004)



Hexahidrofarnesilacetona

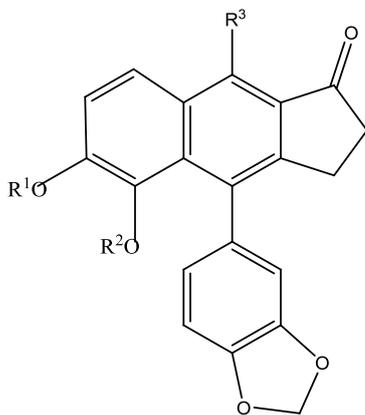


- 1: X=CH₂ farnesilacetona
2: X= O farnesil acetato



Fitol (4R,8R,12R)-4-hidroxi-4,8,12- ácido tetrametilheptadecanoico lactona

Justicia hyssopifolia (NAVARRO et al., 2001)



Tranquilizante

Sedativo hipótico

Analgésicos Narcóticos

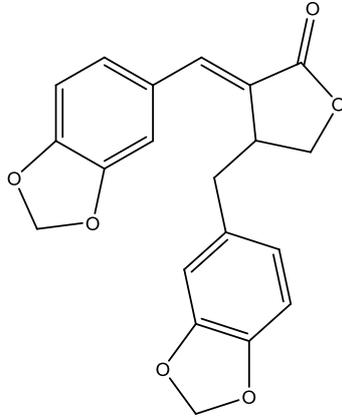
Citotóxico para linhagens celulares leucêmicas

Atividade contra linhagens celulares para melanoma e câncer renal

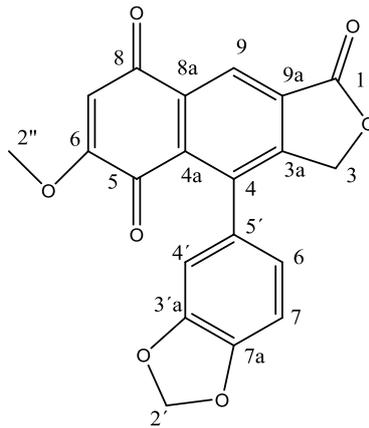
1: R1= O-CH₂-O e R3= OMe Elenosídeo

2: R1= H R2= Glc e R3= H Aglicona

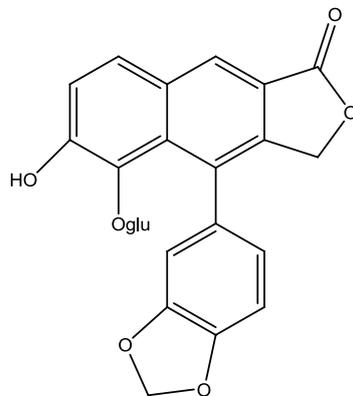
Justicia hyssopifolia (PÉREZ et al., 2004)



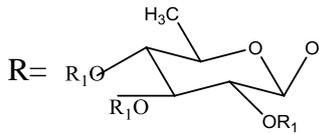
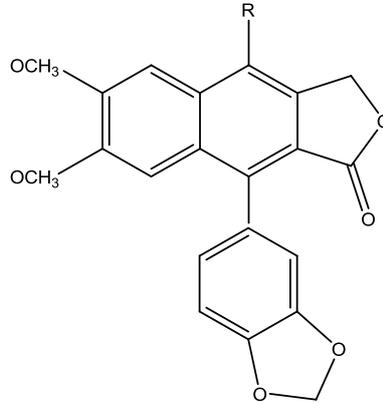
Savinina



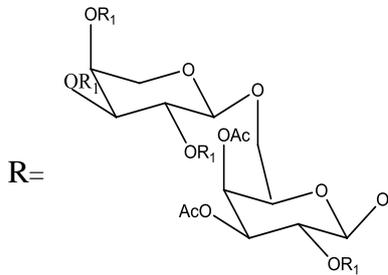
4-(1,3-benzodioxol-5-il)-6 metoxinaftol [2,3-*c*] furan-1,5,8 (3H)-triona - Justicidona



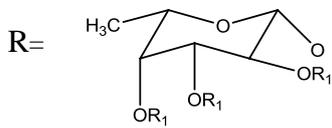
Justicia patentifolia (SUSPLUGAS et al., 2005)



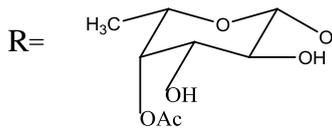
R₁= H patentiflorina A
R₁= Ac



R₁= H 4''- O-acetilmanantosídeo B
R₁= Ac

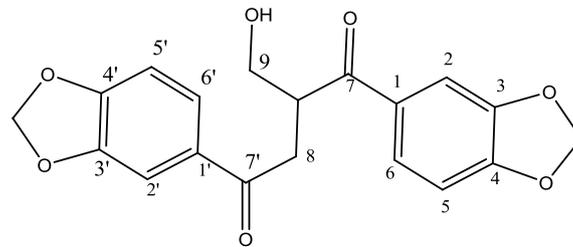


R₁=H patentiflorina B
R₁=Ac

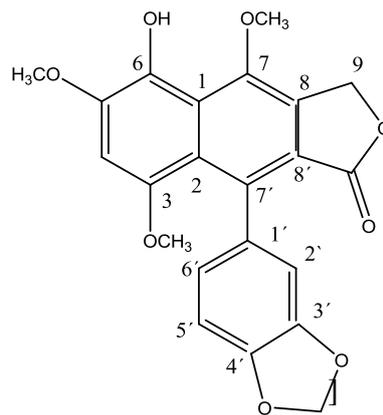


4''-O- acetilpatentiflorina B

Continuação da tabela *Justicia patentifolia* (SUSPLUGAS et al., 2005)

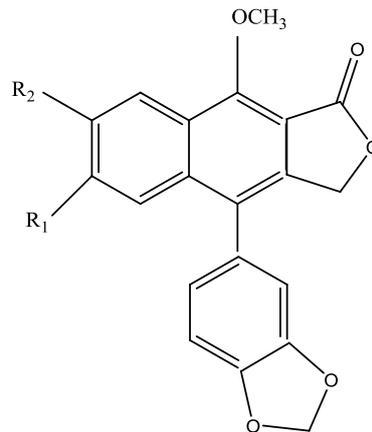


Justiflorinol



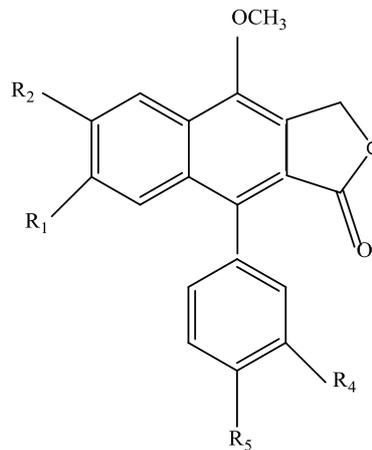
Justicinol

Justicia procumbens (CHEN et al., 1996).



1 : R1-R2= -O-CH₂-O- Neojusticina A Inibição da agregação plaquetária

5: R1=R2 = -OCH₃ Neojusticina



2: R1=R2 = -OCH₃ R3= -OH R4-R5=OCH₂O Justicidina B

3: R1=R2=R3= -OCH₃ R4-R5= OCH₂O Justicidina A

4: R1-R2= R4-R5= -OCH₂O R3= -OCH₃ Taiwan E metil éter

6: R1-R2= -O-CH₂-O R3=R4=R5-OCH₃ Chinensinaftol metil éter

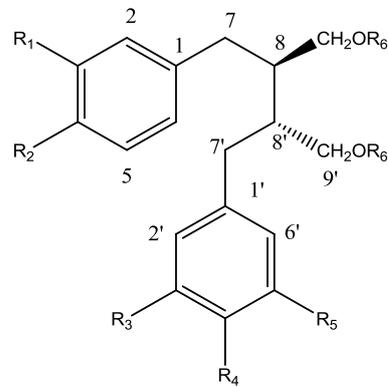
7: R1-R2= -O-CH₂-O R3=R4= -OCH₃ R5= -OH 4'-dimetilchinensinaftol

8: R1-R2=R4-R5= OCH₂O R3=OH Taiwanina E

9: R1-R2= -OCH₂O R3=OH R4-R5= -OCH₃ Chinensinaftol

10: R1=R2= -OCH₃ R3= -OH R4-R5= -OCH₂O Difilina

Justicia procumbens (CHEN; HSIN. HUANG, 1998)



- 1: R1-R2= O-CH2-O, R3=OCH3, R4=OH, R5=H, R6=Ac Justin A
 - 2: R1-R2= O-CH2-O, R3=R4=R5=OCH3, R6=Ac (-) dihydroclusina diacetato
 - 3: R1=R2=R3=R4=OCH3, R5=H, R6=Ac secoisolariciresinol dimetil éter diacetato
 - 4: R1=R2=R3=R4=R5=OCH3, R6=Ac 5'-metoxy-4,4'-di-O-metilsecolariciresinol diacetato
 - 5: R1-R2=O-CH2-O, R3=R5=OCH3, R4=OH, R6=Ac Justin B
 - 6: R1=R2=R3=R5=OCH3, R4=OH, R6=Ac Justin C
 - 7: R1-R2=O-CH2-O, R3=R4= OCH3, R5=H, R6=Ac 2,3-dimetoxysecisolintetrano acetato
 - 8: R1=R2=R3=R4=OCH3, R5=H, R6=H secoisolariciresinol dimetil éter
 - 9: R1=R2=R3=R4=R5=OCH3, R6=H 5-metoxi-4,4'-di-O-metilsecolariciresinol
 - 10: R1-R2=O-CH2-O, R3=R4=R5=OCH3, R6=H (-) dihydroclusina
-

2.3 *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. – sara tudo

Justicia acuminatissima (Miq.) Bremek. é uma espécie presente no Brasil, nativa da Amazônia e utilizada com finalidades ornamentais e terapêuticas, conhecida vulgarmente como sara tudo. (SANTOS, 2006).

Trata-se de um arbusto, cujas folhas são utilizadas pelas populações do interior da região norte do Brasil, em chás para cura e alívio de processos inflamatórios. Apesar de seu intenso uso no interior do Brasil não se encontra na literatura trabalhos científicos acerca das propriedades terapêuticas desta espécie. Realizando busca na base de dados científicas ISI, Web of Science não é possível encontrar trabalhos que fornecem subsídios farmacognósticos a essa espécie. No entanto nessa mesma base de dados é grande o número de trabalhos com outras espécies do gênero *Justicia*. Na base Web of science encontramos 280 trabalhos quando a busca é realizada com a palavra *Justicia*. Para dar suporte teórico a este trabalho apenas aqueles relacionados ao mesmo foram selecionados.

- Sinonímia: *Justicia calycina* (Nees) V.A.W Graham (MOBOT, 2009)
- Basinômio: *Rhytiglosa acuminatissima* Miq. (MOBOT, 2009)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar caracterização farmacognóstica da espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) (Bremek.) abordando farmacologicamente a atividade antiinflamatória atribuída e atividades relacionadas bioquimicamente à inflamação.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar caracterização macroscópica e microscópica das folhas e galhos da espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek.
- Realizar prospecção fitoquímica a fim de conhecer as classes de metabólitos secundários presentes nas folhas da espécie.
- Realizar análise fitoquímica do extrato bruto, obtido a partir das folhas do vegetal, visando obter frações enriquecidas em substâncias com potencial biológico.
- Avaliar a capacidade de inibição da agregação plaquetária *in vitro* do extrato aquoso das folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek.
- Avaliar o comportamento do extrato aquoso das folhas da espécie estudada sobre a coagulação sanguínea.

- Avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas da espécie estudada.
- Avaliar a atividade antiinflamatória *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek pelo modelo da formalina, e no modelo do edema de pata induzido por carragenina.
- Avaliar a interferência do extrato aquoso das folhas da espécie sobre o epitélio gástrico no modelo de teste da lesão gástrica induzida por indometacina.

4. METODOLOGIA

4.1 OPERAÇÕES PRELIMINARES

4.1.1 Coleta do material vegetal

Para análise fitoquímica, ramos inteiros foram coletados no Município de Manaus, Amazonas, pelo senhor José Lima, técnico do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Para a análise biológica, ramos inteiros do vegetal foram coletados no Município de Careiro-Castanho na Vila do Purupuru, pelo senhor Francisco Medeiros Cavalcante, líder comunitário da Comunidade Nossa Sra. de Nazaré – Vila do Purupuru e colaborador do projeto.

4.1.2 Conservação das amostras

Após a coleta, três ramos inteiros de três indivíduos diferentes foram acondicionados separadamente, em frascos de vidro contendo solução de água e álcool em partes iguais e gotas de glicerina para serem posteriormente submetidos a descrição botânica microscópica (OLIVEIRA; AKISUE, 2005).

4.1.3 Secagem e pulverização

O material vegetal foi colocado em estufa com circulação de ar interna, sob temperatura de 42 °C por uma semana, até que estivesse quebradiço, quando foram separados folhas e galhos da amostra. A moagem das folhas e dos galhos foi procedida em moinho de faca, separadamente, conforme orientações da literatura (OLIVEIRA; AKISUE, 1998).

4.1.4 Preparo dos extratos

Para a realização deste trabalho, dois extratos diferentes foram preparados, ambos aquosos, visando se aproximar do uso popular feito com essa espécie. Para o estudo fitoquímico, utilizou-se como critério de escolha para determinação da metodologia extrativa empregada, aquela que conferisse maior rendimento, o que foi avaliado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 4^a ed, segundo teste de dessecação a peso constante, sendo escolhido a infusão a 5%, conforme descrito posteriormente.

Para os testes biológicos e farmacológicos optou-se por mimetizar o uso popular feito com a espécie, utilizando para isso, a maceração aquosa na concentração de 10%, sendo esta a concentração aproximada do verificado junto a comunidade da Vila do Purupuru, quando utilizada pela população local.

4.2 BOTÂNICA

4.2.1 Identificação da espécie

A espécie foi classificada taxonomicamente por botânicos do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, onde duas exsicatas foram depositadas, referentes as espécies coletadas no município do Careiro Castanho e no campus do INPA, sob numeração 224414 e 224040, respectivamente.

4.2.2 Descrição botânica macroscópica

Três ramos provenientes de indivíduos diferentes foram coletados no mesmo dia em que a descrição macroscópica foi realizada. As características morfológicas das folhas e galhos da espécie vegetal foram descritas por observação a olho nu e com auxílio de lupa quando necessário (OLIVEIRA; AKISSUE, 2005).

4.2.3 Descrição botânica microscópica

4.2.3.1 Cortes histológicos

Amostras das folhas inteiras e do caule, previamente armazenadas, foram submetidas a cortes em micrótomo de mesa com aproximadamente 1 cm². Os cortes realizados nas folhas foram feitos nas regiões da nervura central, ápice, base e pecíolo. As amostras foram submetidas a processo de desidratação em gradiente crescente de concentração em solução de álcool etílico, partindo de álcool 50% onde estavam armazenadas até álcool 95%. As soluções foram trocadas de 2 em 2 horas. Os cortes foram incluídos em resina por 24 horas, conforme recomendações do fabricante: Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberger Strabe 17-

19, D-69226 Nussloch/Heidelberg) e cortadas em micrótomo de mesa. Os cortes foram corados com azul de toluidina e a montagem das lâminas foi feita em bálsamo do Canadá. (O'BRIEN et al., 1964).

4.2.3.2 Dissociação da epiderme foliar

Fragmentos da folha armazenada foram cortados com 1 cm², em formato quadrado passando pela nervura central, e acondicionados em frasco de vidro com mistura de peróxido de hidrogênio e ácido acético glacial 1:1 (v/v). O conjunto permaneceu em estufa por 24 horas a 60 °C. Em seguida, a solução foi drenada e o material permaneceu em repouso em água destilada por 48 horas, quando se observou o início da dissociação que foi finalizada com auxílio de estilete. O material foi lavado em água destilada e limpo com auxílio de pincel. O material foi corado em safranina e a lâmina montada em glicerina 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

4.3 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados com material vegetal fresco, coletado no dia do teste no campus do INPA. Foram realizados quatro testes histoquímicos nas folhas e no caule do vegetal buscando os compostos como identificados na tabela 3. As lâminas obtidas foram fotografadas com fotomicroscópio Axioskop MC80, Zeiss e fotoestereoscópio Stemi SV11 MC 80, Zeiss, do Laboratório de Botânica Agroflorestral (LABAF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os testes histoquímicos foram realizados segundo Ascensão, 2004.

Tabela 3. Testes histoquímico realizados com as folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek.

Número	Teste histoquímico	Metabólito secundário
1	Cloreto de Ferro III	Compostos Fenólicos
2	Lugol	Amido
3	Vermelho de Rutênio	Substâncias pécticas
4	Xylidine Ponceau (XP)	Radicais catiônicos protéicos

4.3 FITOQUÍMICA

4.3.1 Prospecção fitoquímica preliminar

4.3.1.1 Teste para investigação de heterosídeos cianogênicos

Foram pesados 10 gramas do material vegetal seco e pulverizado e colocados em erlenmayer de 250 mL com tampa esmerilhada adicionados de 50 mL de água destilada. À tampa da vidraria foi preso papel de filtro embebido em solução de picrato de sódio, sem que este tocasse o líquido. A vidraria foi levada ao banho-maria por duas horas a 60 °C. O aparecimento de cor castanho-avermelhado no papel, indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

4.3.1.2 Teste para detecção de saponinas

Extrato aquoso a 2% por decocção foi preparado a partir da matéria prima vegetal (MPV). O extrato foi filtrado e submetido a agitação vigorosa, onde se observou a formação de espuma. Foram adicionadas três gotas de ácido clorídrico a 10%. O não desaparecimento da espuma indica a presença de saponinas (SCHENKEL et al, 2007).

4.3.1.3 Teste para detecção de alcalóides

Foi preparado extrato por decocção com 1,00 grama da (MPV) e 20 mL de ácido clorídrico (HCl) a 10%. O extrato filtrado foi distribuído em 5 tubos de ensaio. Um dos tubos serviu como controle do teste e aos quatro restantes foram acrescentadas gotas dos reagentes: Mayer, Bertrand, Hager e Dragendorff. O aparecimento de precipitado em pelo menos dois tubos indica a presença de alcalóides (COSTA, 2002).

4.3.1.4 Teste para pesquisa da presença de cumarinas

Extrato aquoso por decocção foi preparado sob refluxo por cinco minutos, com 2,5 g. de MPV e 50 mL de etanol 70%. O extrato foi filtrado, e em um pedaço de papel de filtro foram aplicadas duas gotas do mesmo. Sobre uma destas, foi adicionada uma gota de hidróxido de potássio (KOH) 1N. A segunda gota serviu como controle do teste. O papel foi levado a lâmpada ultravioleta, onde o aparecimento de cor amarelo fluorescente, azul ou verde na mancha do extrato indica a presença de cumarinas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

4.3.1.5 Teste de glicosídeos cardioativos (RATES; BRIDI, 2007)

Foram fervidos 2 g da amostra pulverizada com 20 mL de etanol a 50 % e 10 mL da solução de acetato de chumbo a 10%, por 2 minutos. O extrato foi filtrado e o sobrenadante foi transferido para funil de separação, onde foram adicionados 15 mL de clorofórmio. A solução foi agitada e centrifugada novamente para a separação das fases, a operação foi repetida e as fases clorofórmicas foram reunidas no mesmo béquer. Alíquotas de 5 mL foram colocadas em tubos de ensaio e evaporadas à secura em banho-maria, os quais foram submetidos as reações de Libermann-Burchard, Kedde, Legal, Baljet e Keller-Kiliani.

4.3.1.5.1 Reação de Libermann-Burchard

No momento do uso, o reativo para esta reação foi preparado, misturando 5 mL de anidrido acético e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. O resíduo foi dissolvido em 1 mL do reativo, observando o aparecimento da cor castanha ou verde que indica a positividade do teste.

4.3.1.5.2 Reação de Kedde

O reativo foi preparado no momento da reação dissolvendo 100 mg de ácido 3,5-dinitrobenzóico em 10 mL de álcool comum. Ao resíduo presente no tubo de ensaio, foram adicionados 2 mL do álcool a 50 %; 2 mL de água destilada, 2 mL do reativo preparado e 2 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 1N. Após 5 minutos, ocorrendo o desenvolvimento de coloração vermelho- violácea estável, o teste é considerado positivo.

4.3.1.5.3 Reação de Legal

O reativo desta reação foi preparado no momento da análise, partindo de 30 mg de nitroprussiato de sódio solubilizados em 9,9 mL de água. Ao resíduo presente no tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de piridina ao resíduo, 0,5 mL de água, 0,5 mL da solução de hidróxido de sódio a 10% e 0,5 mL da solução do reativo. O desenvolvimento de cor foi observado, sendo o teste negativo quando o aparecimento de coloração vermelha ocorre.

4.3.1.5.4 Reação de Baljet

O reativo dessa reação foi preparado, também no momento do uso, dissolvendo 1 g de ácido pícrico em 100 mL de álcool a 50%. Ao resíduo presente em tubo de ensaio foram adicionados 2 mL do reativo. O aparecimento de coloração laranja é tido como indicativo da positividade do teste.

4.3.1.5.5 Reação de Keller-Kiliani

No momento do uso, o reativo foi preparado misturando 6 mL da solução de ácido acético glacial e 0,2 mL da solução de cloreto férrico a 9 %. O resíduo do tubo foi dissolvido em 3 mL deste reativo e seu conteúdo foi transferido cuidadosamente para outro contendo 3 mL de ácido sulfúrico concentrado sem agitar. O aparecimento de cores na zona de contato dos dois líquidos foi observado, sendo o resultado positivo se houver formação de anel vermelho pardo e a solução acética adquire lentamente coloração azul-esverdeada.

Os testes para detecção de fenóis, taninos hidrolisáveis e taninos condensados, antocianinas, antocianidinas e flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas e flavonas, flavonóis, flavonas, flavononóis e xantonas, esteróides livres e triterpenóides pentacíclicos livres foram realizados de acordo com Matos (1997), seguindo marcha analítica, iniciada pelo preparo de extrato hidroalcolico como descrito a seguir.

4.3.1.6 Preparação do extrato hidroalcolico

Extrato aquoso por decocção sob refluxo foi preparado por cinco minutos, com 2,5 gramas de MPV e 50 mL de etanol 70%. O extrato foi filtrado para balão volumétrico de 50 mL onde seu volume foi aferido. Desse extrato, 10 mL foram separados para um béquer que foi levado ao banho-maria até sua secura, para ser submetido ao teste para detecção de esteróides e triterpenóides pentacíclicos livres. O volume restante do extrato filtrado foi dividido em sete tubos de ensaio e identificados de 1 a 7, onde os testes para busca de metabólitos secundários foram realizados, como descritos abaixo.

4.3.1.7 Teste para detecção de esteróides livres e triterpenóides pentacíclicos livres

O resíduo presente no béquer que foi levado à secura foi extraído com 2,0 mL de clorofórmio. O processo foi repetido 3 vezes. A solução de extração foi filtrada gota a gota em algodão coberto com alguns centigramas de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para um tubo de ensaio bem seco. Foram adicionados 1,0 mL de anidrido acético e procedeu-se agitação. Em seguida, 3 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adicionadas e novamente procedeu-se a agitação. O rápido aparecimento de cores deve ser observado. A cor azul seguida de verde permanente indica a presença de esteróides livres. A coloração parda e vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.

4.3.1.8 Teste para fenóis, taninos hidrolisáveis e taninos condensados

No tubo 1 foram adicionadas gotas de solução de cloreto férrico (1N). O tubo foi agitado e a formação de precipitado foi observada. A interpretação do resultado foi feita conforme o quadro abaixo.

Coloração do precipitado	Grupo presente
Variável entre o azul e o vermelho	Fenóis
Azul	Taninos pirrogálicos (hidrolisáveis)
Verde	Taninos flobabênicos (condensados ou catéquicos)

Quadro1 – Dados para interpretação do resultado do teste para detecção de Fenóis, taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Fonte: MATOS, 1997

4.3.1.9 Teste para detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides

O teste foi realizado com os tubos 2, 3 e 4. O tubo 2 foi acidulado até pH 3, o tubo 3 foi alcalinizado até pH 8,5 e o terceiro tubo também foi alcalinizado até pH 11. Deve-se observar qualquer variação de cor do material, interpretando como o quadro a seguir.

Constituinte	Cor observada		
	pH 3	pH 8	pH 11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarelo
Chalconas e Auronas	Vermelho	-	Vermelho púrpura
Flavononóis	-	-	Vermelho laranja

Quadro 2- Dados para interpretação do resultado do teste para detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Fonte: MATOS, 1997

4.3.1.10 Teste para detecção de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

O tubo 5 foi acidulado com ácido clorídrico (HCl) até pH 1-3 e o tubo 6 foi alcalinizado com hidróxido de sódio (NaOH) até pH 11. Foram observadas as mudanças de cor que foram comparadas com o teste anterior. O aparecimento ou a intensificação da cor indica a presença de constituintes como os presentes no quadro a seguir.

	Ácido	Alcalino
Constituintes	Cor do meio	Cor do meio
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavonas	-	Vermelho laranja

Quadros 3 – Dados para interpretação do resultado do teste para detecção de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Fonte: MATOS, 1997

4.3.1.11 Teste para detecção de flavonóis, flavonas, flavononóis e xantonas

No tubo 7 foram adicionados centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Foram observadas mudanças na coloração da solução ao final da reação que é indicada pelo término da efervescência. O aparecimento ou intensificação de coloração vermelha indica a presença de Flavonóis, Flavonas, Flavononóis e Xantonas livres ou seus heterosídeos.

4.3.2 Dessecação até peso constante

Para escolha da metodologia extrativa empregada no preparo do extrato aquoso utilizado na análise fitoquímica, através de técnicas cromatográficas, três extratos foram preparados, com a finalidade de escolher aquela que conferisse maior rendimento. Foram eles a decocção, a infusão e o ultrassom nas concentrações de 5 e 15%. Depois de preparados, 1 mL de cada extrato foi colocado em pesa-filtro previamente tarado e levados à secura em estufa por 1 hora. A pesagem do pesa-filtro foi realizada, a cada 1 hora, até que não houvesse variação maior que 0,5 mg entre duas pesagens consecutivas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed.).

4.3.3 Partição líquido-líquido

O extrato escolhido para análise fitoquímica foi submetido a partição líquido-líquido, com gradiente crescente de polaridade, partindo de hexano, em seguida diclorometano e por último acetato de etila, a fim de que houvesse semi-purificação dos extratos através da afinidade de metabólitos secundários por afinidade com o solvente (CHECINEL FILHO, YUNES, 2001).

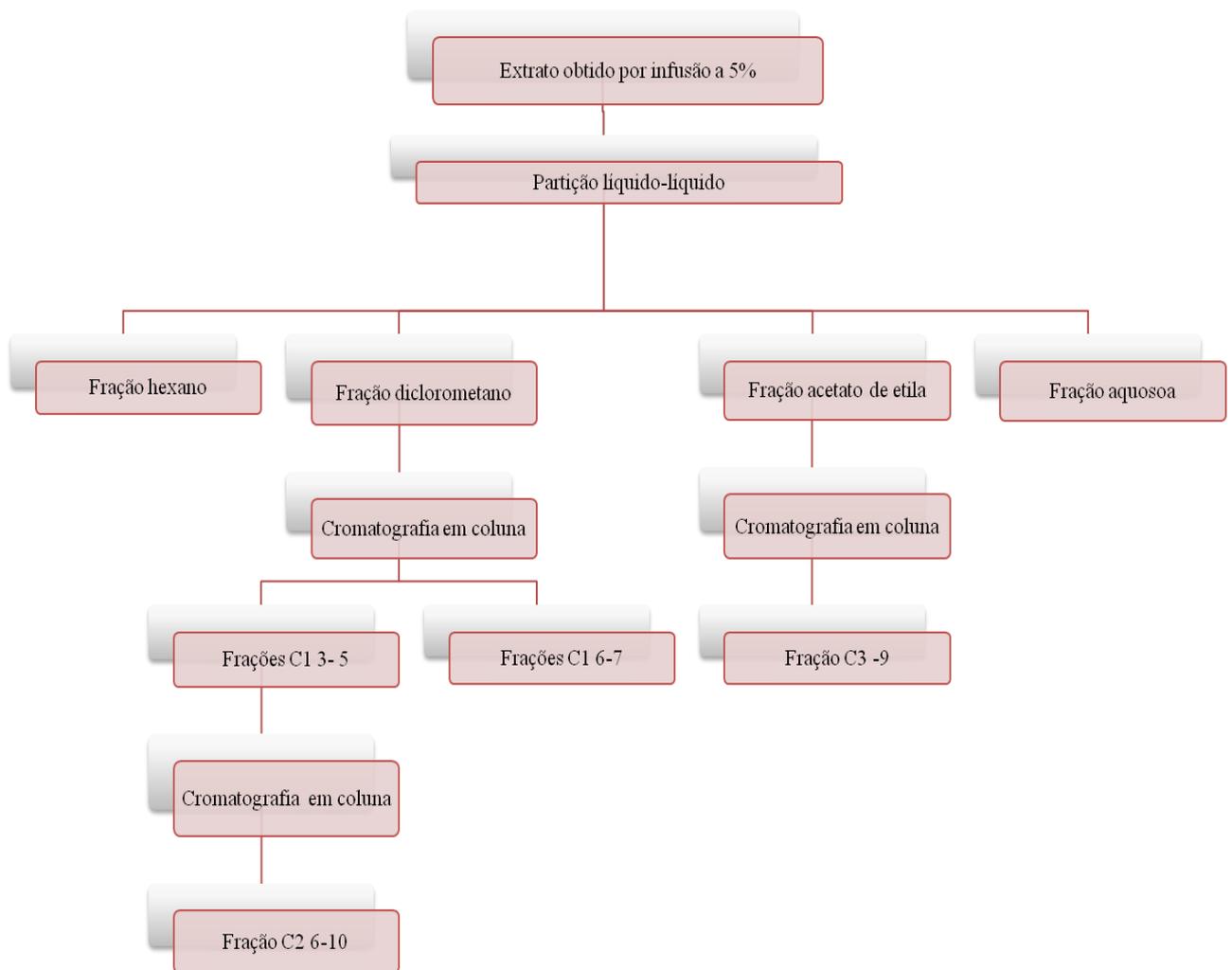
4.3.4 A cromatografia

As frações obtidas da partição líquido-líquido foram submetidas a cromatografia em camada fina (CCD), em cromatoplasmas de sílica gel 60, com o objetivo de avaliar o perfil cromatográfico de cada fração, fazendo uso dos reveladores, KOH 1N para busca de cumarinas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007) e NP, o revelador natural. De acordo com dados da literatura e avaliação dos resultados obtidos a partir da CCD a fração diclorometano foi selecionada a ser submetida à cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária a sílica gel e como fase móvel o sistema de solvente Metanol:Água (50:50). Toda a cromatografia em coluna foi acompanhada por CCD e as frações obtidas foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico.

4.3.5 Análise espectroscópica do extrato aquoso e das frações

Os extratos brutos obtidos das folhas da espécie vegetal, para análise fitoquímica e para análise biológica e farmacológica, assim como as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila e as frações selecionadas da cromatografia em coluna foram analisadas por espectroscopia de Infra-vermelho. A espectroscopia de Infra-vermelho foi realizada pela Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O fluxograma 1 resume as

etapas realizadas para a obtenção de frações enriquecidas em metabólitos secundários com interesse biológico. Partindo da metodologia empregada no preparo do extrato.



Fluxograma 1: Roteiro para obtenção de fração ricas em metabólitos secundários de interesse.

4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.4.1 Agregação plaquetária (BORN, 1962)

Amostras de plasma sanguíneo foram coletadas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e utilizadas dentro do período máximo de três horas. O teste foi realizado em agregômetro de plaquetas. As amostras foram centrifugadas, duas vezes consecutivas, por cinco minutos a 1500 rpm, com o objetivo de retirar a fração sobrenadante, chamada de Plasma Rico em Plaquetas – PRP. A plaquetometria da amostra foi avaliada em Analisador Hematológico, sendo considerado adequado para análise valores $300 \times 10^3 \pm 20$. A amostra foi centrifugada novamente, por 5 minutos a 3000 rpm, para coleta do Plasma pobre em plaquetas – PPP, que serve como branco do teste. O PRP foi incubado juntamente ao extrato em tubo a 37 °C por 1 minuto no agregômetro. Após esse tempo, o agregante plaquetário foi adicionado ao tubo, e mediu-se a porcentagem de agregação plaquetária durante 5 minutos. Os valores são comparados ao controle do teste, que foi realizado utilizando o PRP acrescido de água destilada e o agregante plaquetário. Para esse teste foi utilizado como agregante plaquetário o ADP. Os testes foram realizados em triplicatas. Os resultados foram comparados ao controle e expressos em porcentagem, seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = 100 - (\text{agregação da amostra/agregação do controle}) \times 100$$

O projeto de pesquisa teve aprovação emitido pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, protocolado sob número 038/2006 (Anexo C).

4.4.2 Coagulação sanguínea

A atividade do extrato aquoso das folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq). Bremek sobre a coagulação sanguínea foi avaliada através dos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Para tanto utilizamos o método de Brown (1998) adaptado por Osoniyi e Onajobi (2003). Os testes foram realizados em coagulômetro tendo como critério para o término, a formação do coágulo. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.4.2.1 Tempo de protrombina (TP)

Amostras de sangue de voluntários sadios foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio e centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação o PPP foi recolhido para ser utilizado no teste. Para realização deste teste utilizou-se o reagente thromboplastin-SI (extrato liofilizado de cérebro de coelho 2,6% e cloreto de cálcio 0,13%), que foi reconstituído com água destilada de acordo com o manual do fabricante, e incubado a 37 °C por 10 minutos antes do início do teste. Nesse teste, o tempo de formação do coágulo foi registrado e comparado com o controle, servindo como parâmetro do teste. O extrato foi testado nas concentrações 40, 20, 10, 5 e 2,5 mg/mL. O controle do PPP foi realizado visando avaliar a coagulabilidade do plasma. Para cada ensaio as quantidades de cada componente do teste foram colocadas como descrito na tabela 3.

Tabela3. Quantidade de reagentes para a determinação de Tempo de Protrombina

PPP (µL)	Reagente (µL)	Amostra (µL)	Tipo de amostra
50	100	-	Controle do PPP
50	96	4 (H ₂ O)	Branco
50	96	4 (Extrato)	Teste

4.4.2.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Amostras de sangue de voluntários sadios foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, o PPP foi recolhido sendo esta a fração utilizada no teste. Para esta análise utilizou-se o reagente hemoStat aPTT-EL (extrato de cérebro de coelho cloroformizado). O extrato foi testado nas concentrações de 40, 20, 10, 5 e 2,5 mg/mL . Cada componente do teste foi adicionado como na tabela .

Tabela 4- Quantidade de reagentes para a determinação de Tromboplastina parcial ativada

PPP (μL)	Reagente (μL)	CaCl ₂ (μL)	Amostra (μL)	Tipo da amostra
30	30	40	-	Controle PPP
30	30	36	4 (H ₂ O)	Branco
30	30	36	4 (Extrato)	Teste

4.5 TESTES FARMACOLÓGICOS

4.5.1 Animais utilizados nos testes farmacológicos

Para a realização dos testes farmacológicos de toxicidade aguda e formalina foram utilizados camundongos *Swiss* não isogênicos de ambos os sexos com dois meses de idade, e peso equivalente a 20 ± 2 gramas.

Para a realização dos testes de edema de pata e lesão gástrica induzida por indometacina, foram utilizados Ratos *Wistar* de ambos os sexos, não isogênicos de 2 meses de idade, e peso igual a 180 ± 20 gramas (FONSECA et al., 2007).

Para todos os testes farmacológicos foram utilizados animais de ambos os sexos, sendo o número de animais utilizados em cada teste, dividido igualmente entre machos e fêmeas.

O extrato testado em todos os testes farmacológicos foi o mesmo utilizado em todos os testes biológicos: extrato aquoso obtido por maceração a 10%.

Os animais foram recebidos do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ficaram acondicionados em gaiolas de 40x50x20 cm, recebendo ração e água *ad libitum*, com temperatura e luz controladas, ciclo 12/12 horas sendo levados à sala de testes 2 horas antes para que se ambientassem.

4.5.2 Preparo das soluções utilizadas nos testes farmacológicos

Formol – solução 2% diluída em solução salina 0,9%.

Fentanil – solução 5 µg/mL diluído em solução salina 0,9%.

Carragenina – solução 2% solubilizada em solução salina 0,9% e aquecida a 40 °C.

Indometacina – solubilizada em solução 0,1 N de NaOH com pH 8 (LUCENA et al., 2006).

4.5.3 Toxicidade aguda (Vasconcelos et al., 2007)

Visando a observação de efeitos gerais e a toxicidade aguda do extrato testado, foram utilizados 6 animais, separados em 2 grupos com três animais cada, sendo cada grupo constituído de animais machos e fêmeas, e dois animais controle um animal para cada sexo. Os animais foram mantidos em gaiolas separadamente de acordo com o sexo. O extrato foi administrado por via oral (gavagem), na dose 5000 mg/kg. Os animais foram privados de ração 12 horas antes do teste e após administração foram observados durante duas horas, a cada 15 minutos, quando seu comportamento foi observado e registrado, segundo a tabela de

observação de parâmetros em testes farmacológicos que segue em anexo (Anexo A). Decorrido este período, os animais receberam água e ração à vontade e foram observados por 15 dias.

4.5.4 Teste da formalina (LAPA et al., 2008).

Para o teste da formalina foram separados 6 grupos com 6 animais cada, sendo 2 grupos referentes aos controles com indometacina e fentanil. O terceiro grupo, controle negativo, recebeu água potável, e os três restantes receberam o extrato aquoso nas concentrações 30, 100 e 300 mg/kg. Cada animal recebeu 30 µl/L de solução de formalina 2% por via subplantar na pata direita traseira. Os animais foram observados nos primeiros 5 minutos, referentes a primeira fase da atividade nociceptiva, e dos 15 aos 30 minutos, referentes a segunda fase, após a administração de formalina. O tempo que cada animal passou lambendo ou mordendo a pata injetada foi contado, e os resultados dos animais tratados foram comparados aos controles negativos.

4.5.5 Teste do edema de pata (Winter et al., 1962; LAPA et al., 2008.)

Foram utilizados para este teste 30 ratos albinos *Wistar*, divididos em 5 grupos de 6 animais. O primeiro grupo constituiu o grupo controle positivo (indometacina) 10 mg/kg, o segundo grupo constituiu-se dos animais controle negativo (água potável) 10 mL/kg, e os três grupos restantes foram formados para as doses de 30, 100 e 300 mg/kg de peso. Os animais receberam o extrato e os controles 1 hora antes do início do teste, por via oral. Após 1 hora do tratamento, os animais receberam 0,3 mL da solução de carragenina 2%, intraplantar, na pata direita traseira. A pata esquerda traseira serviu como controle, sendo administrados nesta o mesmo volume de solução salina 0,9%. O volume do edema de pata formado foi medido com

pletismômetro na primeira hora após início do teste, e a cada hora até a quinta hora do teste. O resultado foi expresso como variação do volume da pata em relação ao volume da pata utilizada como controle. A figura a seguir mostra o momento da medida da variação do volume do edema na pata do animal em pletismômetro.



Figura1: Avaliação da variação do volume do edema de pata do animal em pletismômetro.

4.5.6 Teste da lesão gástrica induzida por Indometacina (LAPA et al., 2008).

Foram utilizados para este teste 18 animais, divididos em três grupos de 6 animais cada, um grupo referente ao extrato, outro o controle negativo (água) e o terceiro indometacina (controle positivo). Os animais receberam por via oral o extrato na dose de 300 mg/kg de peso, a água 10 ml/kg e a Indometacina na dose de 10 mg/kg. Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia etérea, e seus abdômens

foram abertos e os estômagos retirados. Cada estômago foi armazenado em solução salina 0,9% gelada até que todos fossem retirados e abertos ao longo da pequena curvatura, sendo sua mucosa lavada com solução salina delicadamente. Os estômagos foram fixados em parafina e observados em lupa. Em seguida, alguns parâmetros foram observados, os quais apresentavam pontuações, a partir dos quais foi calculado o índice de úlcera, através da somatória dos mesmos. Os itens observados bem como a pontuação de cada um estão descritos a seguir:

- | | |
|-----------------------|---------------------|
| • Coloração da mucosa | • Edema |
| Hiperêmica – 0 pontos | Leve – 1 ponto |
| Descorada – 1 ponto | Moderado- 2 pontos |
| • Pregas | Intenso- 3 pontos |
| Presente – 1 ponto | • Hemorragia |
| Ausente – 0 ponto | Leve- 1 ponto |
| • Petéquias | Moderado – 2 pontos |
| Leve – 1 ponto | Intenso – 3 pontos |
| Moderado- 2 pontos | |
| Intenso – 3 pontos | • Muco |
| • Úlceras | Leve – 1 ponto |
| Somatória das úlceras | Moderado – 2 pontos |
| presentes | Intenso – 3 pontos |

A figura 2 mostra o estômago de um animal fixado em parafina e observado em estereoscópio.



Figura 2: Estômagos fixados em parafina observados em lupa

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BOTÂNICA

5.1.1 Descrição botânica macroscópica

As espécies do gênero *Justicia* apresentam semelhanças morfológicas (OLIVEIRA et al., 2000) sendo a descrição de suas características botânica uma ferramenta de extrema importância. Dessa maneira a descrição botânica macroscópica foi realizada onde foi observado que *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. é um arbusto de aproximadamente 2 metros de altura. Suas folhas medem comumente de 9 a 13 cm de comprimento e 3 a 5 cm de altura, sendo verdes em ambas as faces. São

simples, opostas cruzadas com consistência membranácea e pilosas. Seu padrão de nervura é peninérveo. Apresenta contorno lanceolado com margens levemente crenadas. Seu ápice é acuminado e a base é cuneata. Quanto ao pecíolo é liso apresenta de 1,7 a 2,7 cm de comprimento sendo achatado, côncavo-convexo em seção transversal.

A descrição das características macroscópicas da espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. reforçam a afirmação de que há similaridade entre os membros do gênero *Justicia*. Dessa maneira, as informações acerca de suas características são de extrema importância, uma vez que muitas espécies desse gênero são utilizadas pelas populações como plantas medicinais. Essas informações podem servir como fonte para a correta determinação da espécie. Assim como descrito para *Justicia pectoralis* Jac. var. *stenophylla* Leonard, trata-se de uma erva com lâmina lanceolada, verde e de consistência membranácea. Seu ápice e base se assemelham ao descrito para *Justicia gendarussa* Burm. F, assim como a leve crenação nas margens (OLIVEIRA et al., 2000). O pecíolo se assemelha ao descrito para *Justicia zarucchii*, uma outra espécie encontrada também na região Amazônica, sendo esta porém diferente nos demais aspectos aqui observados da espécie estudada neste trabalho (WASSHAUSEN, 1984). A figura 3 mostra a disposição das folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. A figura 4 mostra o aspecto geral desta espécie.



Figura 3: Disposição oposta-cruzada das folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek.



Figura 4: *Justicia acuminatissima* (Miq) Bremek.

5.1.2 Descrição botânica microscópica

Para descrição das características microscópicas da espécie observamos a folha em sua nervura central, mesofilo e pecíolo observando a lâmina foliar como um todo e o caule. A nervura central apresenta epiderme uniseriada composta de células cúbicas. O tecido subepidérmico é constituído de colênquima angular que é interrompido por esclerênquima. Observa-se a presença de tricomas glandulares e tricomas do tipo tector, o qual pode ser visto na figura 5 no item C. Na face adaxial o colênquima é angular e interrompido por parênquima com células do esclerênquima. Voltado para a face abaxial há colênquima angular e contínuo. Após o tecido colenquimático está a matriz parenquimática de preenchimento abrigoando o feixe vascular semicircular e central com dois feixes vasculares laterais. A região intercostal é composta por epiderme adaxial com células irregulares de tamanho variado, sendo várias as inclusões de cristais de

oxalato de cálcio do tipo drusa. A epiderme abaxial apresenta células semelhantes, onde também se observam células maiores com as mesmas inclusões.

O mesofilo é dorsiventral com uma fileira de células constituintes do parênquima paliçádico, seguida de quatro a cinco camadas de parênquima lacunoso relativamente denso, onde as células estão quase justaposta (Figura 5 item B) É possível perceber por observação da região do mesofilo a presença de cutícula fina, ao longo da lâmina foliar conforme a figura 5 no item A, onde também se observa presença de estômato aberto realizando a troca gasosa. Ao nível das nervuras secundárias ocorre colênquima acima do parênquima paliçádico e abaixo da epiderme abaxial. O feixe vascular é circular semelhante aos auxiliares e não se observa células da bainha do feixe vascular. A figura 5 se refere ao estudo anatômico realizado com a lâmina foliar da espécie.

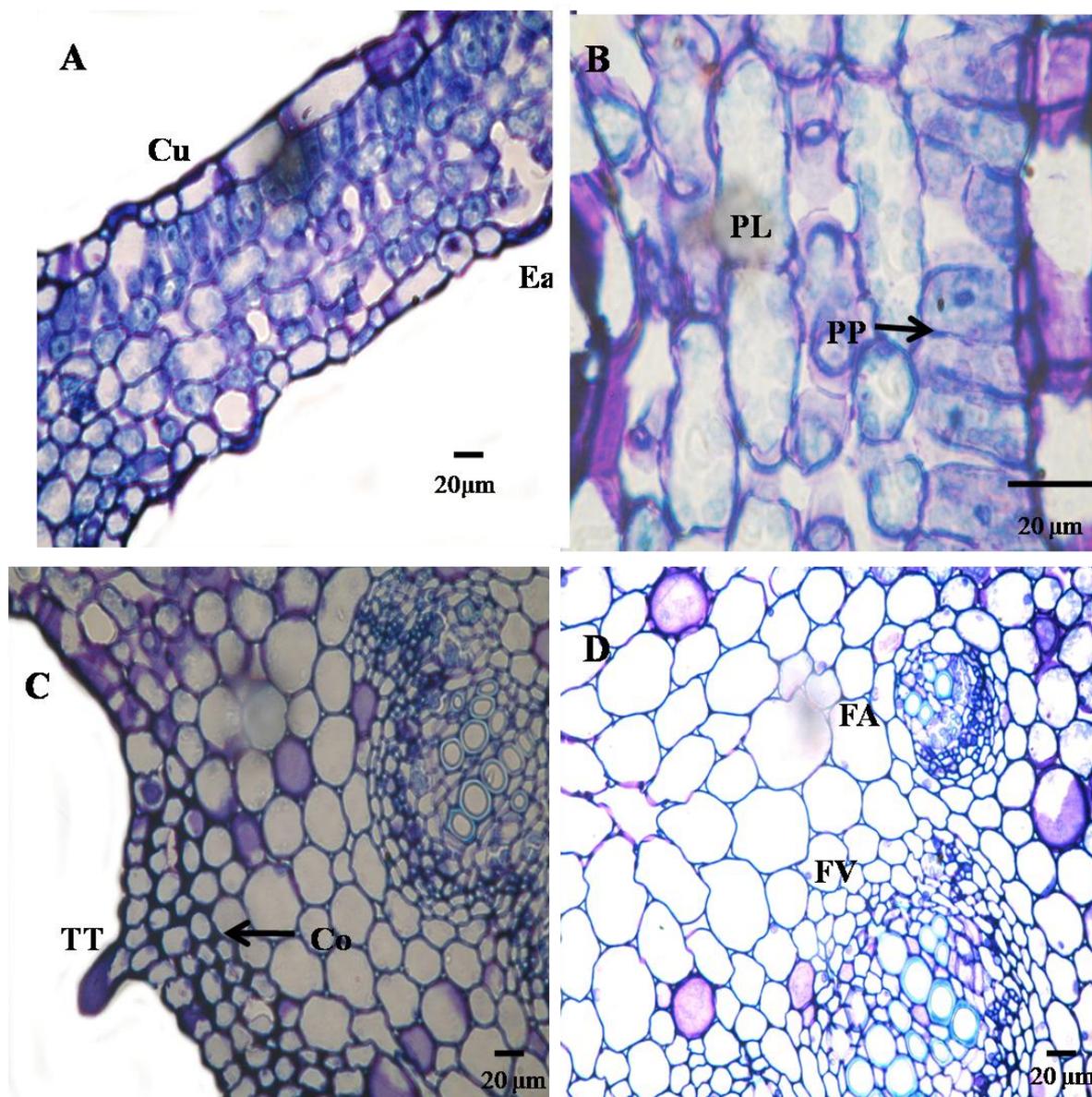


Figura 5: Estudo anatômico da lâmina foliar de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. A- Mesofilo da folha. Em destaque cutícula fina e estômato aberto. B- Organização dos parênquimas no mesofilo foliar. Parênquima paliçádico seguido por parênquima lacunoso. Foto com giro. C- Nervura central. Presença de Colênquima abaixo da epiderme. Em destaque Tricoma tector. D- Nervura central com feixes vasculares bicolaterais e feixes acessórios. Co – Colênquima. Cu – Cutícula. Ea – Estômato aberto. Fa- Feixe acessório. FV- Feixe vascular. TT- Tricoma tector.

O pecíolo apresenta epiderme uniseriada, composta de células cúbicas com parede periclinal externa espessa e paredes anticlinais com certa sinuosidade. Foram observadas células com inclusão, cristais de oxalato de cálcio, característicos de drusas. Tricomas papilares secretores foram encontrados em pequeno número. A presença de tricomas na família Acanthaceae já é conhecida e bem descrita na literatura (AKHTAR;

SYED, 2006). A região subepidérmica é ocupada por colênquima com espaçamento angular e em alguns casos chegando a ser angular. Abaixo do colênquima há presença de células parenquimáticas com bastante espaço esquizógeno. O sistema vascular é composto de um feixe central semicircular em meia lua bicolateral e dois feixes complementares circulares, o que pode ser visto por observação da figura 6 item A.

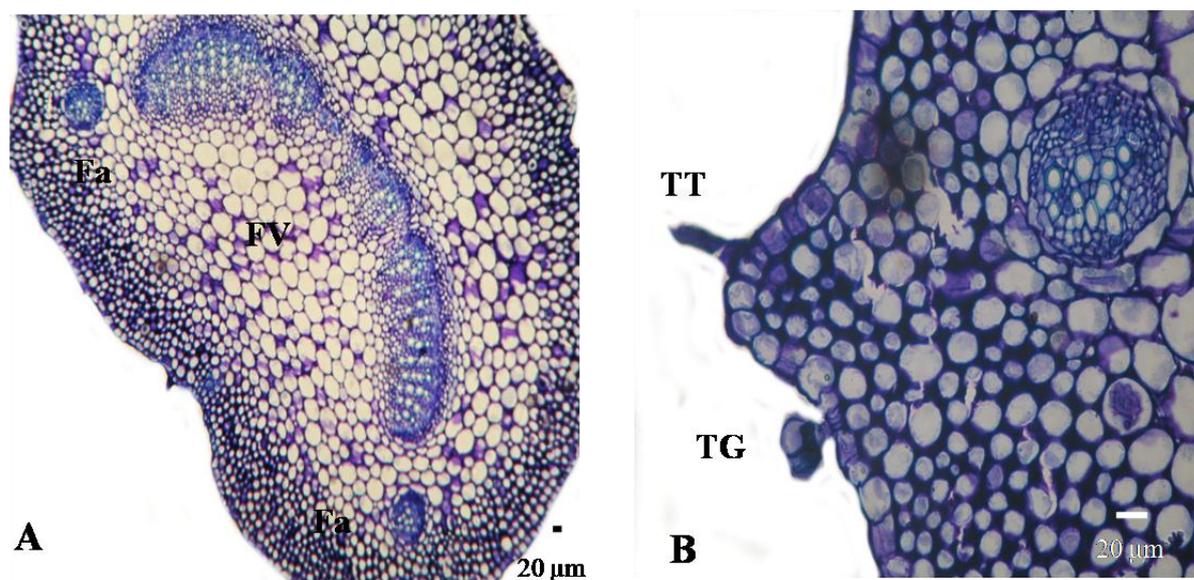


Figura 6: Pecíolo da espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. A- Vista em corte transversal do pecíolo. Em destaque os Feixes vasculares e Feixes Acessórios. B- Epiderme uniseriada. Presença de tricoma tector e tricoma glandular. Fa- Feixes acessórios. FV- Feixe vascular. TG- Tricoma Glandular. TT- Tricoma Tector.

A família Acanthaceae se apresenta como uma família onde há grande presença de espécies produtoras de cristais de oxalato de cálcio. Além disso, a presença de tricomas glandulares e não glandulares também é comum (METCALFE, CHALCK, 1957). Desta maneira, observar cristais e tricomas na espécie estudada já era esperado.

O caule de *J. acuminatissima* apresenta cutícula espessa e epiderme uniseriada composta por células cúbicas. A parede periclinal externa é espessa e as paredes anticlinais apresentam certa sinuosidade e o tecido subepidérmico é constituído por

colênquima angular. Neste tecido, em sua camada mais interna observamos a presença de cristais de oxalato de cálcio, do tipo drusa, comuns na família. Na região cortical do caule, em sua parte mais interna, há tecido parenquimático de preenchimento. O cilindro vascular é formado por vários feixes bicollaterais de floema, xilema e novamente floema em organização secundária. A figura 7 mostra algumas das estruturas encontradas no caule dessa espécie vegetal, com destaque ao estômato funcional observado no item B.

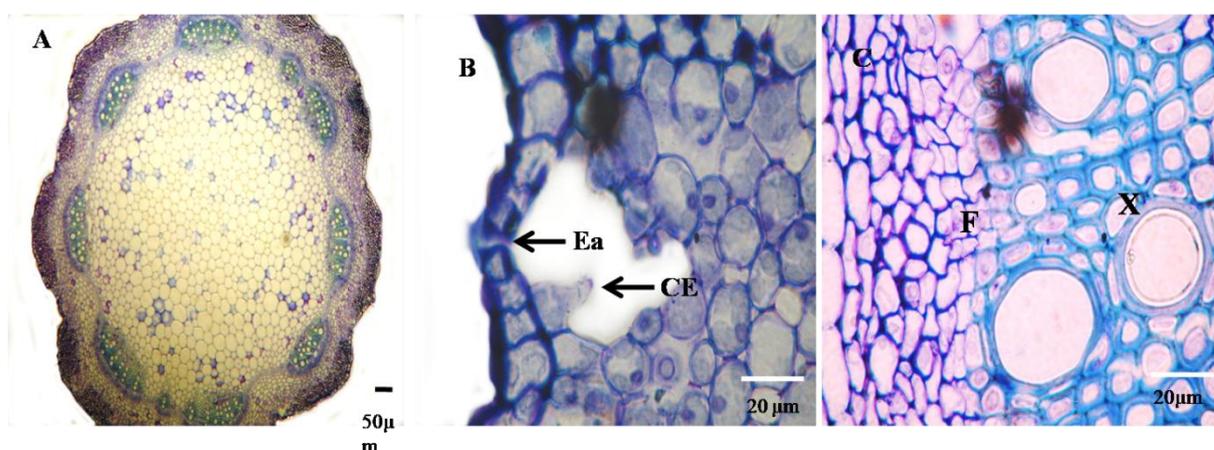


Figura 7: Caule de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. A- Vista geral do caule em corte transversal mostrando o parênquima de preenchimento e os feixes vasculares ao longo de todo o caule. B- Estômato funcional. Detalhe para a câmara estomática. C- Floema e Xilema com presença de células meristemáticas em divisão celular. CE- Câmara estomática. Ea- Estômato aberto. F- Floema. X- Xilema.

A família Acanthaceae é referendada na literatura como uma das quatorze famílias onde os cistólitos estão presentes (METCALFE; CHALK, 1957). No entanto, não foram observados cistólitos na espécie estudada, uma vez que não se observou a presença de litocistos nem de células contendo grânulos característicos de cristais de carbonato de cálcio. Porém, foram observadas muitas células contendo cristais de oxalato de cálcio, tipo drusa, o que pode estar associado à presença de grande quantidade de cálcio no solo (LARCHER; BOEGER, 2006).

A observação da anatomia foliar e do caule da espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. é uma importante ferramenta que pode auxiliar na correta identificação, dado o uso intenso na medicina popular na região norte brasileira.

5.1.3 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos realizados com as folhas da espécie demonstraram a presença de compostos fenólicos, amido e radicais protéicos, substâncias pécticas não foram observadas.

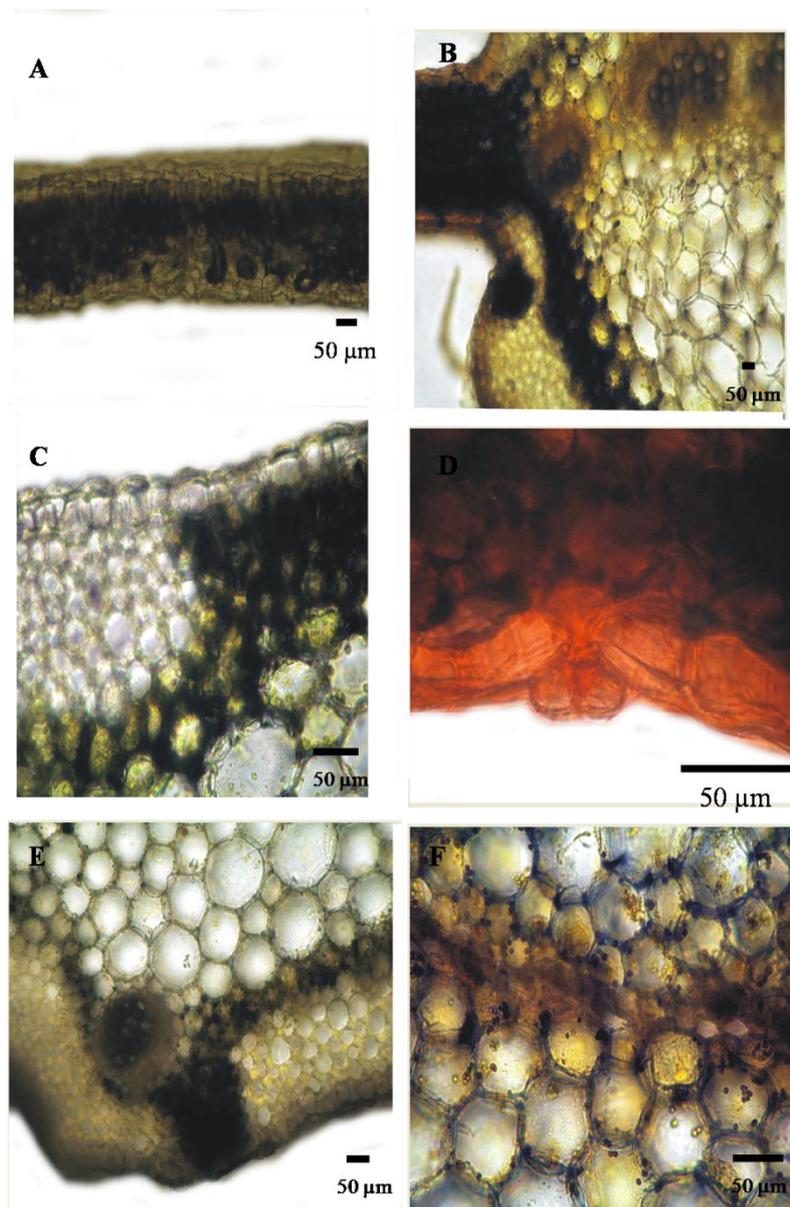


Figura 8 – Testes histoquímicos na lâmina foliar e pecíolo de *Justicia acuminatissima* (Miq) Bremek: A) Mesofilo corado em FeCl_3 . Aumento de 20x. B) Nervura Central corada com Lugol 10x de aumento. C) Folha corada em FeCl_3 40x de aumento. D) Folha aumento de 100x corado em XP. E) Pecíolo corado com FeCl_3 20x de aumento. F) Pecíolo corado em lugol 40x de aumento.

A região do tecido parenquimático presente abaixo do colênquima e que o intercala se apresenta como uma região muito rica em substâncias. Na epiderme foliar evidenciou-se a presença de proteínas. Já no pecíolo há a presença de poucos grãos de amido em torno do sistema vascular. No parênquima paliçádico do mesofilo foliar há

grande presença de compostos fenólicos que chegam mesmo a alcançar o parênquima lacunoso. A presença de compostos fenólicos também é evidenciada no caule assim como proteínas e amido. A intensa coloração do mesofilo com FeCl_3 , elucida a alta concentração de compostos fenólicos pode estar associada as atividades biológicas demonstradas por este vegetal.

5.1.4 Dissociação da epiderme foliar

O arbusto apresenta folha anfistomática, o que parece ser comum em arbustos dada a menor incidência de luz solar. As epidermes abaxial e adaxial foram observadas ao microscópio ótico e suas características são: A epiderme abaxial apresenta grande incidência de estômatos do tipo diacítico. Tricomas tectores estão presentes, sendo tricomas tectores unicelulares, uniseriados simples e tricomas tectores pluricelulares também uniseriados. As células epidérmicas apresentam parede sinuosa, e ao longo das nervuras se apresentam com contorno mais alongado. Ao longo da face abaxial da folha encontramos bases de tricomas.

A epiderme adaxial apresenta estômatos diacíticos, assim como descrito para face abaxial. Há presença de tricomas unicelulares uniseriados simples e tricomas pluricelulares. Ao longo da face adaxial, encontram-se bases de tricomas pluricelulares. As células epidérmicas se apresentam com parede sinuosa e, ao longo das nervuras, as paredes são alongadas. Há grande concentração de substância ergástica em toda a face inferior concordando com os testes histoquímicos. As figuras 9 e 10 retratam a epiderme abaxial e adaxial de *J. acuminatissima*.

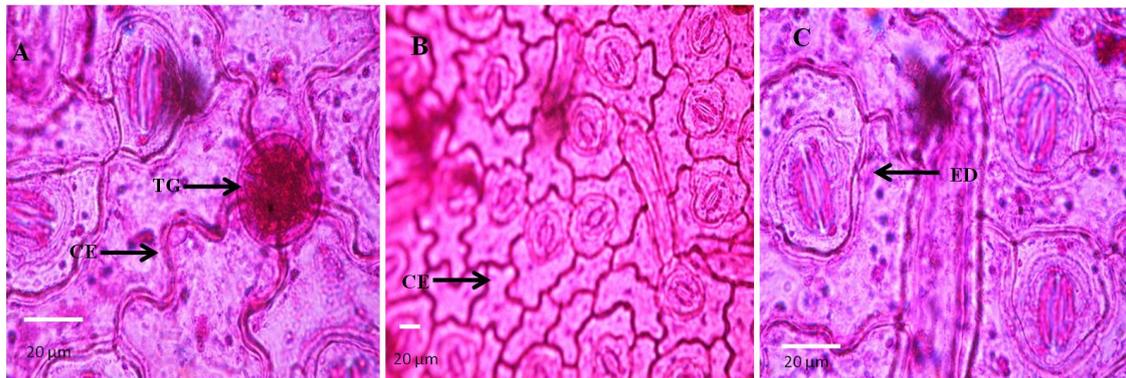


Figura 9: Epiderme abaxial de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. A- Vista frontal onde se observa a parede das células epidérmicas em contorno sinuoso. No detalhe um Tricoma glandular. B- Grande presença de estômatos e células epidérmicas com parede sinuosa. C- Detalhe do estômato, mostrando se tratar de estômato diacítico.

CE: Célula Epidérmica. TG: Tricoma Glandular. EP: Estômato diacítico.

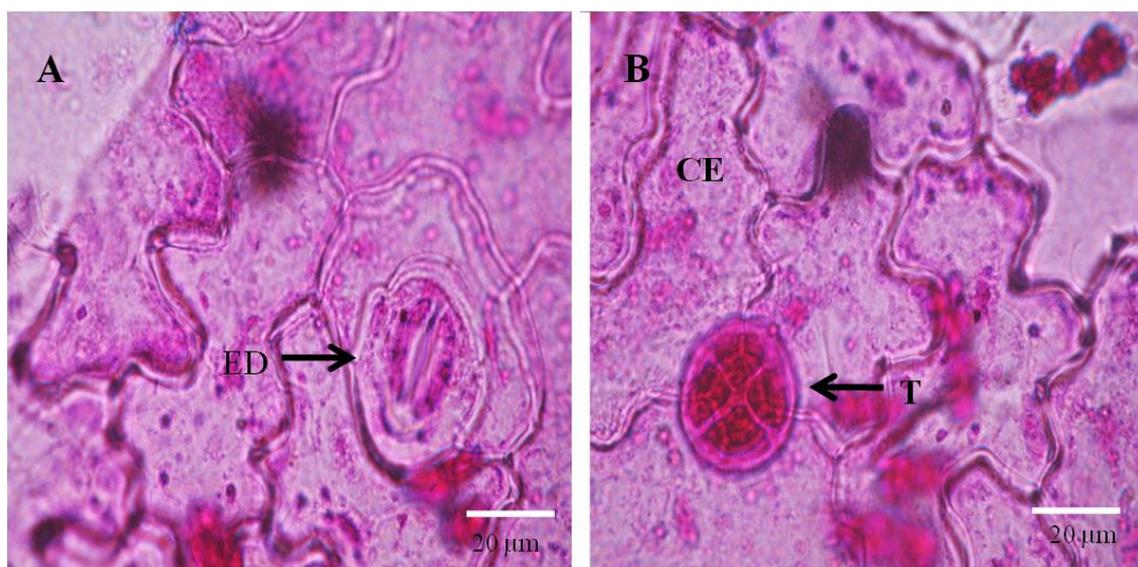


Figura 10: Epiderme adaxial da espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. Células com paredes sinuosas são percebidas. A- Presença de estômato paracítico. B- Destaque para as células epidérmicas. Presença de tricoma em seção transversal. CE- Célula Epidérmica. EP- Estômato diacítico. T- Tricoma.

5.2 FITOQUÍMICA

5.2.1 Prospecção fitoquímica preliminar

O conhecimento das classes de metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais é uma ferramenta muito importante nos estudos farmacognósticos uma vez que pode encaminhar os estudos de atividades biológicas, ou mesmo indicar caminhos para o isolamento de substâncias que podem futuramente fazer parte do arsenal de substâncias utilizadas na terapêutica. Neste sentido as marchas de análises fitoquímicas são uma ferramenta nas mãos daqueles que estudam produtos naturais. Uma planta pode produzir milhares de substâncias diferentes, em diferentes concentrações, e o conhecimento das classes presentes em uma espécie facilita o delineamento do estudo. A tabela 5 indica os testes realizados nos quais os resultados foram positivos.

Tabela 5. Testes positivos na prospecção fitoquímica

Metabólito Pesquisado	Resultados
Saponina	Positivo
Catequinas	
Cumarinas	
Esteróides	
Taninos condensados	

A espécie estudada mostrou a presença de cumarinas, saponinas, esteróides, taninos condensados e catequinas. A presença de cumarinas está de acordo com os achados em trabalhos feitos com outra espécie do gênero, *Justicia pectoralis*, que apresenta a cumarina e a umbeliferona como seus princípios ativos (LINO et al., 1997), podendo essa classe de metabólitos ser a responsável pela atividade biológica descrita

para *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek., uma vez que ambas são utilizadas para a mesma finalidade. Além disso, a presença de saponinas também foi descrita para *Justicia gendarussa*, (DIN et al., 2002), cujos metabólitos predominantes pertencem à classe dos flavonóides (OLIVEIRA et al., 2000). A ausência de alcalóides e heterosídeos cianogênicos em *J. acuminatissima* está em consonância com os resultados descritos para *Justicia pectoralis* e *Justicia gendarussa*. Quanto à presença de flavonóides, encontramos relatos na literatura da presença dessa classe de substâncias nas espécies *Justicia gendarussa* e *Justicia chlorostachya*. Já na espécie em estudo, ambas as classes de metabólitos não foram encontradas. No entanto, os esteróides e taninos foram reportados neste mesmo trabalho, assim como visto para *J. acuminatissima*.

A presença de cumarinas na espécie *J. acuminatissima* (Miq.) Bremek. torna seu estudo químico interessante, dada a forma restrita que aparecem na família Acanthaceae, sendo a espécie *Justicia pectoralis*, até o momento, o único membro do gênero a apresentar cumarinas (OLIVEIRA et al., 2000). Muitas são as atividades biológicas atribuídas às cumarinas, inclusive a atividade antiinflamatória reportada a esse vegetal (OJALA, 2001). Dessa maneira, as cumarinas tornaram-se foco principal do trabalho fitoquímico realizado nesse estudo. A figura 11 mostra os testes realizados nos quais os resultados encontrados foram positivos.

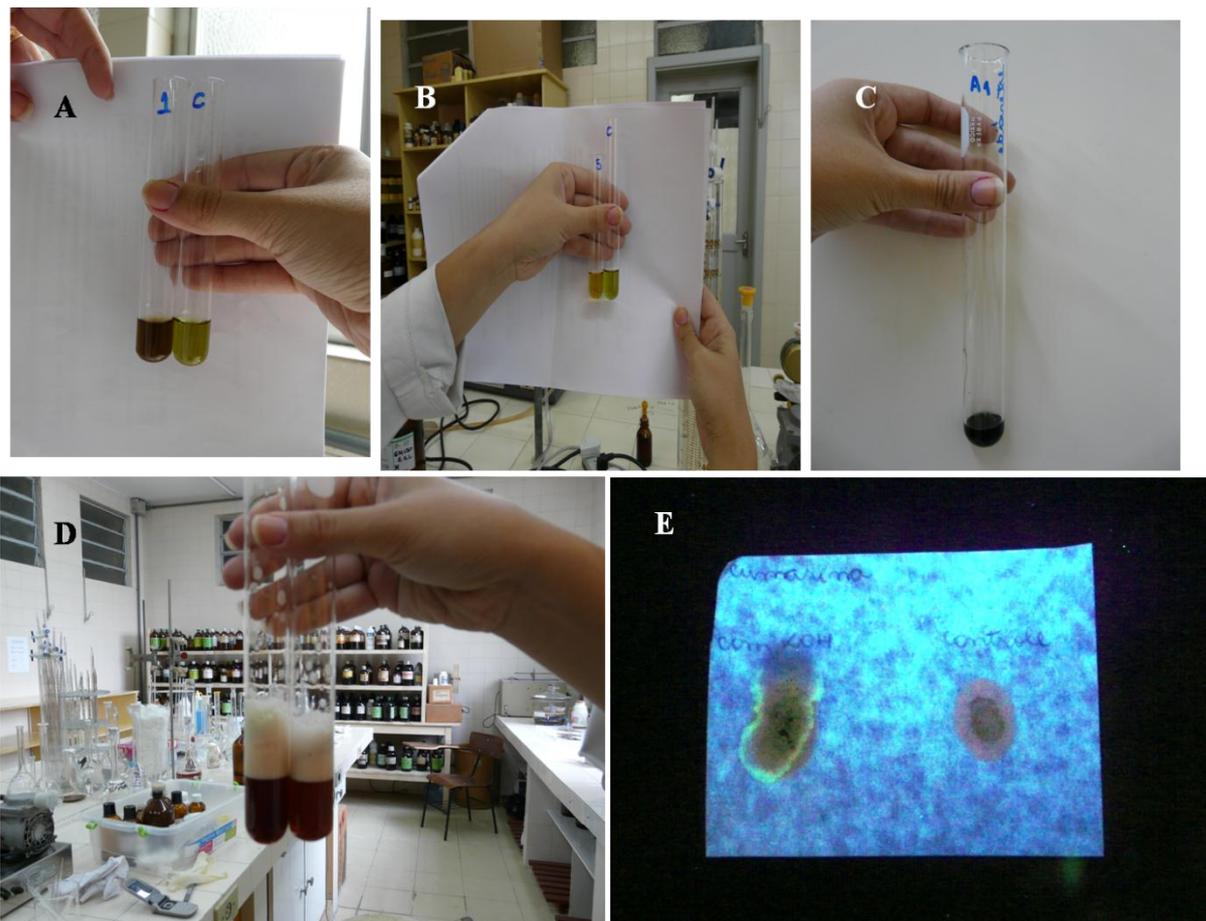


Figura 11: Resultados positivos encontrados na pesquisa de metabólitos secundários. A- Presença de compostos fenólicos. B- Coloração parda indicando presença de catequinas. C- Positividade no teste para detecção de esteróides. D- Presença de espuma mesmo com adição de ácido clorídrico, indicando a presença de saponinas. E- Fluorescência amarela em gota de extrato alcalinizada indicando a presença de cumarinas.

5.2.2 Dessecação a peso constante

Três metodologias foram utilizadas para determinar, através de comparação de seus rendimentos, aquela que iria conferir maior quantidade de material extrativo para que as análises fitoquímicas fossem realizadas. Desta maneira o extrato com maior rendimento após análise dos resultados foi a infusão a 5%, o que pode ser verificado por observação da tabela 6.

Amostra	Concentração do extrato testado	Método de extração	Rendimento em gramas
Folhas	5%	Decocção	0,0595
Folhas	5%	Infusão	0,08325
Folhas	5%	Ultra-som	0,0555

Tabela 6. Resultados da análise de dessecação a peso constante.

Os estudos fitoquímicos necessitam de grande quantidade de extrato para que se possa conhecer o perfil de uma determinada espécie ou mesmo isolar alguma substância desejada (CHECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Pensando nisso, a dessecação a peso constante foi realizada objetivando reconhecer a metodologia que conferisse maior rendimento, para que a mesma fosse empregada na análise fitoquímica. Desta maneira três metodologias foram escolhidas para comparação: decocção, infusão e ultra-som. A decocção e a infusão se aproximando do uso popular e o ultra-som apenas como sendo uma metodologia alternativa. Todos os extratos foram testados a 5 e a 15%, no entanto todas as metodologias extrativas apresentaram maior rendimento a 5%, sendo a infusão a 5%, aquela com rendimento superior a todas as demais.

5.2.3 Partição líquido-líquido

A partição líquido-líquido em ordem crescente de polaridade visa uma semipurificação do extrato trabalhado. Desta maneira, cada fração fornecida por cada solvente utilizado apresentou riqueza de determinado metabólito secundário. Neste estudo, três frações foram fornecidas, a saber: hexânica, diclorometano e acetato de etila.

Cada uma dessas frações após ter sido avaliada por cromatografia em camada fina, utilizando como fase estacionária cromatoplasmas de sílica gel 60, apresentou perfil mostrado na figura 13.

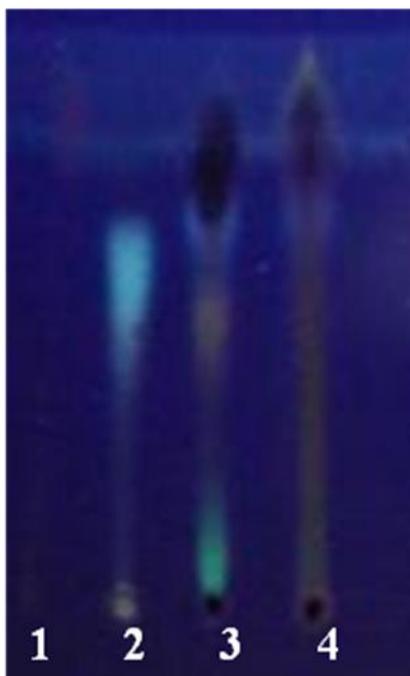


Figura 12: Perfil cromatográfico das frações obtidas na partição líquido-líquido. 1) Extrato. 2) Hexânica. 3) Diclorometano. 4) Acetato de etila Eluente: MeOH:H₂O (50:50)

Optou-se por trabalhar na cromatografia em coluna com as frações diclorometano e acetato de etila, baseados na literatura que relata que a concentração de cumarinas é maior nessas frações (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

5.2.4 A cromatografia

Após observação do perfil cromatográfico das frações obtidas na partição líquido-líquido, e baseados no foco do trabalho fitoquímico – as cumarinas, e nos dados da literatura, a fração diclorometano foi submetida a cromatografia em coluna utilizando como eluente o metanol puro. As frações obtidas ao serem reveladas em solução de KOH 10%, apresentaram coloração indicativa da presença de cumarinas, amarelo, azul e verde, quando submetidas a lâmpada U.V, com λ 356 nm, como demonstrado abaixo:



Figura 13- Frações obtidas da cromatografia em coluna da fração Diclorometano. Revelada com KOH 10% em MeOH.

As frações 3, 4 e 5 foram reunidas e recromatografadas utilizando como eluente MeOH:H₂O (50:50). Ao serem submetidas à cromatografia em camada delgada utilizando como sistema de solventes tolueno:diclorometano:acetona (45:25:30),

reveladas com KOH 10% e submetidas a lâmpada U.V, λ 356 nm, apresentaram coloração característica de cumarinas, neste caso com coloração azul. Uma terceira coluna foi realizada com a fração acetato de etila, utilizando como fase móvel metanol:água (1:1), fornecendo uma fração de coloração característica de cumarina quando revelada da mesma maneira que as demais, sendo chamada de Fração C3 9, a qual também foi submetida a análise espectrométrica.

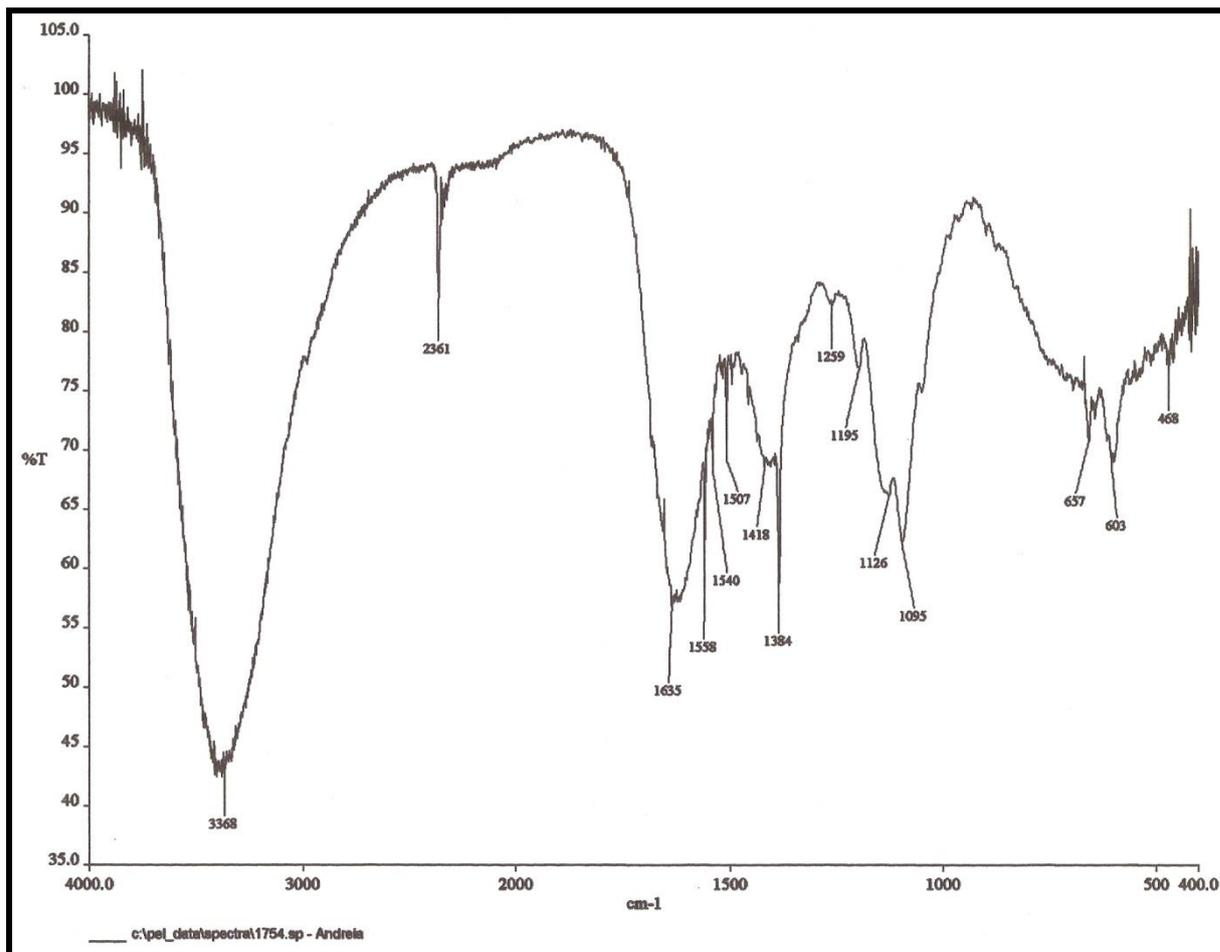


Figura 14: Cromatografia em Camada fina, fração C2 6-10

5.2.5 Análise Espectroscópica do Extrato aquoso e das Frações

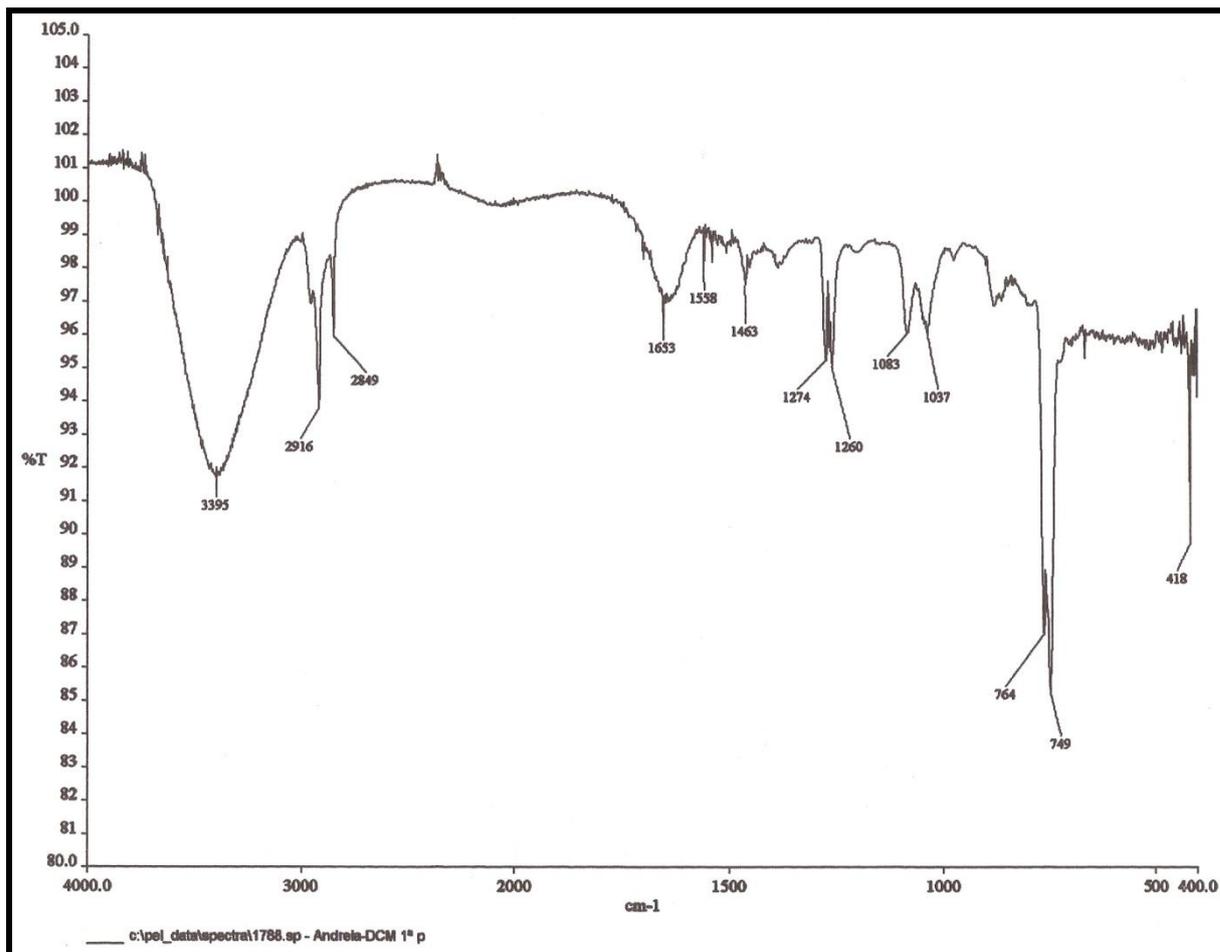
O extrato empregado na análise fitoquímica, a fração diclorometano, e as frações C1 6-7, C2 6-10, resultantes da coluna feita com a fração diclorometano e a fração C3 9, resultante da cromatografia em coluna feita com a fração acetato de etila, foram submetidas a análise espectrométrica por infra vermelho. Nos espectros de infra-vermelho as principais bandas estão descritas e elucidam a presença de importantes

grupos funcionais presentes nas amostras. A descrição desses espectros mostra que trata-se de amostras com presença de grupamento aromático presente, e há grande presença de grupamento hidroxila na maioria das frações aqui descritas. As descrições foram feitas de acordo com Silverstein, 2008.



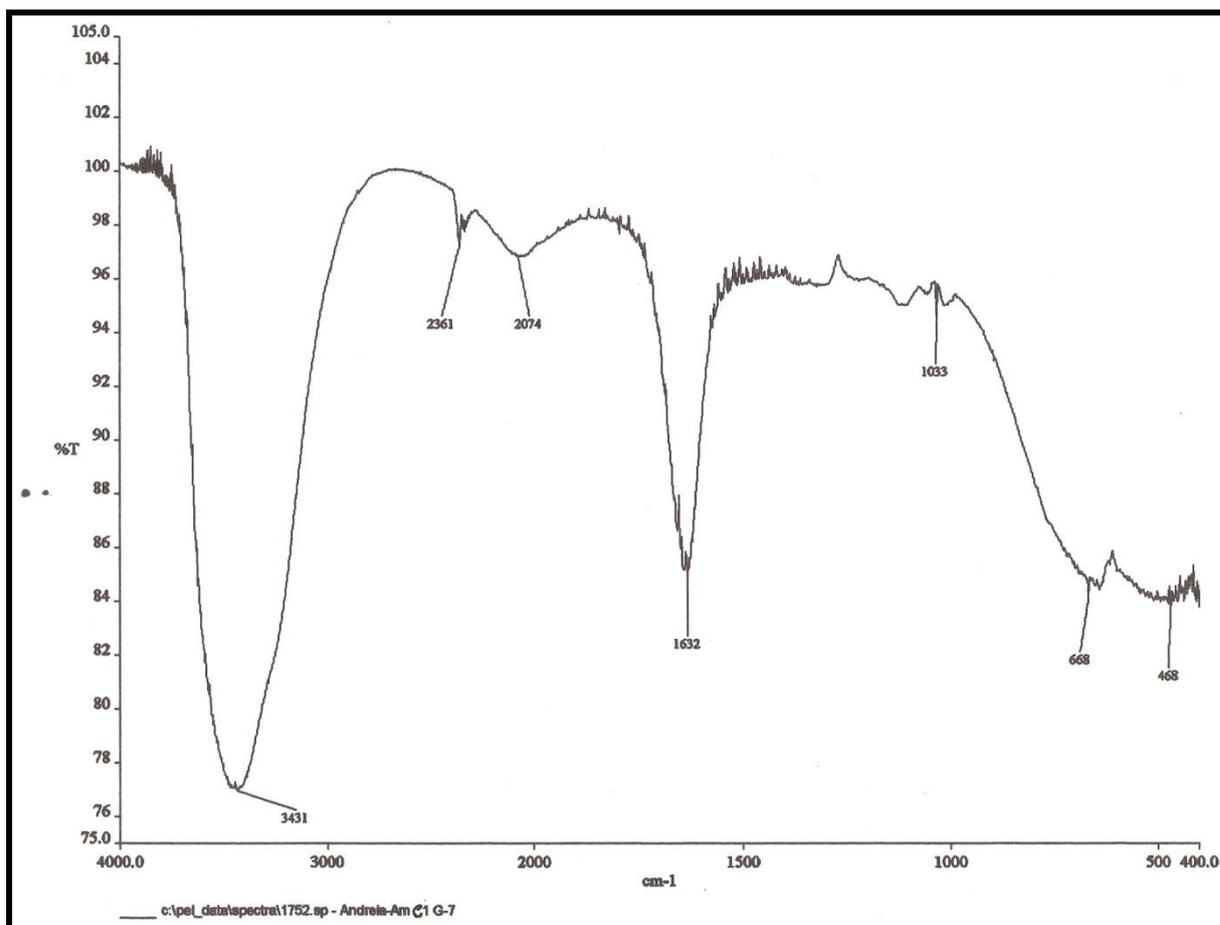
Espectro 1: Extrato aquoso obtido por Infusão a 5%.

O espectro 1, obtido a partir da análise do extrato aquoso por infusão a 5%, utilizado na análise fitoquímica por cromatografia apresentou como bandas indicativas da presença de compostos aromáticos hidroxilados. Em 3368 cm^{-1} observa-se a presença de banda característica da deformação axial da ligação O-H. Em 2361 cm^{-1} verifica-se a presença de deformação axial da ligação C-H. Já na faixa entre 1558 e 1418 cm^{-1} há presença de bandas características da deformação axial das vibrações do esqueleto de C=C.



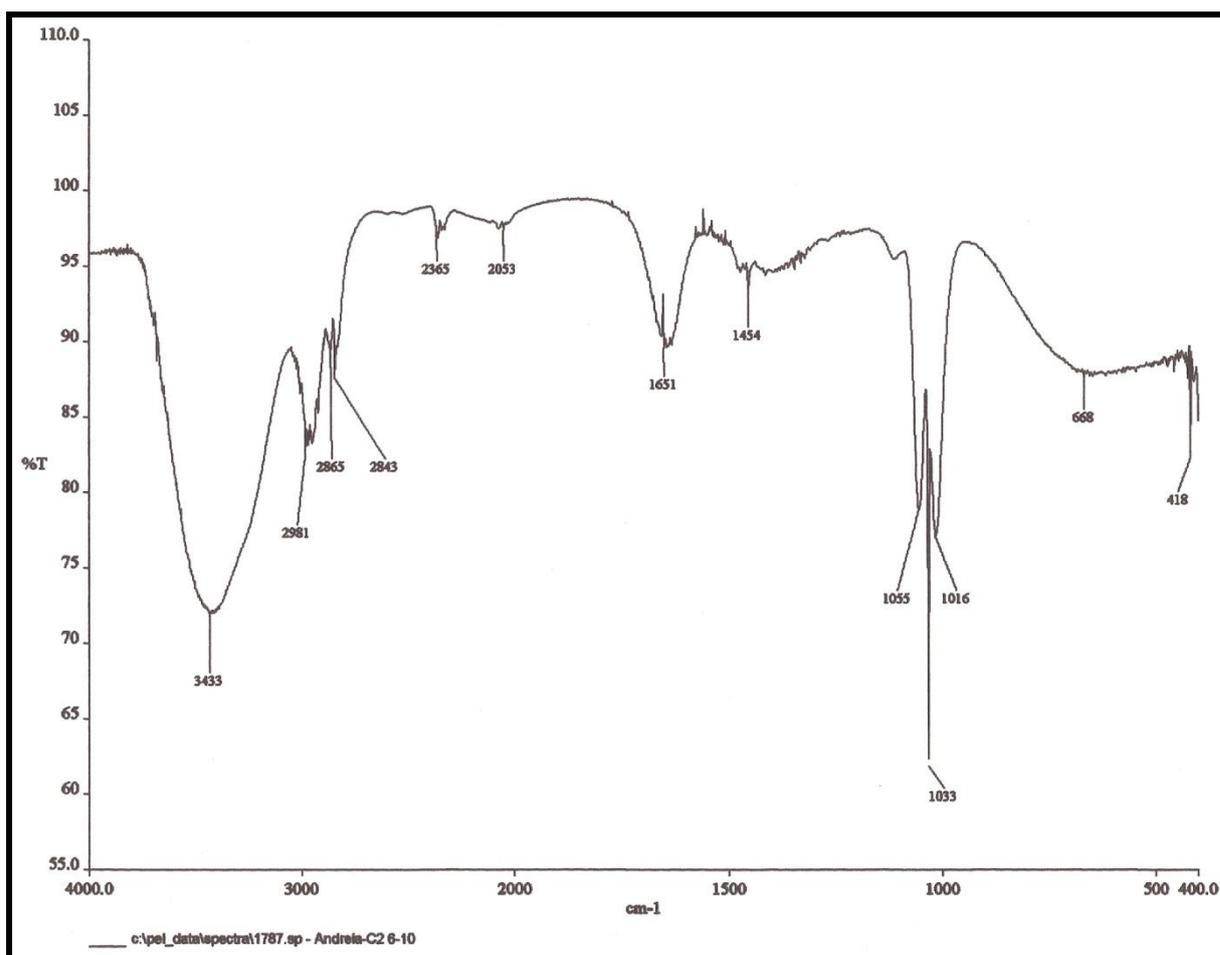
Espectro 2: Espectro na região do infra-vermelho da Fração Diclorometano, originária da partição líquido-líquido

A fração Diclorometano apresenta em seu espectro bandas características de compostos aromáticos hidroxilados, o que é confirmado pela presença em 3395 cm^{-1} da deformação axial da ligação O-H. Em 2916 e 2849 cm^{-1} ocorrem bandas decorrentes da deformação axial de ligação C-H, e em 1653 cm^{-1} de deformação axial de ligação C=C. Em aproximadamente 700 cm^{-1} ocorrem bandas oriundas de deformação angular fora do plano de C-H de compostos aromáticos.



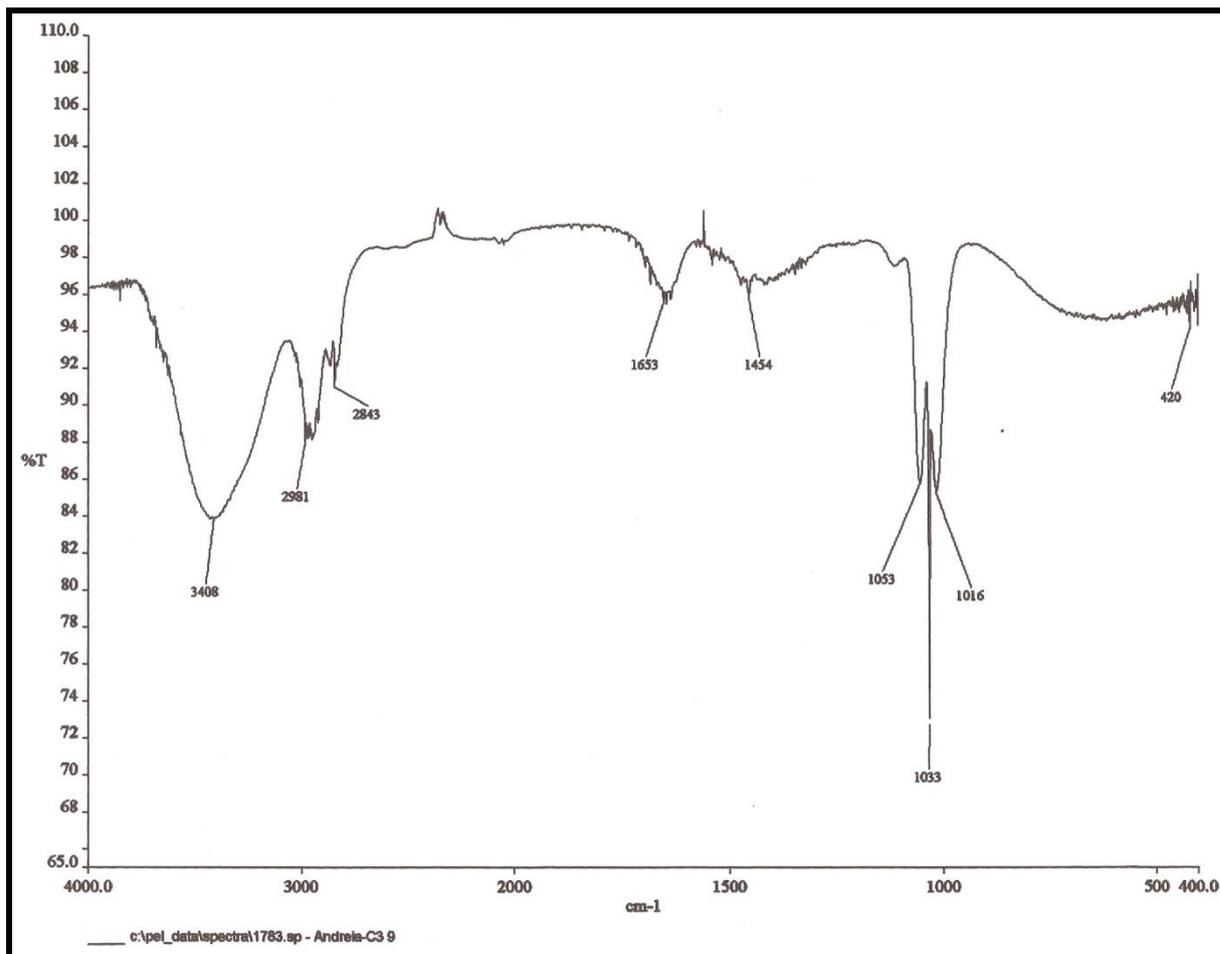
Espectro 3: Fração C1 6-7

A observação das bandas presentes no espectro da fração C1 6-7 mostra a presença de banda da ligação axial O-H em 3431 cm^{-1} . Em 2361 e 2074 cm^{-1} há presença de deformação característica da ligação C-H. Em 1033 cm^{-1} ocorre banda de deformação axial de grupamento C-C=O-C, e em 1632 cm^{-1} há presença de deformação axial da ligação C=C.



Espectro 4: Fração C2 6-10.

A fração C2 6-10 apresenta em 3433 cm^{-1} banda típica de grupamento O-H em sua deformação axial. Em 2981 e 2865 cm^{-1} ocorre deformação axial de grupamento C-H e em 1651 cm^{-1} deformação axial da ligação C=C.



Espectro 5: Fração C3-9.

A fração C3 9 apresenta banda característica de grupamento O-H em 3408 cm^{-1} . Já em 2981 e 2843 cm^{-1} observamos bandas provenientes de deformação axial de C-H. Em 1653 cm^{-1} há presença de vibração de ligação C=C. A presença de bandas entre 2000 e 1650 cm^{-1} são típicas de combinação e harmônicas de compostos aromáticos.

Desta forma, a partir dos dados obtidos na prospecção fitoquímica, do perfil cromatográfico das frações diclorometano e acetato de etila obtidas por partição líquido-líquido, e das características das frações oriundas da cromatografia em coluna, quando reveladas com KOH 10% e observadas sob luz U.V somando a análise das bandas descritas nos espectros no infra-vermelho, sugerimos a possibilidade de forte presença de cumarinas nesta espécie, o que é de grande valia por ser rara em membros da família

Acanthaceae, podendo por isso, se confirmada em estudos posteriores, ser utilizada como marcador químico da espécie.

5.3 TESTES BIOLÓGICOS

5.3.1 Agregação plaquetária

Um dos principais efeitos colaterais causados pelos antiinflamatórios utilizados na clínica advém da intervenção dessa classe terapêutica na agregação plaquetária, causada pela inibição da COX-1, interferindo na produção de PAF e TXA2 por exemplo. Desta maneira, desejou-se avaliar o efeito do extrato aquoso de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. sobre a agregação plaquetária, dada suas propriedades antiinflamatórias relatadas pelo uso popular e demonstradas através de ensaio farmacológico. O teste foi realizado nas concentrações de 40, 20, 10, 5 e 2,5 mg/mL, não sendo possível realizar esse teste nas mesmas concentrações dos testes farmacológicos realizados, uma vez que a detecção da avaliação da capacidade inibidora da agregação plaquetária é feita baseada na medida de formação de agregados de plaquetas, após exposição a agente agregante, sendo esta realizada em aparelho agregômetro, um espectrofotômetro que mede a variação na transmissão de luz através da suspensão de plaquetas utilizada no teste (PIEDADE et al.,2003). Acima dessas concentrações houve impossibilidade de realização de leitura do teste devido a coloração verde-vermelha intensa do extrato. Não foi observada inibição da agregação plaquetária do extrato nas doses testadas, sendo o resultado igual ao do controle.

5.3.2 Coagulação sanguínea

Tanto o teste de avaliação TP quanto o teste TTPA não mostraram diferenças entre os valores dos grupos testados. Desta maneira, não foi possível o cálculo da

Concentração Inibitória 50% (IC₅₀), uma vez que não houve significância estatística nos testes.

5.4 TESTES FARMACÓLOGICOS

5.4.1 Toxicidade Aguda (Vasconcelos et al., 2007)

Após 15 dias de observação, não houve morte de nenhum dos animais testados, desta maneira não foi possível a determinação da DL₅₀. Nenhum dos parâmetros descritos na tabela de parâmetros farmacológicos foi observado durante as duas horas de observação dos animais. Como a dose testada (5000 mg/kg), é considerada máxima pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o extrato não foi considerado tóxico quando administrado por via oral.

5.4.2 Teste da formalina (LAPA et al., 2008).

O teste da Formalina permite a quantificação da resposta antinociceptiva a partir da observação das respostas motoras do animal em teste. No modelo da formalina duas fases são observadas. A primeira fase começa imediatamente após a administração da formalina e dura os cinco primeiros minutos. A segunda fase se inicia aos 15 minutos posteriores e finda aos 30 minutos após a administração da formalina. Essas duas fases apresentam mecanismos de modulação distintos. A primeira fase é de caráter neurogênico sendo sensível a analgésicos opióides. Já a segunda fase é caracterizada por dor de origem inflamatória, sendo portanto, sensível aos fármacos analgésicos anti-inflamatórios (LAPA et al., 2008). O modelo da formalina é uma ferramenta de grande importância nos testes farmacológicos, pois auxilia na diferenciação entre o efeito analgésico e antiinflamatório corriqueiramente confundido nos relatos populares de usos

de extratos vegetais. O extrato de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. foi testado neste modelo visando realizar triagem que auxiliasse na decisão das próximas etapas de avaliação das atividades farmacológicas dessa espécie. O resultado está expresso no gráfico 1, onde a análise estatística foi realizada pelo método ANOVA 2 WAY com pós teste de Bonferroni. Considerou-se significativo valores para $p < 0,05$ (*) e $0,001$ (**).

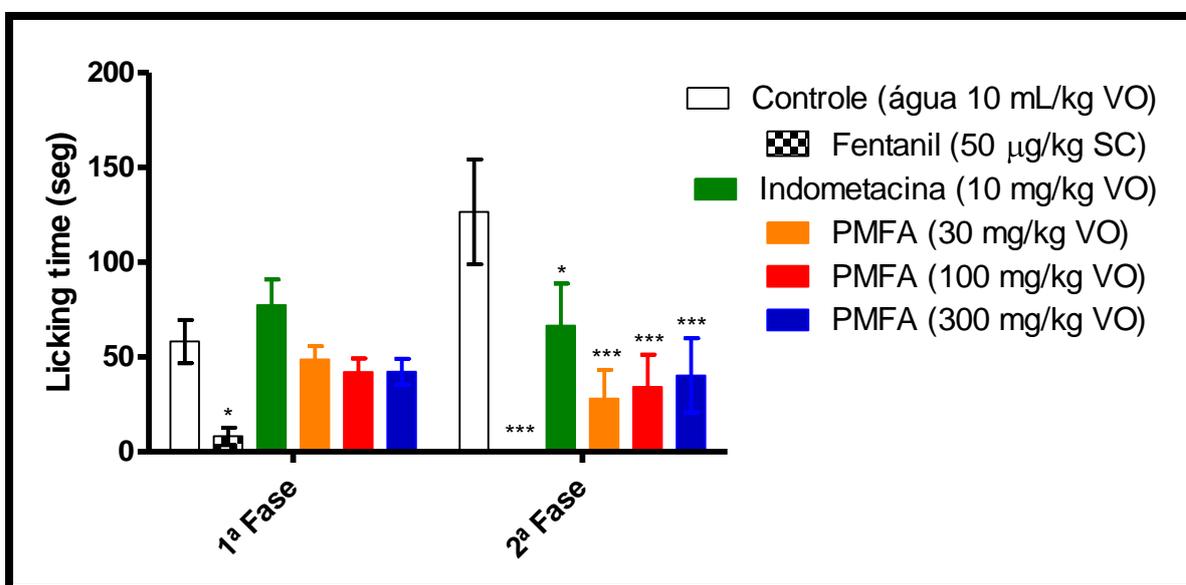


Gráfico 1. Resultado obtido no Teste da Formalina.

De acordo com a observação do gráfico, a ação do extrato testado concentra-se na segunda fase de avaliação deste modelo, indicando assim possível atividade antiinflamatória. Observou-se ação antiinflamatória do extrato em todas as doses testadas, com atividade maior que o fármaco indometacina, utilizado como controle positivo do teste, suprimindo o tempo onde o animal lambeu e/ou bateu a pata (*licking time*) de forma mais intensa que o mesmo. Desta maneira o teste indica forte atividade

antiinflamatória do extrato testado. Conforme esperado, o grupo tratado com fentanil apresentou redução significativa da resposta ao estímulo nocivo desde a primeira etapa do teste, e o grupo tratado com indometacina apresentou redução apenas na segunda etapa do teste, concordando com a metodologia empregada a qual prevê a primeira etapa com atividade analgésica e a segunda etapa do ensaio com atividade antiinflamatória. No grupo controle negativo o tempo onde o animal permaneceu batendo ou lambendo a pata na primeira etapa do teste foi em média de 58 segundos. Na segunda etapa, esse tempo foi de 127 segundos.

Já o grupo fentanil apresentou como tempo médio, 8 segundos na primeira etapa e 0 segundos na segunda etapa do teste. O grupo tratado com indometacina apresentou como média dos tempos 77 segundos na primeira etapa e 67 segundos na segunda etapa do teste. Nenhuma das doses testadas para o extrato foi capaz de reduzir o *licking time* dos animais durante a primeira fase do teste, tendo como média dos tempos para as doses testadas 44 segundos, estatisticamente semelhantes ao tempo médio do controle negativo. Na segunda etapa do ensaio o extrato reduziu significativamente o parâmetro observado, quando comparado ao grupo controle negativo, que apresentou em média 127 segundos de *licking time*. Não se observou uma relação dose-efeito, uma vez que as médias nas três doses testadas foram semelhantes. Vale ressaltar que a atividade redutora do *licking time* foi maior no extrato do que a observada para o fármaco padrão indometacina, sendo este 26% mais eficaz que a indometacina no controle da dor inflamatória, nas doses testadas neste modelo de experimentação. Dessa maneira, o extrato aquoso testado demonstrou atividade antiinflamatória em detrimento da atividade analgésica não observada na primeira fase do teste. A atividade antiinflamatória observada neste ensaio nos levou ao próximo teste farmacológico visando confirmá-la em um segundo modelo de avaliação. O modelo escolhido foi o

modelo do edema de pata induzido por carragenina, por ser um modelo de fácil aceitação e entendimento, com facilidade de execução, dada a disponibilidade de materiais e equipamentos na unidade de experimentação na qual este trabalho foi realizado.

5.4.3 Teste de edema de pata

A inflamação é um dos mais importantes processos de defesa do organismo, entretanto a dor do processo necessita de tratamento (SANMUGAPRIYA; SHANMUGASUNDARAM; VENKATARAMAN, 2005). Muitos são os modelos para avaliação da atividade antiinflamatória, sendo o teste de edema de pata um modelo de avaliação que nos permite encontrar produtos, moléculas e substâncias com atividade antiinflamatória, pela administração de doses orais em doses não tóxicas (WINTER, 1983).

A carragenina que é um potente agente flogístico, quando injetada na pata do animal induz aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Esse aumento do volume é proporcional a intensidade da resposta inflamatória. O edema formado é resultante da ação de vários mediadores da resposta inflamatória, sendo por isso considerado um processo bifásico. Na primeira fase do processo há liberação de histamina, serotonina, bradicinina, PAF, substância P e prostaglandinas. A partir do início da segunda fase observa-se predominância pela liberação de prostaglandinas, que mantêm o edema já formado (LAPA, 2008).

A administração do extrato aquoso das folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. promoveu inibição da formação do edema a partir da segunda hora do teste, tendo seu pico máximo de ação na terceira hora do teste, na dose de 300 mg/kg, com 47% de inibição. Esses resultados confirmaram a atividade

antiedematogênica/antiinflamatória atribuída pela população ao extrato, o que foi verificado inicialmente pelo teste de formalina e confirmado no teste de edema de pata. Na terceira hora do teste foi observado um mecanismo dose dependente, onde a maior atividade foi da dose mais alta testada 300 mg/kg, sendo sua capacidade inibitória nessa dose superior ao fármaco padrão Indometacina, utilizado como controle positivo do teste. A atividade antiedematogênica vista no teste de edema de pata associada aos resultados presentes na segunda fase do teste da fomalina, sugerem um mecanismo antiinflamatório do extrato por alteração da participação do componente de prostaglandinas, como por exemplo, a inibição da COX (LAPA, 2008).

A atividade antiinflamatória já bem descrita na literatura para a espécie endêmica no Brasil *Justicia pectoralis*, se deve à presença das cumarinas 1,2-benzopirona e umbeliferona. A espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. também apresenta essa classe de metabólitos secundários aos quais pode ser atribuída a atividade farmacológica detectada. Sabe-se das muitas atividades biológicas já descritas para essa classe de metabólitos secundários, tais como: anticoagulantes, estrogênica, antimicrobiana, vasodilatadoras, anti-helmíntica, sedativa e hipnótica, analgésicas e antitérmicas (OJALA, 2001), além de atividade sobre dislipdemias, atividade antidepressiva, hepatoprotetora, antiinflamatória, antihistaminica, anti-prurídica, acaricida, antiulcerogênica, antioxidante (KUSTER; ROCHA, 2007). Vale destacar que muitas cumarinas já têm sido reportadas por possuírem atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata. Tanto a cumarina quanto a umbeliferona apresentaram ação similar aos antiinflamatórios não esteroidais - AINES no modelo de teste da carragenina (OJALA, 2001). Diante do exposto e, considerando o resultado positivo dos testes fitoquímicos qualitativos para cumarinas, pode-se propor que substâncias dessa classe de metabólitos seja responsável pela atividade farmacológica espécie.

O gráfico 2 representa a evolução do edema de pata em função do tempo para todos os grupos testados nas 5 horas de experimentação.

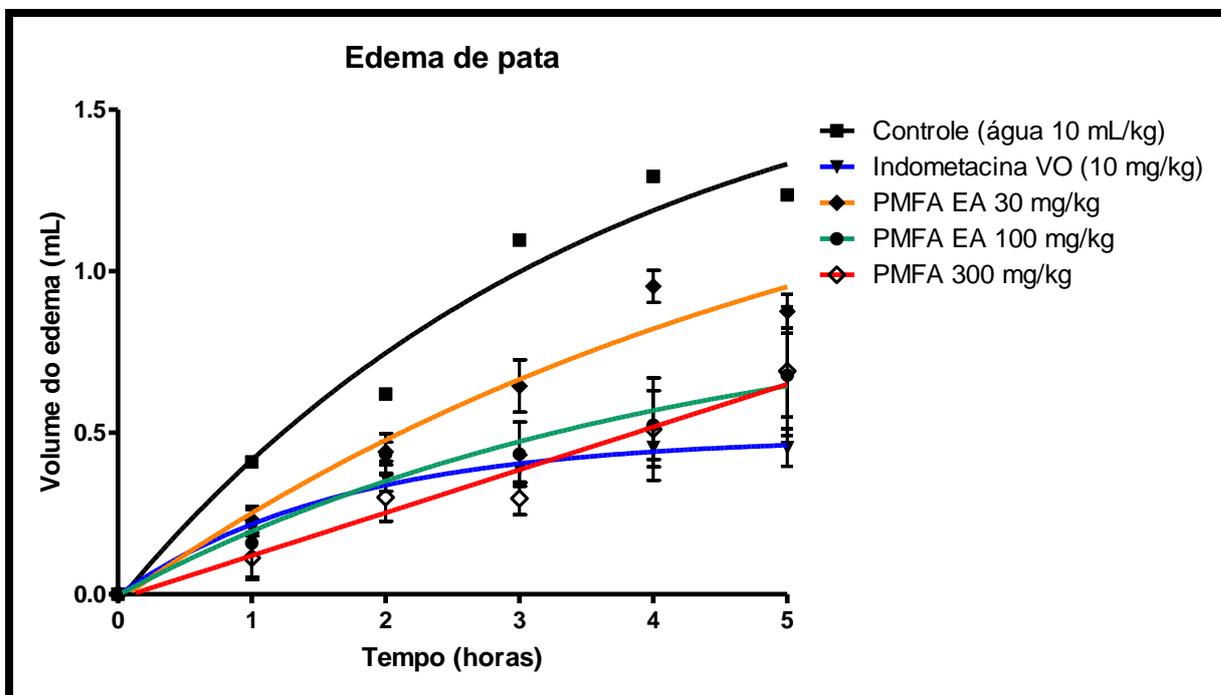


Gráfico 2. Avaliação do edema de pata, nos animais testados, ao longo das horas de experimentação.

O coeficiente de correlação de todas as curvas foi $> 0,9$ sendo a correlação entre os pontos considerada significativa.

Os resultados a seguir, expressos nos gráficos 3 e 4 são referentes a segunda e terceira hora do teste respectivamente. Os dados foram analisados pelo método ANOVA 1-WAY com pós-teste de Dunnett`s.

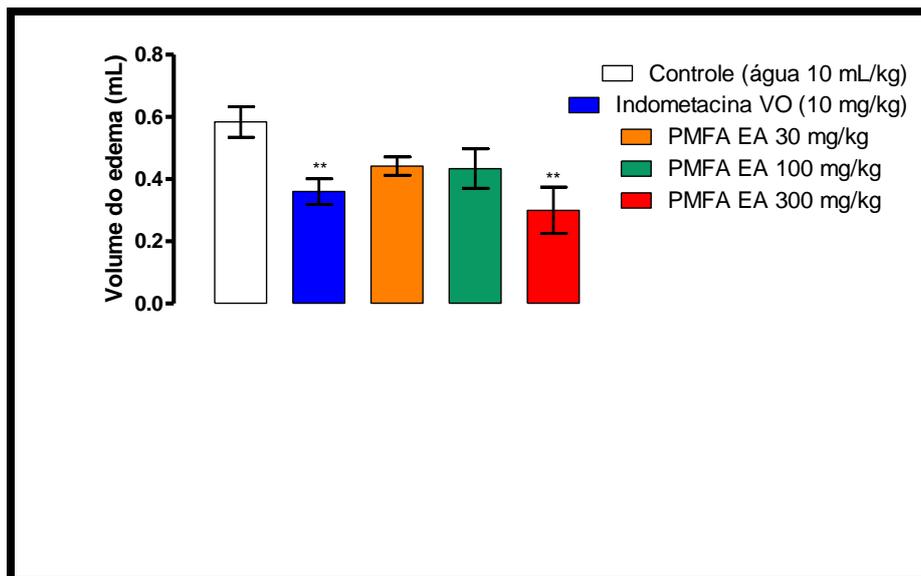


Gráfico 3. Avaliação do edema de pata nos animais testados na segunda hora de experimentação.

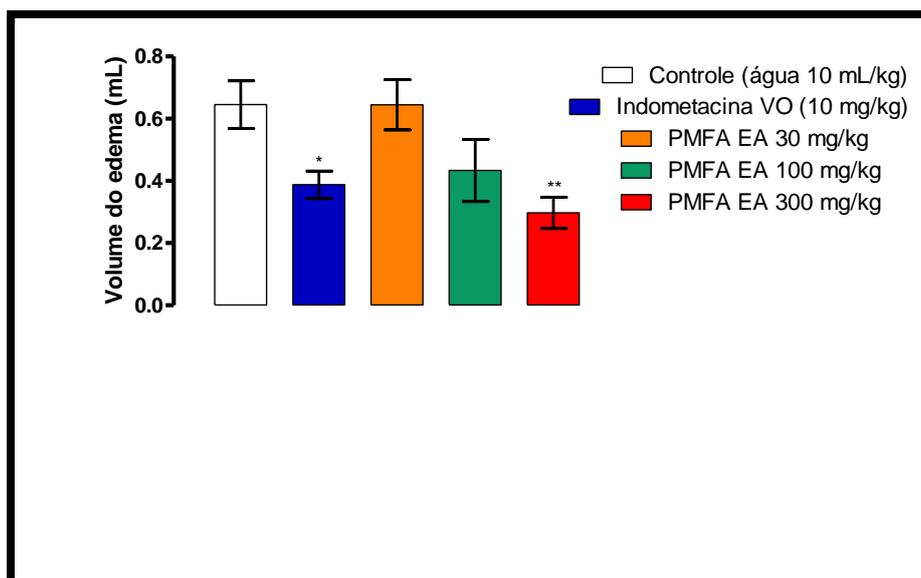


Gráfico 4. Avaliação do edema de pata nos animais testados na terceira hora de experimentação.

5.4.4 Teste da lesão gástrica induzida por Indometacina

Os antiinflamatórios não esteroidais não específicos são inibidores da ciclooxigenase-1. Desta maneira, ao inibir a COX-1, há inibição da produção de prostaglandina E, que é indutora da produção de muco, o qual apresenta ação protetora sobre o epitélio do estômago. Como consequência, o uso de antiinflamatórios desta classe tem como um dos principais efeitos adversos a promoção de úlceras gástricas, sendo este efeito já bem conhecido na clínica. A Indometacina é um exemplo do relatado, apresenta atividade ulcerogênica já conhecida, induzidas por inibição da síntese de prostaglandinas, que são indutoras da secreção de muco e inibidoras da secreção ácida (LAPA, 2008). Tendo em vista a atividade antiinflamatória do extrato obtido das folhas de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. próxima ao fármaco antiinflamatório padrão Indometacina, demonstrada inicialmente pelo teste da Formalina, e confirmada no modelo de atividade antiedematogênica do edema de pata, decidiu-se avaliar a capacidade de lesão gástrica do extrato utilizando como parâmetro a Indometacina. O ensaio escolhido foi o modelo de avaliação da lesão gástrica induzida por indometacina, no qual a indometacina é utilizada como agente ulcerogênico e a atividade antiulcerogênica de extratos é observada. Neste ensaio promovemos uma adaptação, apenas comparando o poder ulcerativo da indometacina com o poder ulcerativo do extrato testado. Apenas a maior dose eficaz na antiinflamação foi avaliada. Os resultados que estão expressos no gráfico 5, foram avaliados pelo método ANOVA 1-WAY com pós-teste de DUNNETT'S sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

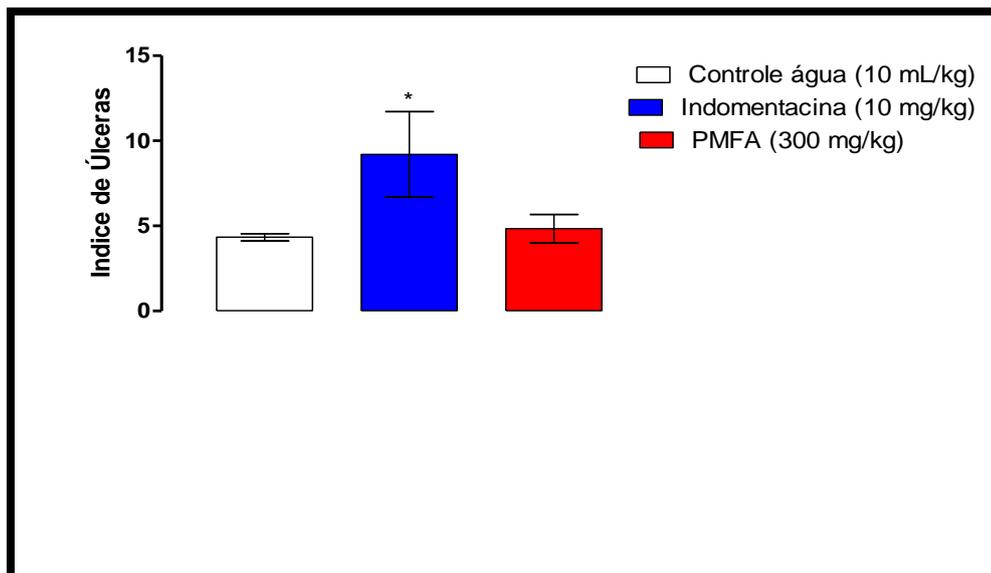


Gráfico 5. Avaliação da lesão gástrica induzida por Indometacina do extrato aquoso das folhas de *Justicia acuminatissima* (miq.) Bremek.

Como podemos observar no gráfico acima, o índice de úlceras causado pela indometacina é estatisticamente superior ao causado pelo controle. Já o número de úlceras causado pelo extrato se equipara ao encontrado nos animais que receberam a administração do controle negativo do teste, a água. Os estômagos dos animais tratados com indometacina apresentaram úlceras tais como vistas nas imagens abaixo:



Figura 15: Estômagos de animais tratados com indometacina. Observar a ulceração no tecido

Já os animais tratados com extrato, não apresentaram ulcerações no tecido estomacal, nem mesmo apresentaram outras alterações, tais como alteração de cor ou muco:



Figura 16: Estômagos de animais tratados com extrato. Observar a ausência de ulcerações no tecido.

Desta maneira, o extrato apesar de apresentar atividade antiinflamatória percebida no modelo do edema de pata, não se apresenta potencialmente lesivo à mucosa estomacal, um dos principais efeitos colaterais da maioria dos antiinflamatórios não esteroidais não seletivos utilizados na clínica corriqueiramente, sugerindo um mecanismo de ação não relacionado a COX-1. Dentre os parâmetros observados neste teste há a observação do volume de muco produzido no estômago. Nos animais que receberam o extrato não houve alteração do volume de muco acumulado no estômago, o que sugere um mecanismo antiinflamatório não COX-1, uma vez que esta enzima está relacionada a produção de prostaglandinas indutoras da produção de muco no estômago, sendo esta enzima, neste tecido uma enzima constitutiva.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho caracterizou farmacognosticamente a espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek, uma espécie presente na flora brasileira e utilizada por suas propriedades medicinais pela população do norte do Brasil.

A descrição farmacobotânica forneceu informações que podem possibilitar a correta identificação da espécie. As características macroscópicas descritas neste estudo, como o padrão de nervura, forma e contorno da lâmina foliar, as características da superfície e disposição das folhas e o contorno foliar podem ser extremamente úteis no reconhecimento da espécie. Além disso, a caracterização microscópica com a elucidação de tricomas tectores e glandulares na lâmina foliar, a presença de cristais de oxalato de cálcio, a caracterização dos tecidos presentes, tais como o parênquima paliádico seguido por parênquima lacunoso e a presença de colênquima, conjuntamente com os resultados obtidos nos testes histoquímicos, onde foram verificados, nos tecidos vivos, a presença de metabólitos secundários, dos quais alguns foram confirmados na prospecção fitoquímica, tais como a presença de substâncias fenólicas, são informações de grande valia tanto para o controle de qualidade, caso um dia esta espécie seja matéria-prima para a produção de medicamento fitoterápico, quanto para levantar hipóteses sobre as atividades farmacológicas, toxicológicas e os possíveis mecanismos de ação de seus constituintes.

Os resultados obtidos com os testes biológicos e farmacológicos se mostraram interessantes, uma vez que a atividade antiinflamatória atribuída a esse vegetal pode ser vista aos olhos da ciência, aproximando a academia das sociedades tradicionais e reafirmando a premissa de que o uso tradicional fornece ferramentas importantes na

busca e descoberta de novas fontes moleculares que possam trazer benefícios à sociedade.

Os estudos de toxicologia aguda foram realizados com extrato aquoso, por via oral, e não demonstraram toxicidade no modelo testado. No entanto, há necessidade de estudos de toxicologia subcrônica e crônica para que se possa inferir sobre a segurança do uso dessa espécie. Apesar disto os resultados mostram que se trata de uma espécie muito interessante sob o ponto de vista químico e farmacológico merecendo estudos posteriores que possam talvez elucidar seus mecanismos de ação sobre a inflamação e/ou isolar moléculas responsáveis pela atividade biológica.

Referências Bibliográficas

AKHTAR, N.; SYED, A. Epidermal structures as taxonomic feature in some members of Acanthaceae. **Pak. J. Pl. Sci.** v.2, n.2, p.163-166, 2006.

AL-JUAID, S.; MOGIB-ABDEL, M.. A Novel Podophyllotoxin Lignan from *Justicia heterocarpa*. **Chemical Pharmacological Bulletin.** v.52, n.5, p.507-509, 2004.

ALBUQUERQUE, R. J. M., RODRIGUES, L. V., VIANA, G. S. Análise clínica e morfológica da conjutivite alérgica indizada por ovoalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cir Bras.** v.19, n.1, p. 43-47, 2004.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: Fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.16, p.678-689, 2006.

AMOROZO, M. C. de M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Bot Bras.** v.16, n.2, p.189-203, 2002.

ASCENÇÃO, L. Métodos Histoquímicos em vegetais. Universidade Federal de Viçosa. Departemaneto de Biologia Vegetal. Julho 2004.

AZEVEDO, S. K. R. de; SILVA, I. M. Plantas medicinais comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Bot Bras.** v.20, n.1, p.185-194, 2006.

BADAMI et al., Antifertility activity of *Derris brevipes* variety coriacea. **J. Ethnopharmacol.** v. 84, p.99-104, 2003.

BALDUCCI-ROSLINDO, E; SILVIO, K.G; MALAGOLI, D.M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinalis*. **Rev Odontol Univ São Paulo.** v.13,n.2 – São Paulo. abril-junho, 1999.

BARBOSA-FILHO et al.. Anty-antiinflammatory activity of alkaloyds: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.16, n.1, jan-mar, 2006.

BRAZ, D. M.; CARVALHO-OKANO, R. M.; KAMEYAMA, Cíntia. Acanthaceae da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.4, p. 495-504, 2002.

BORN, G. V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**, 194: 927-929, 1962.

CARVALHO, W.A; CARVALHO, R.D.S; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da cicloxigenase-2: Avanços terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol.** v.54, n.3, p. 448-464, 2004.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória: Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev Bras de Anesthesiol.** v.48, n.2, p-137-158, março-abril,1998.

CHECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova.** v.2, n.1, 1998.

CHEN, C. et al. Antiplatelet arynaphthalide lignans from *Justicia procumbens*. **Journal of Natural Products.** v.59, p.1149-1150, 1996.

CHEN, C.; HSIN, W.; HUANG, Y. Six new diarylbutane lignans from *Justicia procumbens*. **J.Nat.Prod.** v.61, p.227-229, 1998.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**; 5 ed, Lisboa, editora: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002, v.2,

DIN, L.. et al., A preliminary phytochemical srvey of plants in crocker range, Sabah, Malaysia. **ASEAN Review of biodiversity and environmental conservation.** July-September, 2002.

FALCÃO, H. de S. et al., Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, 2005.

FALKENBERG, M. de B., DOS SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; GUERRA, Miguel Pedro (et al) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2007. p.1102.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 ed. Parte 1 – Editora: Atheneu. São Paulo LTDA.

FONSECA et al. Estudo fitoquímico do decoto das folhas de *Maytenus truncat*. Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decoto. **Química Nova**. v.30, n.4, p. 842-847, 2007.

KAMEYAMA, C. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Acanthaceae. **Rodriguésia**. v.57, n.2, p.149-154, 2006.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico em morfologia vegetal** – Seropédica, Rio de Janeiro:EDUR, 1997. 198p.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. de A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.46, n.3, p.199-206, 2006.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, Cromonas e Xantonas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; GUERRA, Miguel Pedro... (et al) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2007. p.1102.

LAPA, A. J; et al., **Plantas medicinais. Métodos de avaliação da atividade Farmacológica**. Campinas: Editora Unifesp, 2008. 143p.

LARCHER, L.; BOEGER, M. R. T. Anatomia foliar de *Odontonema strictum* (Ness) O. Kuntze (Acanthaceae). **Biotemas**, v.19. n.4, 23-31, dezembro de 2006.

LEAL, L.K.A.M. et al., Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**. v.70, p. 151-159, 2000.

LINO, C.S; et al., Analgesic and Antiinflammatory Activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its Main Constituents: Coumarin and Umbelliferone. **Phytotherapy Research**. v.11, p.211-215, 1997.

LUCENA et al., Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schun. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.1, 67-72, jan- mar, 2006.

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

MARTINS, L.G.S; SENNA-VALLE, L.; PEREIRA, N.A. Princípios ativos e atividades farmacológicas de 8 plantas popularmente conhecidas por nome de medicamentos comerciais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.7, n.2, p.73-76, 2005.

MATOS, F.J. Abreu. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 4. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 1997.

MECKES, M. et al., . Activity os some Mexican medicianl plants extracts on carrageenan-induced rat paw edema. **Phytochemistry**, v.11, p.446-451, 2004.

METCALFE C.R, CHALCK L. **Anatomy of dicotyledones**. Vol II. Oxford Clarendon Press. 1500p, 1957.

Missouri Botanical Garden – MOBOT. Endereço: www.tropicos.org. Acesso em 20 de julho de 2008.

MONTAGNER, C. Atividades antifúngicas, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas. Dissertação. Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. 126p. 2007.

NAVARRO, E. et al., General Behavior, Toxicity, and Cytotoxic Activity of Elenoside, a Lignan from *Justicia hyssopifolia*. **J. Nat. Prod**, v.64, p.134-135. 2001.

O'BRIEN TP, F. N, MCCULLY, ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59:368-373, 1964.

OJALA, T. Biological screening of plants coumarins. (Dissertação). Universidade de Helsink. 62p. 2001.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Farmacognosia. 1^a ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 412 p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de Farmacobotânica. 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 178 p.

OLIVEIRA, F. et al., Screening cromatográfico de Acanthaceae Medicinais *Justicia pectoralis* Jacq e *Justicia gendarussa* Burm. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, n.3, p. 37-41, 2000.

OLIVEIRA, A.; ANDRADE, L. de H. Caracterização de *Justicia pectoralis* JACQ. E *Justicia gendarussa* F. (ACANTHACEAE). **Acta Amazonica**, v.30. n.4, p.569-578. 2000.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **J. of ethnopharmacol.** v.89. p. 101-105, 2003.

PAES, L.S; MENDONÇA, M.S. Aspectos morfoanatômicos de *Bonamia ferruginea* (Choisy) Hallier f. (Convolvulaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.10, n.4, p.76-82,2008.

PERAZA, G. G. et al., O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittalle**, Rio Grande do Sul, v.1 n.19, p.35-44,2007.

PÉREZ, J. A. et al., Justicidone, a Novel p-Quinone-Lignan Derivative from *Justicia Hyssopifolia*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 52, n.1, p. 130-131, 2004.

PIEIDADE, P.R. et al., Papel da curva de agregação plaquetária no controle da antiagregação na prevenção secundária do acidente vascular cerebral isquêmico. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v.61, p.763-767, 2003.

PINO-BENITEZ, N.; C. CORDOBA, Y. Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas com colorantes em el municipio de Quibdó-Chocó. **Scientia et Technica**. n.33, maio, 2007.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.11, n.2, p.57-69, 2001.

RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Hetrosídeos Cardioativos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; GUERRA, Miguel Pedro... (et al) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2007. p.1102.

REZENDE, E.A; RIBEIRO, M.T.F. Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria ou bioprospecção? **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.7, n.3, p.37-44, 2005.

RITTER, M.R. et al., Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, R.S, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12, n.2, p.51-62, jul-dez. 2002.

ROCHA, A. de A. Obtenção e avaliação das atividades analgésicas e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto de arnica brasileira (*Solidao microglossa*, DC). 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Promoção de saúde) – Universidade de Franca.

ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; Screening for antimicrobial activity of ten medicinal Colombian folkloric medicine: A possible alternative of non-nosocomial infections. **BMC. Complement Altern Med**. v.6, n.2, 2006.

SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. **Fármacos para tratamento da dor**. Barueri, São Paulo: Editora Manole, 2008.

SANMUGAPRYA, E; SHANMUGASUNDARAM, P.; VENKATARAMAN, S. Anti-inflammatory activity of *Justicia prostrata* gamble in acute and sub-acute models of inflammation. **Inflammopharmacology**, v.13, n.5-6, p.493-500, 2005.

SANTOS, J. L. dos. Uso e diversidade de espécies vegetais cultivadas na reserva de desenvolvimento sustentável do Tupé, Manaus, Amazonas.2006.86f. Dissertação (Mestrado em Agricultura no trópico úmido) – Instituto de Pesquisas da Amazônia, Amazonas.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, Grace; ATHAYDE, Margareth Linde; Saponinas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; GUERRA, Miguel Pedro... (et al) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2004. p.1102.

SUBBARAJU, G. V. et al., Jusbetonin, the first indol (3,2- *b*) quinoline alkaloid glycoside from *Justicia betonica*. **J. Nat. Prod.** v.67, p.461-462, 2004.

SUSPLUGAS, S. et al., Cytotoxic aryl-naphthalene lignans from a Vietnamese Acanthaceae, *Justicia patentiflora*. **J.Nat.Prod.** v.68, p.734-738, 2005.

TELEFO, P.B. et al., Effects of an aqueous extract of *Aloe buettneri*, *Justicia insularis macranthus*, *Dicliptera verticillata* on some physiological and biochemical parameters of reproduction in immature female rats. **J Ethnopharmacol.** v.63, p.193-200, 1998.

VASCONCELOS, T. H. et al. Estudo toxicológico pré-clínico com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 17, n.4, 583-591, out-dez, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C., Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova.** v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VITOR, A. O. et al., Psicofarmacologia da dor: uma revisão bibliográfica. **Revista eletrônica de Comunicação Informação & Inovação em Saúde**, v.2 n.1, p.87-96. jan-jun, 2008.

WASSHAUSEN, D. C. New and interesting species of *Justicia* (Acanthaceae) from Amazonia. Supl. **Acta Amazônica.** v.14, (1-2) 145-152, 1984.

WINTER, C.A; RISLEY E.A; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med.** v.111, p.544-7, 1962.

WORADULAYAPINIJ, W.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; WIWAT, C. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. **Journal of ethnopharmacology.** v.101. p.84-89, 2005.

ANEXOS

ANEXO A. Tabela de parâmetros observados em testes farmacológicos
Tabela 7. Observação de Parâmetros em testes farmacológicos

Parâmetro	1ª Hora				2ª Hora			
	15	30	45	60	75	90	105	120
Agitação								
Agressividade								
Ataxia								
Contorções								
Convulsões								
Defecação aumentada								
Defecação diminuída								
Defecação líquida								
Ereção da cauda								
Exoftalmia								
Lambida do dorso								
Lambida da pata								
Micção aumentada								
Micção diminuída								
Midríase								
Miose								
Mordedura da cauda								
Movimento estereotipado								
Paralisia								
Piloereção								
Ptose								
Reclusão								
Sedação								
Sialorréia								
Tremor de cauda								
Aumento da frequência cardíaca								
Aumento da frequência respiratória								
Cianose								
Hiperemia								
Palidez								
Dispnéia								
Coça o focinho								

ANEXO B- Equipe Científica

Equipe Científica			
Nome	Título	Formação	Função no trabalho
Maria de Meneses Pereira	Doutor	Farmacêutico- Bioquímico	Orientador
Débora Teixeira Ohana	Doutor	Farmacêutico	Co-orientador
Maria Silvia de Mendonça Queiroz	Doutor	Biólogo	Colaborador
Emerson Silva Lima	Doutor	Farmacêutico- bioquímico	Colaborador
Fernanda Guilhon Simplicio	Mestre	Farmacêutica	Colaborador
Gleyce dos Santos Barbosa	Graduada	Farmacêutica	Colaborador

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com o número 038/2006, intitulado: **“Identificação de espécies botânicas amazônicas como potenciais fitoterápicos: estudos etnobotânicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos.”** tendo como Pesquisador Responsável Prof. Emerson Silva Lima.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 27 de abril de 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFAM

PR. Manoel
.....
Prof. Dra. Mayra Rosa Lozano Bonfatti
Coordenadora

Recebido em 03.03.06
Emerson