



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARCELA NATALIA ROCHA DE CASTRO

**IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS NO EXTRATO  
ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Justicia secunda* Vahl M. (Acanthaceae)  
ATRAVÉS DE ANÁLISES DE CLAE-ESI-EM E SUA ATIVIDADE NO  
SISTEMA CARDIOVASCULAR**

BELÉM  
2020

**MARCELA NATALIA ROCHA DE CASTRO**

**IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS NO EXTRATO  
ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Justicia secunda* Vahl M. (Acanthaceae)  
ATRAVÉS DE ANÁLISES DE CLAE-ESI-EM E SUA ATIVIDADE NO  
SISTEMA CARDIOVASCULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Desenvolvimento e avaliação de Medicamentos Naturais e Sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva

BELÉM

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

C355i Castro, Marcela Natalia Rocha de.  
IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS NO  
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Justicia secunda*  
Vahl M. (Acanthaceae) ATRAVÉS DE ANÁLISES DE CLAE-ESI-  
EM E SUA ATIVIDADE NO SISTEMA CARDIOVASCULAR /  
Marcela Natalia Rocha de Castro. — 2020.  
73 f. : il.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka E Silva  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Belém, 2020.

1. *Justicia*. 2. atividade cardiovascular. 3. metabólitos  
secundários. I. Título.

CDD 615.4

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcela Natalia Rocha de Castro

### **IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS NO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Justicia secunda* Vahl M. (Acanthaceae) ATRAVÉS DE ANÁLISES DE CLAE-ESI-EM E SUA ATIVIDADE NO SISTEMA CARDIOVASCULAR**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Desenvolvimento e Avaliação de Medicamentos Naturais e Sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 28/12/2020

Banca examinadora:



---

Profa. Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva – PPGCF- ICS- UFPA  
Orientadora



---

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva – PPGQ – ICEN-UFPA  
Membro Externo



---

Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro – PPGBbio – IBEF- Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)  
Membro Externo

## **DEDICATÓRIA**

À minha amada família,  
por todo incansável apoio, companheirismo  
e paciência durante esta jornada.  
Vê-los felizes e orgulhosos é a minha maior recompensa!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que sempre me amparou nos momentos mais difíceis, me dando força e bênçãos todos os dias da minha vida.

À minha mãe, Benedita Rocha por todos os ensinamentos, exemplos, amor, ajuda, dedicação, incentivo, puxões de orelha e conselhos para que eu chegasse até aqui. É tudo por você, sempre!

Aos meus irmãos Marcos, Marcio e Mariana, que sempre me apoiaram!

Ao meu namorado Victor que sempre apoia e me incentiva todos os dias, por sempre estar comigo nos momentos felizes e tristes enxugando minhas lágrimas, e sempre me levantando. Com você, essa caminhada foi mais fácil. Palavras nunca serão suficientes para te agradecer.

Às minhas tias, tios e primos que mesmo de longe, nunca deixaram de me apoiar, com palavras de incentivo e carinho.

Aos meus sogros Lucia e José Ivaldo, e cunhados Eduardo e Daniel, que são minha segunda família, que cuidam, aconselham e me acolheram como uma filha.

Aos meus amigos pelas inúmeras demonstrações de apoio e vibrações com as conquistas uns dos outros. É uma honra partilhar esse momento tão especial com vocês.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Consuelo Silva, por todos os cafés científicos, por ter abertas as portas de sua casa para me receber, conselhos, ajudas, conversas, ensinamentos e palavras que acalmam. Aprendi demais com você em durante esses dois anos. Sempre serei grata a você.

Ao Prof. Dr. Milton Silva, por toda paciência, conselhos e conversas, cafés e muito aprendizado não só científico, mas pessoal também.

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL), por toda ajuda e companheirismo. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Em especial ao

Abrão Muribeca, que foi um amigo que sempre pude contar, repassou muitos conhecimentos, orientou e incentivou em relação a pesquisa, tenho e terei muito orgulho de daqui a alguns anos te encontrar como professor na Universidade. Acredito que ganhei amigos para além dos muros da universidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, pela oportunidade e apoio nesses dois anos.

A CAPES pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

## EPÍGRAFE

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”*

Abraham Lincoln

## RESUMO

No campo farmacêutico, as matérias primas a partir de plantas são de grande importância para a medicina popular. *Justicia* é um dos dos principais generos da família Acanthaceae no Brasil, que é representada por 41 gêneros e 432 espécies, das quais *Justicia* L., *Ruellia* L. e *Aphelandra* R. são as mais conhecidas. *Justicia secunda*, que é popularmente conhecida como "raiz do sangue" e "Sanguinaria" é usualmente utilizada para tratamentos como, anemia e em feridas de pés de pacientes diabéticos. Em triagem da composição fitoquímica de diferentes formas de extração das folhas revelou a presença de polifenóis como, flavonoides, taninos e antocianinas. Nesta perspectiva, o extrato bruto das folhas foi investigado via LC-MS e concomitante fora submetido a testes *in vivo* para avaliação da atividade vasorrelaxante. Através dos dados obtidos de análises em HPLC-DAD e CCDC, foi possível observar que o extrato etanólico de *Justicia secunda* possui uma matriz extremamente complexa, sendo possível via modo positivo [M + H]<sup>+</sup> a detecção de 18 constituintes químicos, que sugerem a presença de trimetil glicina, uma classe de alcaloides denominados indoquinolinas e compostos fenólicos, que de acordo com a literatura, foram identificados na mesma família da planta em questão. O extrato promoveu um efeito vasorrelaxante que se mostrou independente do endotélio funcional, corroborando dados descritos na literatura para substâncias que possivelmente estão presentes no extrato.

Palavras-chave: *Justicia*, atividade cardiovascular, metabólitos secundários.

## ABSTRACT

In the pharmaceutical field, raw materials from plants are of great importance for popular medicine. *Justicia* is one of the main genera of the Acanthaceae family in Brazil, which is represented by 41 genera and 432 species, of which queens *Justicia L.*, *Ruellia L.* and *Aphelandra R.* are the best known. *Justicia secunda*, which is popularly known as "blood root" and "Sanguinaria" is usually used for treatments such as, anemia and in wounds on the feet of diabetic patients. In screening the phytochemical composition of different forms of leaf extraction, it revealed the presence of polyphenols such as flavonoids, tannins and anthocyanins. In this perspective, the crude extract of the leaves was investigated via LC-MS and concomitantly it was submitted to tests in vivo to evaluate the vasorelaxant activity. Through the data obtained from HPLC-DAD and CCDC analysis, it was possible to observe that the ethanolic extract of *Justicia secunda* has an extremely complex matrix, being possible via the positive  $[M + H]^+$  detection of 18 chemical constituents, which suggest the presence of trimethyl glycine, a class of alkaloids called indoquinolines and phenolic compounds, which, according to the literature, were identified in the same family of the plant in question. The extract promoted a vasorelaxing effect that was independent of the functional endothelium, corroborating data described in the literature for substances that are possibly present in the extract.

Keywords: *Justicia*, cardiovascular activity, secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Distribuição territorial da espécie *Justicia secunda* Vahl M.

**Figura 2:** Anatomia de uma artéria.

**Figura 3:** Foto da espécie *Justicia secunda* Vahl M.

**Figura 4:** Fluxograma das etapas de fracionamento do extrato bruto.

**Figura 5:** Frações do Extrato.

**Figura 6:** Cromatograma extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.

**Figura 7:** Cromatograma da fração Hexano- Acetato 30% (FR2) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.

**Figura 8:** Cromatograma da fração Hexano- Acetato 50% (FR3) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.

**Figura 9:** Cromatograma da fração Acetato 100% (FR4) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.

**Figura 10:** Cromatograma da fração Acetato-Metanol 20% (FR5) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.

**Figura 11:** Cromatograma da fração Metanol 100% (FR6) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.

**Figura 12:** Cromatograma da fração Metanol 100% 2º volume (FR7) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.

**Figura 13:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com Dragendorff, com leitura na luz visível (Branca).

**Figura 14:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com VAS e visualizada na luz visível.

**Figura 15:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com KOH e visualizados no comprimento de onda de 366nm.

**Figura 16:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com NP-PEG e visualizados no comprimento de onda 366nm.

**Figura 17:** Cromatografia em Camada delgada das frações provenientes do fracionamento de FR3, visualizadas na luz visível (Branca).

**Figura 18:** Fluxograma do fracionamento da fração Hexano-Acetato 50%.

**Figura 19:** Cromatograma de íons totais do Extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* via CLAE-ESI-MS no modo positivo  $[M + H]^+$ .

**Figura 20:** Cromatograma de íons totais do Extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* via CLAE-ESI-MS no modo negativo  $[M - H]^-$ .

**Figura 21:** Desenho molecular da possível substância Trimetil glicina.

**Figura 22:** Desenho molecular das possíveis substâncias Secundarellona A, 10H Quindolina, 6H Quinindolina, 5H, 6H Quindolinona-11-one e 11-Methoxi-quindolina.

**Figura 23:** Desenho molecular das possíveis substâncias, Luteolina, Justicialosideo B, Justicialosideo A e Kaempferol 3-O- $\beta$ -glucosil(1-2) $\beta$ -D-glucosideo.

**Figura 24:** Curva Concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido pelo extrato de (1 – 3000 mg/mL) em anéis (com endotélio ausente) de artéria mesentérica superior de ratos normotensos, pré-contraídos com Fenilefrina (10 mM).

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Relação de publicações com atividade farmacológicas comprovadas, parte da planta utilizada no estudo, tipo de extrato e solvente e referência da publicação.

**Quadro 2:** Relação de publicações de pesquisas etnofarmacológicas de comunidades tradicionais que utilizam a planta como tratamento.

**Quadro 3:** Composição da solução de Tyrode (pH = 7,4).

**Quadro 04:** Dados dos constituintes químicos caracterizados por comparação dos dados das análises do extrato etanólico de *Justicia secunda* (CLAE-ESI-MS) com as bases de dados espectrométricos.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Rendimento dos Extratos

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 OBJETIVOS .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	21
3.1 FAMÍLIA ACANTHACEAE .....	21
3.2 GÊNERO JUSTICIA .....	21
3.3 ESPÉCIE <i>Justicia secunda Vahl M.</i> .....	22
3.4 Aplicação de Técnicas Hifenadas na abordagem de Matrizes Complexas .....	24
3.5 SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL, IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E REGISTRO LEGAL.....	27
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	28
4.2.1 Teste de extração.....	28
4.2.2 Extração por maceração.....	29
4.2.3 Extração por soxhlet .....	29
4.3 REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS .....	29
4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	30
4.4.1 Preparação das amostras .....	30
4.4.2 Fracionamento do extrato bruto .....	30
4.4.3 Análise dos metabólitos secundários através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).....	31
4.4.4 Caracterização química do extrato através das técnicas de CLAE-DAD.....	31
4.4.4 Análise do extrato e frações através de CCDC (Cromatografia em Camada Delgada Comparativa) .....	32

4.4.5 Análise dos Cromatogramas obtidos através Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas LC-MS .....	32
4.5 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	33
4.5.1 Animais .....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1 Testes extrativos para escolha do extrato .....	36
5.2 Fracionamento do Extrato etanólico das folhas de <i>Justicia secunda</i> . (EEFJsp) .....	37
5.3 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Justicia secunda</i> ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD) .....	37
5.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS CLASSES DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NAS FRAÇÕES F3 E F4 DO EXTRATO ETANOLICO DE <i>Justicia seunda</i> . .....	45
5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR LC-MS .....	52
5.6 ATIVIDADE VASORRELAXANTE DO EXTRATO SOBRE TECIDO VASCULAR.....	59
6 CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde - OPAS (2017), as doenças cardiovasculares (DCV) têm sido apontadas como as principais causas de morte dentre qualquer outra enfermidade. Dados estimados do ano de 2015 revelaram que 17,7 milhões de pessoas morreram em razão desta morbidade, simbolizando um total de 31% de todos os óbitos a nível mundial, e que mais de 75% desses óbitos ocorreram em países de baixa e média renda para os portadores destas doenças ou com grau de risco cardiovascular, em razão da presença de um ou mais fatores de risco (OPAS, 2017).

Semelhantemente ocorre no Brasil, em que 72% dos óbitos decorreram de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT), com cerca de 30% consistindo em DCV (NASCIMENTO *et al.*, 2016; GBD *et al.*, 2018). Segundo Oliveira e colaboradores (2020), no Brasil, que é um país de dimensões continentais, a desigualdade econômica torna-se um agravante na medida em que está intimamente correlacionada com a maior mortalidade por DCNT, principalmente as cardiovasculares (OLIVEIRA *et al.*, 2020), e como consequência, com a escassez de recursos, os custos com tratamento das DCV acabam drenando mais recursos existentes, gerando um ciclo vicioso de mais pobreza e atraso para o crescimento socioeconômico do país. (POLANCZYK, 2020).

Diversos fatores influenciam negativamente o acesso a medicamentos, como, socioeconômicos, acessibilidade geográfica e disponibilidade desses produtos (BLUM, LUIZA e BERMUDEZ, 2011), com destaque para as regiões norte e nordeste que exibem uma menor proporção de acesso à medicamentos em relação a outras regiões (DRUMMOND, SIMÕES e ANDRADE, 2018). Neste cenário, é de grande importância o uso alternativo de plantas medicinais (TUROLLA, 2006).

Historicamente a medicina tradicional é a soma total do conhecimento, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, explicáveis ou não, passadas de geração em geração, utilizadas na manutenção da saúde e na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais (WHO, 2019). Neste contexto, durante gerações, o conhecimento popular tem considerado as plantas como de essencial relevância para a prática terapêutica, com o propósito de profilaxia, tratamento ou cura; porém, com os avanços tecnológicos no campo da saúde, essas práticas foram, gradativamente, extinguindo-se com o surgimento dos medicamentos industrializados (AKERELE, 1993; BADKE *et al.*, 2012; ALBIERO e PEREIRA, 2015).

Neste sentido, estudos etnobotânicos são frequentemente significativos em divulgar espécies vegetais de uso medicinal importante em uma determinada região, especialmente para a descoberta de novos princípios ativos (MUTHEE *et al.*, 2011). O conhecimento sobre plantas medicinais é um dos maiores recursos terapêuticos de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002).

No Brasil, a utilização da medicina tradicional não é diferente, uma vez que o País é detentor de cerca de 20% da biodiversidade mundial, com destaque para a Floresta Amazônica, a maior do planeta, que se apresenta como uma fonte inestimável de matérias-primas para fins econômicos, sociais, científicos e de saúde (SOUZA *et al.*, 2004). A importância das plantas medicinais vai muito além da pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, ou quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003).

Estima-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis foram elaborados direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais (CALIXTO *et al.*, 2001).

No campo farmacêutico, as matérias primas a partir de plantas são de grande importância para a medicina popular (SCHENKEL *et al.*, 1985; SIMÕES *et al.*, 1986). Com o avanço em pesquisas e o grande crescimento neste segmento, deve ser considerada a viabilidade das substâncias ativas advindas de plantas medicinais como referência para elaboração de novas drogas ou de medicamentos à base de extratos vegetais: medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL, GOSMANN e PETROVICK, 2001).

O descobrimento de novas drogas a partir de produtos naturais é uma das ferramentas que tem contribuído bastante para o desenvolvimento da química (CORDELL, 2000). Neste contexto é reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (TOMAZZONI, NAGRELLE e CENTA, 2006). Porém, um número pequeno de espécies utilizadas popularmente tem sido analisado cientificamente quanto à sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005).

O gênero *Justicia* é a maior representante da família Acanthaceae, e uma das espécies mais conhecidas neste gênero é *Justicia pectoralis* cujos estudos prévios evidenciaram que suas atividades farmacológicas são resultantes da ação das classes flavonoides, terpenos, alcaloides e cumarinas (CORRÊA e ALCÂNTARA, 2012). A atividade broncodilatadora é atribuída a alcaloides e cumarinas, sendo que esta última também apresenta atividade analgésica, dado que

corrobora com o uso popular para dor de cabeça atribuído à espécie *Justicia pectoralis* (CORRÊA e ALCÂNTARA, 2012).

Sendo assim, considerando a riqueza da flora amazônica, torna-se de grande importância a investigação de novas drogas a partir do estudo fitoquímico de espécies vegetais encontradas na região (YUNES, PEDROSA e FILHO, 2001).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Identificar metabólitos secundários no extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* (EEJs) através de LC-MS e análises putativas e avaliar a atividade deste extrato sobre o sistema cardiovascular.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aplicar técnicas de cromatografia (CCDC e CCVU) para a seleção e agrupamento de metabólitos por meio de fracionamento por solventes orgânicos de diferentes polaridades;
- Descrever o perfil cromatográfico do extrato e frações obtidos da espécie em foco;
- Analisar o extrato etanólico das folhas através de técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS);
- Obter análise *in silico* por consulta aos bancos de dados de espectrometria de massas disponíveis;
- Contribuir para o fortalecimento das bases de dados químicas da espécie *Justicia secunda* (Acanthaceae).
- Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo extrato etanólico de *Justicia secunda*.
- Relacionar os efeitos cardiovasculares provocados, com as substâncias identificadas no extrato testado.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 FAMÍLIA ACANTHACEAE

A família Acanthaceae abrange aproximadamente 275 gêneros e 4000 espécies distribuídas, predominantemente, pelas regiões tropicais, com poucos representantes nas regiões temperadas (WASSHAUSEN, 1998). Os principais centros de diversidade para a família são o sudeste da Ásia, Malásia, Índia, África tropical, Madagascar, Brasil, região Andina, México e América Central (DANIEL, 2000).

As Acantáceas brasileiras ocorrem em praticamente todos os domínios fitogeográficos, apresentando elevado número de espécies nos ambientes florestais da Mata Atlântica, sendo a família bastante ornamental, em sua grande maioria herbácea, subarborescente, arbustiva, raro trepadeiras e árvores (MARTINELLI, MESSINA e SANTOS FILHO, 2014). Os gêneros mais representativos no país são *Justicia*, *Ruellia* e *Aphelandra* e as espécies estão presentes em uma diversidade de habitats, desde restingas, áreas campestres até regiões alagadas (mangues) (MARTINELLI, MESSINA e SANTOS FILHO, 2014).

#### 3.2 GÊNERO *JUSTICIA*

*Justicia* é um dos dos principais generos da família Acanthaceae. Suas espécies são encontradas particularmente na Ásia, América e África (KITADI *et al.*, 2019). Na América do Sul, especificamente no Brasil, a família é representada por 41 gêneros e 432 espécies, com destaque para *Justicia* L., *Ruellia* L. e *Aphelandra* R. (PROFICE *et al.*, 2010).

Todos os segmentos dessa planta são utilizados pela medicina tradicional para tratar diversas enfermidades como diabetes (THEILER *et al.*, 2016), cancro (LIU *et al.*, 2018), doenças respiratórias (LEAL, SILVA e VIANA, 2017), gastrointestinais (KITADI *et al.*, 2019) bem como inflamação (VERDAM *et al.*, 2015).

No sistema nervoso central atua como alucinógenos, agentes ansiolíticos, (GARCÍA, MORA-PEREZ e GONZALEZ-TORRES, 2019) depressores em tratamentos para epilepsia, transtornos mentais, bactericida (HERRERA-MATA, ROMERO e CRESCENTE, 2008), anemia e hipertensão (N'GUESSAN, KOUASSI e OUTARA, 2010; N'GUESSAN, SORO e AMON, 2011). Outras espécies são usadas no tratamento de dor de cabeça, febre, sedativo e analgésico (CORRÊA e ALCÂNTARA, 2012).

Diversas atividades biológicas foram relatadas para diferentes extratos de *Justicia*, e uma quantidade considerável de compostos fitoquímicos foram isolados de diferentes partes dessas plantas (KITADI *et al.*, 2019).

O gênero *Justicia* possui muitos relatos na medicina tradicional, e diversos estudos realizados comprovam a presença de metabólitos secundários, que em uma mistura de substâncias ou isolados são responsáveis por múltiplas atividades farmacológicas, como a substância isolada umbeliferona, derivado cumarínico encontrado em *Justicia pectoralis*, tem sido empregada principalmente para doenças do trato respiratório (LEAL, SILVA e VIANA 2017); os flavonoides encontrados no gênero apresentaram sobretudo atividade antiinflamatória, e os alcalóides isolados demonstraram uma boa atividade broncodilatadora (CORRÊA e ALCÂNTARA, 2012); glicosídeo triterpenóide utilizado para controle da fertilidade e abortivo (KANCHANAPOOM *et al.*, 2004); e lignanas, que é a classe mais encontrada neste gênero, responsável por atividade sedativa, relaxante muscular, citotóxica, antiviral, inseticida, cardiotônica, analgésica, anti-inflamatória e estimulantes, já no sistema nervoso central, apresentaram propriedades depressoras significativas em ratos (N'GUESSAN, KOUASSI e OUATTARA *et al.*, 2010).

### 3.3 ESPÉCIE *Justicia secunda* Vahl M.

A espécie *Justicia secunda*, integra a família *Acanthaceae*, que é popularmente conhecida como "raiz do sangue" e "Sanguinaria" em Barbados e Venezuela, respectivamente (CARRINGTON *et al.*, 2012), é uma erva nativa oriunda da América do Sul, introduzida e atualmente cultivada em outros países africanos, tropicais ou subtropicais, muito utilizada como ornamental até a descoberta de suas atividades farmacológicas (KOFFI *et al.*, 2013).

**Figura 1:** Distribuição territorial da espécie *Justicia secunda* Vahl M.



**Fonte:** Kew science – Plants of the world online.

O chá das folhas de *Justicia secunda* é usualmente utilizado para vários tratamentos, estudos etnofarmacológicos realizados na África, relatam o uso desta planta pela medicina tradicional local como recurso terapêutico para anemia (N'GUESSAN, KOUASSI e OUATTARA, 2010). A anemia falciforme, é caracterizada principalmente pelo formato das hemácias em forma de foice, e que eritrócitos tratados com antocianinas do extrato aquoso, recuperam sua forma normal e devolvendo a estabilidade da membrana na maioria dos glóbulos vermelhos (MPIANA *et al.*, 2010a).

Suas propriedades antimicrobianas também são muito relatadas na medicina tradicional, pelo seu uso em feridas de pés de pacientes diabéticos, que em predominância são causadas por bactérias, em testes *in vitro*, com bactérias isoladas deste tipo de lesão, os extratos metatólico e acetônico obtidos via soxhlet, não produziram efeitos contra as bactérias teste *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (CARRINGTON *et al.*, 2012). Porém, em estudos realizados com extratos aquoso, etanólico e metanólico por maceração apresentou atividade contra patógenos Gram-positivos (HERRERA-MATA, ROMERO e CRESCENTE, 2002; AYODELE, 2020). Evidenciando as diferenças dos extratos, que mesmo partindo de uma mesma matriz, mas com a utilização de solventes distintos e formas diferentes de extração, exibem resultados diferentes.

Estudos *in vivo* realizados a partir do extrato aquoso das folhas de *Justicia secunda*, evidenciaram o efeito anti-hipertensivo em coelhos propositalmente descompensados, e em coelhos normotensos que receberam uma dose do extrato apresentaram resultados significativos de atividade hipotensora (MANDA *et al.*, 2011; ABO, KOUAKARO e ADOU, 2016).

A triagem da composição fitoquímica de diferentes formas de extração das folhas revelou a presença de polifenóis como, flavonoides, taninos e antocianinas (MPIANA *et al.*, 2010a; THEILER *et al.*, 2014), com destaque para a classe de flavonoides que teve o maior número de compostos fenólicos encontrados (KOFFI *et al.*, 2013). Os quadros abaixo exemplificam suas atividades farmacológicas.

**Quadro 1:** Relação de publicações com atividade farmacológicas comprovadas, parte da planta utilizada no estudo, tipo de extrato e solvente e referência da publicação.

Espécie	Atividade Testada	Parte Utilizada	Preparação/ Solvente	Referência
<i>Justicia secunda</i>	Anti-hipertensivo	Folhas	Decocção/ Água	Abo, Kouakaro e Adou (2016)
	Hepatoprotetor e antioxidante	Folhas	Maceração/ Metanol 70%	Aimofumeh, Anyasor e Esiaba (2020)
	Antiinflamatório	Folhas	Maceração/ Metanol 70%	Anyasor, Okanlawan e Ogunbiki (2019)
	Hepatoprotetor, hematínico e antioxidante	Folhas	Decocção/ Água	Anyasor, Moses e Kale (2020)
	Antibacteriano	Folhas	Maceração/ Água, Etanol e Metanol	Ayodele (2020)
	Não produziu efeito Antibacteriano	Folhas	Soxhlet/ Metanol e Acetona	Carrington e colaboradores (2012)
	Antibactericida Gram positivo	Caule e Folhas	Maceração/ Etanol Absoluto	Herrera-Mata, Romero e Crescente (2002)
	Anti-hipertensivo	Folhas	Decocção/Aquoso	Manda e colaboradores (2011)
	Hipoglicemiante	Folhas	Decocção/Aquoso	Mea e colaboradores (2017)
	Anti-falciforme	Folhas	Percolação/ Etanol 95%/ Aquoso	Mpiana e colaboradores (2010a)
	Antioxidante, anti-inflamatório e antinociceptivo	Folhas	Maceração/ Metanol 80%	Onoja e colaboradores (2016)
	inibição da $\alpha$ -glucosidase	Folha	Refluxo/ Metanol e Infusão/ Água	Theiler e colaboradores (2016)
	Hematínico	Folhas	Maceração/ Água, Acetato de etila e Metanol	Yamoah e colaboradores (2020)

**Fonte:** Autora

**Quadro 2:** Relação de publicações de pesquisas etnofarmacológicas de comunidades tradicionais que utilizam a planta como tratamento.

Espécie	Indicação	Parte Utilizada	Preparação/ Solvente	Referência
<i>Justicia secunda Vahl M</i>	Depressão e Anemia	Folha	Infusão/ Água	N'Guessan, Kouassi e Ouattara (2010)
	Anemia	Planta inteira	Decocção/ Água	Teklehaymanot (2009)

**Fonte:** Autora

### 3.4 Aplicação de Técnicas Hifenadas na abordagem de Matrizes Complexas

A quimiotaxonomia associada aos processos cromatográficos (CCD, CLAE, CG) e as técnicas espectroscópicas (UV, IV, EM e RMN) estão sendo aplicadas constantemente na pesquisa de isolamento e identificação de produtos naturais. Essa combinação, resulta no isolamento e identificação de milhares de substâncias de plantas, fungos, algas marinhas entre outras fontes

naturais. Em razão a grande quantidade de substâncias conhecidas advindas destas fontes, é de essencial importância, pesquisar a possibilidade de novos métodos de prospecção para isolamento e identificação de novas substâncias ou de produtos bioativos (LANG *et al.* 2008). As técnicas hífenizadas combinam métodos cromatográficos e espectrais para explorar as vantagens de ambos. A cromatografia produz frações puras ou quase puras de componentes químicos em uma mistura. A espectroscopia produz informações seletivas para identificação usando padrões ou espectros de biblioteca (KOPF e PATEL, 2010).

Nos últimos anos, as técnicas hífenadas têm recebido atenção cada vez maior como o meio principal para resolver problemas analíticos complexos. A associação de tecnologias de separação com técnicas espectroscópicas tem sido demonstrada ao longo dos anos para análise quantitativa e qualitativa de compostos desconhecidos em extratos ou frações de produtos naturais complexos. Para obter informações estruturais que levem à identificação dos compostos presentes em uma amostra bruta, a cromatografia líquida (CL), geralmente uma cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), cromatografia gasosa (CG) ou eletroforese capilar (EC), está ligada à espectroscopia técnicas de detecção, por exemplo, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), matriz de fotodiodo (PDA), absorção de UV-vis ou emissão de fluorescência, espectroscopia de massa (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (ERMN).

HPLC é a técnica de separação analítica mais amplamente usada para a determinação qualitativa e quantitativa de compostos em extratos de produtos naturais. A conexão física de HPLC e MS ou NMR aumentou a capacidade de resolver problemas estruturais de produtos naturais complexos. Devido à maior sensibilidade, o LC-MS tem sido mais amplamente usado do que o LC-NMR. A hífenação nem sempre precisa estar apenas entre duas técnicas; o acoplamento de técnicas de separação e detecção pode envolver mais de uma separação ou técnicas de detecção, por exemplo, LC-PDA-MS, LC-MS-MS, LC-NMR-MS, LCPDA-NMR-MS e semelhantes. Onde a análise de traços é vital, e o enriquecimento do analito é essencial (WILSON e BRINKMAN, 2003).

Os dois elementos-chave na pesquisa de produtos naturais são o isolamento e a purificação de compostos presentes em extratos ou frações brutos obtidos de várias fontes naturais e a identificação inequívoca dos compostos isolados. Assim, a caracterização on-line de metabólitos secundários em extratos ou frações de produtos naturais brutos exige alto grau de sofisticação e riqueza de informações estruturais, sensibilidade e seletividade. O desenvolvimento de várias técnicas hífenadas fornece aos pesquisadores de produtos naturais novas ferramentas

extremamente poderosas que podem fornecer excelente eficiência de separação, bem como aquisição de dados espectroscópicos complementares (KOPF e PATEL, 2010).

Deste modo, a aplicação de técnicas hifenadas, e uma metodologia útil, pois podem fornecer diversas informações estruturais sobre os metabolitos, antes mesmo do seu isolamento. Um detector espectrométrico acoplado à técnica de separação, como por exemplo, CLAE-EM, é uma das ferramentas mais utilizadas no estudo de plantas medicinais, onde a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida estão entre esses métodos de separação acoplados ao detector espectrométrico (ESPADA *et al.*, 2008).

### 3.5 SISTEMA CARDIOVASCULAR

O sistema cardiovascular, constituído pelo coração, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e sangue, tem como principal função estabelecer o equilíbrio homeostático e manutenção da pressão arterial (PA) (DAMPNEY, 1994; AARONSON, WARD e CONNOLLY, 2020).

A pressão arterial que é controlada por um sistema, depende de duas variáveis hemodinâmicas fundamentais, o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica total (RVPT). A interação destas variáveis determina a pressão arterial média (PAM):  $PAM = DC \times RVPT$ . A resistência vascular é influenciada por mudanças tensionais no músculo liso vascular e está diretamente envolvida no controle da PA. O tônus vascular das pequenas artérias e arteríolas é o maior determinante da resistência ao fluxo sanguíneo na circulação (BEVAN e LAHER, 1991; MAYET e HUGHES, 2003).

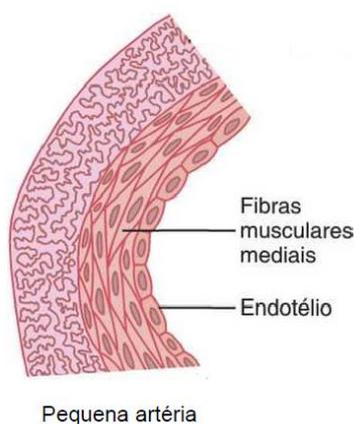
Um importante mecanismo fisiológico de regulação do tônus vasomotor e, conseqüentemente, da resistência vascular e pressão arterial é desempenhado pelo endotélio vascular, considerado um órgão vital na regulação, a curto e a longo prazo, do sistema cardiovascular (LUSCHER e VANHOUTTE, 1990; RUBANYI, 1993), sendo formado por uma única camada de células que revestem internamente a parede dos vasos, realizando a função, tanto como uma barreira semipermeável entre o sangue e tecido, como um instrumento especial no controle do tônus vascular e da microcirculação. Tal controle se dá através da liberação de várias substâncias vasoativas sejam elas vasodilatadoras ou vasoconstritoras, que se difundem para o músculo liso vascular adjacente para influenciar o tônus ou o potencial de membrana. (DAVIES, 2009).

O endotélio produz fatores contráteis, a exemplo da endotelina-1, angiotensina-II, tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandinas, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radicais livres, fisiologicamente existe um equilíbrio preciso entre a liberação dos fatores endoteliais, sendo a

produção de fatores relaxantes mais importante, prevalecendo sobre os efeitos dos agentes contráteis. Além de seu papel vasodilatador, o endotélio normal previne contra o desenvolvimento de lesões vasculares, inibindo a agregação plaquetária, a adesão leucocitária e a proliferação das células musculares lisas (FENG *et al.*, 1997; TRIGGLE *et al.*, 2004).

A degeneração endotelial conduz a numerosos processos deletérios, danificando as células vasculares bem como os tecidos vizinhos. Assim, a disfunção endotelial desenvolve um papel principal na patogênese de DCV como a aterosclerose e hipertensão (DHARMASHANKAR e WIDLANSKY, 2010; SEALS, JABLONSKI e DONATO, 2011).

**Figura 2:** Anatomia de uma artéria.



**Fonte:** Adaptada do tratado de fisiologia médica.

O tônus vascular desempenha um importante papel na regulação e manutenção da pressão arterial, mediado pela regulação do tônus da célula muscular lisa vascular e determinado pelo equilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasorrelaxantes, e é desempenhado, em grande parte, pelas células endoteliais (TOUYZ *et al.*, 2018). A célula muscular lisa vascular representa a via final comum para muitas destas alterações dinâmicas na hipertensão, conseqüentemente inúmeras pesquisas têm salientado a elucidação de mecanismos fisiológicos e eventos fisiopatológicos que regulem o crescimento e contração de célula muscular lisa vascular na saúde e na doença cardiovascular (FURCHGOTT, 1984).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL, IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E REGISTRO LEGAL**

A coleta foi realizada em setembro de 2019 com obtenção de (12,305 kg) da espécie *Justicia secunda* (Acanthaceae), o material foi recolhido na Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental. Para fins legais de acesso a esta planta, junto ao

Ministério do Meio Ambiente, este trabalho foi registrado junto ao Sistema Nacional de Gestão ao Patrimônio Genético (SISGEN) sob o seguinte número de cadastro: AF7AA4B. Além disso, uma exsicata foi identificada pela botânica Dr<sup>a</sup>. Silvane Tavares Rodrigues e depositada no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental (IAN197.191).

As folhas de *Justicia secunda* foram cuidadosamente separadas dos caules e flores, selecionadas e lavadas em água corrente, aspergidas com solução de etanol 70° GL e secas em estufa com fluxo de ar à temperatura de 45 °C. O material vegetal, após seco, foi triturado em moinho de facas e peneirado em tamis com granulometria na faixa 180 µm, segundo recomendação da Farmacopeia Brasileira - 5<sup>a</sup> edição (BRASIL, 2010), pesado e armazenado em dessecador, obtendo-se um rendimento total de 2,128 kg.

**Figura 3:** Foto da espécie *Justicia secunda* Vahl M.



Fonte: Autora

## 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

### 4.2.1 Teste de extração

Os testes de extração foram realizados preconizando os solventes indicados pela farmacopeia Brasileira - 5<sup>a</sup> edição (BRASIL, 2010).

#### **4.2.2 Extração por maceração**

A primeira extração foi realizada por meio do processo de maceração. Para isto, 1,3 kg de material vegetal seco e triturado (folhas) foi mantido por 48 h em contato com álcool etílico, posteriormente filtrado e a solução obtida foi concentrada em evaporador rotativo a baixa pressão até secagem completa do material.

#### **4.2.3 Extração por soxhlet**

Para obtenção do extrato etanólico, foram utilizados 100 g de material botânico seco e triturado (folhas), a extração foi promovida através do soxhlet, que acoplado a um condensador e um balão de fundo redondo recebeu 700 mL de etanol, e permaneceu sob extração durante 8 horas ou até a percepção de saturação do material botânico, com temperatura aproximada de 78°C.

O solvente do extrato foi evaporado no mesmo sistema utilizado para realização da extração até a recuperação de aproximadamente 400 mL de etanol, e o extrato posteriormente transferido para uma placa de petri que permaneceu em estufa com fluxo de ar forçado (a 45 °C) para evaporação total do etanol, foram realizadas oito extrações para obtenção de extrato.

### **4.3 REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS**

Para a realização das Colunas Cromatográficas (CC) foram utilizados como fase móvel os solventes hexano, acetato de etila e metanol grau ACS da marca TEDIA e como fase estacionária, sílica gel, 60-200µm da marca Silicycle.

Para as análises cromatográficas utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu, constituído por uma bomba quaternária modelo LC-20AT. Degaseificador de membranas DGU-20A, Detector de Arranjos de Diodo (DAD), modelo SPD-M20A, auto injetor de amostras SIL-20A, interface de comunicação CBM-20A acoplado a um microcomputador Pentium IV com software de integração LC Solution, utilizou-se uma coluna Gemini C18 da marca Phenomenex (4,60 x 250mm; 5µm), água ultrapura e acetonitrila grau HPLC da marca TEDIA.

Em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizou-se um aparelho semiautomático da CAMAG controlado pelo software winCATS, as placas cromatográficas de sílica gel F-254 da marca MERCK (20x10 cm) e derivatizadores Dragendorff, Vanilina Sulfúrica Ácida (VAS), Difenilboriloxietilamina/Polietilenoglicol (NP-PEG) e Hidróxido de Potássio (KOH).

#### **4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO**

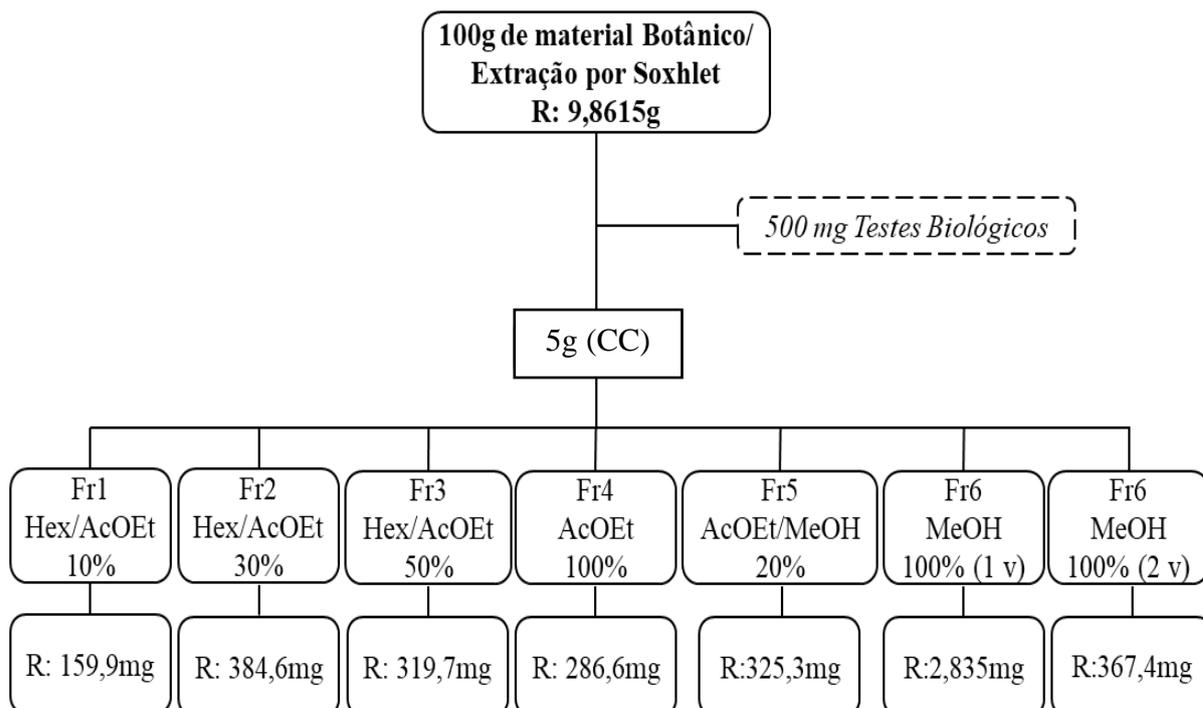
##### **4.4.1 Preparação das amostras**

As amostras foram preparadas de acordo com a finalidade experimental. Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas foi realizada a remoção de interferentes apolares da amostra através de *clean up* em extração de fase sólida (SPE). Em seguida, as amostras foram filtradas e, por fim, transferidas para seus respectivos vials.

##### **4.4.2 Fracionamento do extrato bruto**

No processo de separação dos componentes do extrato e frações por cromatografia em coluna, foram utilizadas colunas cromatográficas de vidro, estas selecionadas de acordo com a quantidade de material a ser adsorvido, com fase estacionária de sílica-gel 60 de granulometria 70–230 Mesh (0,063–0,20 mm) da Maherey-Nagel®. Para o fracionamento usou-se hexano, acetato de etila e metanol para a eluição, conforme a Figura 4.

**Figura 4:** Fluxograma das etapas de fracionamento do extrato bruto.



Fonte: Autora

#### 4.4.3 Análise dos metabólitos secundários através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

As amostras foram injetadas via LC-MS, em um modelo Xevo G2-XS QToF (Waters®) de configuração ESI-QToF. O tempo de aquisição de dados foi de 1 minuto por infusão direta. Para o método via LC-MS, alíquotas de 1 mg do extrato após tratamento por SPE, foram ressuspendidas e solubilizadas em H<sub>2</sub>O/ACN (2:8) na concentração final de 100µg.mL<sup>-1</sup>, em seguida as soluções foram filtradas e injetadas via UPLC com uso de método gradiente de 5 a 95% de ACN em 20 minutos com fluxo de 0,3mL/min em coluna BEH C18 (1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm). Os espectros foram adquiridos no modo positivo e negativo na faixa de 50 - 1200 Da. As configurações do sistema operacional foram: Tensão do capilar: 3kV; Tensão do cone: 40V; Temperatura da fonte: 120 °C; Temperatura de dessolvatação: 500 °C; Fluxo do gás de dessolvatação: 600 L/h; Fluxo de gás no cone: 30 L/h.

#### 4.4.4 Caracterização química do extrato através das técnicas de CLAE-DAD

Para o tratamento de extração de fase sólida (SPE), uma alíquota de 5 mg do extrato foi solubilizada em 800 µL de acetonitrila e submetida em banho ultrassônico por 1 minuto, em seguida foram adicionados 200 µL de água ultrapura e estabelecida uma concentração solução

final H<sub>2</sub>O:ACN 2:8 v/v, permanecendo no banho ultrassônico pelo mesmo tempo. Concomitantemente, foi realizado o condicionamento do cartucho C18 (SPE) contendo 50 mg de fase estacionária, com um volume de 1 mL de solvente orgânico Acetonitrila (ACN) e um volume de 1 mL de água ultrapura.

Após condicionamento do cartucho, as amostras foram inoculadas, realizando o tratamento por SPE e posteriormente evaporadas para obtenção do peso. Após evaporação da solução resultante, a massa foi pesada e ressuspensa em 1 mL de uma solução composta por H<sub>2</sub>O:ACN 2:8 v/v, filtradas e injetadas em HPLC a uma concentração final de 5 mg/mL para o extrato total, e 1 mg/mL para as frações. Em seguida, o extrato resultante foi analisado qualitativamente em HPLC-DAD. Como fase móvel utilizou-se um sistema em modo gradiente composto por água (A) e acetonitrila (B) indo de 5 a 100% de B em 60 min, em varredura de comprimento de onda de 200 a 400 μm sob vazão de 1 mL/min.

#### **4.4.4 Análise do extrato e frações através de CCDC (Cromatografia em Camada Delgada Comparativa)**

Alíquotas da amostra foram aplicadas em placas de sílica gel em bandas de 7 mm de largura, com 13 mm de distância entre elas. As placas foram eluídas em uma cuba cromatográfica de vidro utilizando como fase móvel uma mistura contendo por Hex:AcOEt, na proporção de 35:65 v/v. Após este processo, as placas foram derivatizadas com NP-PEG, KOH, VAS e Dragendorff e em seguida avaliadas, sendo que as duas primeiras foram avaliadas sob a luz ultravioleta 366 nm e as duas últimas sob luz visível, posteriormente foram fotografadas e armazenadas.

#### **4.4.5 Análise dos Cromatogramas obtidos através Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas LC-MS**

Os cromatogramas da análise de *full scan*, foram obtidos via LC-MS para o extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* no modo  $[M + H]^+$  e  $[M - H]^-$ . Foi preparada um quadro constando os dados de fórmula estrutural, massa protonada e desprotonada para substâncias já isoladas ou identificadas de plantas da mesma família, gênero e da espécie estudada. Após comparação dos íons presentes no cromatograma do extrato com os dados compilados no quadro, os íons não identificados foram comparados por anotação em busca nas bases de dados METLIN, MONA, TMIC E isoMETLIN.

#### 4.5 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

O extrato etanólico de *Justicia secunda* obtido segundo protocolo operacional padrão do Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL), foi encaminhado à Universidade Federal da Paraíba, aos cuidados do Prof. Dr. Isaac Almeida de Medeiros, para realização dos ensaios cardiovasculares *in vitro*, aprovado pelo comitê de ética sob o protocolo de número (CEUA 6944201119).

##### 4.5.1 Animais

Para a realização dos protocolos experimentais (*in vitro*) foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 150 - 300 g com dois a três meses, obtidos do biotério Prof. Thomas George do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Delby Fernandes de Medeiros. Os animais foram mantidos sob condições constantes de temperatura (21 +/- 1°C) e ciclo claro escuro de 12 horas (6:00 às 18:00 horas), tendo livre acesso a alimentação e água. Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

##### 4.5.2 Substância teste

Para a realização dos protocolos experimentais *in vitro*, imediatamente antes dos experimentos, o extrato foi solubilizado em cremofor na proporção de 1:1 e diluído em água destilada para a concentração de 10<sup>-1</sup> M; ou em solução salina (0,9%) para a concentração de 20 mg/ml.

##### 4.5.3 Drogas utilizadas

Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de acetilcolina (ACh); cloridrato de fenilefrina (FEN); todos obtidos da Sigma-Aldrich (EUA) e dissolvidas em água destilada e cremofor.

##### 4.5.4 Soluções

No protocolo *in vitro* foram utilizadas soluções nutritivas (pH = 7,4) aeradas com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantidas a 37° C. Na preparação das soluções foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), bicarbonato de sódio

(NaHCO<sub>3</sub>) e glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (SIGMA), cuja composição em milimolar (mM) é descrita no Quadro 3.

**Quadro 3:** Composição da solução de Tyrode (pH = 7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6

#### 4.5.5 Preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Os ratos foram eutanasiados em seguida realizada uma incisão no abdômen do animal e artéria mesentérica cranial identificada, após identificação foi extraída e imediatamente transferida para a solução de Tyrode, onde o vaso foi dissecado e seccionado em anéis (1 - 2 mm de comprimento). Os anéis tiveram o endotélio removido por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal. Cada anel foi imerso em cubas contendo solução de Tyrode, a 37° C, gaseificada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (carbogênio), para manter o pH relativamente constante entre 7,2 e 7,4. Em seguida, os anéis foram suspensos verticalmente por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (DATAQ®, 2008, Insight, Brasil) e submetidos à tensão basal de aproximadamente 0,75 g, durante 60 minutos para estabilização. Durante este período a solução do banho foi trocada a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos e a linha de base ajustada quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970). Mudanças na tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição (WinDaq/XL, DI 148-U, Insight, Brasil).

#### 4.5.6 Verificação da presença de endotélio funcional

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 µM) após adição de 10 µM de acetilcolina (ACh). Os anéis com relaxamento superior a 80% sobre a pré-contracção com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Já os anéis com relaxamento inferior a 10%, foram considerados sem endotélio funcional (E-) (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). Para esse estudo foram utilizados apenas anéis sem endotélio funcional. Os demais foram descartados.

#### **4.5.7 Avaliação da atividade vasorrelaxante do extrato sobre tecido vascular.**

O protocolo de avaliação da tolerância induzida pelo extrato foi realizado de acordo com Daiber e colaboradores (2004). Após um período de estabilização de 60 minutos e posterior verificação do endotélio funcional (10  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M), o extrato foi adicionado ao banho e incubado por 30 minutos. Após este período os anéis foram lavados e submetidos a um segundo período de estabilização, semelhante ao anterior. Em seguida, induziu-se uma contração com FEN (10  $\mu$ M) e concentrações crescentes do extrato foram aplicadas de maneira cumulativa para a obtenção de uma curva concentração-resposta. O relaxamento foi expresso como percentagem reversa da contração induzida pela FEN, os testes foram realizados em duplo.

O relaxamento induzido pelo extrato, em anéis pré-incubados foram comparados com o relaxamento dos anéis que não sofreram exposição prévia ao extrato. Em outro grupo, os anéis foram incubados apenas com uma solução de água e acetonitrila (10  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M) e o mesmo veículo foi administrado cumulativamente nas mesmas doses utilizadas do extrato ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M) após a contração com FEN (Grupo controle).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Testes extrativos para escolha do extrato

De acordo com a revisão da literatura, estudos farmacológicos sobre a espécie *Justicia secunda*, são bem descritos, com a utilização de métodos de extração como, decocção, infusão, maceração entre outros, com diversos solventes, mas principalmente com o solvente água (MANDA, 2011) e metanol (ONOJA *et al.*, 2016).

Após a evaporação total, o extrato etanólico por maceração foi pesado e obteve-se 34 g de extrato, que representa 2,61% do material vegetal inicial seco, o que pode ser considerado um rendimento baixo, razão pela qual foi necessário otimizar o método de extração, logo, foram realizados novos testes de extração conforme Tabela 1.

**Tabela 1:** Rendimento dos Extratos.

Massa (material seco)	Volume (Solvente) 2 bateladas	Extrato pós- SPE	Rendimento (%)
500 mg	8 mL Etanol maceração	7 mg	1,4
500 mg	8 mL de Água	76 mg	15,2
500 mg	8 mL de Metanol	40 mg	8,0
500 mg*	Etanol Soxhlet	49,30 mg	9,0

**Nota:** \*Extrato e Rendimento%, encontrados de acordo com o cálculo de estimativa.

**Fonte:** A autora.

Os solventes foram escolhidos de acordo com o preconizado na Farmacopeia Brasileira - 5ª edição, que recomenda a água e o etanol como solventes de escolha para extratos, e na hipótese da escolha do solvente metanol, teria que ser realizado o teste de determinação de Metanol que não deve ultrapassar mais que 0,05% (v/v) de metanol para extratos fluidos.

Os extratos, aquoso e metanólico apresentaram um rendimento esperado de acordo com o descrito na literatura, que está em torno de 10% do rendimento para extratos relatados no mesmo gênero, e por apresentarem estudos em relação a suas atividades farmacológicas optou-se por trabalhar e investigar o extrato etanólico (KOFFI *et al.*, 2013; ONOJA *et al.*, 2016). O extrato de escolha foi o etanólico por Soxhlet, onde se obteve o rendimento de 9,8615g a partir do extrato seco, cerca de 9% de rendimento do material botânico inicial, pois a que comparado a outros extratos realizados no mesmo gênero pode ser considerado um rendimento satisfatório.

Foram realizadas sucessivas extrações, no intuito de adquirir extrato suficiente para testes farmacológicos e estudo fitoquímico.

## 5.2 Fracionamento do Extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*. (EEFJsp)

De posse do extrato etanólico, realizou-se, inicialmente, um teste de separação em uma coluna cromatográfica por via úmida (CCVU) com 1 grama de extrato adsorvido em sílica gel, utilizando como fase móvel uma mistura de solventes em grau crescente de polaridade Hex:AcOEt:MeOH. Esta coluna resultou em 7 frações, denominadas da seguinte forma: Fr-1 (Hex:AcOEt 10%), Fr-2 (Hex:AcOEt 30%), Fr-3 (Hex:AcOEt 50%), Fr-4 (AcOEt), Fr-5 (AcOEt:MeOH 20%), Fr-6 (MeOH) e Fr-7 (MeOH 2 VOL) como ilustra a Figura 5.

**Figura 5:** Frações do Extrato.



**Fonte:** Autora.

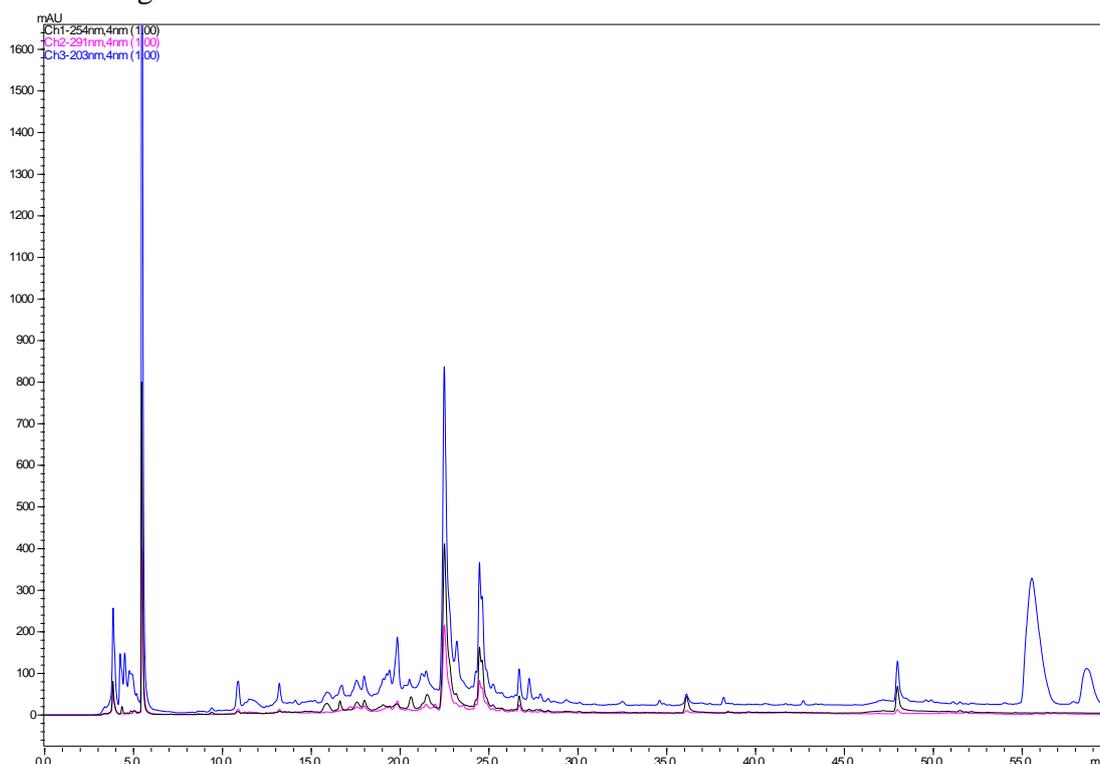
Porém quando reproduzido para uma escala maior, com 30 g de extrato, não houve separação com êxito, que pode ter provocado o alargamento de banda, ocorrida por diversos fatores e processos como difusão de Eddy (CASS e DEGANI, 2001), temperatura que exerce efeito sobre a viscosidade da fase móvel e consequentemente sobre a retenção, seletividade e eficiência da coluna (MUHLEN e LANÇAS, 2004). Após sucessivos fracionamentos, a quantidade ideal de material botânico, sílica gel e constituição de fase móvel foram encontradas, e o método de fracionamento foi reproduzível com 5 gramas de extrato.

Após o fracionamento de 5 gramas de extrato, a recuperação para a somatória das frações da coluna foi de 4,6785g (93,5%).

## 5.3 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *Justicia secunda* ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

Os resultados cromatográficos referentes ao extrato, foram comparados aos de outras espécies vegetais que utilizaram a mesma técnica de caracterização fitoquímica (Figura 6).

**Figura 6:** Cromatograma extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.



**Fonte:** Autora

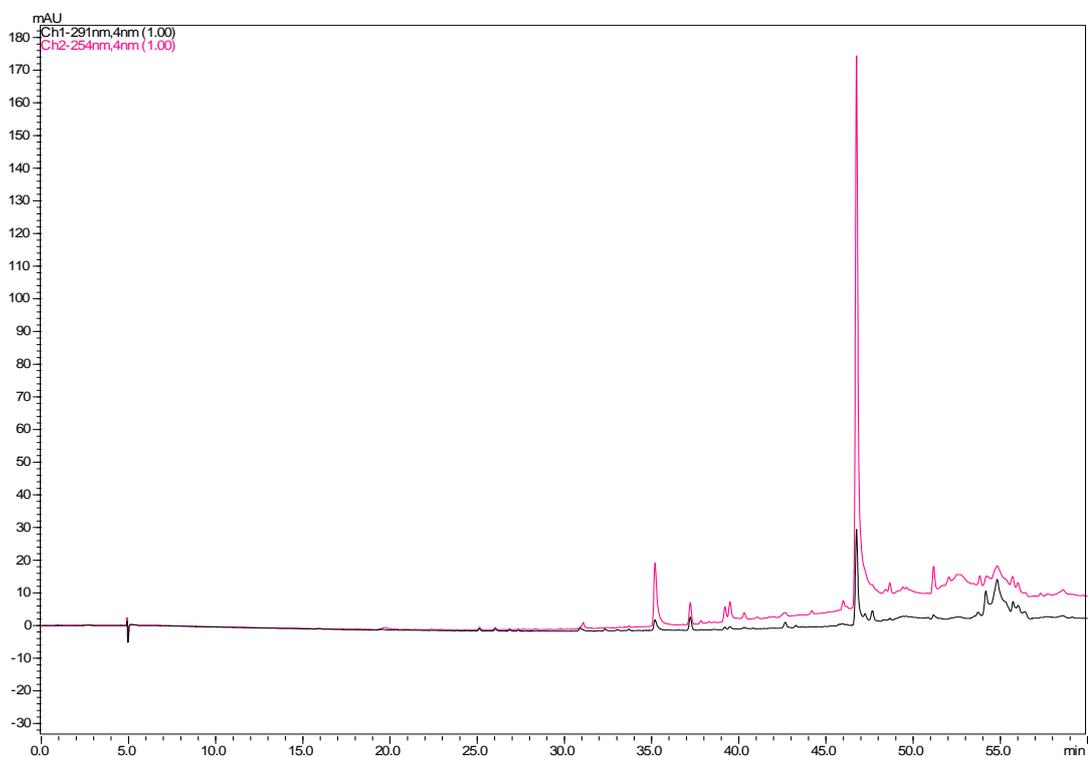
Inicialmente a amostra foi devidamente tratada por SPE, como mostrado anteriormente no item 4.2.3, para retirada de qualquer interferente, e as condições cromatográficas adequadas, para fase móvel foi utilizada uma mistura binária de água e acetonitrila, que iniciou com 5% de acetonitrila até a concentração de 100%, com uma coluna Gemini C18, com fluxo de 1mL/min, o tempo de aquisição dos dados foi de 60 min, com varredura de 200 a 400 nm.

O cromatograma obtido foi a partir de uma concentração de 5 mg/mL, com absorbâncias na faixa de 254 nm, 291nm e 203 nm com substâncias de diversas polaridades distintas que de acordo com sua faixa de absorbância, podem ser comparadas com as classes que possuem a mesma característica na literatura, como na faixa de 240 a 285 nm, absorções características de flavonoides encontrados no gênero (KOFFI *et al.*, 2013); 291 nm, que sugere a presença de alcaloides encontrados na espécie estudada (THEILER *et al.*, 2014.); e 203 nm, que sugere a presença de terpenos com absorção máxima de UV entre 200 e 215 nm (JIANG *et al.*, 2016).

Cada uma das frações resultantes do extrato etanólico foi injetada em CLAE-DAD utilizando-se as mesmas condições cromatográficas para comparação com aquele extrato. Os cromatogramas das frações são apresentados abaixo, na sequência de polaridade das mesmas.

A figura 7 apresenta absorções com tempo de retenção entre 35- 60 minutos, que eluiram no final do cromatograma, no tempo de retenção de aproximadamente 47 minutos o pico com maior intensidade de absorção é evidenciado.

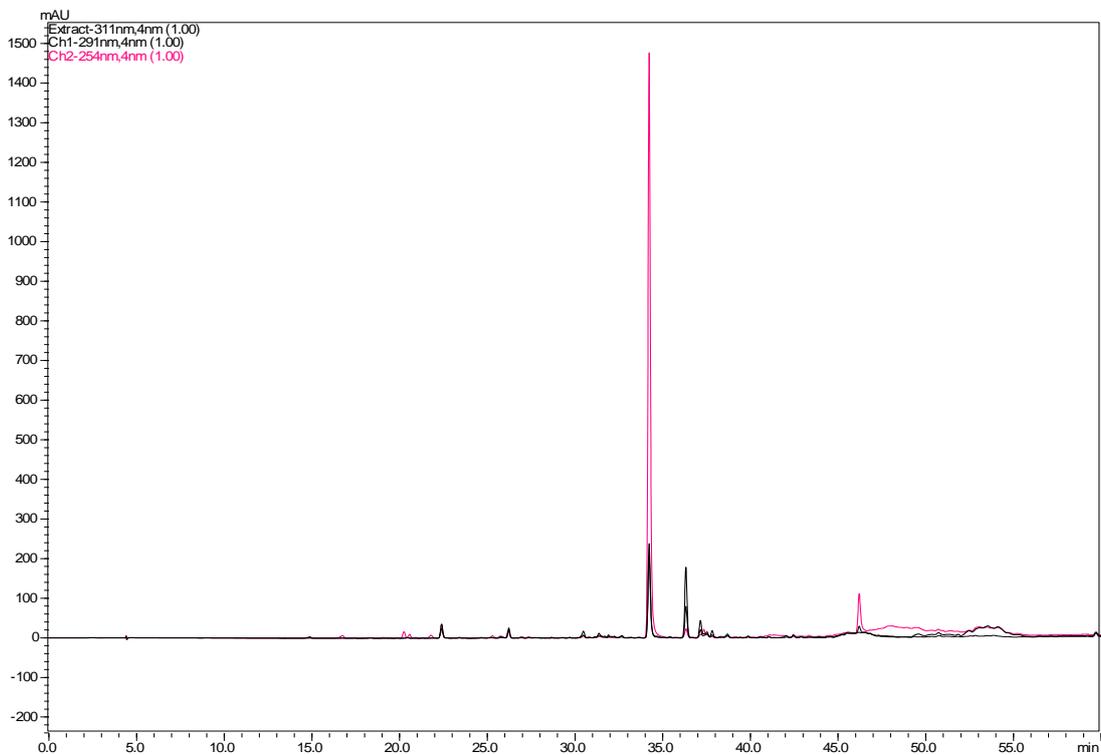
**Figura 7:** Cromatograma da fração Hexano- Acetato 30% (FR2) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.



**Fonte:** Autora

Na figura 8, diferente da fração anterior, a eluição dos compostos inicia em aproximadamente 15 minutos, mesmo em absorções baixas podendo observados até 55 minutos, com um pico majoritário em torno de 34 minutos bem absorvido no comprimento de onda de (254nm).

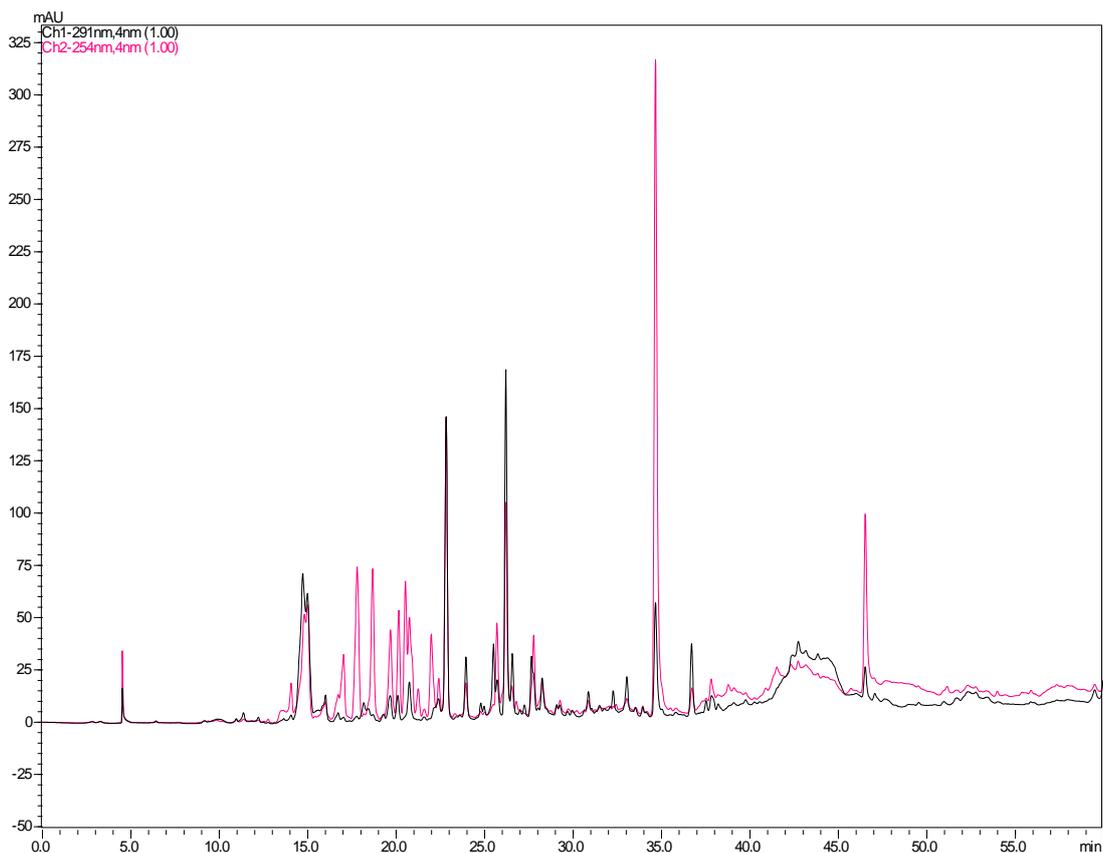
**Figura 8:** Cromatograma da fração Hexano- Acetato 50% (FR3) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.



**Fonte:** Autora

Na figura 9, nota-se relativa abundância de substâncias absorvidas, com substâncias que eluem em torno de 4-60 minutos, com características de média polaridade, com destaque um composto majoritário que absorve mais que as outras substâncias no tempo de retenção em aproximadamente 35 minutos em um comprimento de onda (254nm), pode-se inferir que também foi identificada na fração anterior com o mesmo tempo de retenção, já que as análises partem de uma mesma matriz amostral e foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas.

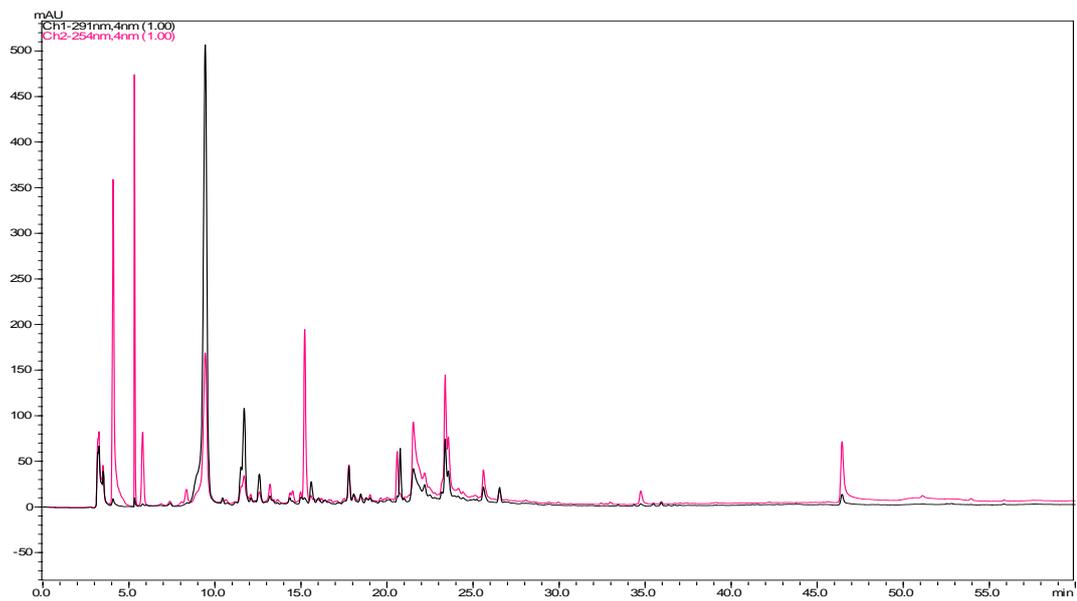
**Figura 9:** Cromatograma da fração Acetato 100% (FR4) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.



**Fonte:** Autora

Na figura 10, no cromatograma pode-se observar uma gama de substâncias absorvidas em diferentes tempos de retenção, estes compostos absorvidos são de grande maioria de alta polaridade, com início de eluição de 3-35 minutos, com um pico majoritário mais intenso absorvido em 9 minutos, no comprimento de onda (291nm).

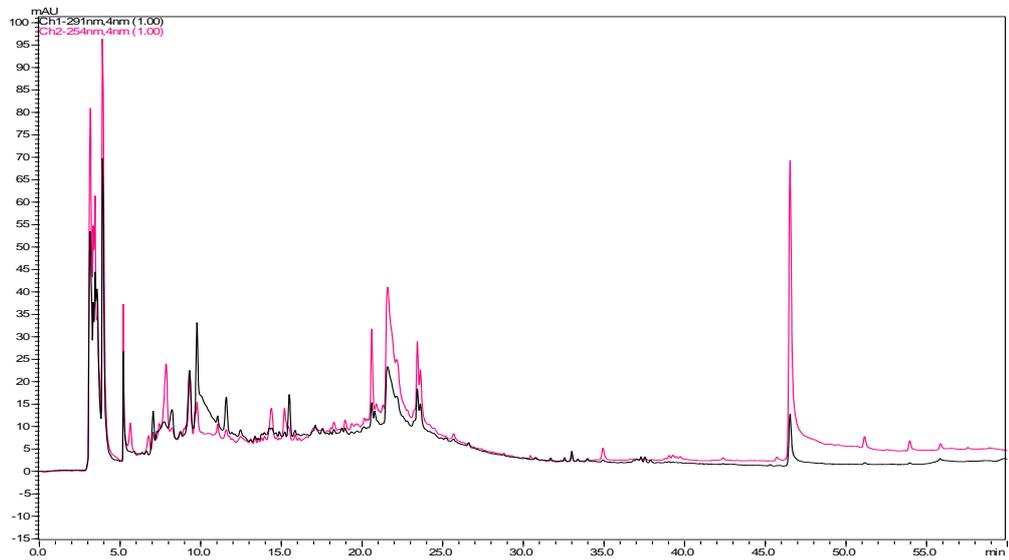
**Figura 10:** Cromatograma da fração Acetato-Metanol 20% (FR5) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.



Fonte: Autora

Na figura 11, o cromatograma apresenta compostos de alta a média polaridade com início da eluição de 3-35 minutos, similar ao cromatograma anterior, porém com pouca resolutividade, alargamento de banda, diminuição de intensidade dos picos e elevação do pico base.

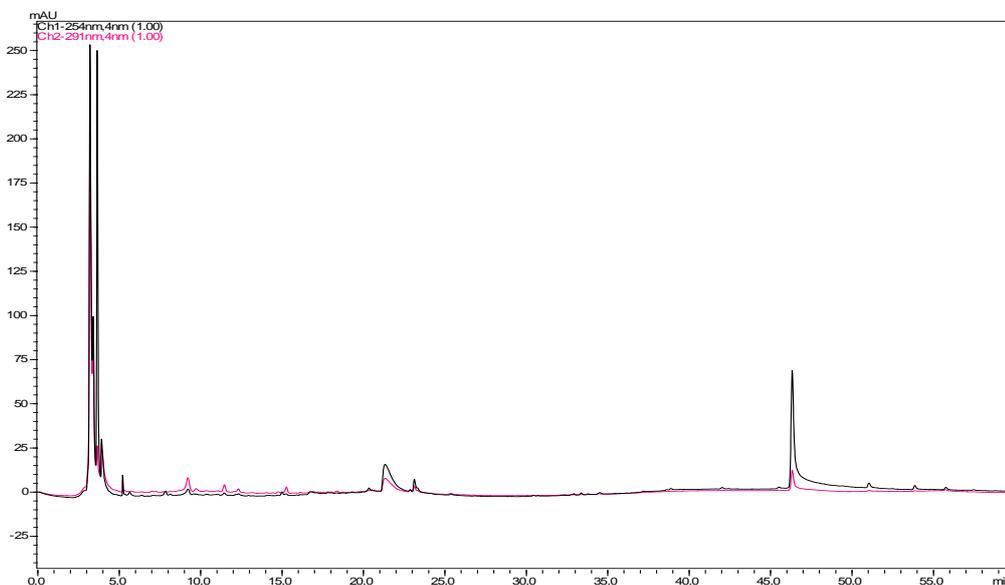
**Figura 11:** Cromatograma da fração Metanol 100% (FR6) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.



Fonte: Autora

Na figura 12, são observadas no cromatograma substâncias em sua grande maioria com características de alta polaridade, eluindo no início da corrida cromatográfica.

**Figura 12:** Cromatograma da fração Metanol 100% 2º volume (FR7) do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda*.



**Fonte:** Autora

A detecção eficiente e a caracterização rápida de produtos naturais desempenham um papel importante como suporte analítico no trabalho dos fitoquímicos, uma vez que extratos vegetais são geralmente misturas muito complexas contendo centenas ou mesmo milhares de constituintes diferentes (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

A natureza do problema de separação varia consideravelmente, desde o isolamento de pequenas quantidades para determinação estrutural, até o isolamento de quantidades muito maiores para testes biológicos abrangentes ou mesmo a produção de agentes terapêuticos. Na cromatografia líquida, as fases estacionária e móvel são de primordial importância porque a separação ocorre por meio da distribuição seletiva de componentes entre essas duas fases. Uma fase móvel consistindo em um único eluente pode não ser suficiente para separar e eluir cada composto de um determinado produto natural, especialmente se a mistura de eluição incluir compostos com polaridades diferentes, como exemplificado nos cromatogramas acima (SOARES, SCARMINIO e BRUNS, 2011).

A estratégia utilizada com o objetivo de separar metabólitos do extrato na fase móvel, são rotineiramente aplicadas à cromatografia em coluna clássica, que utilizando três solventes, podendo ser utilizados solventes puros, misturas binárias e até mesmo ternárias, e essas soluções

de eluição passem através da coluna em ordem crescente de polaridade, este é o procedimento químico clássico de fracionamento cromatográfico (HOUGHTON e RAMAN, 2012).

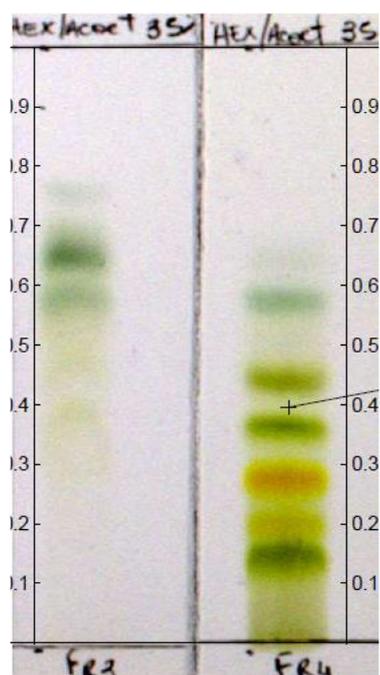
#### **5.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS CLASSES DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NAS FRAÇÕES F3 E F4 DO EXTRATO ETANOLICO DE *Justicia seunda*.**

A partir da análise qualitativa das frações através de Cromatografia Líquida de alta eficiência, foi observada que a fração Hexano-Acetato de Etila 50% (FR3), aparentemente apresentava menor complexidade de diversidade metabólica, sendo a primeira fração escolhida para isolamento através do método de cromatografia de fase reversa, porém, após o tratamento por SPE, o rendimento diminuiu consideravelmente. Logo, optou-se pelo isolamento pelo método em coluna por via úmida com solventes de fase normal, para isto, as duas frações FR3 e FR4, foram comparadas por cromatografia em camada delgada para obtenção de um sistema de eluição eficiente, após a qual foram reveladas com o auxílio de derivatizadores.

A partir da análise realizada com derivatizadores, as frações foram testadas para as seguintes classes de substâncias: flavonoides, alcaloides, cumarinas e terpenos nas frações.

Ao utilizar o Dragendorff, ocorre uma reação colorimétrica visível, imediatamente após o contato com o reagente, produzindo assim uma coloração amarela ou amarronzada que pode ser observada a luz visível (WAGNER e BLADT, 2001).

**Figura 13:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com Dragendorff, com leitura na luz visível (Branca).

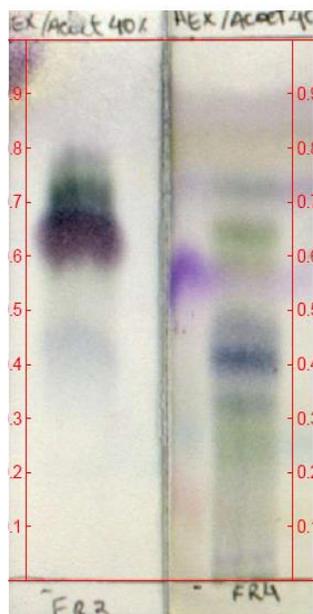


Fonte: Autora

Observa-se que houve reação somente para a fração FR4, com fator de retenção aproximado entre 0,2 e 0,3. Que corrobora com outros estudos realizados para a espécie, que identificaram qualitativamente a presença de alcalóides (KONÉ *et al.*, 2012; ANYASOR, OKANLAWAN e OGUNBIKI, 2019), como por exemplo, o isolamento de três alcaloides derivados da pirrolidona denominados secundarellona A, B e C (THEILER *et al.*, 2014).

A reação de Vanilina Sulfúrica Ácida (VAS) com grupos cromóforos característicos de terpenos gera uma reação colorimétrica azul/roxa (WAGNER e BLADT, 2001).

**Figura 14:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com VAS e visualizada na luz visível.

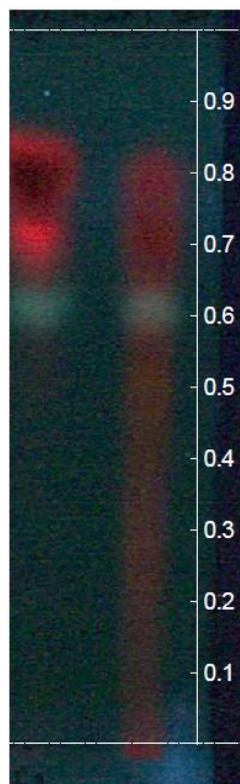


**Fonte:** Autora

Tais modificações na coloração foram observadas para a aplicação das frações FR3 e FR4. Estudos fitoquímicos realizados nos galhos, através de testes qualitativos para a mesma espécie, corroboram com nossos achados (MORA e PESANTES 2017). Porém, não há relatos de terpenos isolados desta espécie até o momento (AYODELE, 2020).

O revelador Hidróxido de Potássio (KOH) são característicos para substâncias cumarínicas, pode-se observar que nas duas frações aparecem bandas brancas próximo ao  $r_f$  de 0,6 que sugerem sua presença. Estudos corroboram com achados de testes fitoquímicos qualitativos que atestam a presença de substâncias desta classe nos galhos da espécie. No entanto, não há relatos de substâncias isoladas para a espécie *Justicia secunda* (MORA e PESANTES, 2017).

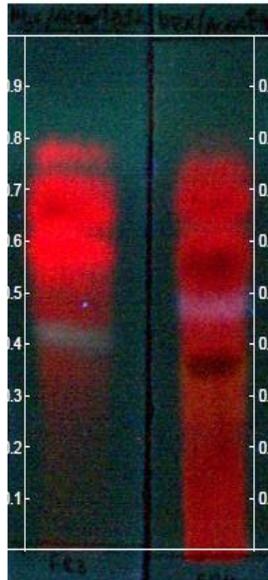
**Figura 15:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com KOH e visualizados no comprimento de onda de 366nm.



**Fonte:** Autora

Outro reagente capaz de intensificar a fluorescência de cumarinas é o NP-PEG, gerando uma coloração azul ou verde, para flavonoides a reação dependerá do seu tipo estrutural, podendo resultar em amarelo, verde ou azul fluorescentes no ultravioleta a 365nm (WAGNER e BLADT, 2001). Observa-se que houve reação colorimétrica azul para a fração F4.

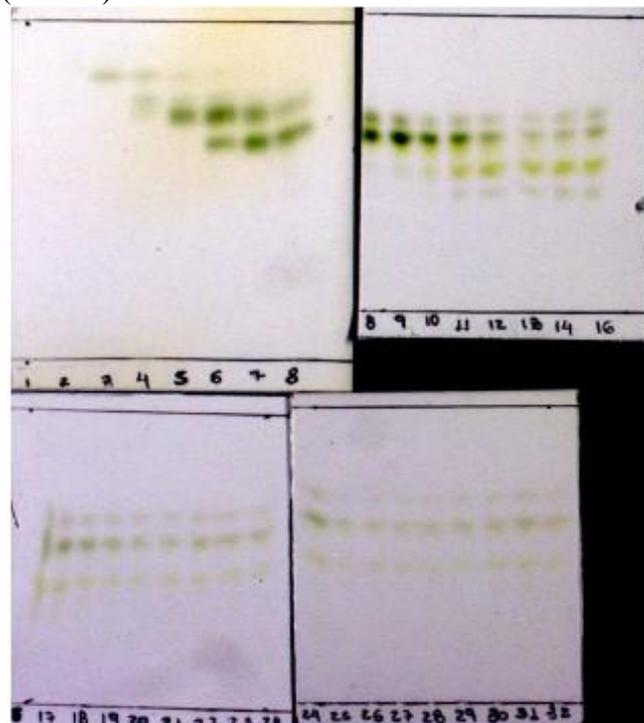
**Figura 16:** Cromatografia em Camada delgada das Frações Hexano- Acetato de Etila 50% (FR3) e Acetato de Etila 100% (FR4), reveladas com NP-PEG e visualizados no comprimento de onda 366nm.



Fonte: Autora

Após testes de eluição com diferentes sistemas em cromatografia em camada delgada, foi realizada uma coluna filtrante clássica, com intuito de fracionar a fração hexano-acetato 50%, e o sistema que melhor separou a bandas cromatográficas foi o Hexano-Acetato 35%.

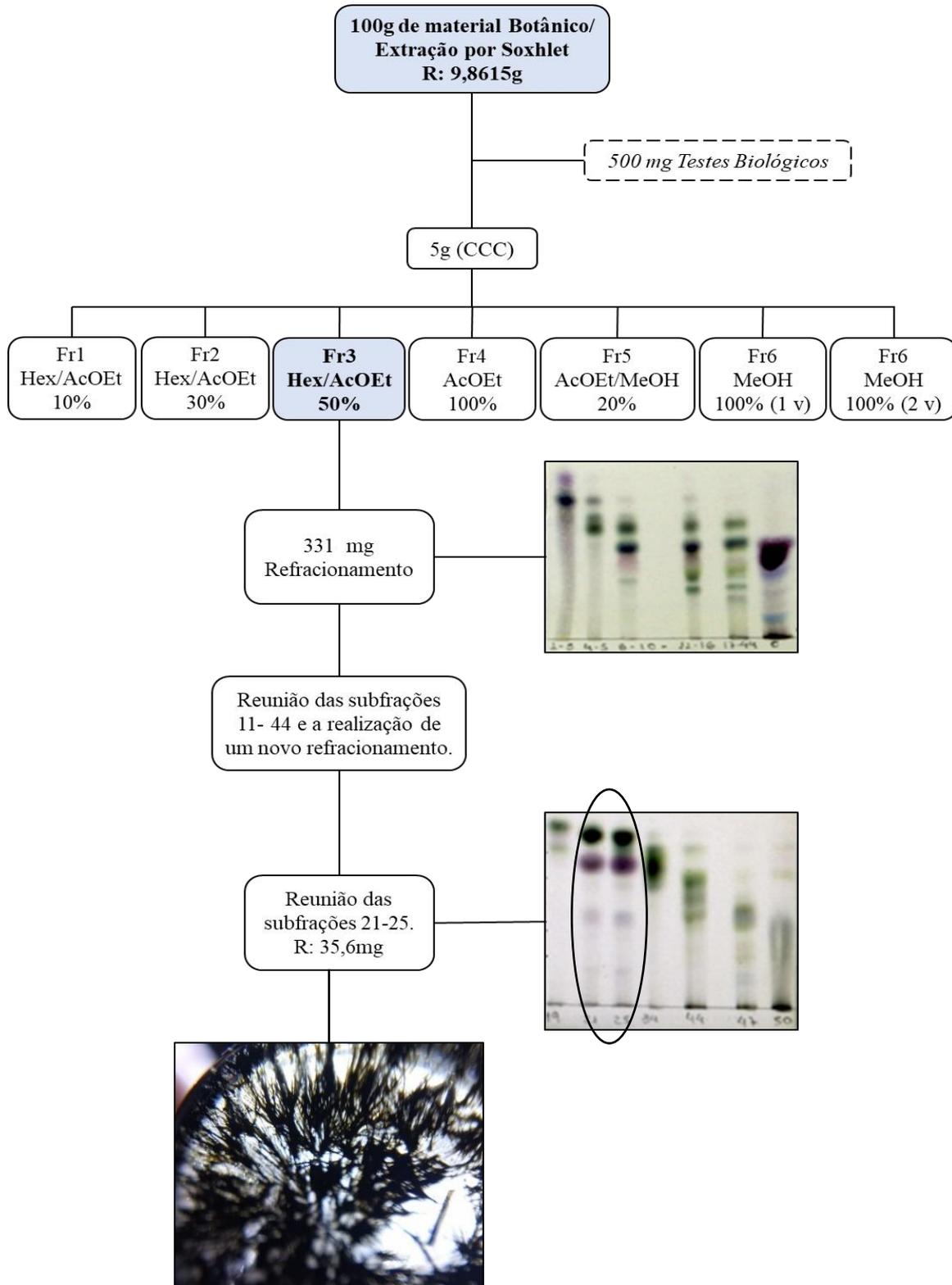
**Figura 17:** Cromatografia em Camada delgada das frações provenientes do fracionamento de FR3, visualizadas na luz visível (Branca).



Fonte: Autora

O fracionamento foi realizado com 331 mg da fração FR3, resultando em 44 frações. As subfrações semelhantes foram reunidas, e as subfrações de 11-44 passaram por um novo fracionamento, as frações 21-25 apresentaram formação de cristal, e foram reunidas. De acordo com o esquema abaixo.

**Figura 18:** Fluxograma do fracionamento da fração Hexano-Acetato 50%.

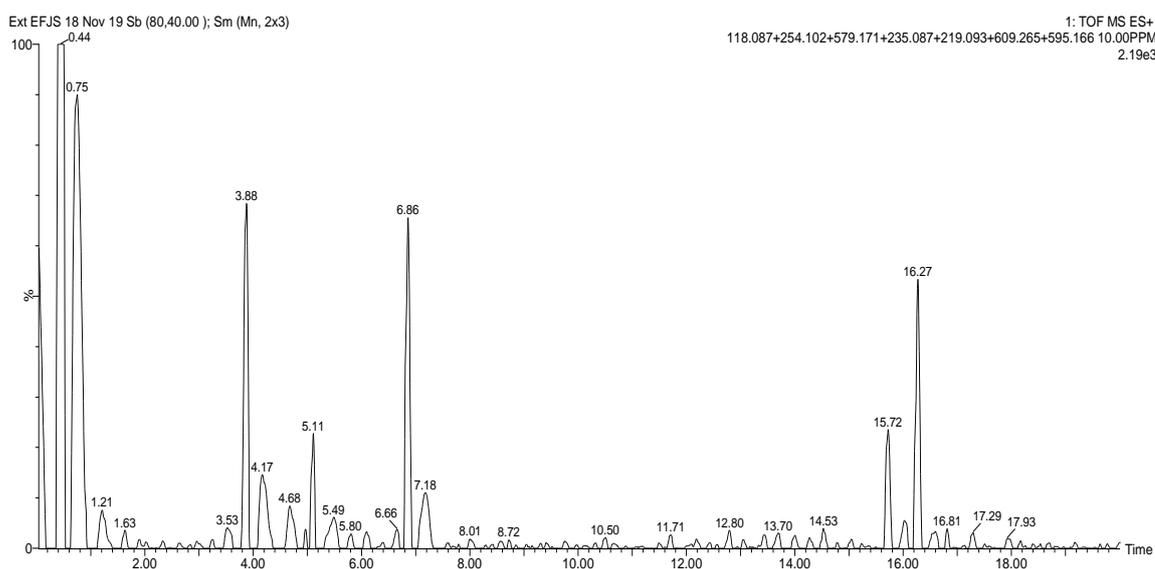


Fonte: Autora

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR LC-MS

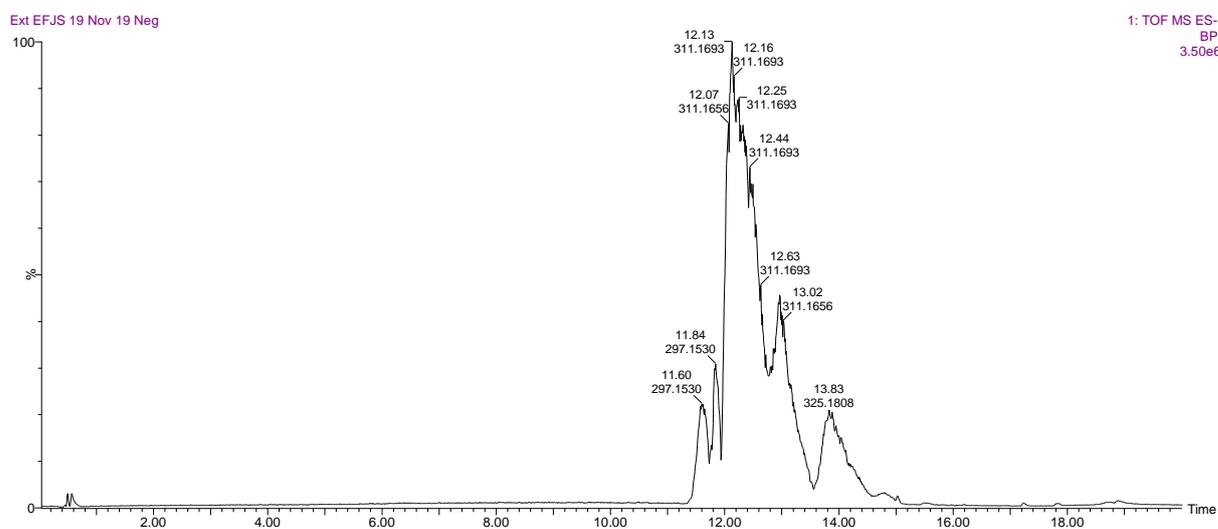
Abaixo, nas figuras 19 e 20 são apresentados os cromatogramas referentes às análises do extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* via CLAE-ESI-EM no modo *full scan*, nos dois modos de ionização, positivo  $[M + H]^+$  e negativo  $[M - H]^-$ .

**Figura 19:** Cromatograma de íons totais do Extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* via CLAE-ESI-MS no modo positivo  $[M + H]^+$ .



Fonte: Autora

**Figura 20:** Cromatograma de íons totais do Extrato etanólico das folhas de *Justicia secunda* via CLAE-ESI-MS no modo negativo  $[M - H]^-$ .



Fonte: Autora

Conforme pode-se observar nas figuras 19 e 20, os cromatogramas da análise via CLAE-ESI-EM apresentaram dois perfis distintos de ionização, destacando-se a configuração no modo positivo, pois houve melhor ionização dos compostos; já no modo negativo, houve predominância da ionização dos compostos “contaminantes” sobre as substâncias da amostra que podem ser advindos de plásticos, sabão entre outros.

De acordo com o exposto acima, no modo de ionização negativa, os contaminantes ionizam intensamente sobrepondo e suprimindo as substâncias da amostra em questão. Deste modo, optou-se em estudar e caracterizar os metabólitos presentes no extrato no modo de ionização positiva  $[M + H]^+$ .

Dentre os íons detectados no extrato, fez-se a caracterização através das massas de alta resolução calculadas  $[M + H]^+_{Cal}$  e observadas experimentalmente  $[M + H]^+$ .

**Quadro 04:** Dados dos constituintes químicos caracterizados por comparação dos dados das análises do extrato etanólico de *Justicia secunda* (CLAE-ESI-MS) com as bases de dados espectrométricos.

Pico	Fórmula Molecular	Tempo de Retenção	Massa Teórica	Massa Experimental	Erro PPM	Nome da Substância
1	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	0,455 min	118,0868	118,0868	0	Betaína
2	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>	0,488min	2541028	254,1037	3,54	Secundarellona A
3	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	0,496 min	287,0556	287,0569	0,49	Luteolina
4	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>	1,341min	254,1028	254,1019	-3,54	Secundarellona A
5	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	2,526 min	287,0556	287,0564	2,78	Luteolina
6	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	2,708 min	565,1557	565,1564	1,23	Justicialosídeo A
7	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	2,831 min	287,0556	287,0562	2,09	Luteolina
8	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	2,960 min	565,1557	565,1554	-0,53	Justicialosídeo A
9	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	2,960 min	595,1653	595,1663	1,68	kaempferol 3-o-β-d-glucosil-6 " - α-l-ramnopiranosídeo
10	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	3,048 min	579,1714	579,1728	2,41	Justicialoside B
11	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	3,142 min	287,0556	287,0565	3,13	Luteolina
12	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	3,179 min	565,1557	565,1563	1,06	Justicialoside A
13	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	3,239 min	579,1714	579,1713	-0,17	Kaempferitrim
14	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	3,239 min	579,1714	579,1716	0,34	Justicialosideo B
15	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	3,308 min	235,0871	235,0870	-0,42	5H,6H Quindolinona-11-one

<b>16</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	4,667 min	249,1028	249,1034	2,40	11-Methoxi-10H-Quindolina
<b>17</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	4,746 min	219,0922	219,0930	3,65	10H- Quindolina ou 6H-Quinindolina
<b>18</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	5,529min	219,0922	219,0930	3,65	10H- Quindolina ou 6H-Quinindolina

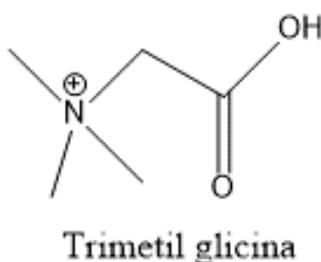
**Fonte:** Autora.

Para a substância de número **1** foi identificado um íon de massa  $[M + H]^+_{exp}$  (118,0868 m/z), no extrato de *Justicia secunda*, sendo eluído no tempo de 0,445 min, possuindo alta hidrofiliabilidade. Em comparação com outros estudos, observou-se que sua massa de alta resolução é semelhante à glicina betaína que possui massa  $[M + H]^+_{Teo}$  (118,0868 m/z) e fórmula molecular (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>) o cálculo de seu erro foi em ppm=0. A trimetil glicina (glicina betaína, licina ou oxineurina), é um de amônio quaternário, descoberto no século XIX no suco da beterraba, totalmente solúvel em água e em metanol (RIVOIRA *et al.*, 2017).

De acordo com estudos desenvolvidos por Macrae e Towers (1984), este composto foi isolado e identificado em extrato etanólico de *Justicia pectoralis* que pertence ao mesmo gênero da planta abordada neste trabalho, estes pesquisadores, observaram em seus testes farmacológicos que frações contendo betaína são responsáveis pela indução de contração muscular.

Dentre os diferentes papéis bem documentados da betaína, os seguintes são os mais relevantes, como osmólito orgânico que realiza o contra balanceamento em desequilíbrios em estado de estresse osmótico em organismos vivos; doador de metila para a remetilação de homocisteína que participa de uma via metabólica para biossíntese de moléculas essenciais (metionina); protetor contra lesão hepática induzida por álcool e biologicamente importante no desenvolvimento do câncer (CRAIG, 2004; ZEISE, 2007).

**Figura 21:** Desenho molecular da possível substância Trimetil glicina.



As substâncias de número **2** e **4**, foram identificadas através da observação de íons de massa  $[M + H]^+_{exp}$  (254,1037 m/z, Tr: 0,488min ) e (254,1019 m/z, Tr: 1,341 min ), as duas substâncias

possuem aproximadamente a mesma massa, porém com tempos de retenção diferentes, este fato pode acontecer quando há ocorrência de isômeros na mesma amostra, sendo necessário realizar o experimento de fragmentação para diferenciá-los (PENNA E CORREA, 2020).

Em comparação com trabalho de Theiler e colaboradores (2014), em que foi realizado o isolamento e elucidação estrutural de três novas amidas cíclicas de *Justicia secunda*, e identificada a substância secundarellona A, com fórmula molecular ( $C_{12}H_{15}NO_5$ ), que é derivada da pirrolidona. A massa de alta resolução comparada com a observada neste estudo apresentou erro em ppm igual a 3,54 para a substância 2, e de -3,54 ppm para a substância 4.

A secundarellona A é um isômero de posição, podendo exibir dois tipos de configuração, apresentando a conformação com a hidroxila na ramificação  $R_1$  ou  $R_2$  (THEILER *et al.*, 2014).

Para as Substâncias **17** (219,0930 m/z, Tr: 4,746 min) e **18** (219,0930 m/z, Tr: 5,529 min), que possuem a mesma massa de alta resolução, porém com tempos de retenção distintos, possivelmente podendo ser isômeros de posição. Em comparação com dados da literatura, a massa de alta resolução da substância é semelhante à 10H-quindolina produzida sinteticamente, e ou 6H-Quinindolina que possuem fórmula molecular ( $C_{15}H_{10}N_2$ ) com erro em ppm=3,65 para as duas substâncias.

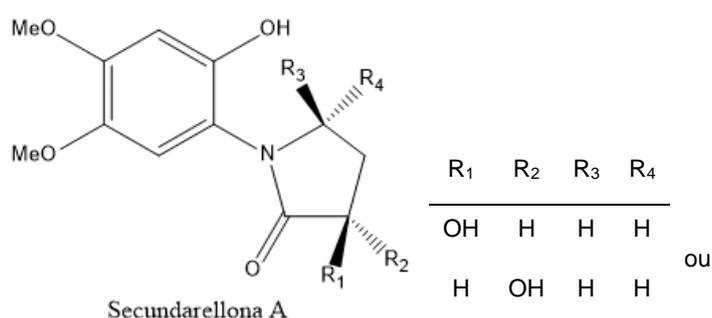
A 10H-quindolina, é um alcalóide indoloquinolina, e foi sintetizado pela primeira vez por Gellert, Raymind-Hamed e Schlitter (1951). Em 1978, Dwuma-Badu e colaboradores (1978), relataram o seu isolamento em raízes de *Cryptolepis sanguinolenta* (PAULO, GOMES e HOUGHTON, 1995), e posteriormente em 2004 isolado em *Justicia betonica* (SUBBARAJU *et al.*, 2004).

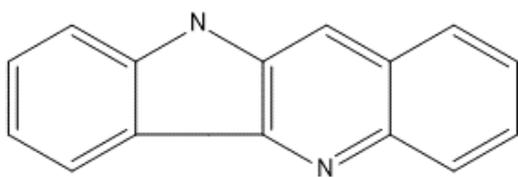
A 6H-Quinindolina é um alcalóide sintético, descrito por (OBERKOBUBUSH, 1953; MARSAI, 1989), posteriormente isolado em *Justicia betonica* (SUBBARAJU *et al.*, 2004). De uma forma geral a quindolina mostrou significativa atividade contra *Candida albicans*, e *Cryptococcus neoformans*, atividade antiparasitária, antimalárica contra *Plasmodium falciparum* K1, *Trypanosoma cruzi* sendo mais ativa contra a forma epimastigota e mostrou ser citotóxico, antiproliferativo e atividade antitumoral contra diferentes linhagens celulares (câncer de ovário, carcinoma epidermóide de boca), redução dependente da dose do aumento da pressão induzida por fenilefrina em ratos, não exibindo atividade antifúngica e de agregação plaquetária (MENDEZ, BRACCA e KAUFMAN, 2018).

A substância **15** identificada no modo  $[M + H]^+_{exp}$ , com massa (235,0870 m/z, Tr: 3,308 min), e a substância **16** identificada no modo  $[M + H]^+_{exp}$  com massa (249,1034 m/z, Tr: 4,667) em comparação com achados na literatura, a massa de alta resolução sugere que a substância **15**

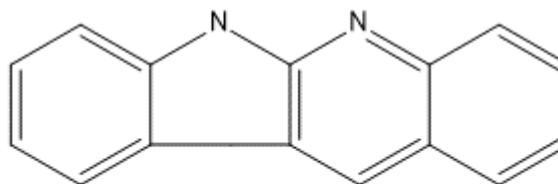
possa ser 5H,6H- Quindolinona, que possui formula molecular (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O), e a substância **16** sugere que seja a 11-metoxi-10H-Quindolina, as duas substâncias já possuem dados relatados e foram isoladas a partir de *Cryptolepis sanguinolenta* (CHAVES *et al.*, 2017) e *Justicia betonica* (SUBBARAJU *et al.*, 2004), com erro ppm=-0,42. Dados farmacológicos, destacam sua atividade vasorrelaxante de anéis de artéria mesentérica com endotélio funcional e após remoção do endotélio (CHAVES *et al.*, 2017). A maioria dos alcalóides indólicos isolados apresentam diversas atividades farmacológicas, sendo atualmente utilizados na medicina ou ainda em investigação com o objetivo de desenvolver novos fármacos (NDAGIJIMANA *et al.*, 2013). De modo abrangente, Indoloquinolinas de ocorrência natural são uma pequena família de alcalóides, que foram isolados principalmente de *Cryptolepis sanguinolenta* (Lind.) Schlechter, família Asclepiadaceae, esses alcalóides indólicos tem efeito depressivo central moderado, ação antiespasmódica não competitiva fraca no intestino de camundongos e um efeito hipotensivo em ratos foram relatados para a maioria dos compostos alcalóides (OZAKI, 1989). A maioria dessas propriedades é comum a outras indoloquinolinas naturais, que diferem em potência e seletividade (THOBOKHOLT *et al.*, 2020).

**Figura 22:** Desenho molecular das possíveis substâncias Secundarellona A, 10H Quindolina, 6H Quindolina, 5H, 6H Quindolinona-11-one e 11-Metoxiquindolina.

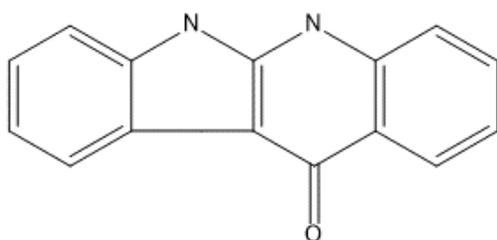




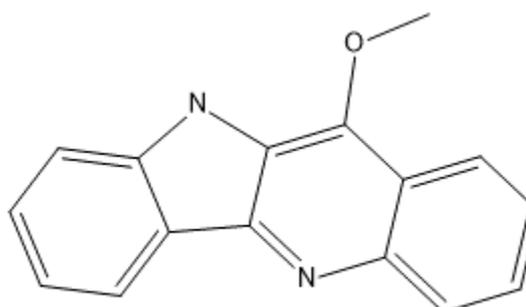
10H Quindolina



6H Quinindolina



5H, 6H Quindolinona-11-one



11-Metoxi-quindolina

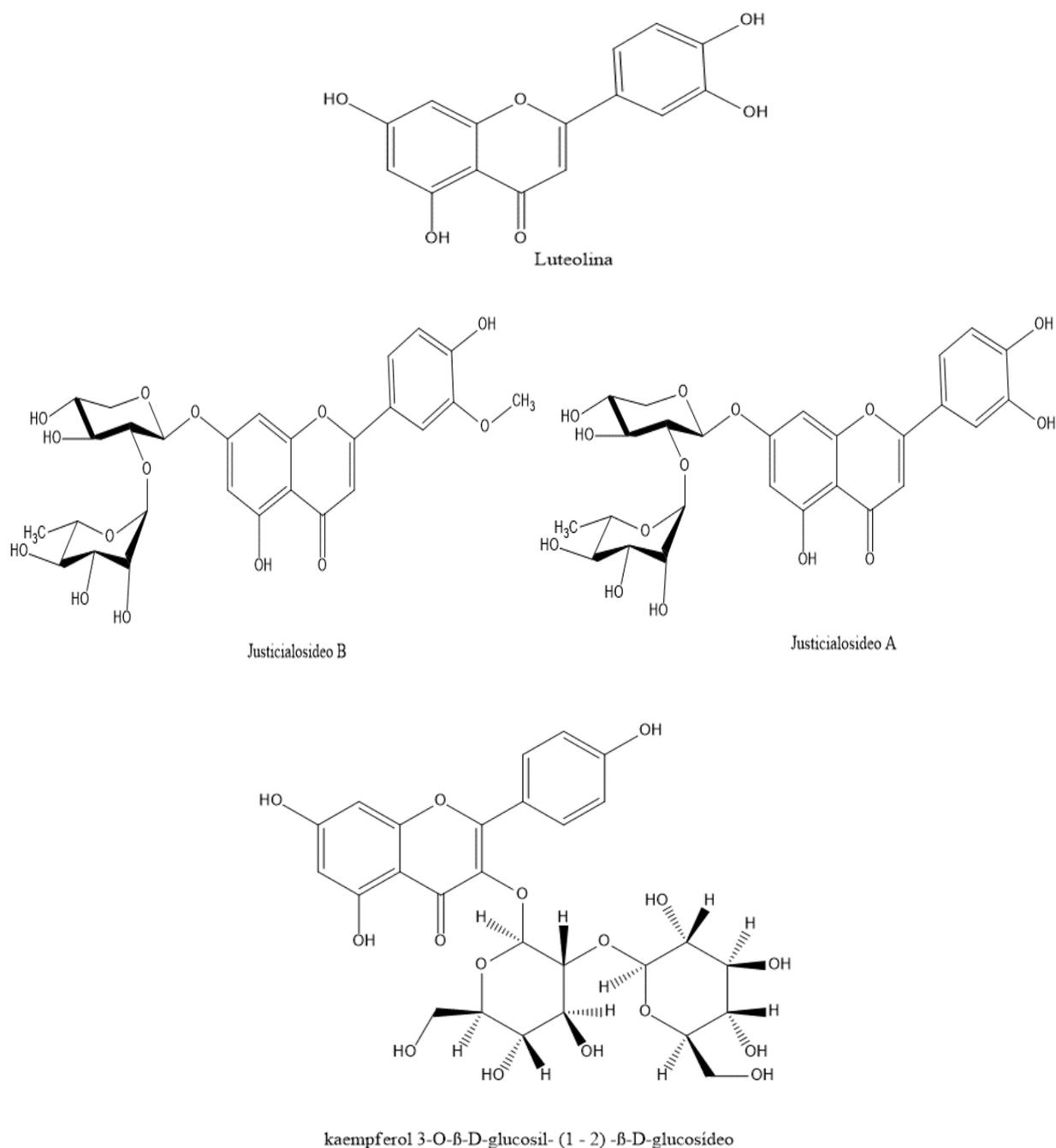
As substâncias **3** com massa (287,0569 m/z, Tr: 0,496 min), **5** com massa (287,0564 m/z, Tr: 2,526 min), **7** com massa (287,0562 m/z, Tr: 2,831 min) e **11** com massa (287,0565 m/z, Tr: 3,142 min), identificadas no modo  $[M + H]^+_{exp}$ , exibem massas aproximadas e com tempos de retenção diferentes, que de acordo com a literatura sugere a presença de Luteolina de fórmula molecular ( $C_{15}H_{10}O_6$ ), identificada e isolada no gênero *Justicia* (VERDAM, *et al.*, 2015), e na espécie *Justicia secunda* (KOFFI *et al.*, 2013). Com sua estrutura central característica de um flavonoide, suas atividades farmacológicas são muito descritas na literatura, principalmente por sua atividade antioxidante (KOFFI *et al.*, 2013).

As substâncias **6** com massa (565,1564 m/z, Tr: 2,708 min), **8** com massa (565,1554 m/z, Tr: 2,960 min) e **12** com massa (565,1563 m/z, Tr: 3,179 min), porém com tempos de retenção distintos, possivelmente podendo ser isômeros de posição. Em comparação com dados da literatura, a massa de alta resolução da substância é semelhante ao Justicialosídeo A com fórmula molecular ( $C_{26}H_{28}O_{14}$ ), identificado e isolado recentemente em *Ruspolia hypocrateriformis* (Vahl), que compartilham a mesma Família das Acanthaceas (GUETCHUENG *et al.*, 2019).

As substâncias **10** com massa (579,1728 m/z, Tr: 3,048 min) e **14** com massa (579,1714) m/z, Tr: 3,239 min), foram identificadas no modo  $[M + H]^+_{exp}$ , estes dados foram relacionados com os achados de Guetchueng e colabores (2019) que descreve a descoberta de dois novos glicosídeos de flavonas, as massas encontradas se assemelham ao Justicialosídeo B, identificado e isolado em *Ruspolia hypocrateriformis* (Vahl).

Para a substância de número **9** foi identificado um íon de massa  $[M + H]^+_{\text{exp}}$  (595,1663 m/z), no extrato de *Justicia secunda*, sendo eluído no tempo de 2,960 min. Em comparação com outros estudos, observou-se que sua massa de alta resolução é semelhante ao kaempferol 3-o- $\beta$ -d-glucosil-6 " -  $\alpha$ -l-ramnopiranosídeo, que possui massa  $[M + H]^+_{\text{Teo}}$  (595,1653 m/z) e fórmula molecular (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>) o cálculo de seu erro foi em ppm=1,68. De acordo com a literatura, é relatado seu isolamento em *Ginkgo biloba* (MARKHAM, GEIGER e JAGGY, 1991), esta classe é muito importante, pois muitos desses compostos possuem também importantes propriedades farmacológicas, como: propriedades antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, dentre outras (SANTOS e RODRIGUES, 2017).

**Figura 23:** Desenho molecular das possíveis substâncias, Luteolina, Justicialosideo B, Justicialosideo A e Kaempferol 3-O-β-glucosil(1-2)β-D-glucosideo.



## 5.6 ATIVIDADE VASORRELAXANTE DO EXTRATO SOBRE TECIDO VASCULAR

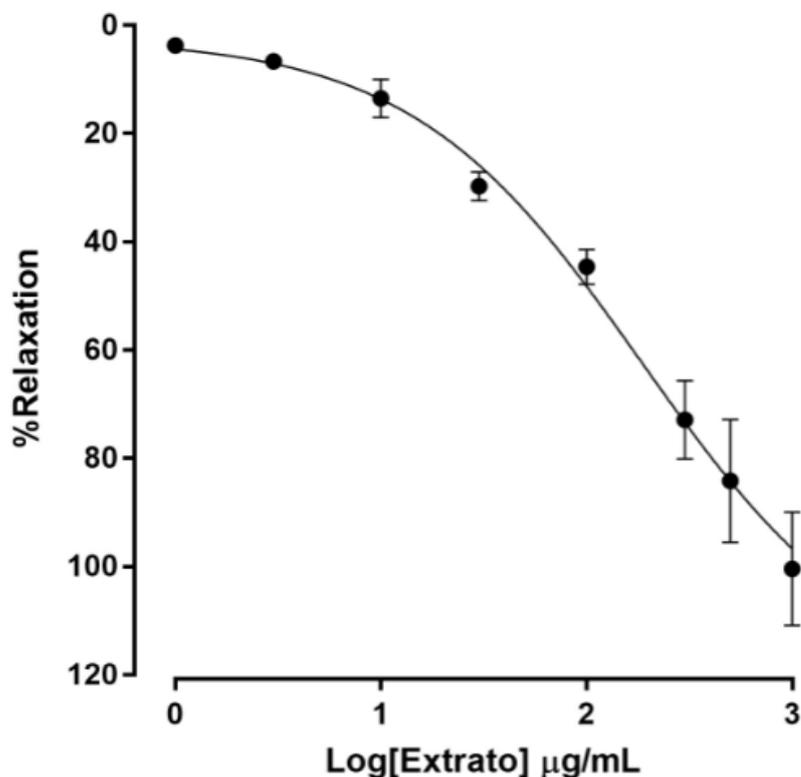
O extrato promoveu vasorrelaxamento, dependente de concentração, em anéis de artéria mesentérica superior isolados de rato pré-contraídos com FEN. Esta resposta foi observada, em anéis sem endotélio e seu vasorrelaxamento foi dose dependente (200 mg/ml ± 4%; 500 mg/ml ±

10%; 1.000 mg/ml  $\pm$  15%; 1.500 mg/ml  $\pm$  30%; 2.000 mg/ml  $\pm$  45%; 2.500 mg/ml  $\pm$  75%; 2.800 mg/ml  $\pm$  87%; 3.000 mg/ml  $\pm$  112%).

O vasorelaxamento produzido pelo extrato, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio, não parece ser mediado por fatores vasoativos liberados pelo endotélio vascular, mas provavelmente devido a um efeito direto do extrato sobre o músculo liso arterial. Estudos anteriores realizados por Manda e colaboradores (2011), no qual testaram extrato aquoso em coelhos induzidos a hipertensão com adrenalina, foi observado que o efeito hipotensivo do extrato de *Justicia secunda* em dosagens crescentes de 22-55 mg/kg reduziu significativamente a hipertensão, sendo reversível em baixas doses, porém em doses elevadas irreversível, sugerindo que o extrato aquoso exibe uma ação antagonista tanto nos receptores  $\beta_1$  no coração, levando a desestimulação das contrações das fibras do miocárdio, quanto nos receptores  $\alpha_1$  localizados nos vasos sanguíneos. Assim como descrito por Abo e colaboradores (2016), que testou o extrato aquoso de *justicia secunda* em coelhos normotensos, em doses crescentes de 1,25-75mg/kg induziu a hipotensão dose dependente, com 75mg/kg a hipotensão induzida tornou-se irreversível e a partir 100 mg/kg levando a letalidade, considerando a participação do endotélio vascular que secreta fatores para o vasolexamento arterial.

Como descrito anteriormente, o vasorrelaxamento promovido pelo extrato etanólico de *Justicia secunda* é obtido independente do endotélio funcional, e seu mecanismo pode ser atribuído diretamente às células musculares lisas. A contração das células musculares lisas é controlada pela concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, ocorre através do influxo desse íon pela membrana plasmática e por liberação de fontes internas, que por sua vez sofre influência direta das modificações elétricas que ocorrem na membrana destas células. Tais modificações ou potenciais de membrana são determinados pelo balanço entre despolarização e hiperpolarização, decorrentes da atividade de uma grande variedade de canais iônicos presentes nesta membrana favorecendo, desta forma, a contração ou o relaxamento, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2016).

**Figura 24:** Curva Concentração-resposta para o efeito vasorelaxante induzido pelo extrato de (1 – 3000 mg/mL) em anéis (com endotélio ausente) de artéria mesentérica superior de ratos normotensos, pré-contráídos com Fenilefrina (10 mM).



Uma característica particular das plantas medicinais é sua complexa composição química, que incluem uma variedade de substâncias químicas, bioativas sobre diferentes alvos farmacológicos. Alguns componentes deste complexo são responsáveis por efeitos específicos, enquanto outros desenvolvem um papel adicional na resposta terapêutica. Porém, muitos efeitos e propriedades terapêuticas são frequentemente atribuídas apenas ao fitocomplexo, de maneira que quando separada, estas substâncias demonstram uma perda de suas propriedades farmacológicas (EHRMAN, BARLOW e HYLANDS, 2007).

Das possíveis substâncias presentes no extrato etanólico de *Justicia secunda* que de acordo com a literatura possuem a atividade vasorrelaxante descrita, é a classe das indoloquinolinas, que são alcalóides, e têm sido alvo de estudos biológicos e químicos, principalmente de síntese (THOBOKHOLT *et al.*, 2020).

Esses alcalóides promoveram significativo vasorrelaxamento em artéria mesentérica ratos com endotélio funcional e após sua remoção. Porém, após a remoção do endotélio o efeito vasorrelaxante foi alterado, pois o endotélio vascular secreta várias substâncias biologicamente ativas. Assim, a atividade vasorrelaxante das substâncias testadas descritas na literatura, parece

envolver substâncias derivadas do endotélio e atuam nas células musculares lisas, visto que em preparações livres de endotélio foi possível observar efeito relaxante (FERLIN *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2017).

## 6 Conclusão

Através dos dados obtidas de análises em HPLC-DAD e CCDC, foi possível observar que o extrato etanólico de *Justicia secunda* possui uma matriz extremamente complexa.

As análises espectrométricas via modo positivo  $[M + H]^+$  possibilitaram a detecção de 18 constituintes químicos, que sugerem a presença de trimetil glicina, uma classe de alcaloides denominados indoquinolinas e compostos fenólicos, que de acordo com a literatura, foram identificados na mesma família da planta em questão.

O extrato promoveu um efeito vasorrelaxante que se mostrou independente do endotélio funcional, corroborando dados descritos na literatura para substâncias que possivelmente presentes no extrato.

## REFERÊNCIAS

- AARONSON, PI; WARD, JPT; CONNOLLY, MJ. **The cardiovascular system at a glance**. John Wiley & Sons, 2020.
- ANDRADE, DML; BORGES, LL; TORRES, IMS; *et al.* Efeito Vasodilatador Independente do Endotélio Induzido pela Jabuticaba (*M. cauliflora*) em Artérias Isoladas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 223-229, 2016. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2016004200223&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2016004200223&script=sci_arttext&tlng=pt)
- ABO, KJC; KOUAKOU, KL; YAPO, A. Hypotensive and Antihypertensive Effects of Total Aqueous Extract of *Justicia secunda* Vahl M. (Acanthaceae) in Rabbits. **International Journal of Science and Research**. Volume 5 Issue 5, May 2016. Disponível em: [https://www.ijsr.net/get\\_abstract.php?paper\\_id=NOV163636](https://www.ijsr.net/get_abstract.php?paper_id=NOV163636)
- AIMOFUMEH, EO; ANYASOR, GN; ESIABA, I. *Justicia secunda* Vahl leaf fraction protects against acetaminophen-induced liver damage in rats by alleviating oxidative stress and enhancing membrane-bound phosphatase activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 10, n. 11, p. 479, 2020. Disponível: <https://www.apjtb.org/article.asp?issn=2221-1691;year=2020;volume=10;issue=11;spage=479;epage=489;aulast=Aimofumeh;type=0>
- ALBIERO, ALM; PEREIRA, AVG. A importância das plantas medicinais na atenção básica: oficinas de aprendizagem. **Arquivos do MUDI**, v. 19, n. 2-3, p. 23-42, 2015. Disponível em: <http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/30055#:~:text=Segundo%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Mundial%20da,efeitos%20colaterais%20em%20seus%20usu%C3%A1rios>.
- ANYASOR, GN; OKANLAWON, AA; OGUNBIYI, B. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. **Clinical Phytoscience**, v. 5, n. 1, p. 49, 2019. Disponível em: <https://clinphytoscience.springeropen.com/articles/10.1186/s40816-019-0137-8>
- ANYASOR, GN; MOSES, N; KALE, O. Hepatoprotective and hematological effects of *Justicia secunda* Vahl leaves on carbon tetrachloride induced toxicity in rats. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 95, n. 5, p. 349-359, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31969022/>
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram** 28: 13-19, 1993. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1622190](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1622190)
- AYODELE, AE; ODUSOLE, OI; ADEKANMBI, AO. Phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Justicia secunda* Vahl on selected clinical pathogens. **MicroMedicine**, v. 8, n. 2, p. 46-54, 2020. Disponível em: <http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/mmed/article/view/275>

BADKE, MR; BUDÓ, MLD; ALVIM, NAT; *et al.*, Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/tce/v21n2/a14v21n2.pdf>

BEVAN, JA; LAHER, I. Pressure and flow-dependent vascular tone. **The FASEB journal**, v. 5, n. 9, p. 2267-2273, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1860618/>

BLUM, B; LUIZA, VL; BERMUDEZ, JAZ. Acesso a medicamentos medido no nível domiciliar: a proposta da OMS e outras iniciativas brasileiras. **Rev Bras Farm**, v. 92, n. 3, p. 223-31, 2011. Disponível em:

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2010. 546p., 1v/il. 1. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>

CARRINGTON, S; COHALL, DH; GOSSELL-WILLIAMS, M; *et al.* The antimicrobial screening of a Barbadian medicinal plant with indications for use in the treatment of diabetic wound infections **West Ind Med J**, 61 (9), 2012. Disponível em: [https://westindies.scielo.org/scielo.php?pid=S0043-31442012000900003&script=sci\\_arttext&tlng=es](https://westindies.scielo.org/scielo.php?pid=S0043-31442012000900003&script=sci_arttext&tlng=es)

CALIXTO, JB; SCHEIDT, C; OTUKI, M; *et. al.* Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261-279, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989526>

CALIXTO, JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **J Ethnopharmacol**, 100: 131–134, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003612?via%3Dihub>

CHAVES, OS; GOMES, RS; TOMAZ, ACA; *et al.* Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone . **Molecules**, v. 18, n. 3, pág. 2769-2777, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23455668/>

CHAVES, OS; TELES, YCF; MONTEIRO, MMO; *et al.* Alkaloids and phenolic compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and vasorelaxant activity of two indoquinoline alkaloids. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 94, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28067836/>

CORDELL, GA. Biodiversity and drug – a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, 55: 463-480, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200002302?via%3Dihub>

CORRÊA, GM; ALCÂNTARA, AFC. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 220-238, Fev. 2012. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2012000100031](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2012000100031).

CRAIG SA. Betaine in human nutrition. **Am J Clin Nutr**; 80(3):539–549; 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/80/3/539/4690529#:~:text=Betaine%20is%20an%20important%20human,%2C%20heart%2C%20and%20kidney%20health>.

DANIEL, TF. Additional chromosome numbers of American Acanthaceae. **Syst. Bot.** 25(1):15-25, 2000. Disponível em: [https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/6694/Daniel\\_2000.pdf](https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/6694/Daniel_2000.pdf)

DAMPNEY, RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological reviews**, v. 74, n. 2, p. 323-364, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8171117/>

DHARMASHANKAR, K; WIDLANSKY, ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 6, p. 448-455, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20857237/>

DAVIES, PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. **Nature clinical practice Cardiovascular medicine**, v. 6, n. 1, p. 16-26, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2851404/>

DOS SANTOS, D; RODRIGUES, MMF. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao/article/view/3639#:~:text=O%20objetivo%20deste%20estudo%20consistiu,mecanismos%20de%20a%C3%A7%C3%A3o%20dessas%20subst%C3%A2ncias>.

DRUMMOND, ED; SIMÕES, TC; ANDRADE, FB. Acesso da população brasileira adulta a medicamentos prescritos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, p. e180007, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbepid/v21/1980-5497-rbepid-21-e180007.pdf>

DWUMA-BADU, D; AYIM, JS; FIAGBE, NI; *et al.* Constituents of West African medicinal plants XX: quindoline from *Cryptolepis sanguinolenta*. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 67, n. 3, p. 433-434, 1978. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/641744/>

EHRMAN, TM; BARLOW, DJ; HYLANDS, PJ. Phytochemical databases of Chinese herbal constituents and bioactive plant compounds with known target specificities. **Journal of chemical information and modeling**, v. 47, n. 2, p. 254-263, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17381164/>

ESPADA, A; MOLINA-MARTIN, M; DAGE, J; *et al.* Application of LC/MS and related techniques to high-throughput drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 9-10, p. 417-423, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644608000810>

FENG, D; NAGY, JA; HIPPI, J; *et al.* Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores. **The Journal of Physiology**, v. 504, n. Pt 3, p. 747, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9401980/>

FERLIN, MG; CHIARELLOTO, G; ANTONUCCI, F; *et al.* Mannich bases of 3H-pyrrolo [3, 2-f] quinoline having vasorelaxing activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 5, p. 427-434, 2002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523402013557>

FONSECA, FN. Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis*-chambá: Obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, p. 130, 2009. Disponível em:

[http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/4223/1/2009\\_dis\\_fnfonseca.pdf](http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/4223/1/2009_dis_fnfonseca.pdf)

FURCHGOTT, RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 24, n. 1, p. 175-197, 1984.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6203480/>

GARCÍA-RÍOS, RI; MORA-PÉREZ, A; GONZÁLEZ-TORRES, D. Anxiolytic-like effect of the aqueous extract of *Justicia spicigera* leaves on female rats: A comparison to diazepam.

**Phytomedicine** Volume 55, Pages 9-131. 2019, Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711318302599?via%3Dihub>

GBD, 2016 Brazil Collaborators. Burden of disease in Brazil, 1990-2016: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*.

2018;392(10149):760-75. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31221-2.( Falta ajeitar)

GELLERT, E; RAYMOND-HAMET; SCHLITTLER, E. Die konstitution des alkaloids cryptolepin. **Helvetica Chimica Acta**, v. 34, n. 2, p. 642-651, 1951. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/hlca.19510340228>

GUETCHUENG, Stephanie T. *et al.* Justicialosides A and B, two new flavone glycosides from the leaves of *Ruspolia hypocrateriformis* (Vahl) Milne-Redh.(Acanthaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 31, p. 101-103, 2019.

HAMBURGER, M; HOSTETTMANN. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HERRERA-MATA, H; ROMERO, AR; CRESCENTE O. Biological Activity of “Sanguinaria” (*Justicia secunda*) Extracts **Pharmaceutical Biology**., Vol. 40, No. 03, pp. 206–212. 2002.

Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1076/phbi.40.3.206.5826>

HOUGHTON, Peter; RAMAN, Amala. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**. Springer Science & Business Media, 2012.

JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids Department of Pharmaceutical Sciences. **Curr Protoc Plant Biol**. p. 6; 1: 345–358, 2016.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27868090>

JOSÉ-CHAGAS, FN; VIANNA FILHO, MDM; PESSÔA, LM; *et al.* Aspectos Químicos e Ecológicos de Espécimes Masculinos e Femininos de *Cecropia* Loefl. (Urticaceae). **Rev. Virtual Quim.**, Vol 6, Nº. 2, 432-452, 2013. Disponível em:

<http://rvq.sbgq.org.br/imagebank/pdf/v6n2a18.pdf>

LIU, B; YANG, Y; LIU, H; *et al.* Screening for cytotoxic chemical constituents from *Justicia procumbens* by HPLC–DAD–ESI–MS and NMR. **Chemistry Central Journal** 12:6. 2018. Disponível em: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-018-0371-z>

KANCHANAPOOM, T; NOIARSA, P; KASAI, R; *et al.* Justiciaosides E–G, triterpenoidal glycosides with an unusual skeleton from *Justicia betonica*. **Tetrahedron** 61 2583–2587. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040402005001298>

KITADI, JM; LENGBIYE, EM; GBOLO, BZ; *et al.* *Justicia secunda* Vahl species: Phytochemistry, Pharmacology and Future Directions: A mini-review. **Discovery Phytomedicine**; 6(4): 157-171. 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/335741466\\_Justicia\\_secunda\\_Vahl\\_species\\_Phytochemistry\\_Pharmacology\\_and\\_Future\\_Directions\\_A\\_mini-review](https://www.researchgate.net/publication/335741466_Justicia_secunda_Vahl_species_Phytochemistry_Pharmacology_and_Future_Directions_A_mini-review)

KOFFI, EN; GUERNEVE, CL; LOZANO, PR; *et al.* Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses. **Industrial Crops and Products** 49 682–689. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669013002872>

KONÉ, WM; KOFFI, AG; BOMISSO, EL; *et al.* Ethnomedical study and iron content of some medicinal herbs used in traditional medicine in Cote d’Ivoire for the treatment of anaemia. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 9, n. 1, p. 81-87, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3746533/>

KOPF, A; PATEL, NB. Guide to pain management in low-resource settings. **Seattle, WA: International Association for the Study of Pain**, p. 67–78, 2010. Disponível em: [https://s3.amazonaws.com/rdcms-iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/Publications2/FreeBooks/Guide\\_to\\_Pain\\_Management\\_in\\_Low-Resource\\_Settings.pdf](https://s3.amazonaws.com/rdcms-iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/Publications2/FreeBooks/Guide_to_Pain_Management_in_Low-Resource_Settings.pdf)

LANG, G; MAYHUDIN, NA; MITOVA, MI; *et al.* Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595–1599, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np800222z>

LEAL, LKAM; SILVA, AH; VIANA, GSB; *Justicia pectoralis*, a coumarin medicinal plant have potential for the development of antiasthmatic drugs?. **Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Farmacognosia**. 27 794–802. 2017 Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v27n6/0102-695X-rbfar-27-06-0794.pdf>

LUNTE, SM. Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultravioleta visible and electrochemical detection. **Journal of Chromatography**. A Volume 384, Pages 371-382, 1987. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez3.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0021967301946849>

LUSCHER, TF; VANHOUTTE, PM. The endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. **CRC press**, 1990.

MARTINELLI, G; MESSINA, T; SANTOS FILHO, L. Livro vermelho da flora do Brasil: plantas raras do cerrado. 1. ed. Rio de Janeiro: **CNCFlora**, 2014.

MARKHAM, KR; GEIGER, H; JAGGY, H. Kaempferol-3-O-glucosyl (1–2) rhamnoside from *Ginkgo biloba* and a reappraisal of other gluco (1–2, 1–3 and 1–4) rhamnoside structures. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 1009-1011, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/003194229280058M>

MACIEL, MAM; PINTO, CA; VEIGA-JUNIOR, FV; *et al.* Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím Nova** 25: 429-438, 2002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000300016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000300016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

MANDA, P; ABROGOUA, DP; BAHY, C; *et al.* Kablan Evaluation of the antihypertensive activity of total aqueous extract of *Justicia secunda* Valh (*Acanthaceae*) **Afric J Pharm Pharmacol**, 5 (16) pp. 1838-1845, 2011. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Pierre\\_Manda/publication/272726064\\_Evaluation\\_of\\_the\\_antihypertensive\\_activity\\_of\\_total\\_aqueous\\_extract\\_of\\_Justicia\\_secunda\\_Valh\\_Acanthaceae/links/56806af608ae051f9ae7cb9a.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Pierre_Manda/publication/272726064_Evaluation_of_the_antihypertensive_activity_of_total_aqueous_extract_of_Justicia_secunda_Valh_Acanthaceae/links/56806af608ae051f9ae7cb9a.pdf)

MAYET, J; HUGHES, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, v. 89, n. 9, p. 1104-1109, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1767863/>

MEA, A; EKISSI, YHR; ABO, KJC; *et al.* Hypoglycaemiant and anti- hyperglycaemiant effect of *justicia secunda* m. Vahl (*acanthaceae*) on glycaemia in the wistar rat. **International Journal of Development Research**; Vol. 07, Issue, 06, pp.13178-13184, June, 2017. Disponível em: <https://www.journalijdr.com/hypoglycaemiant-and-anti-hyperglycaemiant-effect-justicia-secunda-m-vahl-acanthaceae-glycaemia>

MEEK, IL ; LAAR, MAFJV; VONKEMAN, HE. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. **Pharmaceuticals (Basel)**; 3(7): 2146–2162. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4036661/>

MENDEZ, MV; BRACCA, ABJ; KAUFMAN, TS. Isolation, Synthesis, and Biological Activity of Quindoline, a Valuable Indoloquinoline Natural Product and Useful Key Intermediate. **Synthesis**, v. 50, n. 07, p. 1417-1429, 2018. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0036-1591947>

MORA, Z; PESANTES, PB. Characterization and phytochemical study of *Justicia secunda* valh (*sanguinaria*, *singamochilla*, *insulina*). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/319455965>

MULLER, SD. Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata*, CURTIS, *Passifloraceae* – MARACUJÁ DOCE. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Simony%20Davet%20Muller.pdf>

MUTHEE, JK; GAKUYAA, DW; MBARIA, JM; *et al.* Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitokitok district of Kenya. **J Ethnopharmacol** 135: 15–21, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349318>

MPIANA, PT; NGBOLUA, KNN; BOKOTA, MT; *et al.* *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. **Blood Transfus**, 8, pp. 248 – 254. 2010a. Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-78049307567&origin=inward&txGid=95a0aa48d7668334b90a659ff1167aa7>

MPIANA, PT; BOKOTA, MT; NDJELE, MBL; *et al.* Antisickling activity of three species of *Justicia* from Kisangani (DR Congo): *J. tenella*, *J. gendarussa* and *J. Insularis* **Int J Biol Chem Sci**, 4 (6) pp. 1953-1961 2010b. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/c85f/755b1a58933094d5ccb45908452881df6121.pdf>

NASCIMENTO, BR; BRANT, LCC; DE OLIVEIRA, GMM; *et al.* Cardiovascular disease epidemiology in portuguese-speaking countries: data from the Global Burden of Disease, 1990 to 2016. **Arq Bras Cardiol.**; 110(6):500-511, 2018. Disponível em: [https://www.scielo.br/pdf/abc/v110n6/pt\\_0066-782X-abc-110-06-0500.pdf](https://www.scielo.br/pdf/abc/v110n6/pt_0066-782X-abc-110-06-0500.pdf)

NDAGIJIMANA, A; WANG, X; PAN, G; *et al.* A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies. **Fitoterapia**, v. 86, p. 35-47, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376412/>

N'GUESSAN, K; KOUASSI, KH; OUATTARA, D. Plants used to treat anaemia, in traditional medicine, by Abbey and Krobou populations, in the South of Côte-d'Ivoire J. **Appl. Sci. Res.**, 6 (8), pp. 1291-1297. 2010 Disponível em: <http://www.ethnopharmacologia.org/prelude/pdf/biblio-hg-54-guessan.pdf>

N'GUESSAN, K, SORO, D; AMON, ADE. Plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies cardiovasculaires, en pays Abbey et Krobou, dans le Sud de la Côte d'Ivoire. **Phytothérapie**, pp. 1-10. 2011. Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84907427478&origin=inward&txGid=996064b67df7b5cee164c036d13bbbd4>

OLIVEIRA, GMM; BRANT, LCC; POLANCZYK, CA; *et al.* Estatística Cardiovascular–Brasil 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 3, p. 308-439, 2020. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2020001100308](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2020001100308)

ONOJA, SO; EZEJA, MI; OMEH, YN; *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract of *Justicia secunda* Vahl leaf. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 53, n. 3, p. 207-213, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506816300690>

OPAS, Organização Pan-Americana de Saúde. Doenças Cardiovasculares. 2017.

OZAKI, Y. Pharmacological studies of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. **Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica**, v. 94, n. 1, p. 17-26, 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2792960/>

PAULO, A; GOMES, ET; HOUGHTON, PJ. New alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 10, p. 1485-1491, 1995. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50124a002>

PENNA, TC; CORRERA, TC. Técnicas avançadas para a diferenciação de isômeros por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 43, n. 8, p. 1125-1137, 2020. Disponível em: [http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=9135](http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=9135)

POLANCZYK, CA. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares no Brasil: A Verdade Escondida nos Números. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 2, p. 161-162, 2020. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2020000900161&lng=en&nrm=iso](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2020000900161&lng=en&nrm=iso)

PROFICE, SR; KAMEYAMA, C; CÔRTEZ, ALA; *et al.* **Braz; Acanthaceae. In: R.C. Forzza et al. (orgs.).** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010 Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000033>

RIVOIRA, L; STUDZIŃSKA, S; SZULTKA-MŁYŃSKA, M; *et al.* New approaches for extraction and determination of betaine from *Beta vulgaris* samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.**, 409(21): 5133-5141, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5534198/>

RODRIGUES, IMC; SOUZA FILHO, APS; FERREIRA, FA. Estudo fitoquímico de senna alata por duas metodologias. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-83582009000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582009000300011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

RUBANYI, GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 22, p. S1-14, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7523767>

SEALS, DR; JABLONSKI, KL; DONATO, AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. **Clinical science**, v. 120, n. 9, p. 357-375, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21244363>

SILVA, JMS; MENDONÇA, PP; PARTATA, AK. Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.7, n.4, Pub.5, 2014. Disponível em: <https://assets.itpac.br/arquivos/Revista/74/artigo5.pdf>

SOUZA, AQL; SOUZA, ADL; FILHO, AS; *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da mazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta amaz** 2: 185 – 195. 2004. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672004000200006&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672004000200006&script=sci_abstract)

SCHENKEL, EP; SIMÕES, CMO; MENDES, SS; *et al.* O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, v.1, p.65-72, 1985. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/19238>

SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; PETROVICK, PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP; *et al* (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: **Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC**, Cap 15, p. 301-332, 2001.

SIMÕES, CM; MENTZ, LA; SCHENKEL, EP; *et al*. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Editora da Universidade UFRGS**, 1986.

SOARES, DX; SCARMINIO, IS; BRUNS, RE. Mixture designs for exploring class diversity and metabolite fingerprinting: An efficient column chromatographic strategy. **Analytica chimica acta**, v. 702, n. 2, p. 288-294, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267011009147>

SUBBARAJU, GV; KAVITHA, J; RAJASEKHAR, D; *et al*. Jusbetonin, the first indolo [3, 2-b] quinoline alkaloid glycoside, from *Justicia betonica*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 3, p. 461-462, 2004. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np030392y>

TACKIE, AN; BOYE, GL; SHARAF, MHM; *et al*. Cryptospirolepine, a unique spiro-nonacyclic alkaloid isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 5, p. 653-670, 1993. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50095a001>

TEKLEHAYMANOT, T. Ethnobotanical study of knowledge and medicinal plants use by the people in Dek Island in Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 1, p. 69-78, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19477609>

THEILER, BA; REVOLTELLA, S; ZEHL, M., *et al*. Secundarellone A, B, and C from the leaves of *Justicia secunda* VAHL. **Phytochemistry Letters**. cxxix–cxxxii. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390014000901>

THEILER, BA; ISTVANITS, S; ZEHL, M; *et al*. HPTLC Bioautography Guided Isolation of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibiting Compounds from *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae) **Phytochem. Analysis**, 28, 87–92. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pca.2651>

THOBOKHOLT, EN; LARGHI, EL; BRACCA, ABJ; *et al*. Isolation and synthesis of cryptosanguinolentine (isocryptolepine), a naturally-occurring bioactive indoloquinoline alkaloid. **RSC Advances**, v. 10, n. 32, p. 18978-19002, 2020. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/ra/d0ra03096a#!divAbstract>

TOUYZ, RM; ALVES-LOPES, R; RIOS, FJ; *et al*. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular research**, v. 114, n. 4, p. 529-539, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29394331>

TOMAZZONI, MI; NAGRELLE, RRB; CENTA, ML. Fitoterapia Popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm**, Florianópolis, 15(1): 115-21, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v15n1/a14v15n1.pdf>

TRIGGLE, CR; DING, H; ANDERSON, TJ; *et al*. The endothelium in health and disease: a discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to

vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 263, n. 1, p. 21-27, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15524164/>

TUROLLA, MSR; NASCIMENTO, ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbcf/v42n2/a15v42n2.pdf>

VERDAM, MCS; GUILHON-SIMPLICIO, F; BARBOSA, GS; *et al.* Anti-inflammatory action of Justicia acuminatissima leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 25 264–268. 2015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2015000300264&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2015000300264&script=sci_arttext)

VIEGAS-JUNIOR, RC; BOLZANI, VS; BARREIRO, EJ. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quím Nova** 29: 326-337, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n2/28453.pdf>

YAMOAHA, A; ADOSRAKU, RK; AMENU, JD; *et al.* Evaluation of the Haematinic Activities of Extracts of Justicia secunda Vahl Leaves in Red Blood Cells of Laboratory Rats. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 8, n. 3, p. 48-57, 2020. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=98678>

YUNES, RA; PEDROSA, RC; FILHO, VC. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím Nova** 24: 147-152, 2001. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422001000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

WASSHAUSEN, DC. Acanthaceae of the Southeastern United States. **Castanea** 63(2): 99-116, 1998. Disponível em: [https://www.jstor.org/stable/4034065?seq=1#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/4034065?seq=1#metadata_info_tab_contents)

WAGNER, H; BLADT, S. Plant drug analysis. Thin Layer Chromatography Atlas. 2ed. **Springer**. Londres, 2001.

WILSON, ID; BRINKMAN, UA Th. Hyphenation and hypernation: the practice and prospects of multiple hyphenation. **Journal of Chromatography; A**, v. 1000, n. 1-2, p. 325-356, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967303005041>

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants, **Genebra**, v.1, p.133, 2003. Disponível em: <https://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4928e/s4928e.pdf>

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global report on traditional and complementary medicine. **World Health Organization**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/WhoGlobalReportOnTraditionalAndComplementaryMedicine2019.pdf?ua=1>

ZEISEL, SH. Gene response elements, genetic polymorphisms and epigenetics influence the human dietary requirement for choline. **IUBMB Life**. Jun;59(6):380-7; 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17613168/>