



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALINE HOLANDA SILVA

CONTRIBUIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICO A PARTIR DE
***Justicia pectoralis* (CHAMBÁ) PARA O TRATAMENTO DA ASMA: OTIMIZAÇÃO,**
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

FORTALEZA

2018

ALINE HOLANDA SILVA

**CONTRIBUIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICO A PARTIR DE
Justicia pectoralis (CHAMBÁ) PARA O TRATAMENTO DA ASMA: OTIMIZAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Tese apresentada à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578c Silva, Aline Holanda.
CONTRIBUIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICO A PARTIR DE *Justicia pectoralis*
(CHAMBÁ) PARA O TRATAMENTO DA ASMA: OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTI-INFLAMATÓRIA / Aline Holanda Silva. – 2018.
132 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal .

1. *Justicia pectoralis*. 2. cumarina. 3. umbeliferona. 4. extrato microencapsulado. 5. atividade
antiasmática. I. Título.

CDD 615

ALINE HOLANDA SILVA

**CONTRIBUIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICO A PARTIR DE
Justicia pectoralis (CHAMBÁ) PARA O TRATAMENTO DA ASMA: OTIMIZAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 31/08/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Antonia Torres Ávila Pimenta
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa
Universidade Regional do Cariri

Dr^a. Bianca Oliveira Louchard
Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos/Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Suzana Barbosa Bezerra
Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza

*A Deus, provedor da minha existência que me
sustenta e fortalece a cada novo dia.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Eudemberg e Magda, pelo grande esforço que fizeram para eu chegar aqui e por tanto se orgulharem do que eu faço e também ao meu irmão, por fazer parte da nossa grande aventura chamada vida.

Aos meus filhos peludos, Coco e Yoda (gato peste, gato danado) e a todos os demais membros da minha família de quatro patas cuja existência foi ou é essencial: Nenês, Zara, Tom, Pretinha: saudade eterna; Pequena, Bola, Maria e tantos outros adotivos: companheiros fieis. Animais fantásticos. Como se diz por aí: "só sabe os quem cria".

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, não somente por ter me aceitado como sua aluna, mas por confiar no meu potencial e sempre me fazer acreditar que sou capaz ao longo desses vários... vários anos de ensinamento. Sou grata por toda confiança e responsabilidade depositada sobre mim, o que me enriqueceu bastante e fez-me crescer não só como pesquisadora, mas também como pessoa.

Aos meus companheiros e amigos da MEAC. Apoio e compreensão os define. "Não sei o que teria sido de mim sem vocês!" Pessoas maravilhosas. Agradeço todos os dias pela nossa convivência que vai além do trabalho.

A um grupo seletivo de auto-ajuda (Rs!) formado por pessoas pessoas especiais. Nathália, Taiana, Sandra, Suzana e Moisés. Algumas próximas, algumas mais distante, mas que não deixam o vínculo se desfazer.

Aos colegas de laboratório, companheiros "nessa longa estrada da vida" por terem sido fundamentais nessa etapa, em especial Fernanda, Elizama e Hilmar e a tantos outros que certamente torceram por esse trabalho (até mesmo porque não me aguentam mais no laboratório... Rs!).

Ao Diogo Mirón, pessoa de uma inteligência fantástica, que me apoiou e contribuiu muito para o desenvolvimento de vários dos experimentos contidos aqui neste trabalho. Sempre me apoiando de uma maneira bem peculiar.

Ao Prof. Marcos Esmeraldo por se disor prontamente em cultivar o chambá, matéria-prima e ponto de partida para que o desenvolvimento do trabalho pudesse ocorrer.

A profa. Arlete Sales por sua ajuda e por dividir seus conhecimentos em botância.

A profa. Janaína Serroa Azul pelo auxílio com os cortes histológicos.

Ao Kirley (EMBRAPA) e prof. Edilberto (CENAUREMN) pelo trabalho de elucidação estrutural do composto isolado que proporcionou o apripomamente do trabalho.

A toda banca examinadora pela disposição em agregar melhorias e por prontamente atender a solicação em participar desse momento.

Aos amigos que se fizeram presente e aos familiares que aqui não foram pontuados, mas que nem por isso são menos importantes.

A todos que pacientemente ouviram minhas reclamações, desabafos e enxugaram minhas lágrimas, apoiaram-me e não me fizeram desistir, contribuindo direta ou indiretamente para o cumprimento desta etapa...

MUITO OBRIGADA!!!

*Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer.*

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

CONTRIBUIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICO A PARTIR DE *Justicia pectoralis* (CHAMBÁ) PARA O TRATAMENTO DA ASMA: OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.

Justicia pectoralis (Acanthaceae), chambá, popularmente usada no tratamento de afecções respiratórias, está presente nas Farmácias Vivas, Rénisus e Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Estudos têm demonstrado ação anti-inflamatória, broncodilatadora e antiasmática, relacionadas à presença de cumarina (CM) e umbeliferona (UMB). O objetivo do trabalho foi desenvolver extrato seco (micropartículas) padronizado e investigar seu efeito anti-inflamatório em modelo experimental de asma exacerbada. Metodologia analítica (CLAE-DAD) foi validada para dosagem de CM e UMB e se mostrou específico, linear, preciso, exato e robusto. Foi determinado que o melhor tempo de colheita das partes aéreas de *J. pectoralis* é aos três meses de cultivo, sendo verificada influência sazonal. Na otimização do processo extrativo, após investigação de diversos métodos e variáveis do processo, verificou-se que a maceração seguida de percolação foi a que apresentou melhor concentração de marcadores. O extrato foi empregado na otimização da produção do extrato seco de *Justicia pectoralis* por *spray drying* (ESPJP), apresentando bons índices reológicos, baixa higroscopicidade, morfologia esférica e teor de CM = $21,10 \pm 0,014$ (0,70) e UMB = $1,74 \pm 0,20$ (1,05) e rendimento de $59,45 \pm 1,78$ (2,05). Estudo cromatográfico (CLAE-DAD) e de elucidação estrutural permitiram propor 2-O-ramnosil-eswertina como novo marcador químico. ESPJP não mostrou citotoxicidade (MTT e LDH) em neutrófilo humano. O efeito anti-inflamatório do ESPJP foi investigado em modelo experimental de asma brônquica exacerbada por meio de estímulo imuno-infeccioso (OVA e LPS) em camundongos BALB/c. ESPJP (100 mg/Kg, v.o.) foi capaz de promover redução significativa do número de leucócitos totais presente no LBA, bem como a atividade da mieloperoxidase. Análise histológica revelou que o ESPJP causou diminuição no número de células inflamatórias na região peribronquiolar e na produção de muco nos pulmões. Os resultados obtidos permitiram definir e padronizar etapas e parâmetros de produção do ESPJP que mostrou atividade anti-inflamatória e foi empregado na formulação de fitoterápico para uso oral.

Palavras-chave: *Justicia pectoralis*, cumarina, umbeliferona, extrato seco, 2-O-ramnosil-eswertina, atividade antiasmática.

ABSTRACT

CONTRIBUTIONS TO PHYTOTHERAPY DEVELOPMENT FROM *Justicia pectoralis* (CHAMBÁ) FOR THE TREATMENT OF ASTHMA: OPTIMIZATION, CHARACTERIZATION AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY.

Justicia pectoralis Jacq. (Acanthaceae), “chambá”, it used in the treatment of respiratory diseases. Present in Pharmacies Vivas and Rénisus, pharmacological studies demonstrate their anti-inflammatory, bronchodilator and antiasthmatic actions, being these related to the presence of coumarin (CM) and umbelliferone (UMB) in the plant. The aim of the study was to develop standardized dry extract (microparticles) and investigate its anti-inflammatory effect in an experimental model of exacerbated asthma.. Analytical methodology (CLAE-DAD) was validated for CM and UMB dosing and showed to be specific, linear, precise, accurate and robust. It was determined that the best harvest time of the aerial parts of *J. pectoralis* is at three months of cultivation, and seasonal influence is verified. In the optimization of the extraction process, after investigation of several methods and process variables, it was verified that the maceration followed by percolation had the best concentration of markers. The extract was used to optimize the production of the dry extract of *Justicia pectoralis* by spray drying (ESPJP), presenting good rheological indexes, low hygroscopicity, spherical morphology, CM = 21.10 ± 0.014 (0.70) and UMB = 1.74 ± 0.20 (1.05) and yield of 59.45 ± 1.78 (2.05). Chromatographic study (HPLC-DAD) and structural elucidation allowed to propose 2-O-rhamnosyl-eswertine as a new chemical marker. ESPJP did not show cytotoxicity (MTT and LDH) in human neutrophils. Anti-inflammatory effect of ESPJP was investigated in an experimental model of bronchial asthma exacerbated by immuno-infectious stimulus (OVA and LPS) in BALB/c mice. ESPJP (100 mg/Kg) was able to promote a reduction in the number of total cells present in BAL, as well as the activity of myeloperoxidase. Histological analysis revealed that ESPJP caused a decrease in the number of inflammatory cells in the peribronchial region and in the production of mucus in the lungs. Results allowed to define and standardize stages and parameters of ESPJP production that showed anti-inflammatory activity and was used in the formulation of phytotherapeutic for oral use.

Keywords: *Justicia pectoralis*, coumarin, umbelliferone, dried extract, 2-O-rhamnosyl-eswertine, asthsmatic activity.

LISTA DE ABRAVIATURAS

\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau (s) Centígrado (s)
<	Menor que
μg	Micrograma
μL	Microlitro
C-18	Octadecilsilano
H₃PO₄	Ácido fosfórico
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Abs	Absorbância
cels	Células
CysLTs	Cis-leucotrienos
CM	Cumarina
DAD	Detector de Arranjo de Diiodo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPR%	Desvio Padrão Relativo
DSC	Dióxido de Silício Coloidal
ECP	Proteína Catiônica Eosinofílica
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ESPJP	Extrato Seco padronizado de <i>Justicia pectoralis</i>
EtOH	Etanol
FH	Fator de Hausner
g	Gramas
h	Hora
HBSS	Solução salina tamponada de Hanks
HE	Hematoxilina & Eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio

IC	Índice de Carr
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
Kg	Kilograma
KOH	Hidróxio de potássio
L	Litro
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB	Leucotrieno
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase
nm	Nanômetro
OVA	Ovalbumina
p/v	Peso/volume
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Solução salina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
THF	Tetrahidrofurano
TMB	Solução de tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UMB	Umbeliferona
UR	Umidade Relativa
vs.	Versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática de um aparelho de secagem por asperção.....	25
Figura 2 - Aspecto macroscópico de <i>Justicia pectoralis</i> (A), inflorescência (B) e seu xarope distribuído por programas governamentais de fitoterapia (C).....	27
Figura 3 - Constituintes químicos presentes nas partes aéreas de <i>Justicia pectoralis</i>	31
Figura 4 - Fisiopatologia da asma e suas complexas interações celulares.	40
Figura 5 - Planejamento dos estudos farmacêuticos e biológicos de <i>Justicia pectoralis</i>	47
Figura 6 - Protocolo experimental do modelo de asma exacerbada induzida por ovalbulmina e lipopolissacarídeo em camundongos BALB/c.	59
Figura 7 - Cromatograma (CLAE – DAD) da solução padrão dos marcadores químicos e extrato hidroalcoólico de <i>Justicia pectoralis</i>	63
Figura 8 – Espectro de pureza do pico da solução padrão dos marcadores químicos e extrato hidroalcoólico de <i>Justicia pectoralis</i>	64
Figura 9 – Representação gráfica das curvas de calibração dos marcadores químicos de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	67
Figura 10 – Gráfico de resíduos obtido por tratamento estatístico da curva de calibração dos marcadores químicos.	67
Figura 11 – Secções foliares de <i>Justicia pectoralis</i>	76
Figura 12 – Desenvolvimento de biomassa em canteiro de cultivo de <i>Justicia pectoralis</i>	77
Figura 13 - Sazonalidade dos teores de cumarina e umbeliferona em <i>Justicia pectoralis</i>	77
Figura 14 - Aspecto macroscópico do extrato seco de <i>Justicia pectoralis</i> acrescido de adjuvantes de secagem.....	83
Figura 15 - Gráfico de Pareto para os parâmetros de resposta avaliados no planejamento fatorial 2 ³ do processo de produção do extrato seco de <i>Justicia pectoralis</i>	85
Figura 16 - Perfil do cromatográfico do Extrato Seco de <i>Justicia pectoralis</i> (ESPJP) e seus marcadores químicos umbeliferona e cumarina.	88
Figura 17 – Absorção de umidade do extrato seco padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> produzido por <i>spray drying</i> exposta a diferentes atmosferas de umidade relativa.....	88
Figura 18 – Fotomicrografia do extrato microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> obtida por microscopia eletrônica de varredura.....	88
Figura 19 - Xarope produzido a partir do extrato seco padronizado de <i>Justicia pectoralis</i>	89

Figura 20 - Cromatograma do extrato microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> com identificação do novo marcador químico por CLAE-DAD.....	90
Figura 21 - Efeito do extrato microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> sobre a alteração da permeabilidade da membrana de neutrófilos humanos determinado pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	91
Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade do extrato microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> em neutrófilos humanos através do teste do MTT.....	92
Figura 23 – Efeito do tratamento com extrato microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> sobre a migração celular induzida por ovoalbumina e lipopolissacarídeo em camundongos BALB/c.....	94
Figura 24 - Células do lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c submetidos à indução de asma através de imunização e desafio com ovalbumina e lipopolissacarídeo.....	95
Figura 25 - Efeito do tratamento com com extrato microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em tecido pulmonar de animais sensibilizados e desafiados com ovoalbumina e lipopolissacarídeo.....	96
Figura 26 - Inflamação em cortes histológicos de pulmões de camundongos BALB/c asmáticos após diversos tratamentos.....	98
Figura 27 - Produção de muco em cortes histológicos de pulmões de camundongos BALB/c asmáticos após diversos tratamentos.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações e volumes de umbeliferona empregados na construção da curva padrão por CLAE-DAD.....	48
Tabela 2 - Concentrações e volumes de cumarina empregados na construção da curva padrão por CLAE-DAD.	49
Tabela 3 - Preparo das soluções para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE-DAD: umbeliferona.	50
Tabela 4 - Preparo das soluções para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE-DAD: cumarina.	50
Tabela 5 - Distribuição percentual dos adjuvantes de secagem empregados na preparação do extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i>	52
Tabela 6 - Fatores e níveis utilizados para avaliar o processo de produção do extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i>	53
Tabela 7 - Planejamento fatorial 2 ³ para padronização do processo de produção do extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i>	53
Tabela 8 – Parâmetros analíticos (CLAE-DAD) para análise de cumarina e umbeliferona em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i>	62
Tabela 9 - Curva de calibração da umbeliferona de método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	66
Tabela 10 - Curva de calibração de cumarina de método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	66
Tabela 11 - Avaliação da precisão (repetibilidade) do método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	69
Tabela 12 - Avaliação da precisão intermediária do método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	69
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária de umbeliferona e cumarina do método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.....	69

Tabela 14 - Recuperação da umbeliferona em metodologia analítica para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	71
Tabela 15 - Recuperação da cumarina em metodologia analítica para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	71
Tabela 16 - Avaliação da robustez do método analítico para quantificação de umbeliferona em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	73
Tabela 17 - Avaliação da robustez do método para análise da cumarina em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD.	73
Tabela 18 - Quantificação do teor de cumarina e umbeliferona em extrato hidroalcoólico de <i>Justicia pectoralis</i> por CLAE-DAD cultivada por diferentes períodos.	76
Tabela 19 - Avaliação da variação sazonal de <i>Justicia pectoralis</i> monitorada por CLAE-DAD.	77
Tabela 20 - Maceração como método extrativo para produção do extrato de <i>Justicia pectoralis</i> monitorado pelo teor de marcadores por CLAE-DAD.	78
Tabela 21 - Influência dos métodos extrativos de <i>Justicia pectoralis</i> por soxhlet, turbólise e maceração com esgotamento sobre o teor de marcadores CLAE-DAD.	79
Tabela 22 - Avaliação dos efeitos da redução de etanol no solvente extrator em método extrativo a partir de <i>Justicia pectoralis</i> sobre o teor de marcadores.	79
Tabela 23 - Avaliação da influência da proporção entre droga vegetal e solvente extrator em método extrativo a partir de <i>Justicia pectoralis</i>	80
Tabela 24 - Avaliação da influência da agitação em método de extrativo a partir de <i>Justicia pectoralis</i>	80
Tabela 25 - Avaliação da influência da percolação como etapa agregada em método extrativo a partir de <i>Justicia pectoralis</i>	81
Tabela 26 - Planejamento fatorial 2 ³ do processo de produção do extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i>	85
Tabela 27 - Caracterização físico-química do extrato seco padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> produzido por <i>spray drying</i>	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Plantas medicinais como fonte de novos fármacos	20
1.2 Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos.....	22
1.3 Extrato vegetal microparticulado.....	24
1.4 <i>Justicia pectoralis</i> Jacq var. <i>stenophylla</i> Leonard	27
1.4.1 Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos	27
1.4.2 Aspectos químicos.....	30
1.4.3 Aspectos toxicológicos e farmacológicos.....	30
1.4.3.1 Toxicologia pré-clínica.....	322
1.4.3.2 Farmacologia pré-clínica	32
1.4.3.3 Estudos clínicos	36
1.4.4 Estudos preliminares	37
1.5 Asma.....	38
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	44
3.1 Geral	44
3.2 Específicos.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Materiais	45
4.1.1 Material vegetal	45
4.1.2 Aspectos éticos	45
4.1.3 Material biológico	45
4.1.4 Animais experimentais	45
4.1.5 Drogas, reagentes e substâncias químicas de referência	46
4.1.6 Equipamentos	46
4.1.7 Outros materiais.....	46
4.2 Métodos	47
4.2.1 Otimização e validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para dosagem de marcadores químicos em droga <i>in natura</i> e produtos derivados.....	47
4.2.1.1 Especificidade.....	47
4.2.1.2 Linearidade e faixa de trabalho	488
4.2.1.3 Precisão.....	49

4.2.1.4 Exatidão	49
4.2.1.5 Robustez	50
4.2.2 Determinação de parâmetros botânicos para o controle de qualidade das folhas de <i>Justicia pectoralis</i>	50
4.2.3 Determinação do tempo de coleta e avaliação da sazonalidade de <i>Justicia pectoralis</i> monitorado pelo teor de cumarina e umbeliferona	51
4.2.4 Otimização do método de extração a partir de <i>Justicia pectoralis</i>	51
4.2.5 Otimização do extrato microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> produzido por <i>spray drying</i>	52
4.2.6 Caracterização do extrato microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> produzido por <i>spra drying</i>	53
4.2.6.1 Densidade Bruta e de Compactação, Fator de Hausner e Índice de Carr	53
4.2.6.2 Ângulo de repouso	54
4.2.6.3 Determinação da umidade residual	54
4.2.6.3 Higroscopicidade	54
4.2.6.4 Dosagem dos marcadores químicos por CLAE-DAD	55
4.2.6.5 Rendimento do processo de secagem	55
4.2.6.6 Caracterização morfológica	55
4.2.7 Preparação e análise do teor de marcadores de fitoterápico para uso oral a partir do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i>	55
4.2.8 Estudo cromatográfico (CLAE-DAD) do extrato microencapsulado visando a identificação de um novo marcador químico para o controle de qualidade de produtos derivados de <i>Justicia pectoralis</i>	56
4.2.9 Avaliação pré-clínica do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i>	56
4.2.9.1 Avaliação da citotoxicidade em cultura primária de neutrófilos humano	56
▪ Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)	57
▪ Teste do MTT	58
4.2.9.2 Avaliação da atividade anti-anti-inflamatória do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> em modelo experimental de asma exacerbada induzida por lipolissacarídeo e ovalbumina em camundongo BALB/c	58
▪ Sensibilização e bronco-provocação antigênica	58
▪ Efeito sobre a celularidade do lavado broncoalveolar	59
▪ Liberação de mieloperoxidase no tecido pulmonar	60

▪ Análise histopatológica	60
5. RESULTADOS	62
5.1 Otimização e validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para dosagem de marcadores químicos em droga vegetal e produtos derivados de <i>Justicia pectoralis</i>	62
5.1.1 Especificidade.....	63
5.1.2 Linearidade e faixa de trabalho	65
5.1.3 Precisão.....	68
5.1.4 Exatidão	70
5.1.5 Robustez	72
5.2 Determinação de parâmetros botânicos para o controle de qualidade das folhas de <i>Justicia pectoralis</i>	74
5.3 Determinação do tempo de colheita e avaliação da sazonalidade de <i>Justicia pectoralis</i> monitorado pelo teor de cumarina e umbeliferona por CLAE-DAD	75
5.4 Otimização do método de extração a partir de <i>Justicia pectoralis</i>	78
5.5 Otimização do extrato seco microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por <i>spray drying</i>	82
5.6 Caracterização do extrato seco microparticulado de <i>Justicia pectoralis</i> por <i>spray drying</i>	86
5.7 de fitoterápico para uso oral a partir do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i>	89
5.8 Estudo cromatográfico (CLAE-DAD) do extrato seco microeparticulado vpadronizado isando a identificação de um novo marcador químico para o controle de qualidade de produtos derivados de <i>Justicia pectoralis</i>	90
5.9 Avaliação pré-clínica do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i>	91
5.9.1 Avaliação da citotoxicidade em culura primária de neutrófilos humano	91
5.9.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> em modelo experimental de asma exacerbada induzida por ovalbumina e lipopolissacarídeo em camundongo BALB/c	93

5.9.2.1. Efeito do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> sobre o acúmulo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar.....	93
5.9.2.2. Efeito do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em tecido pulmonar de camundongos BALB/c desafiados com ovalbumina e lipopolissacarídeo.....	96
5.9.2.3 Efeito do extrato seco microparticulado padronizado de <i>Justicia pectoralis</i> sobre o infiltrado de células e produção de muco no pulmão de camundongos BALB/c desafiados com ovalbumina e lipopolissacarídeo.....	97
6. DISCUSSÃO.....	100
7. CONCLUSÃO.....	113
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais como fonte de novos fármacos

O uso de plantas para fins terapêuticos, seja no tratamento ou prevenção de doenças, é uma das práticas medicinais mais antigas do homem, sendo, visivelmente uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, alguns sendo inclusive protótipos para síntese de um grande número de fármacos como a digoxina, o paclitaxol, a artemisinina, a vinblastina dentre outras (HARVEY, 2000; VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; VEIGA JÚNIOR, 2008).

Estima-se que, nos últimos anos, dentre os novos fármacos aprovados para uso humano, cerca de 30% são produtos naturais ou derivados destes. Entretanto, em se tratando dos fármacos anticancerígenos, por exemplo, este número sobe para 42% (NEWMAN; CRAGG, 2007). Em termos globais, do total de US\$ 320 bilhões em vendas anuais de produtos farmacêuticos, o mercado de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 20 bilhões todos os anos e está em ascensão (ABIFISA, 2016).

No Brasil, apesar da grande tradição da população no uso de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças, abundante biodiversidade e inúmeras publicações científicas sobre plantas medicinais nacionais, poucos medicamentos da flora brasileira possuem estudos conclusivos para o registro pela agência reguladora nacional (ANVISA) (CALIXTO *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2016). A maioria dos estudos sobre plantas medicinais brasileiras requer conhecimentos adicionais para o desenvolvimento de fitoterápicos de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2014). Por vezes, apresentam ausência de parâmetros para controle de qualidade de matéria-prima ativa e para produtos acabados, bem como dados sobre a farmacocinética, sendo evidências clínicas também raras (CALIXTO *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2016).

Várias desvantagens relacionadas à busca de novos fármacos a partir de produtos naturais têm sido superadas através da aplicação de novas tecnologias úteis, desde a realização de estudos químicos, farmacêuticos a farmacológicos. Isso vem permitido o desenvolvimento de fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade comprovadas os quais se destacam no mercado farmacêutico internacional, como *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* e *Valeriana officinalis* (SCKENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2003; BLUMENTHAL, 2009).

No Brasil, embora exista uma grande variedade de produtos naturais no mercado nacional, como xarope de guaco (*Mikania glomerata*), de agrião (*Nasturtium officinale*), de *Hedera helix*, tintura de agoniada (*Plumeria lancifolia*) e o Acheflan[®] creme (*Cordia verbenacea*), primeiro medicamento com pesquisa e desenvolvimento totalmente nacional, ainda há uma carência expressiva de produtos derivados de plantas que possuam estudos conclusivos, comprovando a segurança e a eficácia clínica de seu uso, além de um rigoroso controle de qualidade (SILVA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2006).

Nesse contexto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem-se mostrado positivamente a favor da necessidade de valorização do uso de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica (OMS, 2002), estimando que 65 a 80% da população mundial, especialmente em países em desenvolvimento, utilizam produtos à base de plantas medicinais no tratamento de suas doenças (RAHMAN; SINGHAL, 2002), sendo estas utilizadas, por vezes, em associação com medicamentos alopáticos, homeopáticos, entre outros (CALIXTO, 2000; FUNARI; FERRO, 2005). No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), através de seus princípios e diretrizes norteadores, reconhece a fitoterapia como recurso terapêutico integrativo e complementar à saúde, dispondo de políticas públicas e normatizações específicas que buscam institucionalizar esta prática (BRASIL, 2012a; FONTENELE *et al.*, 2013).

Assim, a promulgação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS possibilitou ampliar as opções terapêuticas oferecidas a seus usuários com garantia de acesso às plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006).

Em 2010, o programa Farmácia Viva, idealizado pelo professor da Universidade Federal do Ceará, Francisco de Abreu Matos, em 1983, foi finalmente incorporado ao SUS, como forma de garantir a prevenção de agravos, a promoção e a recuperação da saúde com ênfase na atenção básica à saúde (MATOS, 2006; BRASIL, 2010). Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC nº 60, aprovando a primeira edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). Em 2013, reforçando esta ação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou a RDC nº 18 que dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em Farmácias Vivas (BRASIL, 2013). Mais recentemente, em 2016, a RDC nº 84 aprovou o Memento Fitoterápico cujo objetivo é orientar a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2016).

O estado do Ceará foi um dos primeiros do Brasil a sistematizar a utilização de plantas medicinais, medicamentos fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia a partir do programa Farmácia Viva e a regulamentar esse uso no SUS, através da Lei nº 12.951, de 07 de outubro de 1999 e do Decreto nº 30.016 de 30 de dezembro de 2009 (FONTENELE *et al.*, 2013). No município de Fortaleza, participam do elenco do programa treze espécies, a partir das quais são fornecidos doze produtos em diferentes formas farmacêuticas (xarope, tintura, elixir, pomada, creme, capsula) (FORTALEZA, 2004).

1.2 Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos

A transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios e multidisciplinares, relativos aos aspectos botânico, agrônomo, fitoquímico, farmacognóstico, farmacológico, toxicológico, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL; MIGUEL, 1999). O cumprimento dessas etapas é fundamental para obtenção de um produto final com qualidade e tecnologia agregadas (STROHL, 2000; TOLEDO *et al.*, 2003).

Dentre as várias etapas, o desenvolvimento de parâmetros que garantam a autenticidade das espécies vegetais, através da caracterização anatômica e morfológica da planta ou suas partes, constituindo a etapa de estudos botânicos. Nos estudos agrônômicos, objetiva-se a otimização da produção de biomassa e constituintes ativos, investigando-se as melhores condições de plantio e colheita, as quais podem sofrer interferência da sazonalidade e influenciar a complexidade química da espécie. Assim, a distinção e a caracterização da espécie vegetal quanto aos seus constituintes químicos é etapa primordial. Esta pode se desenvolver através do isolamento, elucidação estrutural e identificação de seus compostos mais importantes. Com os estudos de formulação, almeja-se verificar qual o método extrativo mais adequado, selecionar adjuvantes tecnológicos e verificar processos de produção de formas farmacêuticas por meio de delineamentos experimentais. Para verificação quali e quantitativa dos constituintes químicos, é imprescindível o desenvolvimento de metodologias analíticas para avaliação da qualidade do produto fitoterápico nas etapas do ciclo de produção através de métodos químicos, físico-químicos e tecnológicos, devendo obedecer a parâmetros de qualidades estabelecidos nas Farmacopeias, Códigos Oficiais e Literaturas Confiáveis. Além de todas essas etapas, os estudos de atividade biológica fecham o ciclo de produção e

utilização de um fitoterápico ao permitir a caracterização da atividade farmacológica e toxicológica dos derivados extrativos, frações ou substância bioativas por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, para garantir a segurança e eficácia desejada nesses produtos (SIMÕES *et al.*, 2003; MICHELIN; SALGADO, 2004; ZARONI *et al.*, 2004; MIGLIATO *et al.*, 2007).

Considera-se um produto farmacêutico com qualidade aquele que possui suas características reprodutíveis quanto à constância de princípio ativo e propriedades físico-químicas. Por outro lado, os produtos fitoterápicos vêm sendo bastante questionados quanto a sua qualidade ao se comparar diversos lotes do mesmo produto, resultado do uso de métodos de preparação não padronizados nem controlados (LIST; SCHIMIDT, 1989).

O controle de qualidade de fitoterápicos é realizado através da aplicação de métodos físico-químico e biológico adequados, devendo estes estar presentes em toda a cadeia produtiva, desde a qualificação de matérias-primas e insumos intermediários, bem como da forma farmacêutica final. Esse monitoramento deve garantir a obtenção de produtos com características aceitáveis de acordo com a legislação vigente (FONSECA, 2009).

Da mesma forma, a utilização de marcadores químicos no controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos torna-se fundamental em protocolos e legislações de órgãos responsáveis pela regulamentação da produção de medicamentos como a OMS e ANVISA (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010; CHECHINEL-ZANCHETT, 2016; DUTRA *et al.*, 2016). Tais marcadores podem ser identificados e/ou quantificados por metodologias analíticas simples ou complexas como a cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria, cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BRASIL, 2014).

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implantação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser definido como validação. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito e deve avaliar a relação entre os resultados teóricos e experimentais (BRITO *et al.*, 2003). A validação de métodos analíticos é de extrema importância para garantir a qualidade de um produto, constituindo-se uma das exigências das Normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Os métodos de ensaios propostos para avaliar a conformidade dos produtos farmacêuticos devem satisfazer especificações previamente estabelecidas como precisão, exatidão e confiabilidade, sendo considerado validado se suas características estiverem de acordo com esses parâmetros (BARROS, 2002).

No desenvolvimento de fitoterápicos, a transformação do material vegetal em um produto tecnicamente elaborado, que pode ser intermediário ou final, implica a utilização de operações de transformação tecnológica. A complexidade do processo e o número de operações envolvidas são determinados pelo grau de transformação tecnológica requerido, que pode ser mínimo, como é o caso de pós e drogas rasuradas, destinadas à preparação de chás, ou bem mais elaboradas, quando o objetivo é obter frações purificadas ou formas farmacêuticas sólidas como cápsulas ou comprimidos (TOLEDO *et al.*, 2003).

1.3 Extrato vegetal microparticulado

A microencapsulação é uma estratégia amplamente utilizada na obtenção de produtos farmacêutico, químico, agrícola e alimentar onde as microcápsulas formadas possuem tamanho entre 1 a 5000 μm . A microencapsulação é um processo pelo qual um material de núcleo ativo é encapsulado em um invólucro de permeabilidade limitada que o protegerá do ambiente externo até o estímulo correto encontrado. Esta técnica permite líquidos ou sólidos, tais como fármacos, proteínas, hormônios, fertilizantes e outras partículas pequenas ser envoltas em uma concha uniforme. A composição do material do invólucro pode variar dependendo do método utilizado e pode ser formada a partir de material do tipo natural, como amido, gelatina, amido modificado e celulose, acrilatos e outros polímeros sintéticos (SILVA *et al.*, 2014; YUSOP, MANAF, HAMZAH, 2017).

Dentre as vantagens de se produzir uma matéria-prima vegetal na forma de pó, pode-se citar a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilidade de padronização, maior concentração de compostos ativos e elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). A escolha do método mais adequado depende da sensibilidade da amostra ao calor, da aplicação da microcápsula, do tamanho das partículas necessárias, das propriedades físicas e químicas da substância a ser encapsulada e do polímero empregado, do mecanismo de liberação necessário, da escala de produção e do custo (AULTON, 2005; SUAVE *et al.*, 2006).

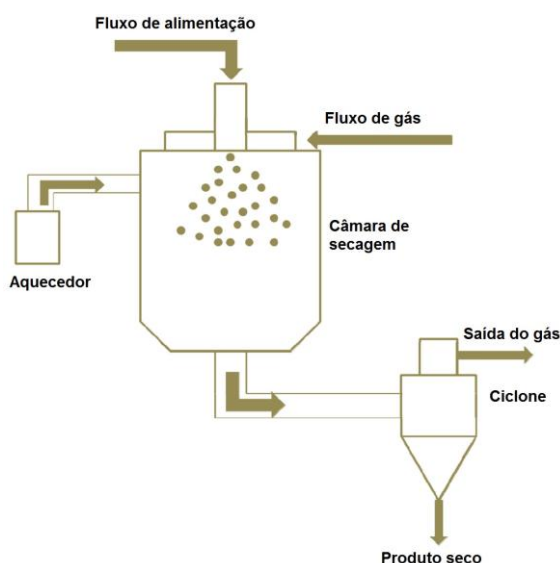
Dentre as tecnologias empregadas, a secagem por aspersão (*spray drying*) constituiu uma das técnicas mais difundidas na indústria de fitoterápicos, devido à sua estabilidade e possibilidade de controle das características do produto final (OLIVEIRA; PETROVICK, 2000). Isso vem permitido o desenvolvimento de fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade comprovadas, como *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* e *Valeriana*

officinalis, que se destacam no mercado farmacêutico internacional (SCKENKEL *et al.*, 2003; BLUMENTHAL, 2009).

O processo de secagem por aspersão (FIGURA 1) consiste em colocar o extrato líquido em contato com ar quente e seco por meio da formação de pequenas gotículas, aumentando assim a superfície de contato, a fim de obter a evaporação do solvente e a recuperação de um produto seco particulado. A separação do sólido formado é obtida por meio de separador ciclone. O tempo que o extrato passa em contato com as temperaturas elevadas é pequeno, o que permite seu emprego na secagem de substâncias sensíveis ao calor. Além disso, consiste numa técnica de baixo custo, quando comparada a outras técnicas que utilizam aquecimento (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Como variáveis que afetam as propriedades de produtos obtidos em *spray dryer*, têm-se fluxo de alimentação, temperatura de alimentação e do ar de secagem, métodos e condições de atomização e diferenças nas propriedades físicas e químicas do material a ser seco. Com relação ao produto obtido, devem ser avaliados a densidade e o volume aparente, o tamanho da partícula e distribuição (incluindo pós finos), a friabilidade da partícula ou resistência à ruptura, o conteúdo de umidade, a dispersibilidade ou a tendência a aglomeração, além da retenção da qualidade desejada ao produto, como aroma, valor alimentício, cor, reconstituibilidade, entre outros (DUFFIE; MARSHALL, 1953). Outros parâmetros de qualidade de um extrato seco é a sua higroscopicidade, a qual deve ser a mais baixa possível para garantir a sua estabilidade e evitar a contaminação biológica (LIST; SCHIMIDT, 1989).

Figura 1 - Ilustração esquemática de um aparelho de secagem por aspersão.



Fonte: Adaptado de Munin; Edwards-Lévy (2011).

As propriedades do produto seco são, em geral, determinadas por fatores relacionados às características do material empregado (extrato fluido) e dos parâmetros operacionais do equipamento. Quando produzidos sem o uso de adjuvantes de secagem, os extratos secos normalmente são higroscópicos e tem baixas propriedades reológicas, de compressibilidade e compactabilidade, sendo, portanto, o emprego de adjuvantes tecnológicos fundamentais para aumentar o rendimento do processo de secagem, além de contribuir positivamente sobre a composição de água do produto, agregando estabilidade e qualidade, podendo inclusive interferir nas características de biodisponibilidade (GALLO *et al.*, 2011; TUYEN, 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Os mais empregados para esse fim são a lactose, as dextrinas e gelatinas, a goma arábica, os derivados da celulose e o dióxido de silício coloidal (LIST; SCHMIDT, 1989).

O dióxido de silício coloidal tem sido amplamente empregado na produção de extratos secos vegetais por apresentar excelentes resultados, uma vez que possui inúmeras vantagens principalmente como agente regulador de fluxo, diminuindo o atrito entre as partículas (ALBERTINI *et al.*, 2004; JONAT *et al.*, 2006). Devido à composição complexa desses extratos, vários problemas surgem durante a secagem no equipamento, tais como, a acumulação do produto nas paredes do aparelho e a aglomeração de partículas. A inclusão de adjuvantes de secagem, como o dióxido de silício coloidal, adicionados à solução a secar podem minimizar esses efeitos indesejáveis. Estudos demonstram que há uma melhora significativa no desempenho de secagem caracterizada pelo aumento do rendimento do processo, além de contribuir positivamente sobre o teor de água do produto e melhorar as propriedades reológicas dos extratos (RANKELL; LIEBERMAN; SCHIFFMAN, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Os derivados da celulose, um dos materiais mais utilizados como adjuvante farmacotécnico, são disponibilizados para a indústria farmacêutica com as mais variadas características e tamanho de partícula, graus de mistura, fluidez, densidade e outras propriedades físicas. É útil na produção de comprimidos devido às características de não-aderência, boa compressibilidade, fácil desintegração, alto potencial de diluição, além de ser inerte, o que a torna compatível com outros diluentes. O emprego desse excipiente, na produção de formas farmacêuticas sólidas, é favorecido pela sua característica de elevada compactabilidade, que é determinada pela capacidade de deformação plástica (ductibilidade), elevadas viscoelasticidade e resistência mecânica, além de baixa elasticidade (TOLLER, SCHMIDT, 2005). De acordo com a fonte originária da celulose e a técnica de transformação são encontrados diversos tipos de celulose possuindo diferentes propriedades. A celulose

microcristalina possui aplicação múltipla na produção de medicamentos, sendo útil por diminuir a formação de ligações de hidrogênio entre as partículas, melhorando o fluxo dos pós (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

1.4 *Justicia pectoralis* Jacq var. *stenophylla* Leonard

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem estudado continuamente uma espécie pertencente ao programa Farmácia Viva e que também está presente na Rénisus e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Dessa forma, *Justicia pectoralis* vem sendo avaliada, visando o desenvolvimento de um fitoterápico a ser empregado no tratamento de afecções respiratórias como a asma. Estudos fitoquímicos com espécies vegetais utilizadas no tratamento dessa patologia têm sido realizados com o objetivo de encontrar novas substâncias terapêuticas que possam servir como candidatos a fármacos ou, então, como protótipos para novos medicamentos (CORRÊA; MELO; COSTA, 2008).

1.4.1 Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos

A família Acanthaceae possui cerca de 250 gêneros e abrange mais de 4000 espécies nas regiões tropicais e, em menor quantidade, em zonas temperadas. Segundo Barroso *et al.* (1991), o Brasil representa um dos maiores centros de diversidade do grupo, com aproximadamente 40 gêneros e 550 espécies. Dentre as espécies do gênero, *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard (FIGURA 2) se destaca pelo emprego de suas folhas como medicinais (CORRÊA, ALCÂNTARA, 2012).

Figura 2 - Aspecto macroscópico de *Justicia pectoralis* (A), inflorescência (B) e seu xarope distribuído por programas governamentais de fitoterapia (C).



Fonte: Fonseca 2009.

J. pectoralis é frequentemente encontrada no México, Venezuela, Trindade, Cuba, Jamaica, Oeste do Equador, Centro-oeste, Norte e Nordeste do Brasil, onde tem sua ocorrência confirmada nos estados de Goiás, Mato Grosso, Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Ceará (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; PROFICE *et al.*, 2015).

Apresenta-se como uma pequena erva sempre verde, perene, suberecta. Macroscopicamente, apresenta caule ascendente, cilíndrico, verde com pelos retrorsos esbranquiçados dispostos em linhas verticais, nós inferiores frequentemente com raízes adventícias. Folhas simples, membráceas, verdes, opostas transversalmente, medindo, em média, de 4 a 6 cm de comprimento. Lâmina foliar peciolada, lanceolada, ápice agudo ou atenuado, base aguda ou estreita, margem inteira com tricomas em ambas as faces. Flores pequenas, sésseis com cálice verde e corola de cor branca ou lilás. A planta íntegra e as folhas recém-colhidas, secas ou após a fervura, exalam um odor que lembra o cheiro adocicado do cumaru, devido à presença de cumarina. Fruto do tipo cápsula deiscente e suas sementes são achatadas de cor castanha avermelhada (TAVARES; VIANA, 1995; OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; GOVÍN *et al.*, 2003).

Multiplica-se facilmente por estacas ou pequenas porções dos ramos já enraizadas. Cresce bem em canteiros, formando conjuntos aglomerados globosos com até 40 cm de altura. Essa forma de crescimento serve para distinguir esta erva de outras que recebem o mesmo nome popular, mas que crescem como grama. Conhecida popularmente como “son curia” (Porto Rico), “sana herida” (Jamaica) ou “tilo, carpintero ou té criollo” (Cuba). Dentre os seus vários epítetos, “chambá” é o mais famoso no nordeste brasileiro, mas sendo também bastante denominada de “anador” (SOUSA, 1991; TAVARES; VIANA, 1995; OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; MATOS, 2007).

A partir de estudos agronômicos, demonstrou-se que a concentração de cumarinas nas folhas de chambá é diretamente proporcional à intensidade de radiação solar incidente, sendo as vermelho-vináceas as que apresentam maior teor deste composto químico em relação às folhas verdes. Entretanto, a alta incidência de radiação solar no primeiro mês após o plantio afeta negativamente o crescimento da planta, acarretando um menor rendimento de biomassa, sendo para fins medicinais, indicado o cultivo inicial de *J. pectoralis* sob sombreamento até o final do primeiro mês e transferência das mudas para radiação total até a coleta (BARROS *et al.*, 1997). Para o cultivo de chambá, apresentaram bons rendimentos médio de biomassa canteiros cuja distância entre plantas variava de 10 – 20 cm, altura de corte de 10 cm e até 3 podas (FERRADÁ; SOSA; FIALLO, 2003).

No Brasil, as folhas de *J. pectoralis* são popularmente utilizadas na forma de chá ou lambedor para tratamento de afecções do trato respiratório, como tosse, bronquite e asma (MATOS, 2007). No lambedor, está comumente associado ao malvariço (*Plectranthus amboinicus*) (MATOS, 2000). O xarope (QUADRO 1) é amplamente produzido e distribuído por programas governamentais de fitoterapia de forma gratuita à população do Nordeste Brasileiro (FORTALEZA, 2004).

Quadro 1 - Formulação básica do xarope de *Justicia pectoralis*.

Indicações: expectorante, coadjuvante no tratamento da bronquite; por sua propriedade broncodilatadora é também empregado no tratamento da asma.		
Apresentação: frascos de vidro âmbar com 100mL de Xarope de Chambá 5%		
Composição:		
	(5 mL)	(15 mL)
Extrato de <i>J. pectoralis</i> var. <i>stenophylla</i> . Leonard. a 20%	1,250mL	3,750mL
Xarope simples aromatizado q.s.p.	5,0000mL	15,000mL

Fonte: Viana; Leal; Vasconcelos (2013).

Em outros países, como no Equador, o decocto das folhas é utilizado para o tratamento de dores menstruais, da tosse e de resfriados. As partes aéreas são usadas na forma de infusão, em Cuba, como expectorante, sonífero, sedativo, calmante, hipotensivo e para o tratamento de erupções cutâneas alérgicas. Na África do Sul, essas infusões provenientes das partes aéreas são usadas para o tratamento de infecções pulmonares. No Suriname, *J. pectoralis* é usada no tratamento da asma e, em Belize, para o tratamento da epilepsia. Na Colômbia, as folhas e caules são utilizados para o tratamento do Diabetes, doenças da próstata, como relaxante da musculatura lisa em afecções respiratórias, antibacteriano e sedativo (CORRÊA; ALCANTARA, 2012). No Panamá, a planta é usada popularmente sob a forma de chá para aliviar mal-estar no estômago e dores nas pernas, enquanto em Trindade é utilizada no tratamento da tosse e como expectorante, além de ser considerada afrodisíaca (MORTON, 1977). No Caribe, seu principal uso é como ansiolítico, sendo comercializados fitoterápicos produzidos a partir do extrato seco padronizado da planta com essa indicação (GOVÍN *et al.*, 2003; LISANATURA, 2013), mas também o extrato bruto das folhas serve como alternativa ao tratamento de *rash* cutâneo (CORRÊA; ALCANTARA, 2012). Desde 1992, em Cuba, *J. pectoralis* compõe o arsenal terapêutico do Sistema Nacional de Saúde (MINSAP, 1992) como sedativo. Ainda, inquéritos etnofarmacológicos recentes da Costa

Rica apontaram o uso de preparações caseiras à base de *J. pectoralis* no alívio dos sintomas da menopausa e da dismenorreia (LOCKLEARA *et al.*, 2010).

1.4.2 Aspectos químicos

Poucos são os estudos mais recentes avaliando a constituição química de *J. pectoralis*. Dessa forma, investigações fitoquímicas realizados com o extrato metanólico da planta, com o emprego de testes qualitativos de identificação de classes químicas e cromatografia em camada delgada (CCD), revelaram a presença de cumarinas, flavonóides, esteróides e triterpenóides, mas ausência de alcaloides (LEAL *et al.*, 2000; OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000). No entanto, em outro estudo (ARAÚJO, FARIA, SAFADI, 2014), também identificada a presença de alcaloides e saponinas.

Duke (1987) refere-se a uma presença de alcaloides ("triptaminas") em baixas concentrações em *J. pectoralis*, provavelmente podendo justificar o potencial alucinógeno da espécie e seu emprego com esse fim por tribos indígenas da América do Sul. Contudo, outros autores afirmam a ausência de alcaloides, sendo o uso de chambá nessas preparações ritualísticas apenas como aromatizante devido ao odor agradável das cumarinas (MACRAE; TOWERS, 1984; MELO; ANDRADE, 1989).

Assim, a química da espécie já é conhecida e investigada há algum tempo. Estudos cromatográficos e de elucidação estrutural isolaram e caracterizaram derivados cumarínicos (1,2-benzopirona, dihidroxycumarina e 7-hidroxidocumarina), bem como derivados do ácido fenilpropionico (DE VRIES; TAUCHER; WURZEL, 1988; MACRAE; TOWERS, 1984). Foi também observada a existência do ácido orto-hidroxitranscinnâmico acetilado, ácido orto-hidroxi-diidrocinnâmico acetilado, β -sitosterol, β -amirina, betaína, justicidina B e das C-glicosilflavonas o-metoxiladas como a eswertisina, 2''-o-ramnosil-eswertisina, eswertiajaponina e 2''-o-ramnosil-eswertiajaponina (WENIGER; SAVARY; DAGUIHL, 1984; MACRAE; TOWERS, 1984; JOSEPH; GLEYE; MOULIS, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 2000) (FIGURA 3).

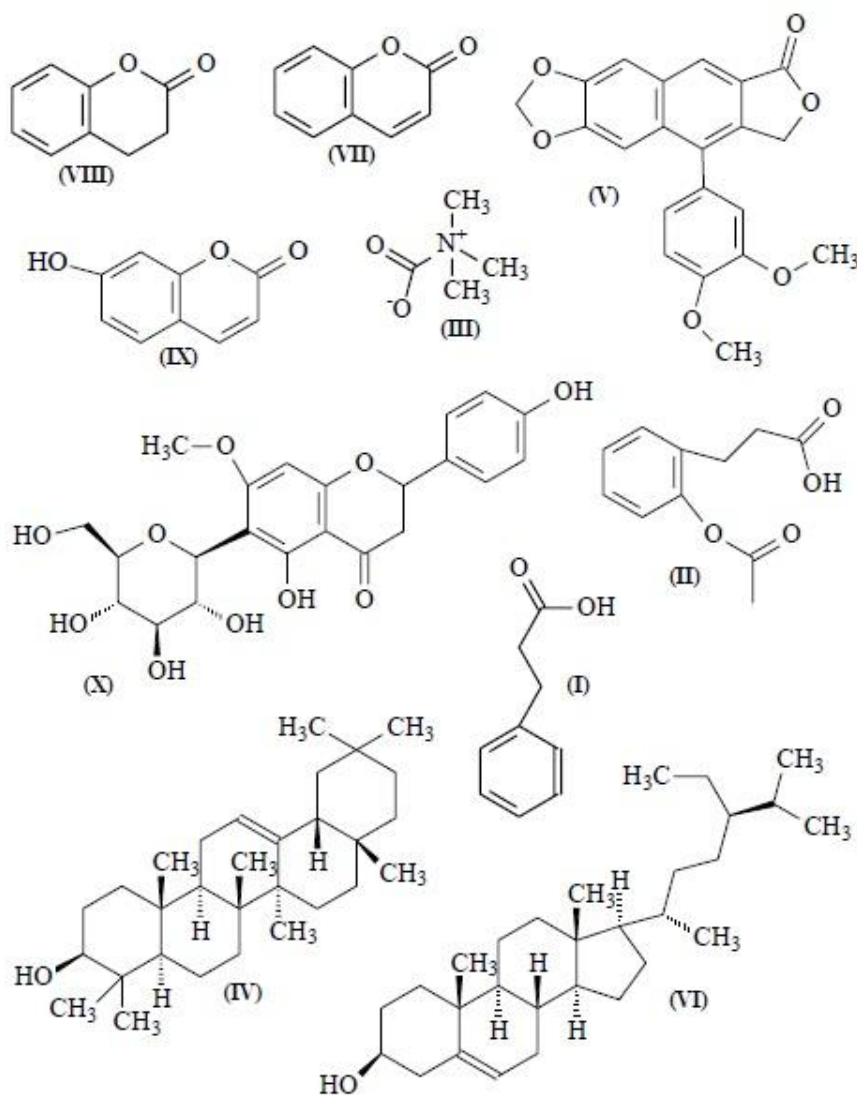
1.4.3 Aspectos toxicológicos e farmacológicos

Estudos evidenciam a bioatividade de extratos oriundos de *J. pectoralis* e de seus compostos isolados, sobretudo dos derivados cumarínicos, cumarina e umbeliferona, os quais

têm sido aptados como os principais componentes responsáveis pelos efeitos farmacológicos da planta (MACRAE; TOWERS, 1984; LINO *et al.*, 1997; LEAL *et al.*, 2000).

A classe de metabólitos secundários denominada de cumarinas é derivada do ácido cinâmico, estando amplamente distribuída no reino vegetal, mas também podendo ser encontrada em fungos e bactérias. As propriedades farmacológicas estão relacionadas ao padrão de substituição no núcleo fundamental (1,2-benzopirano) que, nos seres humanos, ao ser extensamente metabolizado pelas enzimas hepáticas, transforma-se em 7-hidroxycumarina, também conhecida como umbeliferona (MURRAY, 1989; LAKE, 1999; ROHINI; SRIKUMAN, 2014).

Figura 3 - Constituintes químicos presentes nas partes aéreas de *Justicia pectoralis*.



I. ácido fenilpropiónico, II. orto-hidroxitranscinâmico acetilado, III. Betaína, IV. β -amirina, V. Justicidina B, VI. β -sitosterol, VII. Cumarina, VIII. Dihidrocumarina, IX. Umbeliferona e X. Eswertisina.

Fonte: Fonseca (2009); Leal; Silva; Viana (2017).

1.4.3.1 Toxicologia pré-clínica

Lino (1995) observou que a dose letal (DL50) do extrato hidroalcoólico não padronizado das folhas de *J. pectoralis* administrado por via intraperitoneal a ratos em teste agudo foi de $3,0 \pm 0,2$ g/Kg. No entanto, o extrato administrado oralmente em doses de até 10 g/Kg não foi letal aos animais, após 48 h de observação. Na avaliação crônica da toxicidade, o tratamento diário dos ratos com o extrato a 400 mg/Kg, durante 30 dias, causou aumento no hematócrito, na fosfatase alcalina e redução na hemoglobina, sugerindo que o uso prolongado pode causar alterações hematológicas e bioquímicas.

Parra *et al.* (1991) verificou uma CL50 de 60,14 µg/mL para o extrato hidroalcoólico não padronizado obtido a partir de folhas de *J. pectoralis* por meio do ensaio com *Artemia salina* L., podendo este ter atividade biológica, uma vez que o valor de CL50 inferior a 1000 µg/mL é considerado bioativo (MEYER *et al.*, 1982). A toxicidade oral aguda em ratos (DL50) observada foi de 3,5 g/Kg, evidenciando, assim, sua baixa toxicidade.

Toledo *et al.* (2007) avaliou a toxicidade aguda em ratos em dose única de 2g/Kg (v.o.) do extrato hidroalcoólico não padronizado, reduzido em rotaevaporador até a concentração final de 200 mg/mL. Foi verificada ausência de mortalidade ou alterações anatomofisiológicas, sendo o extrato classificado como não tóxico de acordo com o *Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UNITED NATIONS, 2007).

Continuando com a avaliação toxicológica de *J. pectoralis*, testes *in vitro* corroboram com sua baixa ou ausente toxicidade. Estudos realizados por nosso grupo, Fonseca (2009) e Alves (2010), demonstraram que o extrato seco padronizado (ESJP) não é capaz de alterar a viabilidade celular de neutrófilos humano, mensurado pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), mas que um dos seus constituintes químicos promoveu essa alteração (UMB 100 µg/mL). ESJP e seus compostos ativos, CM e UMB, também reduziram, em diferentes intensidades, a liberação de mieloperoxidase (MPO) induzida por estas células, quando induzidas por PMA e fMLP, sendo o ESJP mais eficaz. Além disso, o extrato aquoso não padronizado de *J. pectoralis* não apresentou genotoxicidade em células de medula óssea de roedores (MONTERO *et al.*, 2001).

1.4.3.2 Farmacologia pré-clínica

Na avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais de uso tradicional em Trinidad e demais ilhas caribenhas vizinhas, Chariandy *et al.* (1999) verificou que a fração éter de petróleo obtido a partir das partes aéreas de *J. pectoralis* apresentou atividade antibacteriana acentuada contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* e *Salmonella typhimurium*, e, que a fração acetato de etila, além dos microorganismos já descritos, também possui efeito inibitório ao crescimento de *S. aureus*. No mesmo estudo, ambas as frações na concentração de 0,5 mg/mL apresentaram ação tóxica sobre larvas no estágio IV de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*, causando sua mortalidade após 2 e 9 dias, respectivamente. Em outro estudo (FURTADO *et al.*, 2015) sobre a ação antimicrobiana da planta, o extrato aquoso não padronizado de *J. pectoralis* não demonstrou atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações avaliadas (25, 50 e 100 mg/mL) contra *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Na avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico não padronizado preparado a partir das folhas de *J. pectoralis* (400 mg/Kg, v.o.) e de compostos isolados (CM e UMB 5mg/kg), no modelo de nocicepção induzida por formalina, foi verificado que o sistema opioide não está envolvido, visto que não houve reversão dos efeitos antinociceptivos após pré-tratamento com naloxona, um antagonista opioide. No entanto, o pré-tratamento com L-arginina (inibidor da enzima óxido nítrico redutase) reverteu os efeitos da UMB, sugerindo a participação da via do óxido nítrico nesse efeito. Além disso, o extrato em estudo mostrou atividade broncodilatadora em traqueia de cobaia, o que corrobora, pelo menos em parte, seu uso medicinal popular para problemas das vias aéreas, como asma e bronquite (LINO, 1995; LINO *et al.*, 1997).

Complementar a esses estudos, Leal *et al.* (2000), na avaliação do efeito biológico de extratos hidroalcoólicos de plantas cumarínicas tradicionalmente utilizadas no Nordeste do Brasil para o tratamento de distúrbios respiratórios, observou o efeito antinociceptivo e antiedematogênico em ratos, quando administrado nas doses de 200 e 400 mg/Kg (v.o.) e 50 mg/kg (i.p.), respectivamente. Além desses efeitos, o extrato apresentou inibição da resposta contrátil induzida por carbacol (0,3 μ M) de anéis de traqueia de ratos, caracterizando, assim, um efeito antiespasmódico, com EC₅₀ de $1,5 \pm 0,18$ mg/mL. Fonseca (2009) demonstrou que o extrato seco padronizado de *J. pectoralis* (CM: 8,84 mg/g; UMB: 1,27 mg/g), nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/Kg, reduziu em até 38% o edema de pata induzido por carragenina e 79,6% a nocicepção induzida por capsaicina.

Na investigação das atividades anti-inflamatória e anti-histamínica extrato aquoso das folhas de *J. pectoralis*, observou-se um relaxamento progressivo da traqueia tratada com

doses cumulativas de histamina (1 – 8 µg). No entanto, com doses superiores a 8 µg, a tensão contrátil no tecido aumenta de tal forma a sugerir que o extrato atua como um inibidor competitivo, sendo a inibição reversível (CAMERON *et al.*, 2015). Segundo os autores, é possível que o componente anti-muscarínico do extrato da planta tenha agido em sinergismo com o componente anti-histamínico para produzir coletivamente o relaxamento do músculo liso traqueal.

Moura *et al.* (2017) verificou o efeito antiasmático do extrato hidroalcoólico 20% padronizado de *J. pectoralis* (380 mg/Kg, v.o.) em ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina, sendo comprovada a capacidade do extrato de inibir a hiper-reatividade de traqueia isolada pré-contraída e redução nos níveis de citocinas (TNF-α e IL-1β) no lavado broncoalveolar.

Na investigação dos efeitos de *J. pectoralis* sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), foi observado que o tratamento com o decocto da planta reduziu a conduta agressiva e a atividade exploratória em ratos, assim como bloqueou a excitação induzida por fenciclidina (antagonista do receptor NMDA), mas não foi capaz de prevenir as convulsões induzidas por antagonistas GABAérgicos (pentilenotetrazol e picrotoxina), ao contrário do diazepam, que apresentou neuroproteção, sugerindo que a ação ansiolítica da planta não ocorre via mecanismo dos benzodiazepínicos (SAAD *et al.*, 1987; FERNANDÉZ *et al.*, 1989). Ainda, verificou-se que a administração intraperitoneal do extrato aquoso da planta não foi capaz de reverter os efeitos da apomorfina (agonista dopaminérgico), mostrando não possuírem atividade antidopaminérgica semelhante aos neurolépticos típicos (MÁS *et al.*, 1987).

O efeito ansiolítico do extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis* (EHAJP) foi evidenciado por Venâncio *et al.* (2011) através de testes comportamentais, sendo a droga administrada oralmente de forma aguda a camundongos, nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg. Os resultados mostraram que, semelhante ao diazepam (1 mg/Kg), EHAJP modificou significativamente todos os parâmetros observados no teste labirinto de cruz elevada, sem alterar a atividade motora geral nos testes de campo aberto, rota rod e tempo de sono induzido por pentobarbital. Flumazenil inverteu não apenas o efeito diazepam, mas também o efeito EHAJP. Do mesmo modo, todas as doses de EHAJP aumentaram o tempo de permanência na caixa no teste claro/escuro. A ação ansiolítica está, segundo os autores, possivelmente relacionada com o sistema gabaérgico, refutando efeitos sedativos. Embora, o efeito sedativo do extrato seco padronizado de *J. pectoralis* tenha sido evidenciado em ratos por Chanfrau *et al.* (2008) por meio do modelo de tempo de sono induzido por tiopental.

Ainda sobre os efeitos de *J. pectoralis* sobre o SNC, Venâncio (2015) realizou a avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato seco padronizado em camundongos, demonstrando atividade anticonvulsivante contra convulsões induzidas por picrotoxina (50 e 100 mg/kg), estriçnina, eletrochoque e pilocarpina (25, 50 e 100 mg/kg). Houve também a redução do estresse oxidativo (redução dos níveis de peroxidação lipídica e de nitrito e aumento na atividade da catalase). No modelo de convulsão induzida por pilocarpina, os níveis de aminoácidos inibitórios (GABA, glicina e taurina) aumentaram, enquanto os de aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato) reduziram e houve uma neuroproteção com a diminuição de lesões neuronais nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo.

As diferenças observadas entre os diversos efeitos farmacológicos sobre o SNC podem estar relacionadas a diferenças nos constituintes químicos encontrados nas plantas, provavelmente por variações ambientais de cultivo e dos próprios métodos de produção da droga vegetal e de seus derivados. Ademais, alguns estudos empregaram extratos não padronizados, dificultando a reprodutibilidade dos experimentos (VIANA; LEAL; VASCONCELOS, 2013).

Além dos efeitos anti-inflamatório, ansiolítico e anti-asmático relatados, estudos mostram o efeito hormonal e gastroprotector de *J. pectoralis*. Assim, o extrato metanólico preparado a partir das partes aéreas apresentou capacidade de diminuição, *in vitro*, da afinidade do estradiol e da progesterona aos seus receptores em células cancerígenas de mama humana, aumento da expressão de genes sensíveis ao estrógeno em células de osteosarcoma osteoblástico humano e inibição da COX-2 humana recombinante. Tais ações explicam o uso tradicional da planta para o tratamento de sintomas relacionados à síndrome pré-menstrual e menopausa, bem como anti-inflamatório (LOCKLEARA *et al.*, 2010). Recentemente, Fonseca e Leal (2012) observaram que o tratamento prévio com extrato seco padronizado foi capaz de inibir a formação de úlceras gástricas induzidas por etanol.

Trueba *et al.* (2001) mostraram a atividade antioxidante *in vitro* do extrato seco do chambá (0,0138 – 2,97 mg/mL) na peroxidação lipídica em homogenatos cerebrais de rato. Em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina (nitrosoamida que destrói as células β do pâncreas), ratos tiveram normalizados seus parâmetros de peroxidação lipídica após administração de umbeliferona (30 mg/Kg, v.o.), sugerindo possível efeito sobre as células β do pâncreas (RAMESH; PUGALENDI, 2006).

As cumarinas simples, incluindo-se cumarina e umbeliferona, possuem inúmeras atividades farmacológicas descritas como atividade anti-inflamatória, antioxidante,

antibacteriana, antiviral, antitrombótica, vasodilatadora e antitumoral (HOULT; PAYÁ, 1996; LOPEZ-GONZALEZ *et al.*, 2004).

Cheng *et al.* (2004) mostraram bioatividade de várias cumarinas e sua estreita relação estrutura-atividade inibitória sobre a produção de TNF- α . Segundo Han *et al.* (2005), derivados cumarínicos naturais ou sintéticos com ação anticancerígena e anti-inflamatória podem exercer suas funções biológicas por meio de inibição da ativação de quinases como a MAP-quinase. A cumarina tem sido indicada no tratamento de pacientes com linfedema devido a sua capacidade de aumentar a ação proteolítica de macrófagos (PILLER, 1976; CLODIUS; PILLER, 1978).

Na literatura, são encontradas ações biológicas como espasmolítica, antimicrobiana, hipoglicemiante, hipolipidêmica e antioxidante para a umbeliferona (JURD *et al.*, 1971; RAMESH; PUGALENDI, 2005; 2006). Kurokawa *et al.* (2003) mostrou que a umbeliferona é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, induzida pelo lipopolossacarídeo em macrófagos, sendo também capaz de suprimir a pneumonia em camundongos infectados com o vírus influenza, não por uma ação anti-viral, mas pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (KUROKAWA *et al.*, 2010). Vasconcelos *et al.* (2009) descrevem a capacidade de supressão da resposta inflamatória mediada pela umbeliferona em camundongos asmáticos por redução do acúmulo de leucócitos e da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 no lavado broncoalveolar desses animais.

Justicidina B, lignana isolada de algumas espécies vegetais incluindo *J. pectoralis*, tem atividade antifúngica por inibir o crescimento de alguns fungos patogênicos do gênero *Aspergillus* e *Candida* em concentrações a partir de 1 e 12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Também apresenta ação potente tripanocida contra tripomastigota de *Trypanosoma brucei* e moderada contra *Trypanosoma cruzi* (CI₅₀ – 0,2 e 2,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Possui, ainda, citotoxicidade inespecífica observada em cultura de células neoplásicas sanguíneas e brônquicas (JOSEPH; GLEYS; MOULIS, 1988; GERTSCH *et al.*, 2003).

1.4.3.3 Estudos clínicos

Nobre *et al.* (2006), em ensaio clínico piloto com pacientes (n = 37) asmáticos leve ou moderado, observou que a administração do xarope de *J. pectoralis* e *Plectranthus amboinicus* (malvariço) (5 mL, 3 vezes ao dia por 2 semanas consecutivas) produziu, ao final de uma semana de tratamento, diminuição da obstrução das vias aéreas com aumento significativo (14,5; 14; 9%, respectivamente) nos parâmetros de avaliação respiratória como

volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁), capacidade vital forçada (CVF) e fluxo expiratório máximo (FEM). Além disso, observou-se uma melhora na expectoração e ausência de efeito colateral.

Santana *et al.* (2007), demonstrou, através de ensaio clínico realizado com 21 pacientes asmáticos em idade entre 6 a 12 anos, que o uso do xarope de *J. pectoralis* durante duas semanas melhorou o quadro obstrutivo e sintomatológico de pacientes com asma intermitente, persistente leve ou persistente moderada, revelando uma ação broncodilatadora do fitoterápico.

Linhares (2012) em ensaio clínico duplo-cego piloto, controlado por placebo, observou que o uso terapêutico de xarope padronizado contendo folhas de *J. pectoralis*, *Plectranthus amboinicus* e essência de *Mentha arvensis* suficiente para aromatizar, preparado pela Farmácia Escola da Universidade Federal do Ceará, administrado (20 mL, 3 vezes ao dia por 14 dias consecutivos) em 35 pacientes com asma leve, como terapia complementar, não apresentou modificações nos parâmetros de provas de função pulmonar (CVF, VEF₁, relação VEF₁/CVF e fluxo expiratório forçado – FEF – entre 25 e 75% da CVF). Entretanto, verificou-se haver uma melhora na qualidade de vida, mensurado através de resultados obtidos a partir de questionário validado sobre Qualidade de Vida em Asma com Atividades Padronizadas – AQLQ (S) (GUILLEMIN; BOMBARDIER; BEATON, 1993), sem causar toxicidade ou efeitos adversos.

Nascimento (2018) avaliou a eficácia do xarope de chambá a 5% quando comparado a um placebo no tratamento da tosse e sintomas respiratórios em 114 crianças. O resultado mostrou que o xarope foi eficaz no alívio sintomático da tosse, da congestão nasal e da rinorreia, além de melhorar a capacidade de dormir das crianças e de seus responsáveis, quando comparado ao placebo.

1.4.4 Desenvolvimento tecnológico

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem estudado continuamente a referida espécie. Até o momento, foi desenvolvido e validado de acordo com a legislação vigente um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD) para determinação do teor de CM e UMB em produtos derivados de *J. pectoralis*. As condições para produção da droga vegetal em estufa com circulação e renovação de ar foram estabelecidas, assim como parâmetros farmacognósticos da droga. O método extrativo empregado (percolação) foi avaliado quanto as influências de variáveis (tempo de maceração,

proporção droga:solvente e teor alcoólico do solvente extrator) por meio de um planejamento fatorial (2³), no qual a proporção droga:solvente e do teor de etanol afetaram o rendimento de CM e UMB nos extratos produzidos. O extrato hidroalcoólico produzido sob condição eleita (droga:solvente, 1:15; teor de etanol: 20%; tempo de maceração: 24h) foi caracterizado físico-quimicamente e submetido a secagem por *spray dryer*, empregando como excipiente dióxido de silício coloidal, sendo determinadas suas propriedades físico-químicas. A avaliação toxicológica *in vitro* do extrato seco padroniza (ESPJP; CM: 8,84 mg/g; UMB: 1,27 mg/g) mostrou sua baixa citotoxicidade em neutrófilos humano, mensurada pela atividade da enzima lactato desidrogenase, além de reduzir a liberação de mieloperoxidase por eles. Ainda, o ESPJP (100, 200 e 400 mg/Kg) reduziu em até 38% o edema de pata induzido por carragenina e 79,6% a nocicepção induzida por capsaicina (FONSECA, 2009; FONSECA; SILVA; LEAL, 2010).

Assim, a perspectiva dos estudos tem sido avaliar o potencial de um novo produto padronizado produzido a partir de *Justicia pectoralis* para o tratamento da asma.

1.5 Asma

Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que afeta cerca de 18% da população mundial, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de dispneia, sibilância, constrição torácica e tosse. É caracterizada por hiper-responsividade brônquica, aumento da secreção de muco e obstrução variável do fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com o tratamento (GINA, 2018).

A OMS declarou 383 mil mortes por asma no mundo no ano de 2015 e é importante ressaltar que esses valores podem ser maiores, em razão dos óbitos por asma serem subestimados nas estatísticas de mortalidade que consideram apenas a causa básica de morte (WHO, 2017). No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 20 milhões de pacientes asmáticos (COMISSÃO DE ASMA DA SBPT, 2012). No período de 2008 a 2013 foram registrados no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) mais de 1 milhão de internações em virtude das exacerbações da asma, gerando um custo ao sistema público de saúde de quase 170 milhões de dólares (CARDOSO *et al.*, 2017).

A exposição a estímulos irritantes como endotoxinas bacterianas, alérgenos, fumaça de cigarro e pêlos de animais, a predisposição genética e fatores ambientais são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da asma. Adicionalmente, o estilo de vida do indivíduo, que está relacionado à dieta, hábitos sociais e ambiente de trabalho, possui

significância para o desenvolvimento da patologia (LAZAAR; PANETTIERI, 2004; BOUSQUET *et al.*, 2005; CHEN; WONG; LI, 2016).

O processo inflamatório típico da asma é complexo e envolve diversos mediadores e células, até mesmo as constitutivas do sistema respiratório como as células epiteliais e do endotélio vascular, que não deveriam possuir potencial inflamatório. As características observadas na inflamação pulmonar e na desregulação fisiológica são o resultado final dos eventos moleculares e celulares envolvidos na sensibilização, no desenvolvimento de linfócitos T_H2 , na elaboração de citocinas T_H2 e na ativação dos mecanismos efetores dessas citocinas. Assim, há o recrutamento e a ativação de células inflamatórias e mudanças nas células estruturais do pulmão, bem como expressão aumentada de diversos mediadores envolvidos na complexa trama de reações inflamatórias, incluindo citocinas, quimocinas, fatores de crescimento, enzimas, receptores e moléculas de adesão (BISSET; SCHMID-GRENDELMEIER, 2005; HOLGATE *et al.*, 2003).

Em indivíduos geneticamente susceptíveis, o alérgeno interage com células dendríticas e linfócitos T CD4+, levando ao desenvolvimento de linfócitos $Th0$, os quais originam clones de linfócitos T_H2 . Por sua vez, estes produzem citocinas que induzem os linfócitos B a produzirem e liberarem imunoglobulina (Ig)E, interleucinas (IL)-5 que promovem diferenciação e ativação de eosinófilos e citocinas como IL-4 e IL-13 que induzem a expressão de receptores de IgE (FIGURA 4) (D'AMATO *et al.*, 2007; RANG; DALE, 2012). A fase imediata ocorre abruptamente e é causada, principalmente, por espasmos da musculatura lisa brônquica e recrutamento de leucócitos. A resposta tardia está intimamente associada à congestão, produção de muco e hiperreatividade brônquica. Alterações ocorridas na microcirculação brônquica, com ruptura da parede vascular, e transdução plasmática, acentuam o edema e o estreitamento das vias aéreas (TODO-BOM; PINTO, 2006; RANG; DALE, 2012; HOLGATE *et al.*, 2015). Na asma crônica, o quadro inflamatório ocorre em processo cíclico e contínuo de agressão e o reparo das lesões pode levar a alterações estruturais irreversíveis, sem o remodelamento das vias aéreas (COVAR *et al.*, 2010).

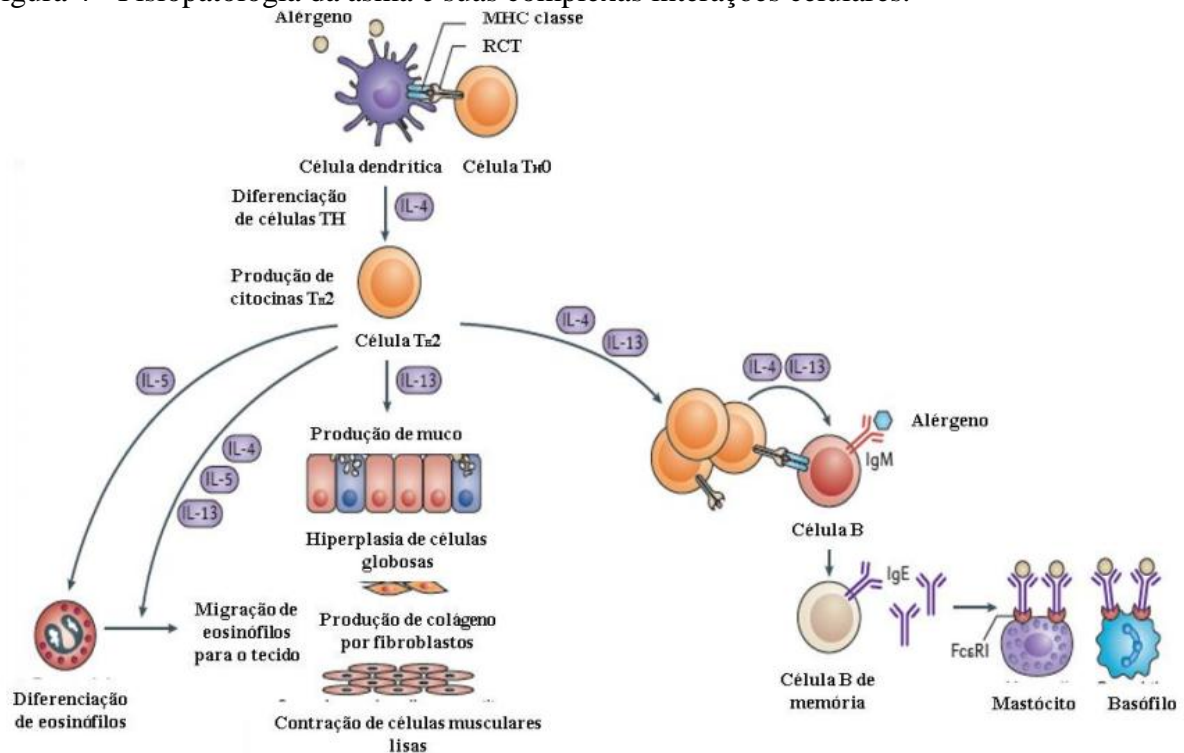
O envolvimento de diversas células no desencadeamento da doença, principalmente eosinófilos, mastócitos e células T têm sido reconhecidos há muito tempo. No entanto, os neutrófilos tiveram um papel central reconhecido na iniciação e desenvolvimento da cascata inflamatória que levam as exacerbações da doença (BUSSE, 2017).

Pacientes com asma grave não apresentam apenas uma exacerbação do processo de hiperresponsividade das vias aéreas, mas também neutrofilia e aumento na produção da IL-17 (CHAKIR *et al.*, 2003; AL-RAMLÍ *et al.*, 2009). Outro mecanismo envolvido na

patogênese da asma severa é a participação da IL-9, principalmente devido ao fato dessa citocina ser importante para o crescimento de vários tipos celulares envolvidos na asma (SANTOS *et al.*, 2007; NEILL; MCKENZIE, 2010).

Neutrófilos ativados podem liberar enzimas como a elastase e mieloperoxidase (MPO), contribuindo para o agravamento da asma. As espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes dessas células estão envolvidas na indução de inflamação em células epiteliais causando lesões teciduais. Essas EROs podem ainda interagir com nitrito (NO_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), levando à formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) cuja presença nas vias aéreas tem sido correlacionada com a gravidade da asma (TSUCHIYA *et al.*, 2012; KUMARI; DASH; SINGH, 2015).

Figura 4 - Fisiopatologia da asma e suas complexas interações celulares.



Fonte: GHANDI et al, 2015, adaptada.

São conhecidas duas abordagens fundamentais no tratamento da asma, a supressão do fator causal (alérgeno) e o emprego de terapia medicamentosa. Os broncodilatadores e os anti-inflamatórios são as duas principais categorias de fármacos utilizados no tratamento da asma. Atualmente, há uma nova classe de substâncias sendo empregada no tratamento da asma, os inibidores da enzima fosfodiesterase 4, que apresentam atividade antiinflamatória e broncodilatadora ao mesmo tempo (CORRÊA; MELO; COSTA, 2008; SOUSA, 2011).

Dentre os medicamentos pertencentes à classe dos anti-inflamatórios, os comumente usados na asma são os corticoides, administrados por via inalatória, apresentam ótimos resultados e possuem baixa biodisponibilidade, causando, assim, pouco ou quase nenhum efeito sistêmico; as cromonas, como o nedocromil e cromoglicato, inibidores da degranulação dos mastócitos, empregados principalmente na asma leve; e os antagonistas dos leucotrienos, os quais podem ser administrados em associação com os corticoides inalados, pois quando ministrados isoladamente não controlam a doença (MOURA; CAMARGOS; BLIC, 2002; BHARADWAJ; AGRAWAL, 2004; COMISSÃO DE ASMA DA SBPT, 2012; KUMARI; DASH; SINGH, 2015).

Na maioria das vezes, o tratamento com corticosteroides inalados por indivíduos asmáticos é bastante eficaz, reduzindo a inflamação, a obstrução e a hiperresponsividade das vias aéreas. Entretanto, um grupo reduzido de pacientes (cerca de 5 a 10%) pode não apresentar reversibilidade total dos sintomas mesmo com o uso regular desse tipo de medicação até quando associado a broncodilatores ou a antileucotrienos. Assim, outras medidas terapêuticas são necessárias para o controle da doença nesse grupo como, por exemplo, o uso de corticoides por via oral. Esses indivíduos cursam com limitação de atividades diárias, piora da qualidade de vida e maior risco de exacerbações graves o que aumenta o risco de mortalidade por asma. Apesar de representarem uma pequena parte dos pacientes asmáticos, estes causam o maior impacto em termos econômicos e de uso de recursos médicos e hospitalares (PETERS *et al.*, 2006; MAUAD; BEL; STERK, 2007).

Como visto, os glicocorticoides são os fármacos mais eficazes para o tratamento da asma e a sua administração por via oral é última alternativa em casos de exacerbações, no entanto foi proposto que a neutrofilia das vias aéreas observada na asma exacerbada possa ser devido ao tratamento com esse tipo de fármaco, pois estes promovem a sobrevivência de neutrófilos por inibição da apoptose (NGUYEN *et al.*, 2005). Em consequência, no decorrer da asma exacerbada a presença de neutrófilos relaciona-se com a ineficiência do tratamento com esses medicamentos.

Poucos trabalhos demonstram modelos de asma exacerbada devido a uma série de variáveis entre locais distintos, uma vez que nem sempre os modelos disponíveis são reprodutíveis (KUMARI; DASH; SINGH, 2015; AMARAL, 2017).

Modelos animais são amplamente utilizados para elucidar a fisiopatogenia de doenças humanas, bem como para avaliar novos alvos terapêuticos. Dentre os animais experimentais empregados nos modelos de asma, os camundongos são os mais utilizados por apresentarem uma resposta alérgica que se assemelha, em certos aspectos, à asma humana,

incluindo as respostas de fase aguda e de fase tardia e a hiperresponsividade brônquica. O modelo experimental de indução de asma com ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c é um dos mais empregados no meio científico. Animais da linhagem BALB/c são geneticamente conhecidos pelo desenvolvimento de resposta predominantemente T_H2 (BRAUN; TSCHERNIG, 2006; CONEJERO *et al.*, 2007).

Quando OVA é administrada em condições e intervalos adequados, leva ao desencadeamento de vários sintomas da asma como intenso infiltrado de células inflamatórias no pulmão, liberação de mediadores inflamatórios, produção exacerbada de muco e citocinas do perfil T_H2 (FACINCONE *et al.*, 1997).

Na exacerbação do quadro asmático, a exposição ao lipolissacarídeo (LPS), componente estrutural da membrana externa de bactérias gram-negativas, é um importante fator de risco (THORNE *et al.*, 2005). Doses elevadas de LPS induzem eosinofilia e neutrofilia nas vias aéreas e uma resposta de tipo T_H1 aumentada (EISENBARTH *et al.*, 2002; DONG *et al.*, 2009).

Em virtude da complexa fisiopatologia da asma e sendo essa uma doença de difícil controle, a busca por novas alternativas terapêuticas é incessante. Nesse contexto, a pesquisa de fármacos provenientes de plantas medicinais que combinem as atividades anti-inflamatória, antioxidante e relaxante muscular e que possam causar menos efeitos indesejáveis em relação à terapêutica atual torna-se atrativa (BASTOS, 2009).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A asma é uma doença crônica inflamatória que afeta cerca de 18% da população mundial, um dos aspectos críticos da doença são as exacerbações, caracterizadas principalmente por um perfil de resposta inflamatória onde os linfócitos Th2, Th17 e neutrófilos têm um papel importante. Além disso, a farmacoterapia para o tratamento da asma disponível ainda apresenta dificuldades, principalmente no que se refere aos graves efeitos colaterais a ocorrência de pacientes refratários à terapia (BARNES, 2010), em especial àqueles com resistência à terapia com corticoides. Diante dessa realidade, evidencia-se a importância de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessa patologia, sobretudo a asma exacerbada. Nesse contexto, sendo as plantas medicinais, em especial *Justicia pectoralis* tem se mostrado como uma fonte em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da asma.

Justicia pectoralis (Acanthaceae), conhecida popularmente como chambá, é uma espécie tradicionalmente empregada no tratamento da asma, presente no programa Farmácia Viva, na RENISUS e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL 2010; 2012 b; 2012c). Estudos farmacológicos, a maioria realizados pelo nosso grupo de pesquisa, têm mostrado que pelo menos parte das atividades anti-inflamatória e broncodilatadora do chambá está relacionada à presença de cumarina e umbeliferona na planta (LINO, 1995; LINO *et al.*, 1997; LEAL *et al.*, 2000; NOBRE *et al.*, 2006; FONSECA, 2009). Estudos clínicos preliminares utilizando xaropes produzidos a partir de *J. pectoralis* demonstraram melhora do quadro obstrutivo das vias aéreas de pacientes com asma leve, bem como da expectoração sem causar toxicidade ou efeitos adversos (NOBRE *et al.*, 2006; LINHARES, 2012; NASCIMENTO, 2018).

Diante do potencial farmacológico de *J. pectoralis*, torna-se oportuno prosseguir o desenvolvimento de um fitoproduto padronizado a partir dessa espécie, incluindo a avaliação da sua eficácia terapêutica para o tratamento da asma.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* (chambá) e investigar seu efeito anti-inflamatório em modelo experimental de asma exarcebada.

3.2 Específico

- Aprimorar o método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD) para determinação do teor dos marcadores químicos (cumarina e umbeliferona) em fitoprodutos de *Justicia pectoralis*;
- Estabelecer parâmetros para o controle de qualidade da droga vegetal através da investigação da possível variação sazonal da droga vegetal, monitorada pelo teor de marcadores químicos, bem como caracterização anatômica das folhas de *Justicia pectoralis*;
- Otimizar o método de produção dos extratos líquido e seco (*Spray drying* - com auxílio de planejamento fatorial 2³) monitorado pelo teor de marcadores (CLAE-DAD) e rendimento do produto;
- Realizar caracterização físico-química e morfológica do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*, incluindo análise por CLAE-DAD e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Prosseguir estudo cromatográfico (CLAE-DAD) do extrato microencapsulado, visando a identificação de um novo marcador químico para o controle de qualidade de fitoprodutos derivados de *Justicia pectoralis*.
- Formular fitoterápico (xarope) a partir do extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis*.
- Realizar avaliação da citotoxicidade em cultura primária de neutrófilos do extrato seco microencapsulado de *Justicia pectoralis*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato microencapsulado de *Justicia pectoralis* em modelo experimental de asma exacerbada em camundongos BALB/c.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Material vegetal

Foram utilizadas as partes aéreas de *Justicia pectoralis* cultivadas no Núcleo de Ensino e Pesquisa em Agricultura Urbana (NEPAU), Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a coordenação do prof. Dr. Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra. Exsicata da espécie (nº 16079) encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará. Autorização de acesso ao patrimônio genético nº processo 010418/2014-8 (CNPq).

4.1.2 Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP) da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de nº 1.757.792 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), também da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo de nº 46/12, segundo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1.3 Material biológico

No presente estudo, utilizou-se um subproduto rico em leucócitos polimorfonucleares, obtido a partir de sangue humano de doadores saudáveis, gentilmente cedido pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

4.1.4 Animais experimentais

Camundongos fêmeas BALB/c (25-30 g) com 6-8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade de Campinas (UNICAMP), foram mantidos em períodos de claro/escuro de 12 h para ambientação e aclimatação, sendo a estes animais fornecido água e ração *ad libitum*.

4.1.5 Drogas, reagentes e substâncias químicas de referência

Acetonitrila grau CLAE (Tédia; JT Baker, EUA); álcool etílico comercial absoluto; Triton X-100, dimetilsulfóxido (DMSO), cumarina e 7-hidroxicumarina (Sigma, EUA); Kit LDH Liquiform (Labtest, Brasil); ácido acético acetato de amônio (Dinâmica, Brasil).

4.1.6 Equipamentos

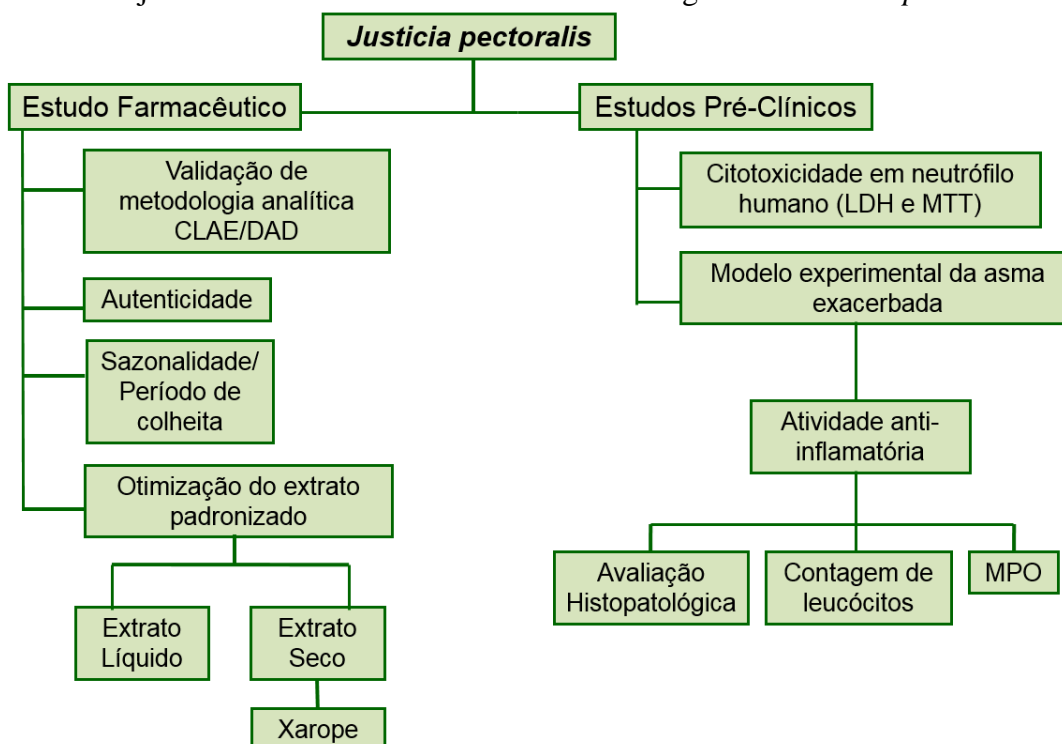
Balança acoplada a sistema de secagem por irradiação infravermelha (Marte, Brasil); balança analítica com precisão de 0,1 mg (A&D Company, Japão); cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Waters 2695) acoplado a detector de arranjo de diodos - DAD (Waters 2996), injetor automático e forno para coluna (Waters, EUA) e software Empower (Waters, EUA); estufa com renovação e circulação de ar (Tecnal, Brasil); estufa de secagem e esterilização (Olidex, Lúnia, Brasil); evaporador rotatório (Heidolph, Laborota 4000, Alemanha); forno mufla (Quimis, Brasil); sistema esepctrofotométrico de microplacas (Synergy HT, Biosystems, Brasil); placa aquecedora (Quimis, Brasil); moinho de facas (MA 048, Marconi, Brasil); percolador (Permuton, Brasil); phmetro (HI 221, Hanna instruments, EUA); purificador de água milli-Q (Millipore, EUA); sistema de filtração a vácuo (Millipore, EUA); sonicador (Unique, Brasil); tamisador (Granulotest, Brasil); microscópio óptico (Olympus Optical® CX41, Brasil); agitador magnético (Fisaton, Brasil); microscópio eletrônico Inpect-50 FEI.

4.1.7 Outros materiais

Coluna cromatográfica Waters C18 250 x 4,6 mm, 5 µm (Waters, EUA); pré-coluna C8, 5 µm com 4,0 x 3,0 mm de dimensões (Phenomenex, EUA); vidrarias volumétricas com certificado de calibração individual; vidrarias e reagentes de uso comum no laboratório; pipetadores automáticos de volume regulável (Gilson, França); filtro para seringa PVDF com 25 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm (Millipore, EUA); filtro de membrana PVDF com 47 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm (Millipore, EUA).

4.2 Métodos

Figura 5 - Planejamento dos estudos farmacêuticos e biológicos de *Justicia pectoralis*.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.1 Otimização e validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para dosagem de marcadores químicos em droga vegetal e produtos derivados de *Justicia pectoralis*

O método analítico a ser empregado em análises de determinação e quantificação de CUM e UMB foi otimizado a partir de métodos previamente desenvolvidos em nosso laboratório (FONSECA, 2009), sendo, em seguida, validado segundo orientações de agências regulatórias (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

4.2.1.1 Especificidade

Especificidade é a capacidade que o método possui para medir exatamente um composto na presença de outros componentes, sendo considerado específico quando produz resposta para uma única substância de interesse (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Foram injetadas, separadamente, alíquotas de 20 µL da fase móvel, soluções padrão (CM 0,3 mg/mL e UMB 0,03 mg/mL) ou extrato hidroalcoólico (20% de etanol em água) da parte aérea de *J. pectoralis*, em triplicata, a fim de demonstrar que não há interferência do diluente e dos demais componentes da amostra na identificação e quantificação dos marcadores.

4.2.1.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade do presente método foi determinada com emprego das soluções padrão de UMB e CM. Os dados para comprovação da linearidade foram obtidos empregando-se o cálculo de regressão linear pelo método dos quadrados mínimos. Também se determinou o coeficiente de correlação e o desvio padrão relativo. Segundo a RE 899/ANVISA (BRASIL, 2003), o coeficiente de correção linear deve ser no mínimo 0,99. Contudo, para extratos vegetais e fitoterápicos o valor do coeficiente de correlação para aceitação da curva de calibração deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2015).

Para determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas, a faixa de trabalho deve estar entre 80 e 120% da concentração teórica do teste (BRASIL, 2017). A escolha da faixa de 70 a 130% da concentração de trabalho visou abranger amplamente uma possível variabilidade do teor de compostos fenólicos no extrato. A curva padrão de UMB foi construída com emprego de 7 (sete) concentrações (0,021 - 0,039 mg/mL), preparada por diluições, em triplicata, de alíquotas de uma solução padrão estoque (0,5 mg/mL), medidos com auxílio de um pipetador de volume variável calibrado, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações e volumes de umbeliferona empregados na construção da curva padrão por CLAE-DAD.

Balão	Solução padrão (mL)	Fase móvel q.s.p. (mL)	Umbeliferona (mg/mL)	Concentração (%)
1	0,420	10	0,021	70
2	0,480	10	0,024	80
3	0,540	10	0,027	90
4	0,600	10	0,030	100
5	0,660	10	0,033	110
6	0,720	10	0,036	20
7	0,780	10	0,039	130

SPE: Solução padrão de umbeliferona preparada a 0,5 mg/mL.

A curva padrão de CM foi construída com emprego de 7 (sete) concentrações (0,21 - 0,39 mg/mL), preparada por diluições, em triplicata, de alíquotas de uma solução padrão estoque (5 mg/mL), medidos com auxílio de um pipetador de volume variável calibrado, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações e volumes de cumarina empregados na construção da curva padrão por CLAE-DAD.

Balão	Solução padrão (m/L)	Fase móvel q.s.p. (mL)	Cumarina (mg/mL)	Concentração (%)
1	0,420	10	0,21	70
2	0,480	10	0,24	80
3	0,540	10	0,27	90
4	0,600	10	0,30	100
5	0,660	10	0,33	110
6	0,720	10	0,36	20
7	0,780	10	0,39	130

SPE: Solução padrão de cumarina preparada a 5 mg/mL.

4.2.1.3 Precisão

A precisão é avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2017). Os ensaios para a determinação da precisão do método analítico foram realizados pelo estudo da repetibilidade e da precisão intermediária.

A precisão por repetibilidade foi avaliada por 6 (seis) injeções repetidas de uma mesma solução amostra, extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis*, em concentração de 100% do valor da curva padrão, preparada sob as mesmas condições (mesmo analista e mesma instrumentação).

A precisão foi avaliada a partir da concordância dos resultados obtidos em três séries de seis amostras, extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis*, em concentração de 100% do valor da curva padrão, sendo determinada em um mesmo dia por analistas diferentes (intra-dia) e em dias diferentes (inter-dias).

Os valores de áreas obtidos serão usados para calcular o valor médio das áreas, o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR%), o qual não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2017).

4.2.1.4 Exatidão

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Pode também se referir à taxa de recuperação do analito adicionado à matriz do produto (BRASIL, 2017).

Esta foi avaliada contemplando o intervalo linear do método, através da adição de quantidades conhecidas do padrão de UMB e CM na solução amostra do extrato, de forma a obter soluções com concentrações equivalentes a 70, 100 e 130% do valor esperado. As amostras foram preparadas sob as mesmas condições, em triplicata, conforme a Tabela 3 e 4. Os valores de área dos picos foram usados para calcular o valor médio das concentrações, taxa de recuperação, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 3 - Preparo das soluções para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE-DAD: umbeliferona.

Concentração (%)	Volume (mL) da SAE (50 %)	Volume (mL) da SPE (5,0 mg/mL)	Fase móvel q.s.p. (mL)	Umbeliferona (mg/mL)
70	0,790	0,060	10	0,021
100	0,790	0,150	10	0,030
130	0,790	0,240	10	0,039

SAE (solução amostra estoque) a 50% possui 0,015 mg/mL de umbeliferona em extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis*. SPE: solução padrão estoque.

Tabela 4 - Preparo das soluções para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE-DAD: cumarina.

Concentração (%)	Volume (mL) da SAE (50 %)	Volume (mL) da SPE (5,0 mg/mL)	Fase móvel q.s.p. (mL)	Cumarina (mg/mL)
70	0,790	0,600	10	0,21
100	0,790	1,500	10	0,30
130	0,790	2,400	10	0,39

A SAE (solução amostra estoque) a 50% possui 0,15 mg/mL de cumarina extrato hidroalcoólico de *J. pectoralis*. SPE: solução padrão estoque.

4.2.1.5 Robustez

A robustez mede a sensibilidade que um método apresenta face a mínimas variações, sendo considerado robusto quando ele não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros (BRASIL, 2017). Dessa forma, a robustez do método empregado para quantificação de UMB e CM em produtos derivados de *J. pectoralis* foi investigada por variações no fluxo, na temperatura do forno da coluna e no pH da fase móvel.

4.2.2 Determinação de parâmetros botânicos para o controle de qualidade das folhas de *Justicia pectoralis*

Para análise da anatomia foliar, fragmentos da região mediana do limbo de folhas completamente expandidas de três espécimes, coletados aleatoriamente no NEPAU/UFC, foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1% e tampão fosfato pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965), desidratados em série etílica crescente (10% até 100%), incluídos e emblocados em historresina (Leica[®]) e seccionados em micrótomo automático. As secções, de 5 µm assim obtidas, foram dispostas em lâminas histológicas, coradas em azul de astra e safranina 9:1 (BUKATSCH, 1972). Posteriormente, as lâminas permanentes foram montadas em resina sintética (Entellan[®]). Os resultados foram analisados em microscópio óptico (Leica DM4000 B LED).

4.2.3 Determinação do tempo de colheita e avaliação da sazonalidade de *Justicia pectoralis* monitorado pelo teor de cumarina e umbeliferona

Após 1, 2, 3 ou 4 meses de cultivo, os teores de ativos (CM e UMB) na parte aérea de *J. pectoralis* foram determinados por CLAE-DAD com emprego de método analítico validado, conforme descrito no item 4.2.1. A partir da escolha do tempo de cultivo, foi realizada investigação da sazonalidade das partes aéreas, sendo os teores de CM e UMB acompanhados durante doze meses. Para realização das análises cromatográficas, foram utilizadas soluções extrativas hidroalcoólicas de *J. pectoralis* produzidas conforme metodologia previamente desenvolvida em nosso laboratório (FONSECA, 2009).

4.2.4 Otimização do método de extração a partir de *Justicia pectoralis*

Foram investigados cinco métodos extrativos em comparação ao desenvolvido anteriormente por Fonseca (2009): maceração (6 e 24 h), maceração (6 h) com esgotamento da droga vegetal, extrator de Soxhlet (6 h) e turbólise (10 min). A realização dos ensaios teve por finalidade obter um método simples, com baixo custo, empregando menor tempo de extração e tecnologia agregada. Para tal, além de diferentes métodos extrativos, foi investigada a influência de variáveis no processo como teor de etanol no solvente extrator, agitação, proporção entre droga e líquido extrator e emprego da percolação como etapa agregada. As soluções tiveram os teores de CM e UMB expressos em mg/g de droga vegetal e quantificados conforme metodologia previamente validada e descrita no item 4.2.1.

No método extrativo maceração (6 h) com esgotamento da droga vegetal, a droga vegetal foi macerada por 6 h, sendo em seguida coletado o volume equivalente a 80% do

volume final. Logo após, foi realizado o esgotamento, onde a solução extrativa resultante será evaporada até o valor de 20% do volume final para ser adicionado aos 80% previamente reservado.

4.2.5 Otimização do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying*

Com base em estudos anteriores desenvolvidos por nosso laboratório (FONSECA, 2009; ARARUNA, 2013), realizou-se uma avaliação preliminar em estufa para escolha do adjuvante de secagem, sendo empregado dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina em proporções de 10 a 30% entre massa de resíduo seco do extrato e massa de excipiente (TABELA 5). As dispersões (extrato com excipiente) foram agitadas durante 15 min em agitador magnético e transferidas para placas de Petri de modo a formar uma fina camada sobre a superfície das mesmas, sendo, mantidas em estufa a 60 °C por 1 h (PEIXOTO, 2005).

Tabela 5 - Distribuição percentual dos adjuvantes de secagem empregados na preparação do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*.

Placa	Dióxido de Silício Coloidal (%)	Celulose Microcristalina (%)
A	30	-
B	20	-
C	15	-
D	10	-
E	10	10
F	5	5
G	5	15
H	15	5

A distribuição nominal das placas em letras se refere à sequência apresentada na figura 14.

Na otimização do método de produção do extrato seco, empregou-se um planejamento fatorial 2^3 com ponto central para o estudo das variáveis do processo extrativo: fluxo de alimentação (L/h), temperatura do ar de entrada (° C) e diâmetro do bico nebulizador/atomizador (TABELA 6). O fluxo de ar foi de 40 L/min para todos os experimentos. A Tabela 7 mostra a combinação final dos fatores e níveis estudados. A resposta do processo de secagem foi definida pelo teor de marcadores (CM e UMB) determinados por CLAE-DAD, conforme metodologia analítica descrita no item 4.2.1. Os resultados foram analisados para definir a influência das variáveis no processo extrativo, sendo consideradas significativas as interações com $p < 0,05$.

Tabela 6 - Fatores e níveis utilizados para avaliar o processo de produção do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*.

Fator	Nível		
	(-)	(0)	(+)
Temperatura de entrada do ar de secagem (°C)	80	95	110
Fluxo de alimentação (L/h)	0,3	0,6	0,9
Bico atomizador (mm)	0,7	1,0	1,3

Tabela 7 - Planejamento fatorial 2³ para padronização do processo de produção do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*.

Condição	Temperatura (°C)	Fluxo de alimentação (L/h)	Bico atomizador (mm)
1	80	0,3	0,7
2	80	0,9	0,7
3	110	0,3	0,7
4	110	0,9	0,7
5	80	0,3	1,3
6	80	0,9	1,3
7	110	0,3	1,3
8	110	0,9	1,3
9	95	0,6	1,0

4.2.6 Caracterização do extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying*

4.2.6.1 Densidade Bruta e de Compactação, Fator de Hausner e Índice de Carr

A densidade bruta foi obtida a partir de uma massa de extrato seco de *J. pectoralis* adicionada em uma proveta de 10 mL limpa e seca, de modo que a relação entre o volume e a massa de pó constituía a densidade aparente. A proveta foi acoplada a um sistema de agitação de peneiras, sendo submetida à vibração intermediária (nível 4) por 1 min e em agitação máxima até que não houvesse variação no volume. A densidade de compactação foi calculada através da relação entre o volume ocupado pelo pó depois da compactação e a massa de pó adicionada à proveta (GUYOT, 1995), de acordo com as equações abaixo:

$$db = \frac{Ma}{Vb} \quad \text{Equação 1}$$

$$dc = \frac{Ma}{Vc} \quad \text{Equação 2}$$

Onde db e dc é a densidade bruta e de compactação, respectivamente, Ma é a massa de extrato seco, Vb e Vc é o volume ocupado pela massa de extrato seco antes e depois da compactação, respectivamente.

O fator de Hausner (FH) foi obtido através do quociente entre as densidades de compactação e aparente do material avaliado. Já o índice de Carr (IC) foi calculado a partir da densidade aparente e de compactação de acordo com a equação abaixo (HAUSNER, 1967; WELLS, 1988).

$$FH = \frac{dc}{db} \quad \text{Equação 3}$$

$$IC = \frac{dc - db}{dc} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde db e dc é a densidade bruta e de compactação, respectivamente.

4.2.6.2 Ângulo de repouso

Determinou-se o ângulo de repouso (α) vertendo uma massa pré-definida de extrato seco através de um funil localizado a uma altura fixa sobre uma superfície horizontal plana contendo papel milimétrico. Através da razão entre a altura (h) e do diâmetro (d) do cone, pôde-se calcular o ângulo de repouso (α) (VIANA, 2006).

4.2.6.3 Determinação da umidade residual

A umidade residual foi determinada por método gravimétrico, utilizando-se estufa a 105 °C conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (2010).

4.2.6.3 Higroscopicidade

Para realização do ensaio, um grama (1 g) de três amostras distintas do extrato seco de *J. pectoralis* foi pesado em recipiente aberto, seco, previamente tarado e armazenados em dessecador hermeticamente fechado, contendo uma solução saturada de hidróxido de potássio (KOH), cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e cloreto de sódio (NaCl) para proporcionar umidade de 8, 32,5 e 75% de umidade relativa (UR), respectivamente, sob 25°C. Após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias de exposição, o teor de umidade das amostras foi determinado

gravimetricamente. A diferença de peso inicial e final foi considerada como a umidade absorvida pelas amostras (CALLAHAN, 1982).

4.2.6.4 Dosagem dos marcadores químicos por CLAE-DAD

A quantificação simultânea de CM e UMB no extrato seco de *J. pectoralis* foi determinada de acordo com o método previamente validado conforme descrição no item 4.2.1.

4.2.6.5 Rendimento do processo de secagem

O rendimento de secagem foi avaliado ao final do processo através da razão entre a massa do produto recuperado e a massa de extrato inicialmente introduzida no sistema, sendo expressa pela seguinte equação (LÉON-MARTINEZ *et al.*, 2010):

$$y = \frac{(W_2 - W_1) - X_{wb}(W_2 - W_1)}{M_v T_s} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde y é o rendimento do pó (%), X_{wb} é o teor de umidade na base úmida (w_b), M_v é o volume de alimentação de extrato (L), T_s é o teor de sólidos totais (g resíduo seco/L), W_1 e W_2 são o peso (g) do receptáculo de pó antes e depois da secagem, respectivamente.

4.2.6.6 Caracterização morfológica

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar as características morfológicas do extrato seco obtido a partir de *J. pectoralis*. A amostra foi fixada em esboços de alumínio com fita dupla face e ouro revestido por pulverização, sendo examinada através de microscópio Tescan (Modelo XMU, VEGA II) sob tensão de aceleração de 30 kV a uma distância de trabalho de 15 mm.

4.2.7 Preparação e análise do teor de marcadores de fitoterápico para uso oral a partir do extrato seco microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis*

O xarope de chambá foi preparado a partir da adição de 750 mg do extrato microparticulado padronizado de *J. pectoralis* (ESPJP) a 100 mL de xarope simples preparado

de acordo com o formulário nacional da farmacopeia brasileira (BRASIL, 2012c). A quantificação simultânea de CM e UMB no xarope foi determinada de acordo com o método previamente validado conforme descrição no item 4.2.1.

4.2.8 Estudo cromatográfico (CLAE-DAD) do extrato microencapsulado visando a identificação de um novo marcador químico para o controle de qualidade de produtos derivados de *Justicia pectoralis*

O estudo foi realizado em nosso laboratório em parceria com o CENAUREMN (Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear) e a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária). Inicialmente, o equivalente a 250 mg de ESPJP foi pesado e transferido para um balão de 25 mL, sendo diluído em solução hidroalcoólica e filtrado através de uma membrana de poro de 0,45 µm. A solução foi então submetida a um processo de *clean up* por extração em fase sólida, empregando-se cartucho de sílica C18 que foi inicialmente condicionada com 20 mL de água ultra pura. Ao fim do processo, uma solução contendo ESPJP (10 mg/mL) foi introduzida no cartucho e eluído com 20 mL de metanol 30% por vazão gravitacional em quatro ciclos. A solução resultante foi filtrada com auxílio de filtro para seringa PVDF com 25 mm de diâmetro e porosidade 0,45µm (Millipore, EUA).

A solução final obtida passou por análises sucessivas por CLAE-DAD com coluna semi-preparativa, empregando diversos métodos os quais variavam a proporção de fase móvel (metanol e água), até boa separação entre os picos. A substância majoritária (Fração JPP) foi coletada, concentrada em rotaevaporador e submetida à elucidação estrutural por espectrometria de massa (UPLC/QToF-MS, Waters) e análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono e hidrogênio (Bruker DPX-300).

4.2.9 Avaliação pré-clínica do extrato seco microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis*

4.2.9.1 Avaliação da citotoxicidade em cultura primária de neutrófilos humano

O potencial citotóxico *in vitro* do ESPJP em neutrófilos humano foi investigado através da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e da produção do sal de formazan no teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio).

Para a realização dos ensaios, o isolamento de células polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, foi realizado a partir de sangue humano conforme metodologia descrita por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com solução salina, utilizando gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos compostos sanguíneos.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripan, corante que se incorpora às células não viáveis, devido à ocorrência de lesões na membrana plasmática. A população de células ($2,5 \times 10^6$ células/mL), predominantemente neutrófilos ($85 \pm 5\%$), apresentou viabilidade celular média de 95%.

- Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima citosólica cuja detecção no fluido extracelular é indicativo de morte ou perda da integridade celular, sendo também responsável pela conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O ensaio foi realizado utilizando-se o Kit LDH Liquiform (Labtest[®]), que se baseia em uma medida espectrofotométrica (340 nm) do consumo de NADH durante a ação catalítica da LDH o qual reduz o piruvato a lactato.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 min a 37 °C, com concentrações crescentes do ESPJP (1; 10; 25; 50 e 100 µg/mL), DMSO (1%, controle), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2%, padrão citotóxico). Logo após, todos os tubos reacionais foram centrifugados a 755 x g por 10 min, a temperatura de 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo. Alíquotas de 250 µL de substrato foram pré-incubadas por 3 min a 37 °C. Adicionou-se 25 µL da amostra de sobrenadante, homogeneizou-se a mistura e realizou-se a leitura da absorvância (340 nm) nos tempos 1 e 3 min a 37° C em espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três diferentes dias. A atividade da enzima LDH nas amostras foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante:

$$A = \left[\frac{(A_1 - A_2)}{2} \right] \times 1746,03 \quad \text{Equação 6}$$

Onde: A = atividade da LDH na amostra, em U/mL; A_1 = absorvância inicial (1 min) em 340 nm; A_2 = absorvância final (3 min) em 340 nm e 1746,03 = fator estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

- Teste do MTT

O ensaio do MTT (MOSMANN, 1983) é um método colorimétrico que se baseia no fato deste sal (brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), de coloração amarela, ser reduzido a outro sal, o Formazan, de coloração roxa. A redução do MTT é catalisada pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, integrante da cadeia respiratória mitocondrial. Desta forma, a atividade desta enzima reflete a funcionalidade metabólica das mitocôndrias, sendo a ausência da redução do MTT um indicativo de diminuição da viabilidade celular.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados em placa de 96 poços em atmosfera de CO₂, por 30 min a 37 °C com concentrações crescentes do ESPJP (1; 10; 25; 50 e 100 µg/mL), DMSO (1%, controle), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2%, padrão citotóxico). Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 min a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e incubou-se uma nova solução (200 µL) contendo MTT 10%, sendo novamente incubada por mais 3 h. Por fim, a placa foi centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e então adicionado 150 µL de DMSO para a lise das células e solubilização do formazan. A placa foi agitada por 15 min com o auxílio de um agitador de placas. A leitura da absorvância (540 nm) foi realizada em leitor de microplaca. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três diferentes dias.

4.2.9.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato microencapsulado de *Justicia pectoralis* em modelo experimental de asma exacerbada induzida por ovalbumina e lipolissacarídeo em camundongo BALB/c

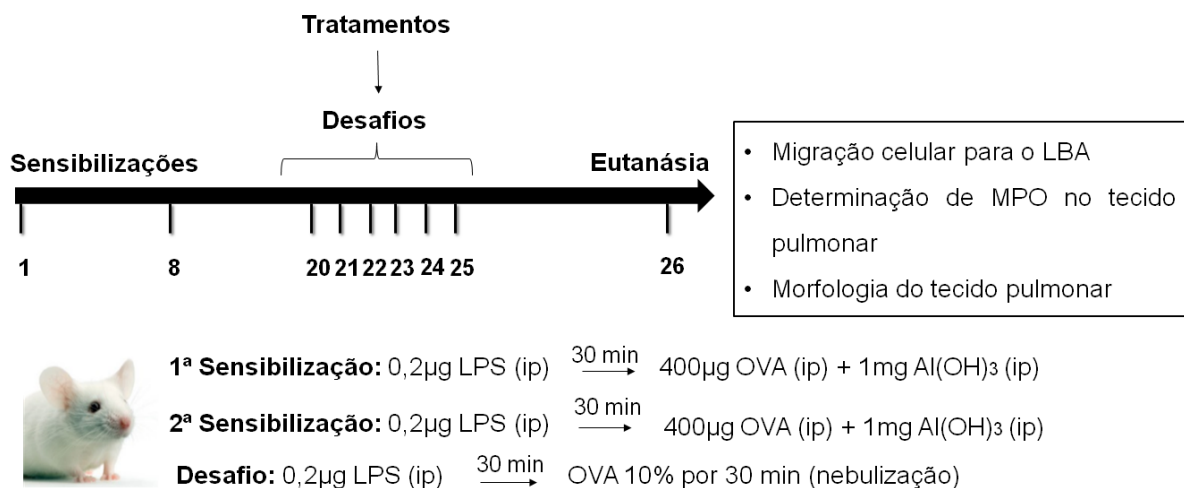
Poucos trabalhos estão descritos na literatura mostrando modelos de asma exacerbada (KUMARI; DASH; SINGH, 2015) e devido a uma série de variáveis entre locais distintos, nem sempre os modelos disponíveis são reprodutíveis. Assim, foi padronizado por nosso grupo de pesquisa um modelo de asma exacerbada por meio de estímulo imunoinfeccioso em camundongos BALB/c fêmeas, no qual os animais foram desafiados com lipolissacarídeo (LPS) e ovalbumina (OVA) para exacerbação do processo inflamatório (AMARAL *et al.*, 2017).

- Sensibilização e bronco-provocação antigênica

A sensibilização dos camundongos fêmeas BALB/c (25-30 g) ao antígeno (OVA) foi realizada por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) de solução contendo 0,2 µg de LPS em 100 µL de salina estéril e depois de 30 min, nova injeção intraperitoneal de uma solução contendo 400 µg de OVA e 1 mg de hidróxido de alumínio em 250 µL de tampão fosfato salina (PBS) estéril. Esse procedimento ocorreu duas vezes, no primeiro (D1) e no oitavo dia (D8) do experimento (FIGURA 6).

Na bronco-provocação, foram considerados animais “desafiados” os camundongos fêmeas BALB/c que foram previamente sensibilizados e submetidos ao desafio antigênico por inalação. Os desafios ocorreram por 6 dias consecutivos, do vigésimo ao vigésimo quinto dia de experimento (D20 ao D25). Os animais receberam por via intraperitoneal 0,2 µg de LPS em 100 µL de salina estéril e, 30 minutos após esse procedimento, foram expostos a aerossol de OVA 10% por 30 min em recipiente fechado de acrílico (medindo 20 x 30 x 21 cm) com ventilação produzida por um nebulizador. O grupo não tratado foi sensibilizado com solução salina estéril e desafiado apenas com solução PBS estéril (FIGURA 6).

Figura 6 - Protocolo experimental do modelo de asma exacerbada induzida por ovalbulmina e lipopolissacarídeo em camundongos BALB/c.



Fonte: Amaral, 2017. LPS: lipopolissacarídeo; MPO: mieloperoxidase; OVA: ovalbumina; ip: intraperitoneal.

- Efeito sobre a celularidade do lavado broncoalveolar

Para avaliar os efeitos imunomodulatórios do ESPJP no modelo de asma exacerbada, o extrato foi administrado na concentração de 100 mg/kg v.o. 1 h antes de cada desafio com OVA. Assim, 24 h após o último desafio (D26), foi realizada a coleta do lavado

broncoalveolar (LBA) e dos pulmões para avaliar a migração de células inflamatórias, presença da enzima mieloperoxidase (MPO) e análise histopatológica (FIGURA 6). Os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina, sendo realizada a exposição cirúrgica e canulação da traqueia. Após serem exanguinados pela artéria carótida, os pulmões foram preenchidos com 0,5 mL de PBS estéril gelado injetado na cânula traqueal por meio de uma seringa de 1 mL. A seringa foi mantida conectada a cânula por 15 segundos e, então, o fluido foi lentamente recuperado. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Foi retirada uma amostra LBA para realizar contagem diferencial com corante panótico rápido e o restante da amostra foi centrifugada por 10 min a 800 g e temperatura de 4 °C. O *pellet* de células foi ressuspensionado em solução salina e diluído com solução Turk (1:1) para contagem total e diferencial de células em câmara de Neubauer. O tecido pulmonar foi separado, o lóbulo direito foi fixado em formol tamponado para análise histopatológica e o lóbulo esquerdo foi utilizado para determinação da enzima MPO.

- Liberação de mieloperoxidase no tecido pulmonar

Para determinar a liberação de MPO, o tecido foi homogeneizado em tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), passando por ciclos de sonicação, congelamento e descongelamentos para que as células fossem lisadas e liberassem seu conteúdo intracelular. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado para a quantificação da MPO. Em placa de 96 poços, adicionou-se 30 µL de sobrenadante, tampão fosfato, peróxido de hidrogênio 0,017% e TMB (solução de tetrametilbenzidina) 18,4 mM, sendo incubada por 5 min a 37 °C. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M e a leitura realizada a 450 nm.

- Análise histopatológica

Ao fim do experimento de sensibilização e bronco-provocação, o lóbulo pulmonar direito foi fixado em formol tamponado 10% para proceder à análise histopatológica. Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação, diafanização e, em seguida, cortados em micrótomo na espessura de 5 µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e de ácido periódico de Schiff (PAS). Os cortes histológicos foram analisados por microscopia óptica.

Todas as lâminas foram confeccionadas e analisadas Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Venenos de Serpentes e Plantas (HISTOVESP) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) sob a coordenação da Profa. Dra. Janína Serra Azul Monteiro Evangelista.

5. RESULTADOS

5.1 Otimização e validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para dosagem de marcadores químicos em droga vegetal e produtos derivados de *Justicia pectoralis*

Para identificação e quantificação de CM e UMB em produtos oriundos de *J. pectoralis*, o método analítico desenvolvido seguiu alguns parâmetros previamente estabelecidos pelo nosso laboratório (FONSECA, 2009). A Tabela 8 descreve as condições experimentais do método anterior e do desenvolvido no presente estudo.

Tabela 8 – Parâmetros analíticos (CLAE-DAD) para análise de cumarina e umbeliferona em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*.

Parâmetro	Especificações	
	Método otimizado	(FONSECA, 2009)
Coluna	C18	C18
Temperatura	40 °C	40 °C
Detector	UMB: 277 nm CM: 323 nm	323 nm
Fluxo	1 mL/min	1,8 mL/min
Eluição	Isocrática	Gradiente
Fase móvel	Orgânica	AcN
	Aquosa	ActAmônio/ácAcético; pH 3,4
		AcN/MeOH/THF
		H ₂ PO ₄ /trietilamina; pH 3
Volume de injeção	20 µL	20 µL

AcN: acetonitrila; ácAcético: ácido acético; ActAmônio: acetato de amônio; H₂PO₄: ácido fosfórico; MeOH: metanol; THF: ácido tetrahydrofurano.

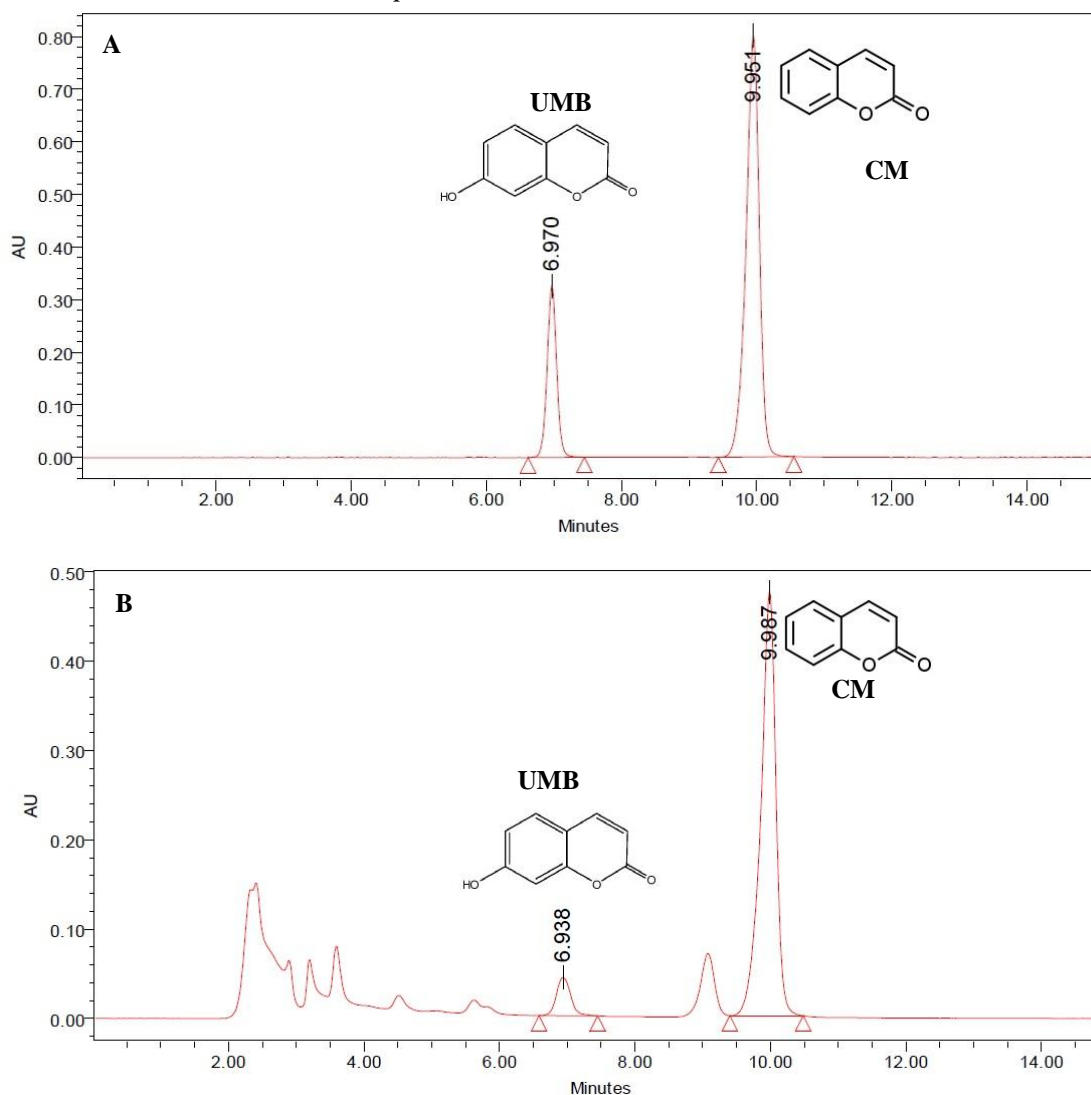
O método de Fonseca (2009) consistia em fase móvel preparada por solução orgânica composta por acetonitrila:metanol:tetrahydrofurano na proporção 5,8:2,2:2 e uma solução tampão de trietilamina:ácido fosfórico:água (0,45:0,24:99,31), as quais eram misturadas para formar a fase A (80:20) e a fase B (60:40) na proporção tampão:fase orgânica, fluxo de 1,8 mL/min, eluição gradiente, detector operado sob 323 nm, temperatura da coluna 40 °C e volume de injeção das amostras de 20 µL.

No estudo atual, estabeleceu-se como meta desenvolver um método em condição menos complexa e com menor custo. Para tanto, a fase móvel otimizada passou a ser composta por tampão acetato de amônio 5 mM (pH 3,4) e acetonitrila, seguindo as proporções 75:25, respectivamente. Houve alteração da eluição para o modo isocrático, redução do fluxo (1 mL/min), com continuidade do emprego de coluna em fase reversa octadecilsilano (C18) sob temperatura de 40 °C. A detecção dos marcadores passou a ser realizada no comprimento de onda máximo para cada substância (CM: 323 nm; UMB: 277 nm).

5.1.1 Especificidade

Na Figura 7, pode ser observada a eluição da UMB e da CM, que apresentaram tempo de retenção de $6,970 \pm 0,21$ min e $9,951 \pm 0,39$ min, respectivamente. Sob a mesma condição analítica, foi observada a separação desses marcadores no extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *J. pectoralis*.

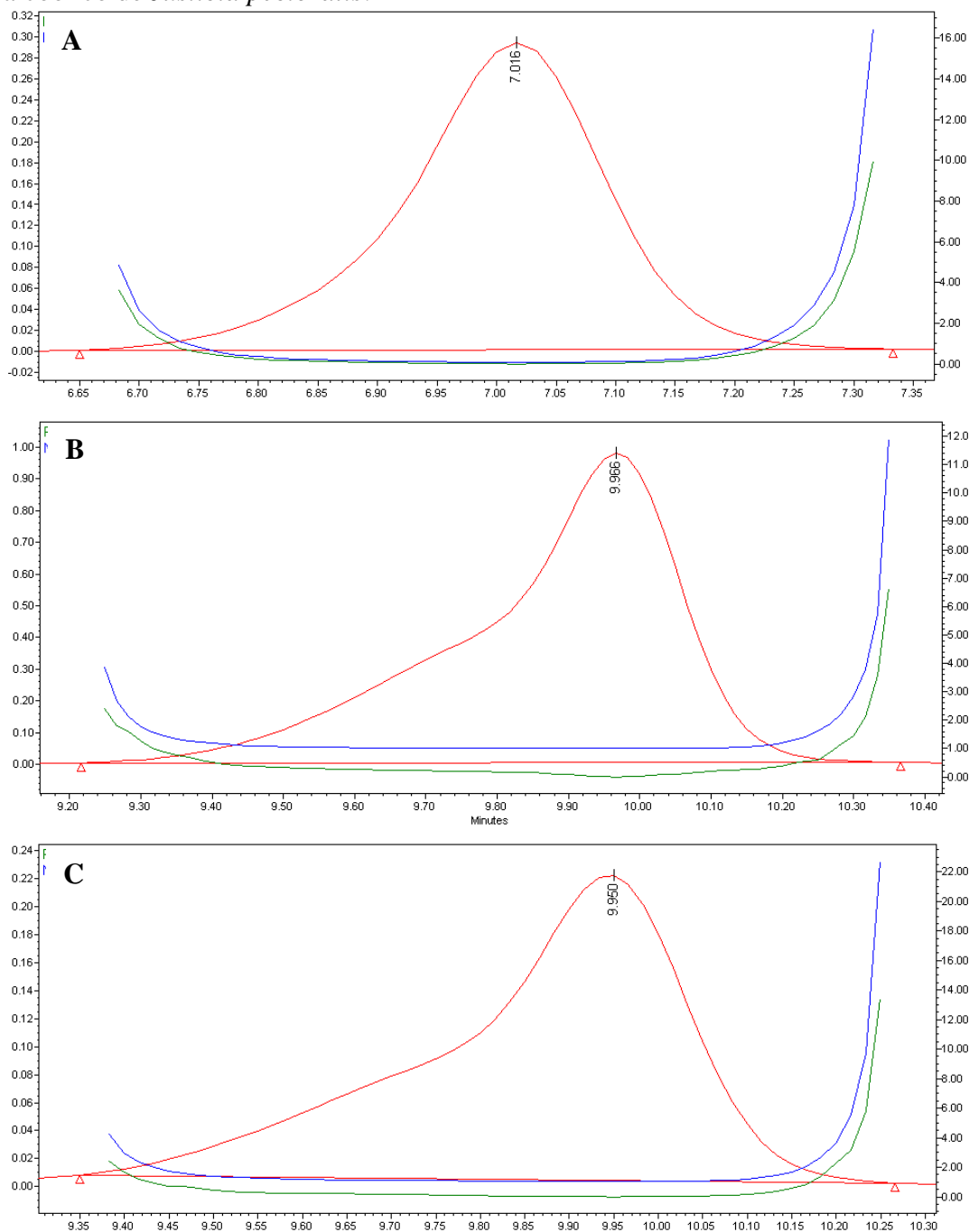
Figura 7 - Cromatograma (CLAE – DAD) da solução padrão dos marcadores químicos e extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis*.



A. Solução padrão. B. Extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis*. Condições: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), fase móvel composta por tampão acetato de amônio (pH 3,4) e acetonitrila, eluição isocrática, fluxo 1 mL/min, detecção em 323 nm e 277 nm. CM = cumarina. UMB = umbeliferona.

A pureza do pico cromatográfico foi determinada após varredura espectrofotométrica do padrão (CM e UMB) e do extrato hidroalcoólico empregando detector de arranjo de diodos (DAD) (FIGURA 8). Esses resultados corroboram com a especificidade e seletividade do método como sendo um indicativo da não co-eluição de outros constituintes da matriz com os marcadores químicos nas condições analisadas.

Figura 8 – Espectro de pureza do pico da solução padrão dos marcadores químicos e extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis*.



A. Umbeliferona. B. Cumarina. C. Extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis*. Condições: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), fase móvel (A: tampão acetato de amônio, pH 3,4; B: acetonitrila, eluição isocrática, fluxo 1 mL/min, detecção em 323 nm e 277 nm.

5.1.2 Linearidade e faixa de trabalho

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados obtidos na avaliação da linearidade do método com emprego dos padrões UMB e CM, respectivamente. A representação gráfica das curvas de calibração e suas respectivas equações da reta, determinadas através do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, podem ser visualizadas na Figura 9. Dentre os dados obtidos, os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,9987 para ambos marcadores (FIGURA 9). Ainda, na análise visual dos gráficos de resíduos obtidos, verificou-se que a maior parte dos valores se encontrava randomicamente distribuídos ao redor da linha de resíduo zero (FIGURA 10).

A análise de variância dos resultados mostrou que existe uma relação linear entre as concentrações dos marcadores químicos UMB e CM e suas respectivas áreas dos picos dentro da faixa de trabalho analisada (UMB: 0,021 – 0,039 mg/mL; CM: 0,21-0,39 mg/mL), atendendo ao critério aceitável para o coeficiente de correlação linear ($r \geq 0,98$) para extratos vegetais e fitoterápicos (BRASIL, 2017).

Tabela 9 - Curva de calibração da umbeliferona de método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Concentração (mg/mL)	Área média (AU)	DPR%
0,021	2140359 ± 80195	3,75
0,024	2486014 ± 11650	4,69
0,027	2825344 ± 75017	2,66
0,030	3153691 ± 82909	2,63
0,033	3534050 ± 82877	2,35
0,036	3808414 ± 13170	2,35
0,039	4112045 ± 14354	3,49

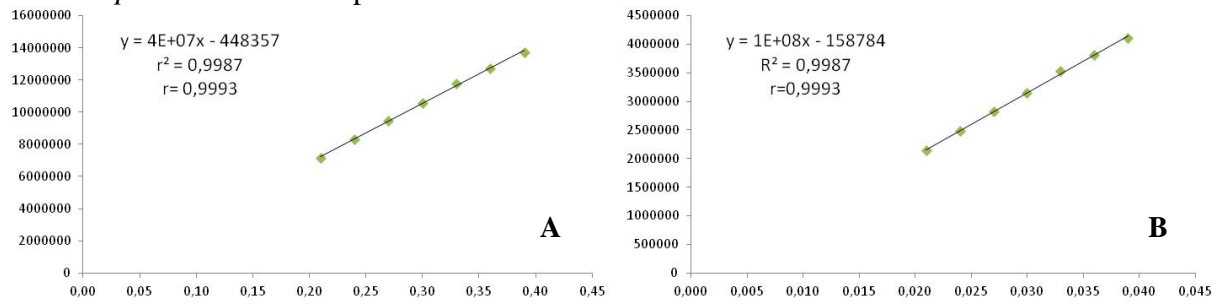
Resultados expressos como a média ± DP. Análises realizadas em triplicata. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Tabela 10 - Curva de calibração de cumarina de método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Concentração (mg/mL)	Área média (AU)	DPR%
0,21	7172501 ± 61103	8,52
0,24	8769507 ± 80615	6,72
0,27	9461601 ± 69911	7,39
0,30	10554397 ± 10554	7,66
0,33	11797567 ± 81130	6,88
0,36	12709796 ± 69066	5,43
0,39	13719934 ± 11416	8,32

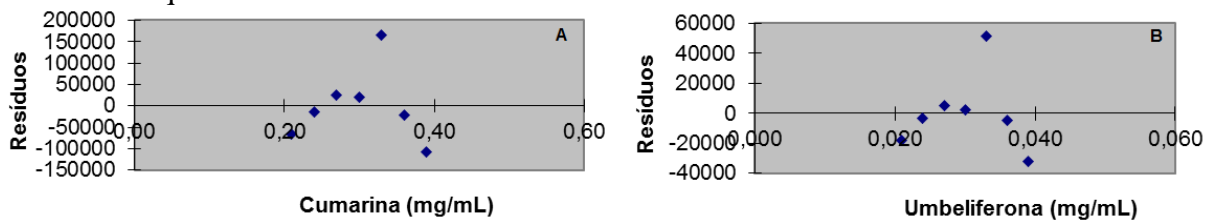
Resultados expressos como a média ± DP. Análises realizadas em triplicata. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Figura 9 – Representação gráfica das curvas de calibração dos marcadores químicos de *Justicia pectoralis* obtidas por CLAE – DAD.



A. Cumarina. B. Umbeliferona. Foram preparadas 7 concentrações de solução padrão de cumarina (0,21 – 0,39 mg/mL) ou de umbeliferona (0,021 – 0,039 mg/mL). Cada ponto representa a média de três análises.

Figura 10 – Gráfico de resíduos obtido por tratamento estatístico da curva de calibração dos marcadores químicos.



$p < 0,05$.

5.1.3 Precisão

A precisão por repetibilidade foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho em único dia e com o mesmo analista. A precisão intermediária foi realizada em diferentes dias e com analistas diferentes, utilizando a mesma concentração.

Ambas as avaliações resultaram em DPR que variaram de 1,72 a 3,28% e de 1,75 a 3,22% para UMB e CM, respectivamente (TABELA 11 e 12). No teste F (ANOVA), para avaliar a igualdade entre as variâncias, foi verificado que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos resultados obtidos (TABELA 13). Assim, o método foi considerado preciso com DPR atendendo o limite estabelecido (5 %) pela legislação vigente (BRASIL, 2017).

Tabela 11 - Avaliação da precisão (repetibilidade) do método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Marcador	Área média (UA)	DPR (%)
Umbeliferona	3227186 ± 105737	3,28
Cumarina	10992982 ± 354301	3,22

Resultados expressos como a média ± DP. Análises realizadas em sextupilcata. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Tabela 12 - Avaliação da precisão intermediária do método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Dia	Analista	Área média (UA)	
		Umbeliferona	Cumarina
1	I	3193607 ± 71008 (2,22)	10881502 ± 242651 (2,23)
	II	3553722 ± 61206 (1,72)	10751798 ± 188617 (1,75)
2	I	3234524 ± 56821 (1,76)	10160580 ± 177720 (1,75)

Resultados expressos como média ± DP (DPR%). Análises realizadas em sextupilcata. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária de umbeliferona e cumarina do método analítico para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Condição Experimental	p-valor uni-caudal	
	Umbeliferona	Cumarina
Analista I x Analista I / dia diferente	0,3761	0,2969
Analista I x Analista II / mesmo dia	0,4372	0,4496
Analista I x Analista II / dia diferente	0,1277	0,0963

p < 0,05.

5.1.4 Exatidão

A exatidão do presente método foi determinada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de marcador (UMB e CM) adicionado à matriz (extrato hidroacoolico de *J. pectoralis*), sendo executada a partir de três amostras em três diferentes concentrações (70, 100% e 130% da solução de trabalho), com três réplicas cada, as quais corresponderam a 0,021; 0,030; 0,039 mg/mL de UMB e 0,21; 0,30; 0,39 mg/mL de CM, respectivamente.

A recuperação média para ambos os marcadores, UMB e CM, foi de 95,95 e 102,96%, respectivamente (TABELA 14 e 15). Os valores de exatidão ficaram em torno de 100% (95,28 – 104,82%), indicando que o método apresenta capacidade de recuperação satisfatória.

Tabela 14 - Recuperação da umbeliferona em metodologia analítica para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Concentração adicionada (%)	Recuperação (%) (DP)	Média (DP)	DPR (%)
70	96,17 (0,020)	95,95 (0,59)	0,006
100	96,39 (0,029)		
130	95,28 (0,037)		

Resultados expressos como a média \pm DP. A concentração de padrão adicionada foi estabelecida em função do teor de marcador determinado no extrato. Análises realizadas em triplicata. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Tabela 15 - Recuperação da cumarina em metodologia analítica para quantificação de marcadores químicos em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Concentração adicionada (%)	Recuperação (%) (DP)	Média (DP)	DPR (%)
70	101,12 (0,21)	102,96 (1,85)	0,018
100	104,82 (0,31)		
130	102,94 (0,40)		

Resultados expressos como a média \pm DP. A concentração de padrão adicionada foi estabelecida em função do teor de marcador determinado no extrato. Análises realizadas em triplicata. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

5.1.5 Robustez

A robustez do método foi investigada por meio de pequenas variações do valor nominal (fluxo 1 mL/min; temperatura 40°C; pH da fase móvel 3,4) de parâmetros analíticos: fluxo (0,9 e 1,1 mL/min), temperatura do forno da coluna (38 e 42 °C) e pH da fase móvel (3,2 e 3,4).

Variações na temperatura e no pH da fase móvel empregada no método analítico não interferiram na análise dos marcadores químicos no extrato hidroalcolico de *J. pectoralis*. Por outro lado, alterações no fluxo da fase móvel (0,9 e 1,1 mL/min) alteraram significativamente as determinações das áreas em relação à condição nominal (1,0 mL/min). Além disso, as referidas alterações nas condições experimentais promoveram variações no tempo de retenção (em torno de 10%) dos marcadores (TABELA 16 e 17).

Tabela 16 - Avaliação da robustez do método analítico para quantificação de umbeliferona em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

Fatores	Área média (AU)	DPR%	Tempo de Retenção (min)
Fluxo 1 mL/min T = 40°C pH 3,4	1186842 ± 5349	0,45	7,029
pH fase móvel 3,2	1178485 ± 5575	0,47	7,733
pH fase móvel 3,4	1205851 ± 7665	0,63	6,367
Fluxo 0,9 mL/min	1215157 ± 7797 ^a	0,64	7,167
Fluxo 1,1 mL/min	1066647 ± 2126 ^b	0,20	6,350
Temperatura 38°C	1188137 ± 10181	0,86	7,172
Temperatura 42°C	1200010 ± 3539	0,29	6,884

Resultados expressos como a média ± DP. Análises realizadas em triplicata. ^aFluxo 1 mL/min vs. Fluxo 0,9 mL/min. ^bFluxo 1,0 mL/min vs. Fluxo 1,1 mL/min. Teste "T" de Student ($p < 0.05$). DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Tabela 17 - Avaliação da robustez do método para análise da cumarina em droga vegetal, solução extrativa e extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD.

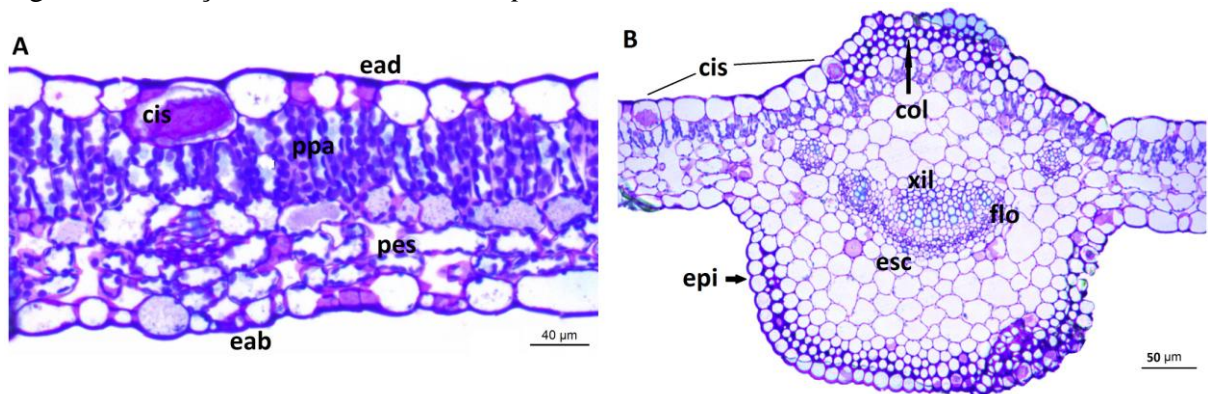
Fatores	Área média (AU)	DPR%	Tempo de Retenção (min)
Fluxo 1 mL/min T = 40°C pH 3,4	12160006 ± 73805	0,61	9,944
pH fase móvel 3,2	11938303 ± 63127	0,53	11,000
pH fase móvel 3,4	12230285 ± 37578	0,31	9,033
Fluxo 0,9 mL/min	12531275 ± 22706 ^a	0,18	10,150
Fluxo 1,1 mL/min	10539279 ± 125458 ^b	1,19	9,011
Temperatura 38°C	12037415 ± 154735	1,28	10,116
Temperatura 42°C	11938303 ± 53347	0,44	9,761

Resultados expressos como a média ± DP. Análises realizadas em triplicata. ^aFluxo 1 mL/min vs. Fluxo 0,9 mL/min. ^bFluxo 1,0 mL/min vs. Fluxo 1,1 mL/min. Teste "T" de Student ($p < 0.05$). DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

5.2 Determinação de parâmetros botânicos para o controle de qualidade das folhas de *Justicia pectoralis*

Ao microscópio óptico, a folha de *J. pectoralis* apresentou-se membranácea, mesomorfa e anfiestomática com epiderme do limbo foliar simples, unisseriada, contendo idioblastos com cristólito na face adaxial. Abaixo da epiderme, observou-se o mesofilo, heterogêneo e assimétrico, com a presença de estratos de parênquima clorofiliano paliçádico e esponjoso. Estômatos diacíticos em maior quantidade na face abaxial (FIGURA 11a). A nervura central, subjacente à epiderme, apresentou contorno biconvexo com cerca de três camadas de colênquima que auxilia na sustentação. O sistema vascular observado foi do tipo colateral com discreto crescimento secundário, onde há um feixe central em semicírculo e dois feixes secundários voltados para a face adaxial. O parênquima fundamental preenche o restante da nervura central (FIGURA 11b).

Figura 11 - Secções foliares de *Justicia pectoralis*.



A. Lâmina foliar. B. Nervura central. cis = cristólito. col = colênquima. eab = epiderme abaxial. ead = epiderme adaxial. epi = epiderme. esc = esclerênquima. flo = floema. pes = parênquima esponjoso. ppa = parênquima paliçádico. xil = xilema.

5.3 Determinação do tempo de colheita e avaliação da sazonalidade de *Justicia pectoralis* monitorado pelo teor de cumarina e umbeliferona por CLAE-DAD.

Na avaliação do período ideal para coleta de *Justicia pectoralis*, com base no estágio de desenvolvimento da planta e no teor de marcadores (CM e UMB), foi observado que, até o terceiro mês de vida, há um aumento na concentração de CM ($6,13 \pm 0,007$ mg/g), seguido de decréscimo no mês subsequente ($3,59 \pm 0,019$ mg/g), sendo a concentração de UMB bastante inferior em relação à CM. Ao longo do período investigado, a concentração de UMB variou de $0,081 \pm 0,0007$ a $0,29 \pm 0,0006$ mg/g, onde o valor mais alto encontrado foi aos dois meses (TABELA 18). A avaliação visual do crescimento da planta respaldou os dados obtidos, uma vez que com três meses de cultivo já era possível obter uma quantidade considerável de biomassa (FIGURA 12).

Na avaliação de uma possível influência sazonal, as partes aéreas de *J. pectoralis*, com então três meses de cultivo, foram coletadas mensalmente durante o período de um ano (setembro/2009 a agosto 2010). O maior teor de CM ($8,390 \pm 0,0038$ mg/g) foi encontrado no mês de setembro e o de UMB ($0,878 \pm 0,0029$ mg/g), no mês de agosto. Por outro lado, o mês de fevereiro foi o que apresentou os menores teores de ambos os marcadores (CM: $3,43 \pm 0,0178$; UMB: $0,17 \pm 0,0010$) (FIGURA 13; TABELA 19).

Tabela 18 - Quantificação do teor de cumarina e umbeliferona em extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis* por CLAE-DAD cultivada por diferentes períodos.

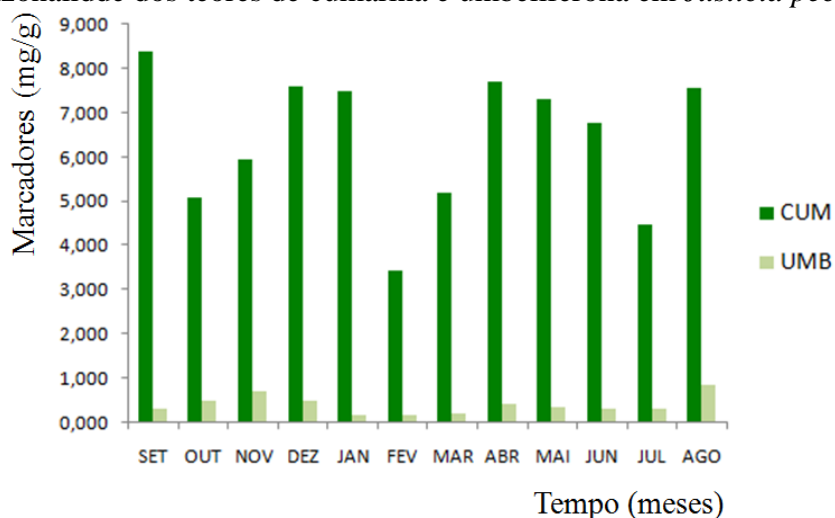
Marcador químico	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses
CM	2,15 ± 0,006 (0,26)	2,98 ± 0,007 (0,22)	6,13 ± 0,008 (0,13)	3,59 ± 0,019 (0,52)
UMB	0,15 ± 0,0003 (0,19)	0,29 ± 0,0006 (0,19)	0,11 ± 0,0005 (0,47)	0,081 ± 0,0007 (0,92)

Análises foram realizadas em triplicata. Extrato hidroalcoólico preparado através de maceração (24h) seguido por percolação 1g:7,5mL. Resultados expressos como média ± DP (DPR%) mg de marcador/g de droga vegetal. CM = cumarina. UMB = umbeliferona. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Figura 12 – Desenvolvimento de biomassa em canteiro de cultivo de *Justicia pectoralis*.



Canteiros de *J. pectoralis* mantidos no Núcleo de Ensino e Pesquisa em Agricultura Urbana (NEPAU), Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará (UFC). A, B e C correspondem a um, dois e três meses de cultivo, respectivamente.

Figura 13 – Sazonalidade dos teores de cumarina e umbeliferona em *Justicia pectoralis*.

Abscissa = mês do ano. Ordenada = concentração em mg de marcador por g de droga vegetal.

Tabela 19 - Avaliação da variação sazonal de *Justicia pectoralis* monitorada por CLAE-DAD.

Marcador (mg/g)	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO
CM	8,39 ± 0,0038 (0,05)	5,10 ± 0,0310 (0,61)	5,94 ± 0,0086 (0,15)	7,62 ± 0,0258 (0,34)	7,48 ± 0,0091 (0,12)	3,43 ± 0,0178 (0,52)	5,19 ± 0,0004 (0,01)	7,70 ± 0,0058 (0,08)	7,30 ± 0,1920 (2,63)	6,78 ± 0,0943 (1,39)	4,48 ± 0,0112 (0,25)	7,57 ± 0,0658 (0,87)
UMB	0,34 ± 0,0012 (0,20)	0,52 ± 0,0007 (0,14)	0,71 ± 0,0009 (0,12)	0,52 ± 0,0032 (0,61)	0,17 ± 0,0002 (0,14)	0,17 ± 0,0010 (0,59)	0,22 ± 0,0010 (0,45)	0,42 ± 0,0023 (0,54)	0,37 ± 0,0119 (3,26)	0,34 ± 0,0112 (3,31)	0,34 ± 0,0012 (0,37)	0,88 ± 0,0029 (0,33)

Análises foram realizadas em triplicata. Extrato hidroalcolico 20% preparado através de maceração (24h) seguido por percolação 1g:7,5mL. Resultados expressos como média ± DP (DPR%) mg de marcador/g de droga vegetal. CM = cumarina. UMB = umbeliferona. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

5.4 Otimização do método de extração a partir de *Justicia pectoralis*

Visando otimizar o processo de produção do extrato de *J. pectoralis* para a obtenção de um produto com o máximo teor de marcadores químicos em um menor custo e tempo possível, foram estabelecidas condições para realização do processo extrativo, comparando-as com as condições experimentais empregadas anteriormente pelo nosso laboratório (FONSECA, 2009).

A Tabela 20 demonstra a influência da variação do tempo de maceração sobre o teor de marcadores. Observou-se que quanto maior o tempo de maceração, maior o teor de CM (6h: $6,35 \pm 0,01$ mg/g; 24h: $8,94 \pm 0,12$ mg/g). O teor de UMB nos extratos obtidos por maceração durante 6 e 24h ($0,125 \pm 0,0002$ mg/g; $0,13 \pm 0,0012$ mg/g, respectivamente) praticamente não diferiram em relação ao método anterior ($0,14 \pm 0,0006$ mg/g), embora tenha sido observado uma redução significativa no menor tempo de maceração em relação ao extrato anterior.

Tabela 20 - Maceração como método extrativo para produção do extrato de *Justicia pectoralis* monitorado pelo teor de marcadores por CLAE-DAD.

Marcador (mg/g)	Maceração (6 h) [#]	Maceração (24 h) [#]	Estudo anterior [§] (Maceração /Percolação)
CM	$6,35 \pm 0,01^a$ (1,20)	$8,94 \pm 0,12^b$ (1,39)	$4,53 \pm 0,006$ (0,13)
UMB	$0,125 \pm 0,0002^a$ (1,02)	$0,13 \pm 0,0012$ (0,91)	$0,14 \pm 0,0006$ (0,45)

[#]Extratos preparados na proporção 1g:7,5mL (droga:solvente). [§]Extrato preparado na proporção 1g:15mL (droga:solvente). Resultados expressos em mg/g de droga vegetal \pm DP (DPR%). ^aMaceração (6h) vs. Estudo anterior. ^bMaceração (24h) vs. Estudo anterior. Teste "T" Student ($p < 0,05$).

Como foi evidenciado um incremento no teor de CM à partir dos dados obtidos, optou-se por investigar se outros métodos extrativos e também o esgotamento da matéria-prima poderiam contribuir mais ainda para o aumento na concentração dos marcadores.

Assim, a Tabela 21 evidencia a influência dos métodos extrativos soxhlet, turbólise e maceração com esgotamento sobre o teor de marcadores, sendo este último o que apresentou a maior concentração, principalmente de CM ($11,53 \pm 0,0019$ mg/g), mas também de UMB ($0,16 \pm 0,0001$ mg/g), mesmo em comparação a todos os outros métodos avaliados (CM – maceração 6 h: $6,35 \pm 0,01$ mg/g; maceração 24h: $8,94 \pm 0,12$ mg/g; soxhlet: $9,35 \pm 0,0037$ mg/g; turbólise: $6,16 \pm 0,20$ mg/g).

Tabela 21 - Influência dos métodos extrativos de *Justicia pectoralis* por sohxlet, turbólise e maceração com esgotamento sobre o teor de marcadores CLAE-DAD.

Marcador (mg/g)	Soxhlet [#] (6 h)	Turbólise [#] (5 min)	Maceração (6 h) com esgotamento da droga vegetal [#]	Estudo Anterior [§] (Maceração/Percolação)
CM	9,35±0,0037 ^a (0,29)	6,16±0,20 ^b (3,25)	11,53±0,0019 ^c (0,13)	4,53 ± 0,006 (0,13)
UMB	0,09±0,0003 ^a (0,23)	0,12±0,002 ^b (1,66)	0,16±0,0001 ^c (0,04)	0,14 ± 0,0006 (0,45)

[#]Extratos preparados na proporção 1g:7,5mL (droga:solvente). [§]Extrato preparado na proporção 1g:15mL (droga:solvente). Resultados expressos em mg/g de droga vegetal ± DP (DPR%). ^aSoxhlet vs. Estudo anterior. ^bTurbólise vs. Estudo anterior. ^cMaceração (6 h) com esgotamento vs. Estudo anterior. Teste “T” Student (p < 0,05).

Como a maceração seguida por esgotamento da droga vegetal apresentou maior teor de marcadores, o método foi escolhido para avaliação da influência da redução da taxa de etanol no solvente extrator sobre o rendimento dos marcadores, visando a minimização de custo (TABELA 22), pois até o momento, os extratos foram preparados com etanol absoluto comercial. Verificou-se que a redução da porcentagem de etanol no solvente extrator de 100% para 20% de EtOH em água, embora significativo, praticamente não interferiu na concentração de CM (EtOH 20%: 11,53 ± 0,0019 mg/g vs. EtOH 100%: 13,37 ± 0,003 mg/g), enquanto que a UMB foi acrescida em 2,5 vezes no seu teor (EtOH 20%: 0,41 ± 0,0001 mg/g vs. EtOH 100%: 0,16 ± 0,0001 mg/g).

Tabela 22 - Avaliação dos efeitos da redução de etanol no solvente extrator em método extrativo a partir de *Justicia pectoralis* sobre o teor de marcadores.

Marcador (mg/g)	Maceração (6 h) com esgotamento da droga vegetal EtOH 100%	Maceração (6 h) com esgotamento da droga vegetal EtOH 20%
CM	11,53 ± 0,0019 (0,13) ^a	13,37 ± 0,003 (0,19)
UMB	0,16 ± 0,0001 (0,04) ^b	0,41 ± 0,0001 (0,15)

Extratos preparados na proporção 1g:7,5mL (droga:solvente). Resultados expressos em mg/g de droga vegetal ± DP (DPR%). ^aCM: EtOH 100% vs. EtOH 20%. ^bUMB: EtOH 100% vs. EtOH 20%. Teste “T” Student (p < 0,05).

Apesar de possuir menor valor agregado e promover elevados teores de marcadores químicos em relação aos métodos anteriormente investigados, a maceração seguida por esgotamento da droga vegetal requer maior volume de solvente extrator, aumentando o custo, além de necessitar de maior habilidade técnica e laboratorial por parte do realizador do processo. Assim, análises para avaliação da influência de outros parâmetros no processo extrativo prosseguiram tendo como método extrativo a maceração por 24h, uma vez

que a extração por Soxhlet e turbólise apresenta elevação da temperatura, podendo resultar em perda do teor de CM, já que esta substância é termolábil.

A Tabela 23 destaca a influência da proporção entre droga vegetal e solvente extrator sobre o método extrativo. De fato, foi evidenciado que em soluções extrativas com uma maior proporção entre droga e solvente extrator (1g:15mL) há um aumento significativo, sobretudo, no teor de CM, quando comparado a uma menor proporção (1g:7,5mL).

Tabela 23 - Avaliação da influência da proporção entre droga vegetal e solvente extrator em método extrativo a partir de *Justicia pectoralis*.

Marcador (mg/g)	Maceração (24 h)			
	1g:15mL		1g:7,5mL	
	EtOH 100%	EtOH 20%	EtOH 100%	EtOH 20%
CM	10,14 ± 0,022 ^a (0,98)	12,15 ± 0,07 ^b (0,56)	8,94 ± 0,12 (1,39)	9,65 ± 0,015 (0,15)
UMB	0,15 ± 0,033 ^a (0,21)	0,70 ± 0,013 ^b (1,89)	0,13 ± 0,0012 (0,91)	0,50 ± 0,002 (0,32)

Resultados expressos em mg/g de droga vegetal ± DP (DPR%). ^a1g:15mL EtOH 100% vs. 1g:7,5mL EtOH 100%. ^b1g:15mL EtOH 20% vs. 1g:7,5mL EtOH 20%. Teste “T” Student (p < 0,05).

No intuito de incrementar mais ainda os níveis de CM e UMB, avaliou-se a atuação da agitação na extração. A Tabela 24 indica o comportamento dos marcadores frente a essa etapa do processo. No entanto, não foi observada nenhum incremento considerável nos níveis de marcadores.

Tabela 24 - Avaliação da influência da agitação em método de extrativo a partir de *Justicia pectoralis*.

Marcador (mg/g)	Maceração			
	24 h		6 h	
	Sem agitação	Sob agitação	Sem agitação	Sob agitação
CM	9,65 ± 0,015 ^a (0,15)	8,09 ± 0,007 (0,09)	6,35 ± 0,01 ^b (1,20)	8,05 ± 0,012 (1,35)
UMB	0,5 ± 0,002 (0,32)	0,43 ± 0,0008 (0,19)	0,125 ± 0,0002 ^b (1,02)	0,46 ± 0,048 (0,87)

Extratos preparados na proporção 1g:7,5mL (droga:solvente) e EtOH 20%. Resultados expressos em mg/g de droga vegetal ± DP (DPR%). ^aCM: maceração (24 h) sem agitação vs. agitação. ^bMaceração (6 h) sem agitação vs. agitação. Teste “T” Student (p < 0,05).

Na avaliação da influência da percolação na concentração de marcadores no extrato hidroalcolico, foi observado que a maceração associada à percolação proporcionou um aumento na concentração de CM e UMB em comparação a maceração (Maceração 24 h – CM: $12,15 \pm 0,07$ mg/g; UMB: $0,70 \pm 0,013$ mg/g vs. Maceração seguida por percolação sem evaporação do solvente extrator - CM: $15,31 \pm 1,81$ mg/g; UMB: $0,8 \pm 0,07$ mg/g) (TABELA 25).

Tabela 25 - Avaliação da influência da percolação como etapa agregada em método extrativo a partir de *Justicia pectoralis*.

Marcador (mg/g)	Maceração (24 h) + Percolação (P1)	Maceração (24 h) + Percolação (P2)	P1 + P2 sem concentração do solvente	P1 + P2 com concentração do solvente	Maceração (24 h)
CM	$8,94 \pm 0,039$ (0,43)	$6,37 \pm 0,01$ (0,16)	$15,31 \pm 1,81^a$ (1,50)	$11,33 \pm 0,05$ (0,42)	$12,15 \pm 0,07^b$ (0,56)
UMB	$0,45 \pm 0,004$ (0,09)	$0,35 \pm 0,0013$ (0,36)	$0,8 \pm 0,07^a$ (1,11)	$0,55 \pm 0,002$ (0,35)	$0,70 \pm 0,013$ (1,89)

Extratos preparados com EtOH 20% em água na proporção 1g:15mL (droga:solvente). Resultados expressos em mg/g de droga vegetal \pm DP (DPR%). ^aP1 + P2: sem evaporação vs. P1 + P2 com evaporação do solvente. ^bMaceração 24h vs. Maceração seguida por Percolação sem evaporação do solvente extrator. Teste “T” Student ($p < 0,05$).

Com base nos experimentos realizados, o método extrativo eleito foi a maceração por 24 h seguida de percolação fracionada (P1 + P2), tendo como proporção entre droga e solvente extrator o equivalente a 1 g de droga vegetal para cada 15 mL de solvente, sendo este uma solução etanólica 20% em água.

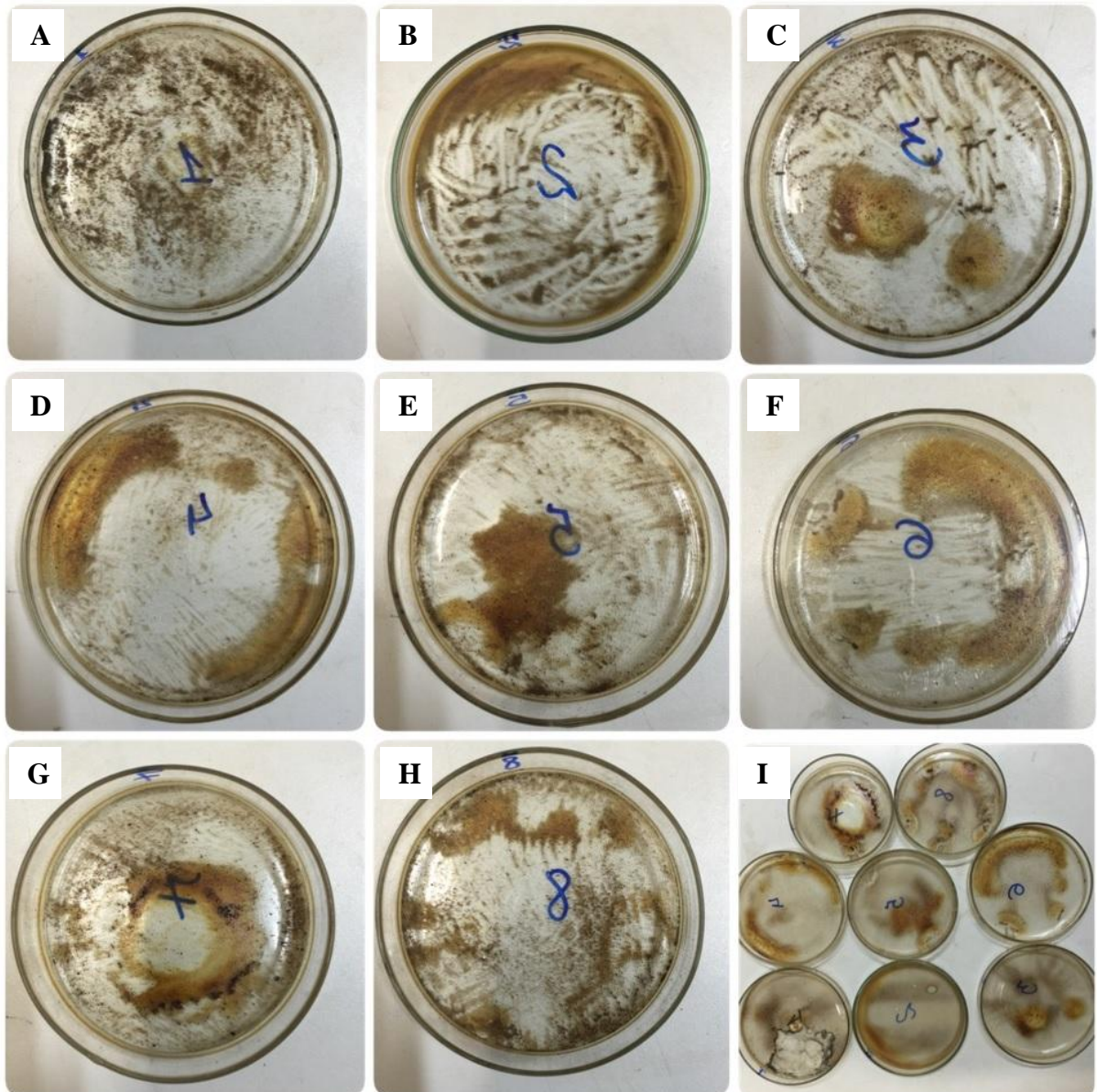
5.5 Otimização do extrato seco microparticulado de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying*

O processo de otimização da produção do extrato seco de *J. pectoralis* se objetivava uma redução no teor de excipientes, em comparação ao extrato seco desenvolvido em nosso laboratório por Fonseca (2009), para que houvesse um ganho real no rendimento do produto. Então, a partir desse estudo anterior, foi verificado que o dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina eram os adjuvantes de secagem que apresentaram forneceram melhores características físicas ao extrato seco. Nesse sentido, foram preparadas suspensões contendo de 10 a 30% de dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina em relação ao resíduo sólido do extrato hidroalcolico de *J. pectoralis* para a secagem (microencapsulação).

Nas condições determinadas no presente estudo, foi observado que, isoladamente, o dióxido de silício coloidal apresentou as melhores características na triagem realizada, pois o pó resultante foi facilmente removível da placa, o que implicaria em menor aderência à câmara de secagem do aparelho de *spray dryer* e possível formação de um pó menos úmido e homogêneo. No entanto, à medida que se reduziu a quantidade deste excipiente no processo de secagem, os extratos obtidos ficavam mais aderidos à placa (FIGURA 14 – condições 1 a 4). Em seguida, foi investigado o comportamento do pó formado com o acréscimo de um outro adjuvante de secagem, a celulose microcristalina, em proporções variáveis (5, 10 e 15%) juntamente com o dióxido de silício coloidal (FIGURA 14 – condições 5 a 6), sendo verificado que mesmo com a presença da celulose microcristalina, ainda era necessário haver uma quantidade relativamente elevada de dióxido de silício coloidal (15%) para que se obtivesse um pó facilmente removível da placa.

A condição que permitiu uma remoção mais fácil da placa foi a preparação do extrato seco de *J. pectoralis* que possuía em sua composição dióxido de silício coloidal (15%) e celulose microcristalina (5%) em relação ao resíduo sólido do extrato líquido (FIGURA 14h – condição 8), sendo, portanto, escolhida para a preparação do extrato seco de *J. pectoralis*.

Figura 14 - Aspecto macroscópico do extrato seco de *Justicia pectoralis* acrescido de adjuvantes de secagem.



Ao extrato, foram adicionadas quantidades diferenciadas de dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina, sendo a suspensão submetida à secagem em estufa por 1 h a 60 °C. A-H. Distribuição do pó formado após etapa de desprendimento da placa para verificação da aderência: A (DSC 30%); B (DSC 20%); C (DSC 15%); D (DSC 10%); E (DSC 10% + CelM 10%); F (DSC 5% + CelM 5%); G (DSC 5% + CelM 15%); H (DSC 15 + CelM 5%). I. Todos os pós resultantes do processo de secagem (A-H) reunidos na mesma imagem. DSC: dióxido de silício coloidal. CelM: celulose microcristalina.

Para determinação das melhores condições operacionais do sistema de secagem do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* por *spray drying*, foram investigadas a influência de algumas variáveis como temperatura do ar de secagem, fluxo de alimentação e diâmetro do bico atomizador, empregando como resposta rendimento, umidade e concentração de marcadores (TABELA 26).

O extrato seco que apresentou maior teor de marcadores foi o produzido na condição 9 (CM: $19,79 \pm 0,079$ mg/g e UMB: $1,69 \pm 0,002$ mg/g). O rendimento dos extratos secos variou entre 37,93 e 46,72%, apresentando variação da umidade relativa entre 6,13 e 9,05% (TABELA 26).

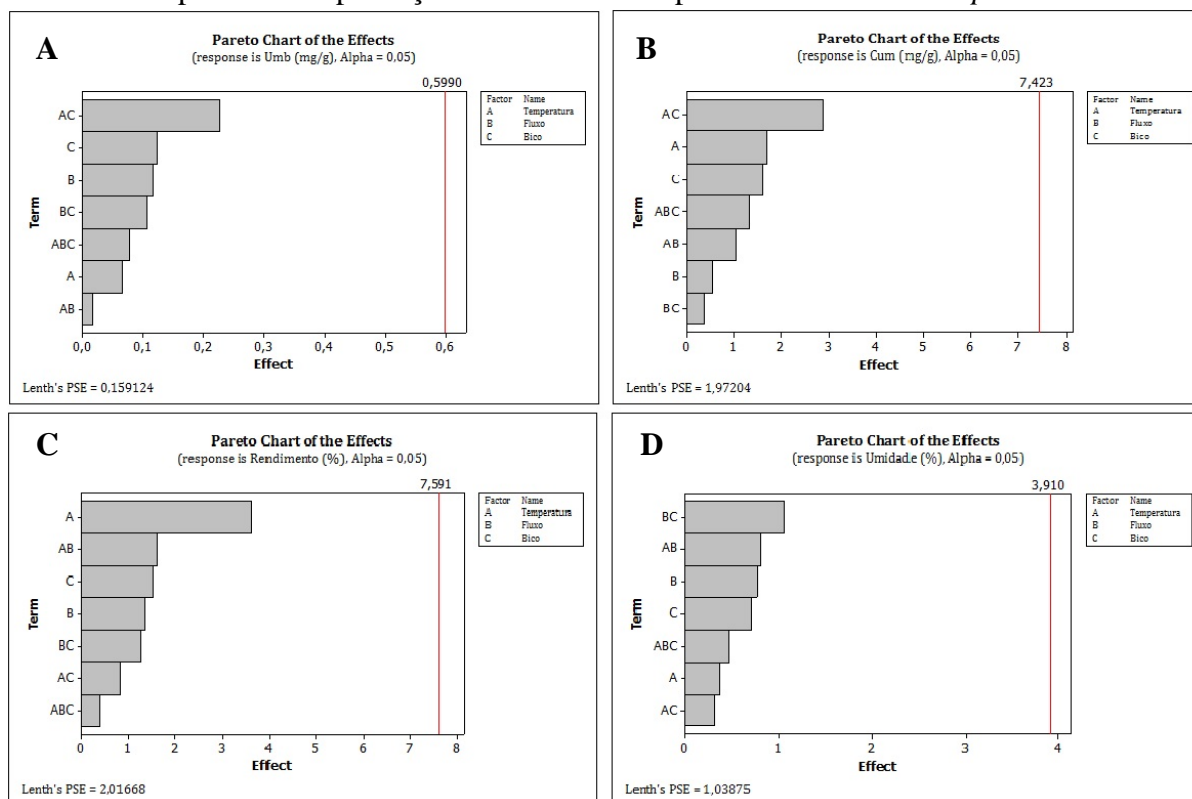
A análise de variância do planejamento fatorial utilizando o teor de CM e UMB, umidade e rendimento demonstrou que nenhum dos fatores verificados influenciaram significativamente no resultado das análises (FIGURA 15). O método, portanto, mostrou-se robusto, tendo como melhor resultado do teor de marcadores químicos o ponto central (nona condição experimental), que foi selecionado para caracterização e avaliação biológica do novo extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*.

Tabela 26 - Planejamento fatorial 2^3 do processo de produção do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*.

Condição	Temp. (°C)	Fluxo de alimentação (L/h)	Bico atomizador (mm)	CM (mg/g)	UMB (mg/g)	Umidade (%)	Rendimento (%)
1	80	0,3	0,7	11,16±0,41 (3,69)	1,13±0,02 (1,90)	6,13	40,55
2	80	0,9	0,7	13,44±0,22 (3,09)	1,34±0,27 (4,11)	8,29	41,93
3	110	0,3	0,7	17,86±0,54 (3,02)	1,21±0,05 (3,82)	7,14	42,15
4	110	0,9	0,7	15,63±0,007 (0,04)	1,60±0,01 (0,55)	8,62	45,97
5	80	0,3	1,3	14,19±0,26 (1,84)	1,59±0,03 (1,62)	7,72	39,85
6	80	0,9	1,3	13,76±0,065 (0,48)	1,66±0,015 (0,91)	8,70	37,93
7	110	0,3	1,3	12,76±0,36 (4,38)	1,35±0,065 (4,82)	9,05	42,30
8	110	0,9	1,3	12,86±0,13 (1,03)	1,31±0,018 (1,39)	7,48	44,40
9	95	0,6	1,0	19,79±0,079 (0,40)	1,69±0,002 (0,14)	6,83	46,72

Resultados expressos como média ± DP (DPR%). Análises realizadas em triplicata. DP = desvio padrão. DPR% = desvio padrão relativo.

Figura 15 - Gráfico de Pareto para os parâmetros de resposta avaliados no planejamento fatorial 2^3 do processo de produção do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis*.



Linha vermelha refere-se à faixa da significância. A. Teor de umbeliferona. B. Teor de cumarina. C. Rendimento (%). D. Umidade (%). Em todos os gráficos no eixo das ordenadas: A – temperatura do ar de secagem (°C); B – fluxo de alimentação (L/h); C – diâmetro do bico atomizador (mm). Eixo das abscissas: Efeito.

5.6 Caracterização do extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying*

Os valores encontrados para a densidade aparente e de compactação, índice de Carr e fator de Hausner e ângulo de repouso estão demonstrados na Tabela 27. O extrato seco padronizado de *J. pectoralis* (ESPJP) apresentou umidade residual de 6,83%.

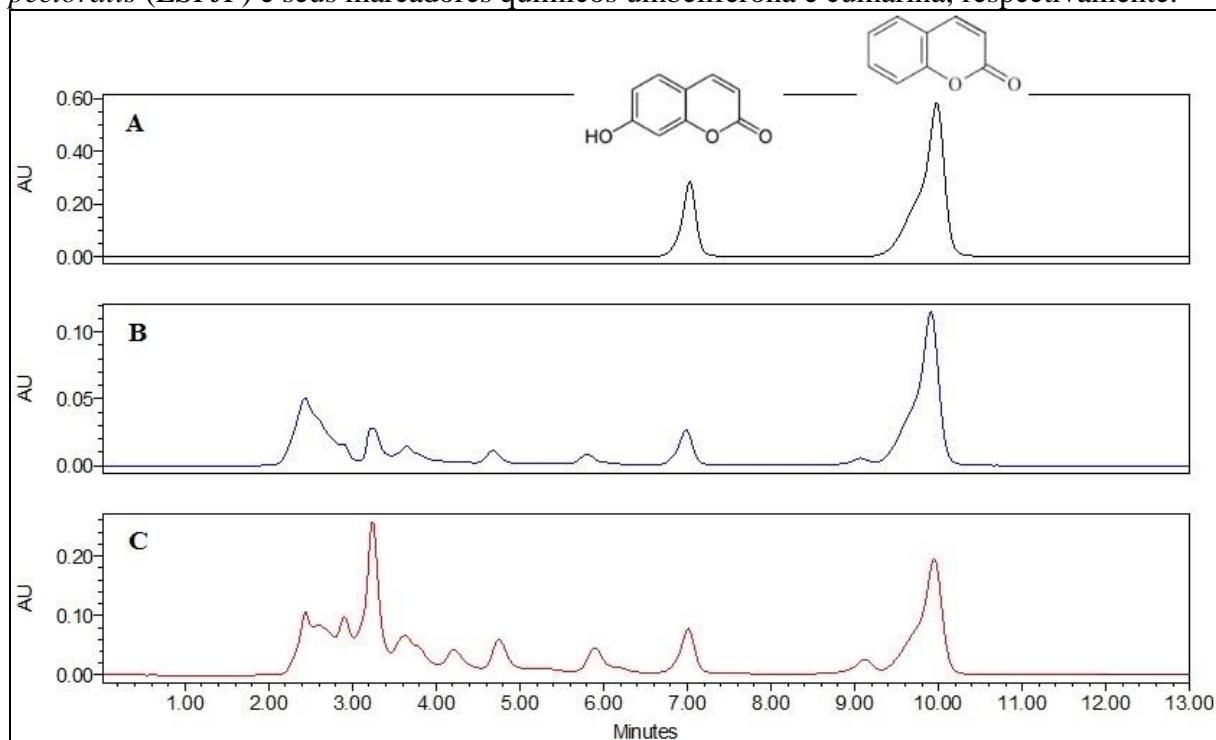
Conforme apresentado na Tabela 27, o ESPJP apresentou um teor de CM e UMB de $21,10 \pm 0,014$ mg/g e $1,74 \pm 0,22$ mg/g, respectivamente. Esses resultados revelaram que o pó obtido através do presente método mostrou um teor de CM significativamente maior (2,5 vezes), quando relacionado ao método anterior ($8,17 \pm 0,20$ mg/g) desenvolvido pelo nosso laboratório (Fonseca, 2009), mas que não houve ganho no teor de UMB. Os demais parâmetros físico-químicos estão descritos na Tabela 27.

A análise cromatográfica mostrou que o ESPJP não causou alterações no perfil cromatográfico quando relacionado aos marcadores químicos UMB e CM (FIGURA 16), sendo os tempos de retenção de 7,04 min e 9,97 min, respectivamente.

A avaliação da higroscopicidade foi realizada pela sorção de água em diferentes condições de umidade relativa (FIGURA 17). Aos 8% (KOH) (0,33% p/p) e 32,5% (MgCl₂) (2,1% p/p) de UR, não foram encontradas diferenças significativas no peso do ESPJP após 14 dias de exposição. No entanto, a 75% de UR, houve uma absorção de umidade expressivamente maior (13,89% p/p) do que nas outras condições.

Análise morfológica do ESPJP por MEV mostrou que as microcápsulas analisadas possuem semelhança quanto à morfologia, apresentando forma esférica e superfície irregular, mas que não apresenta rachaduras, fissuras ou rompimentos. Não foi observada uniformidade no tamanho, cujo diâmetro variou em torno de 5 a 23 μ m (FIGURA 18).

Figura 16 - Perfil do cromatográfico do extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* (ESPJP) e seus marcadores químicos umbeliferona e cumarina, respectivamente.



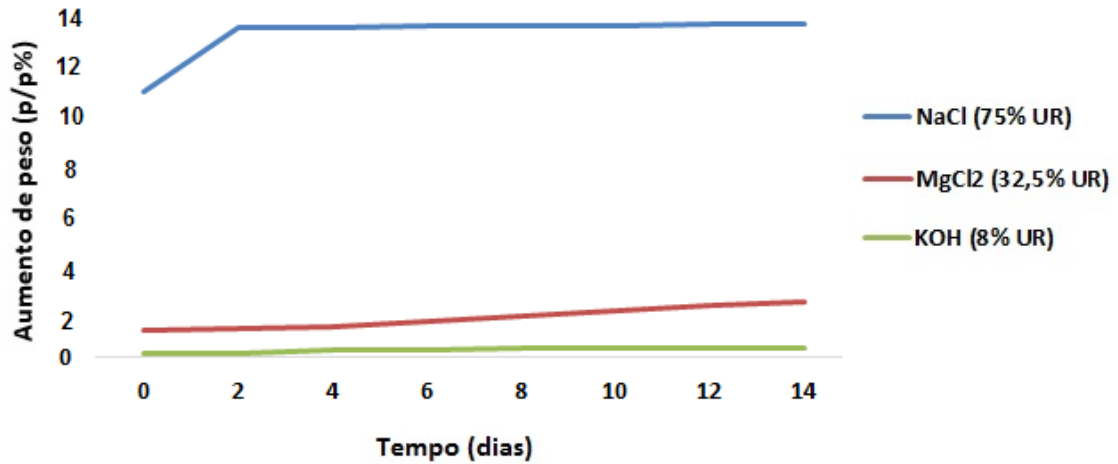
A: Marcadores químicos, cumarina e umbeliferona. B: Extrato hidroetanólico (20%) de *Justicia pectoralis* (1g:15mL) produzido por maceração (24h) seguido por percolação. C: Extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis*.

Tabela 27 - Caracterização físico-química do extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying*.

Parâmetros	Resultados
Densidade bruta (g/mL)	0,20 ± 0,05 (0,58)
Densidade compactada (g/mL)	0,24 ± 0,09 (0,66)
Índice de Carr (%)	17,14
Fator de Hausner	1,17
Ângulo de repouso (°)	28
Umidade (%)	6,23 ± 0,85 (0,64)
Rendimento (%)	59,45 ± 1,78 (2,05)
Teor de CM (mg/g)	21,10 ± 0,014 (0,70)
Teor de UMB (mg/g)	1,74 ± 0,20 (1,05)

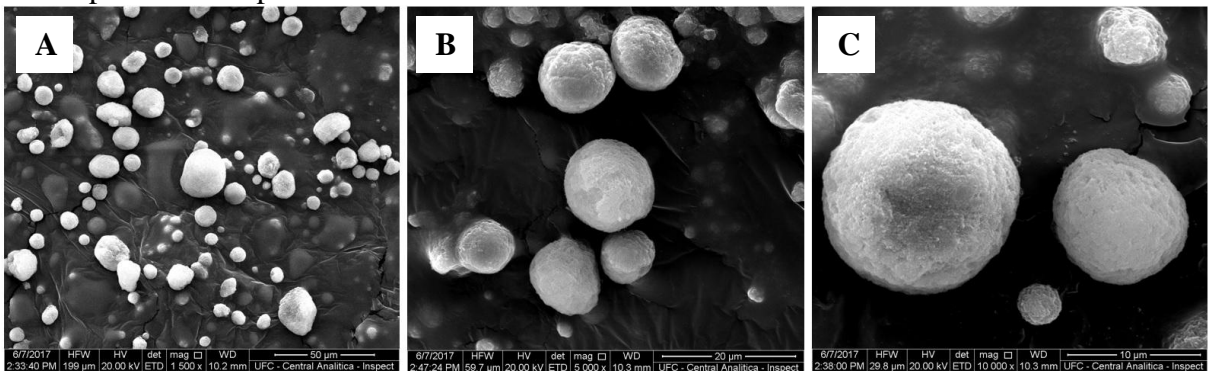
Resultados expressos como média ± desvio padrão (desvio padrão relativo). Análises realizadas em triplicata.

Figura 17 - Absorção de umidade do extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis* produzido por *spray drying* exposta a diferentes atmosferas de umidade relativa.



NaCl: cloreto de sódio; MgCl₂: cloreto de magnésio; KOH: cloreto de potássio.

Figura 18 – Fotomicrografia do extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* obtida por microscopia eletrônica de varredura.

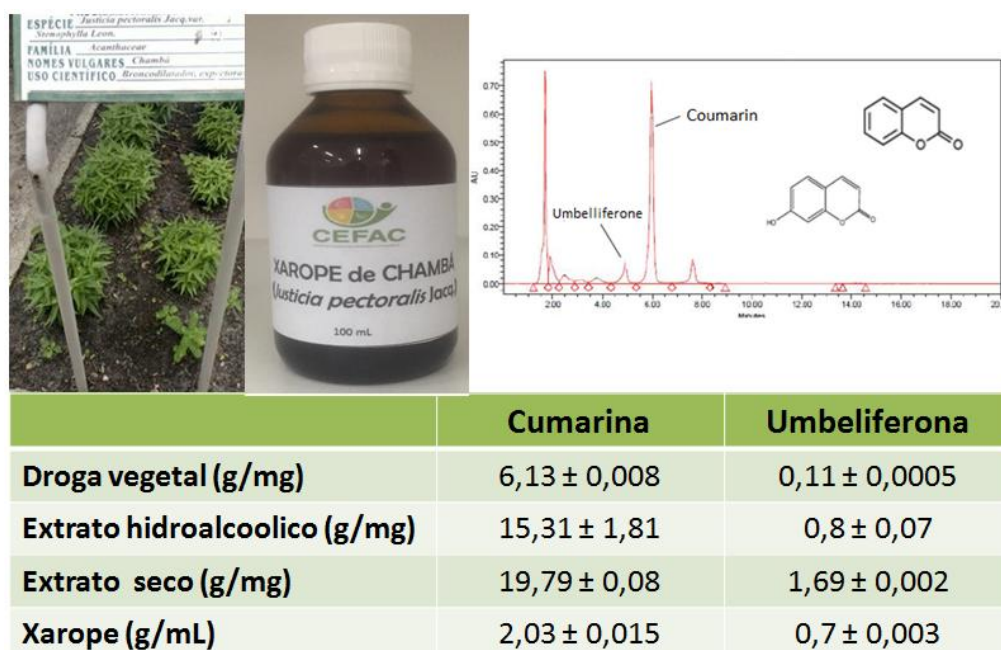


As partículas foram produzidas por *spray drying* com auxílio do dióxido de silício coloidal (15%) e celulose microcristalina (5%) como ajuvante de secagem. A, B e C, aumento de 1500, 5000 e 10000x, respectivamente, com escala de campo de 50, 20 e 10µm, respectivamente.

5.7 Preparação e análise do teor de marcadores do xarope padronizado de *Justicia pectoralis*

O extrato seco padronizado foi facilmente incorporado ao xarope sem que houvesse formação de precipitado, apresentando coloração castanha e aroma característico da planta (FIGURA 19). O teor de CM e UMB foram 2,03 mg/mL e 0,7 mg/mL, respectivamente.

Figura 19 – Xarope produzido a partir do extrato microparticulado de padronizado de *Justicia pectoralis*.

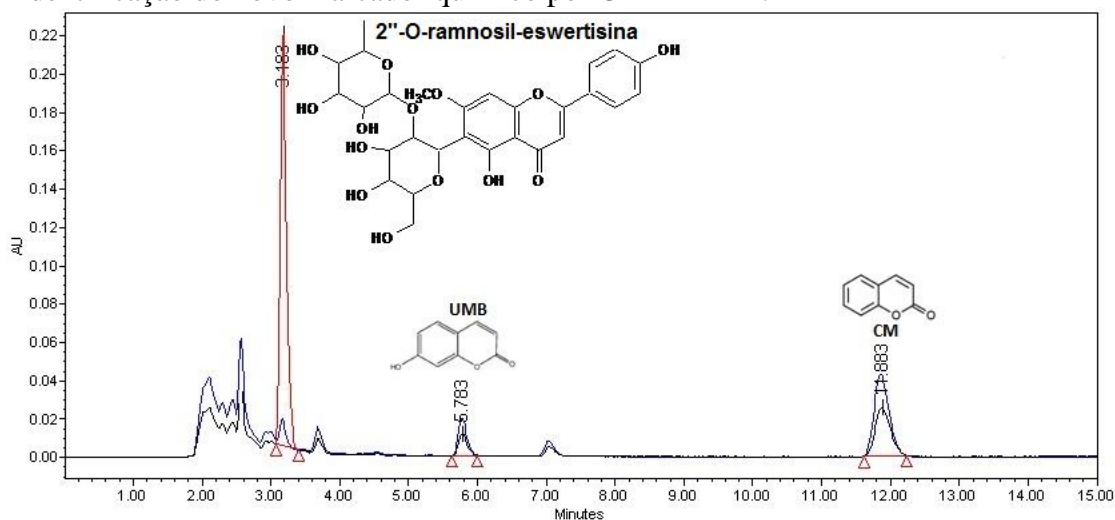


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8 Estudo cromatográfico (CLAE-DAD) do extrato seco microparticulado padronizado visando a identificação de um novo marcador químico para o controle de qualidade de produtos derivados de *Justicia pectoralis*

A fração JPP, após análises de caracterização estrutural, exibiu um pico de molécula protonada a m/z 593.1884 $[M + H]^+$ (calcd. 593.1884), o qual foi compatível com a fórmula molecular $C_{28}H_{33}O_{14}$, além de fragmentos iônicos a m/z 447.1302 ($[M - 146 + H]^+$) e m/z 327.0865 ($[M - 146 - 120 + H]^+$) gerado por perdas neutras de 146 Da and 120 Da, caracterizando a presença de resíduos de ramnose e C-glicose, respectivamente. Além disso, o espectro 1H NMR exibiu ressonância a δ 7.92 e δ 6.93 (2H, d, $J= 8.7$ Hz), característico para presença de anel para-dissubstituído, singletos a δ 6.79 e δ 6.68 (1H, s) relacionado com sinais de hidrogênios aromáticos a δ 5.24-0.65, atribuído aos resíduos de açúcar. Os espectros de RNM 1H e ^{13}C mostraram acoplamentos de uma ligação dos hidrogênios aromáticos e glicosídicos com seus respectivos carbonos, assim como as principais correlações entre δ_H 0.66 e δ_C 16.4 (metil-ramnose), δ_H 3.97 e δ_C 55.6 (metoxil) junto com δ_H 6.68 e δ_C 102.4, δ_H 6.79 e δ_C 90.9, δ_H 6.93 e δ_C 115.6 e δ_H 7.92 e δ_C 128.2, que são característicos dos flavonóides do tipo apigenina. Dessa forma, que a fração JPP era constituída pelo 2''-O-ramnosil-eswertisina. Análise cromatográfica do ESPJP permitiu sua detecção ($Tr = 3,18$ min) ao lado da UMB ($Tr = 5,78$ min) e CM ($Tr = 11.88$ min) (FIGURA 19).

Figura 19 – Cromatograma do extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* com identificação do novo marcador químico por CLAE-DAD.



Condições: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), fase móvel (A: tampão acetato de amônio, pH 3,4; B: acetonitrila, eluição isocrática, fluxo 1,0 mL/min e $\lambda = 271$ nm, 323 nm e 277 nm. CM = cumarina. UMB = umbeliferona.

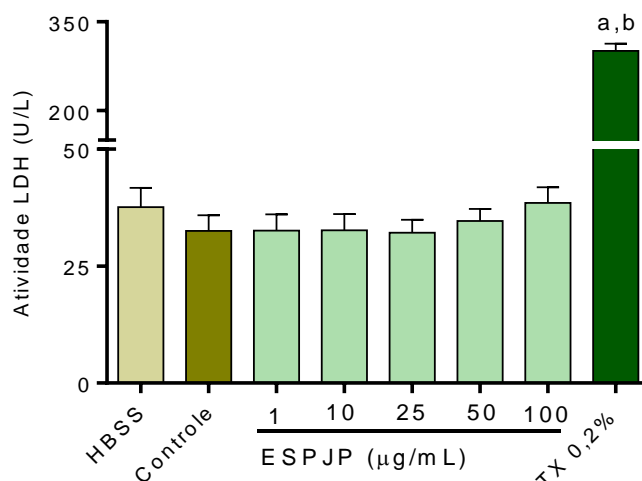
5.9 Avaliação pré-clínica do extrato seco microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis*

Os ensaios toxicológicos e farmacológicos envolveram a avaliação da citotoxicidade em neutrófilo humano e a avaliação da atividade anti-inflamatória no lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c sensibilizados com OVA e LPS.

5.9.1 Avaliação da citotoxicidade em cultura primária de neutrófilos humano

A Figura 21 representa o efeito do ESPJP sobre a toxicidade de neutrófilos mensurada através da atividade da enzima LDH. Observou-se que no grupo controle não houve redução ($32,54 \pm 3,35$ U/L) da viabilidade celular em relação ao grupo não tratado ($37,67 \pm 3,35$). Quanto ao ESPJP, verificou-se que nas concentrações avaliadas (1; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não promoveu aumento da atividade da LDH ($32,60 \pm 3,26$; $32,66 \pm 3,70$; $32,17 \pm 2,72$; $34,68 \pm 2,55$; $38,52 \pm 3,32$ U/L) quando comparado ao controle ($32,54 \pm 3,35$ U/L). Por outro lado, o grupo Triton X 0,2% (padrão citotóxico) aumentou a atividade da LDH ($301 \pm 12,26$), indicando que houve uma diminuição da viabilidade celular.

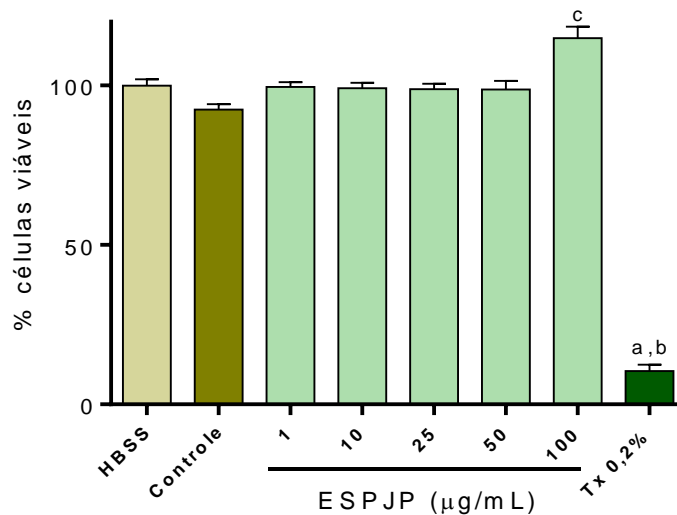
Figura 21 - Efeito do extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* sobre a alteração da permeabilidade da membrana de neutrófilos humanos determinado pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com ESPJP (1, 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 15 min depois foi avaliada a atividade da LDH. HBSS: células não tratadas; Tx 0,2%: Triton x-100 (0,2% v/v) – padrão citotóxico; Controle: veículo (DMSO 1%). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas pelo menos em triplicata e repetidas em três dias diferentes. a vs. HBSS, b vs. Controle ($p < 0,05$ - ANOVA e teste de Tukey, como *post hoc*).

Na Figura 22, pode ser observado que no grupo controle não houve diminuição ($92,43 \pm 1,69\%$) da viabilidade celular em relação ao grupo não tratado ($99,98 \pm 1,99\%$). A adição do ESPJP aos neutrófilos humanos em concentrações crescentes (1; 10; 25; 50 $\mu\text{g/mL}$) não causou redução significativa da viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT ($99,58 \pm 1,43$; $99,18 \pm 1,67$; $98,86 \pm 1,72$; $98,78 \pm 2,66\%$, respectivamente) quando comparado ao controle ($92,43 \pm 1,69\%$). No entanto, ESPJP quando adicionado ao meio na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ promoveu um aumento na viabilidade celular em ($114,8 \pm 3,64\%$) quando comparado ao controle ($92,43 \pm 1,69\%$). O triton X-100, padrão citotóxico, reduziu a viabilidade celular para $10,42 \pm 2,01\%$.

Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade do extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* em neutrófilos humanos através do teste do MTT.



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com ESPJP (1, 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste do MTT. HBSS: células não tratadas; Tx 0,2%: Triton x-100 (0,2% v/v) – padrão citotóxico; Controle: veículo (DMSO 1%). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. a vs HBSS; b vs controle; c vs controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey, *post hoc*).

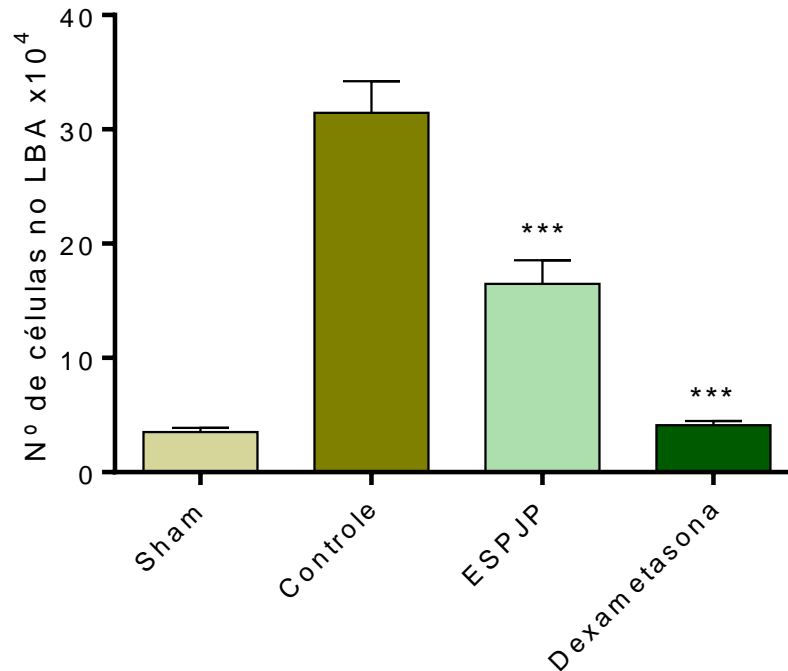
5.9.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato seco microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* em modelo experimental de asma exacerbada induzida por ovalbumina e lipopolissacarídeo em camundongo BALB/c

5.9.2.1. Efeito do extrato seco microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* sobre o acúmulo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar

Na Figura 23, pode ser observado o efeito do ESPJP sobre o acúmulo de leucócitos totais no LBA de animais desafiados com LPS+OVA. O desafio promoveu um aumento significativo no número de leucócitos totais no LBA ($31,46 \pm 2,74 \times 10^4$ cels/mL) em relação ao grupo sham/não desafiado ($3,52 \pm 0,38 \times 10^4$ cels/mL), o que corresponde a um aumento de 8,9 vezes no número células. O tratamento dos animais com ESPJP (100 mg/kg, i.p.) reduziu em aproximadamente 47,6% o número de células presentes no LBA ($16,48 \pm 2,06 \times 10^4$ cels/mL) em relação ao grupo controle. O grupo dexametasona (1mg/mL, i.p.), fármaco padrão, que reduziu em 87% o número de leucócitos totais ($4,12 \pm 2,06 \times 10^4$ cels/mL) quando comparado ao grupo controle.

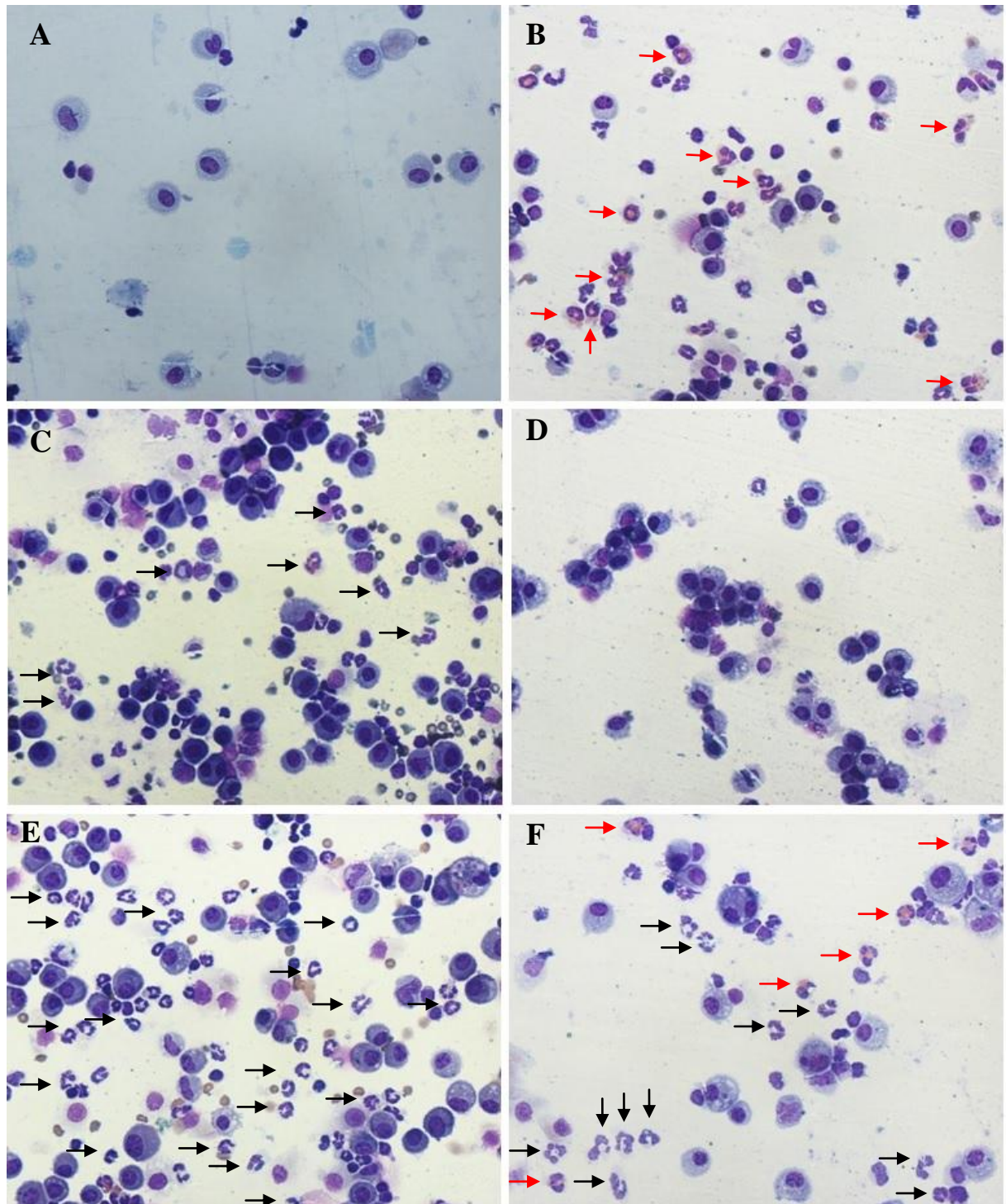
Os resultados apresentados na Figura 24 demonstram que o desafio dos animais com LPS+OVA provocou um perfil celular no LBA característico de um modelo de asma exacerbada com predomínio de neutrófilos em relação à população de eosinófilos, além da presença de mononucleares no foco inflamatório.

Figura 23 – Efeito do tratamento com extrato microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* sobre a migração celular induzida por ovalbumina e lipopolissacarídeo em camundongos BALB/c.



Contagem total de leucócitos no LBA coletado 24h após o último desafio. Camundongos BALB/c (n = 5-7) foram sensibilizados e desafiados com OVA e LPS e tratados ou não (grupo sham) com veículo (DMSO 2%), ESPJP (100 mg/Kg) ou dexametasona (1 mg/kg) 30 min antes de cada desafio com LPS. O grupo sham são animais não tratados e desafiados com PBS estéril. Resultados expressos como média ± erro padrão (***p<0,001; ANOVA e Tukey, *post hoc*).

Figura 24 - Células do lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c submetidos à indução de asma através de sensibilização e desafio com ovalbumina e lipopolissacarídeo.

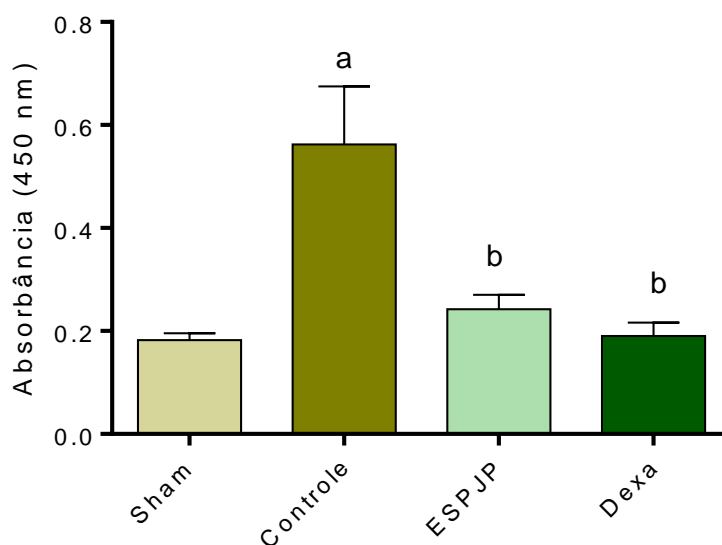


Animais desafiados com salina (A), OVA (B), OVA e LPS (C) e tratados com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) (D), veículo (DMSO 2%) (E) e ESPJP (100 mg/kg, i.p.) (F) tiveram suas células obtidas a partir do LBA, citocentrifugadas e coradas por panótico. Aumento de 60x. Escala de 50 μ m. Setas vermelhas indicam eosinófilos e setas pretas sinalizam neutrófilos.

5.9.2.2. Efeito do extrato seco microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em tecido pulmonar de camundongos BALB/c desafiados com ovalbumina e lipopolissacarídeo.

A sensibilização e desafio dos animais com OVA+LPS aumentou de maneira significativa a atividade da MPO no grupo controle ($0,56 \pm 0,11$) em relação ao grupo sham ($0,18 \pm 0,01$). No grupo de animais tratados com ESPJP (100 mg/kg, i.p.), foi observada uma diminuição significativa da atividade da MPO ($0,24 \pm 0,03$) quando comparada ao grupo controle tratado apenas com veículo ($0,56 \pm 0,11$). Redução semelhante da atividade da MPO foi verificada também para o grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) ($0,19 \pm 0,03$) quando comparada ao grupo controle (FIGURA 25).

Figura 25 - Efeito do tratamento com com extrato microencapsulao padronizado de *Justicia pectoralis* sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em tecido pulmonar de animais sensibilizados e desafiados com ovalbumina e lipopolissacarídeo.



Determinação da enzima mieloperoxidase quantificada em homogenato de tecido pulmonar. Camundongos BALB/c (n = 5-7) foram sensibilizados e desafiados com OVA e LPS, sendo tratados com ESPJP (100 mg/Kg), dexametasona (0,1 mg/Kg) ou veículo (DMSO 2%) 30 min antes dos desafios. Resultados expressos como média ± erro padrão. a vs. Sham. b vs. Controle. *** $p < 0,001$; ANOVA e Tukey, *post hoc*).

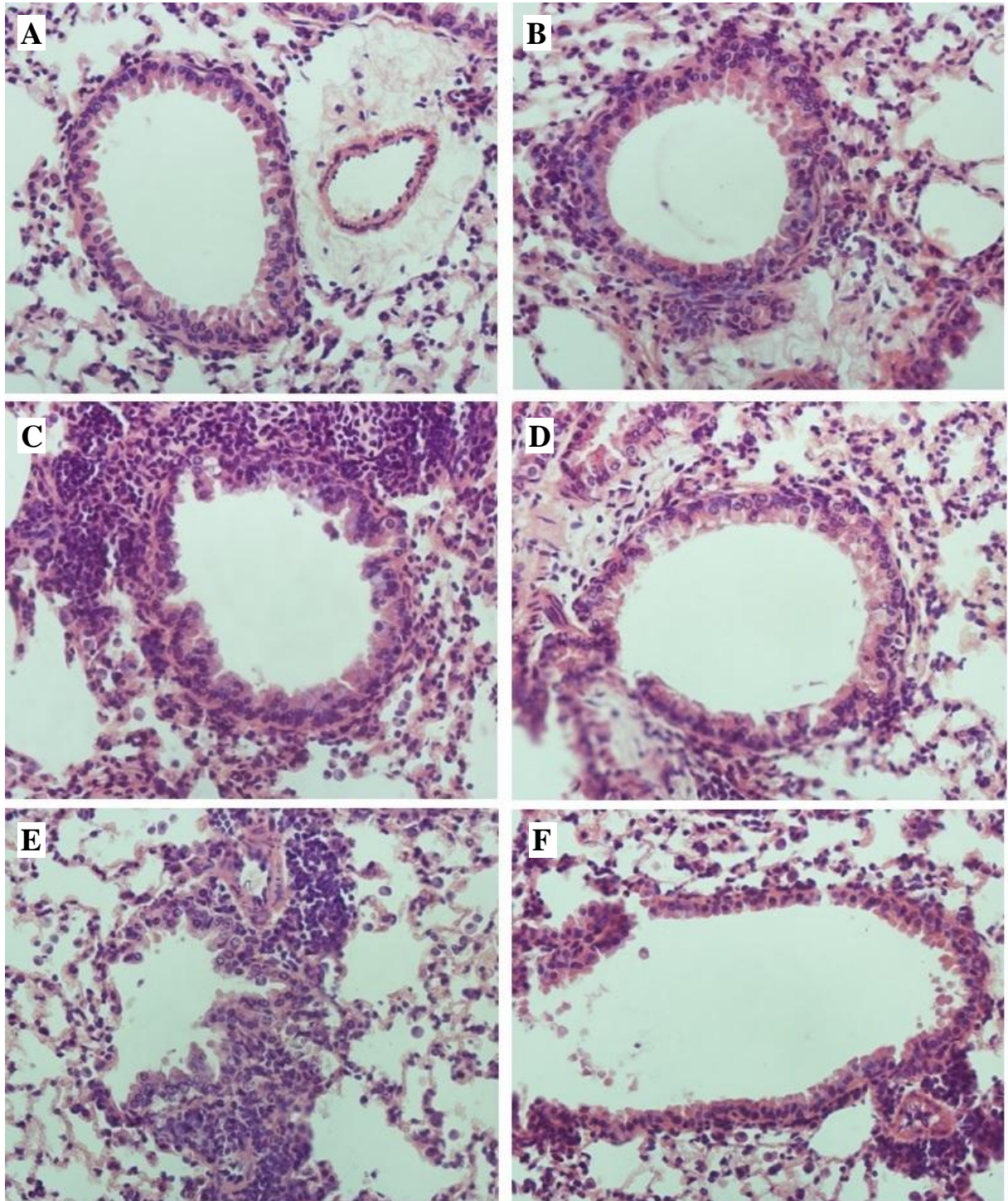
5.9.2.3 Efeito do extrato seco microparticulado padronizado de *Justicia pectoralis* sobre o infiltrado de células e produção de muco no pulmão de camundongos BALB/c desafiados com ovalbumina e lipopolissacarídeo.

Como foi observada diminuição significativa do número de leucócitos presentes no LBA em resposta ao tratamento com ESPJP, o pulmão foi analisado para verificar se essa redução se refletiu no infiltrado de células no tecido pulmonar.

A coloração por hematoxilina-eosina (HE) permite avaliar a presença de células inflamatórias no pulmão. O pulmão dos animais não sensibilizados e desafiados (grupo sham) apresentou parênquima bem conservado e não foi observada a presença de intenso infiltrado de leucócitos nas regiões perivasculares e perialveolares (FIGURA 26a). No grupo de animais sensibilizados e desafiados com OVA e LPS, observou-se um intenso e progressivo infiltrado de células situado nas regiões peribronquiolar e perivascular, demonstrando a instalação do processo inflamatório pulmonar característico da asma (FIGURA 26b e 26c), quando comparado ao grupo sham. Nos pulmões de camundongos tratados com a droga padrão (dexametasona – 1 mg/kg, i.p.), foram encontradas poucas células inflamatórias (FIGURA 26d). O tratamento com ESPJP (100 mg/kg, i.p.) causou diminuição de células inflamatórias na região peribronquiolar, embora não tenha sido capaz de impedir o infiltrado de leucócitos na região perivascular de camundongos quando comparado ao grupo sensibilizado e desafiado com OVA e LPS (FIGURA 26f).

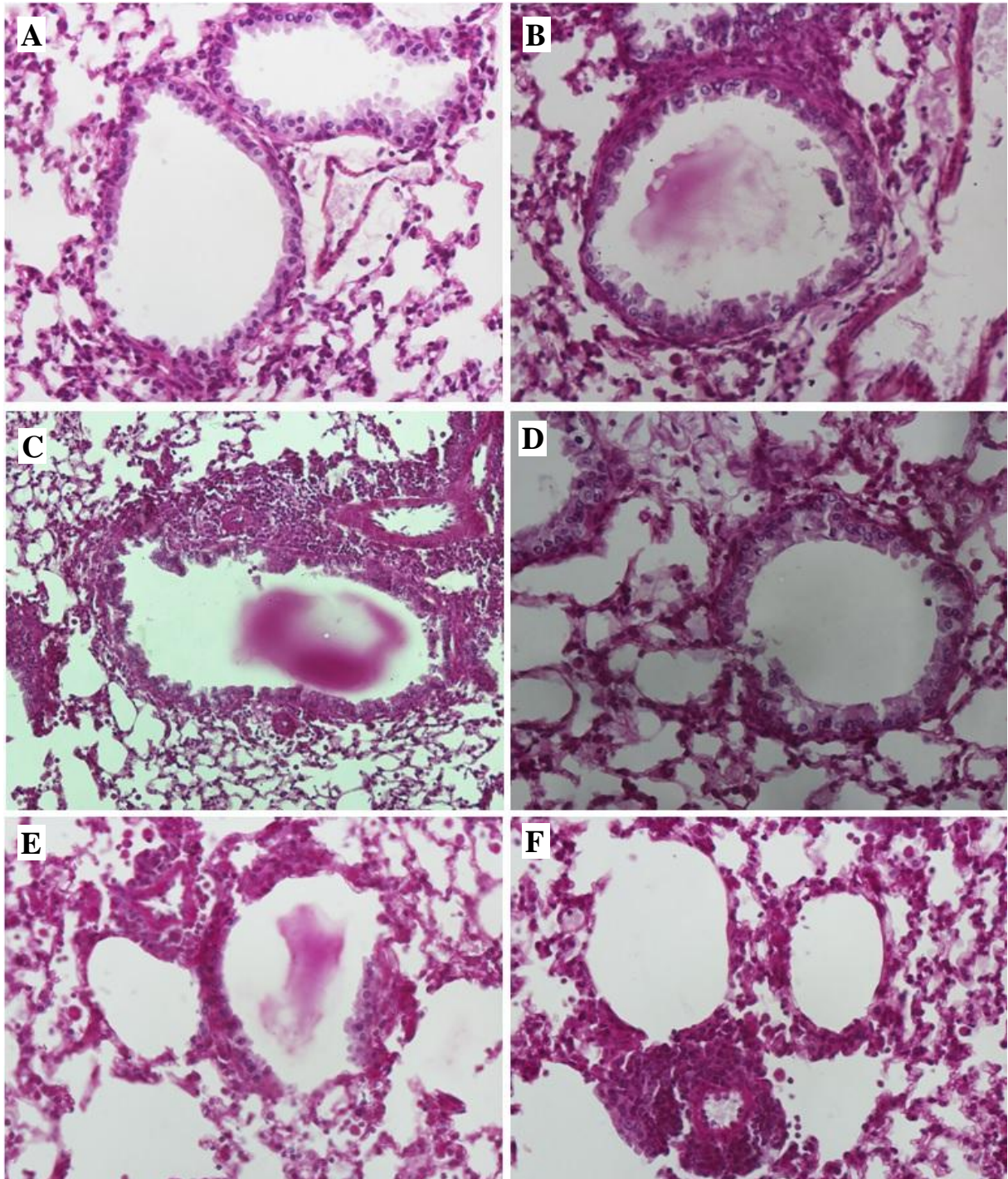
A função do ácido periódico de Schiff (PAS) é corar glicogênio e mucina. Em lâminas coradas com PAS, não se observou a produção de muco nos broquíolos de animais tratados apenas com salina e não desafiados com OVA + LPS (FIGURA 27a). No grupo controle positivo da indução de asma (grupo OVA – FIGURA 27b e grupo OVA e LPS – FIGURA 27c), uma produção excessiva de muco mostrou-se bastante evidente, sendo diminuída com o tratamento com dexametasona (FIGURA 27d). O tratamento com o ESPJP também levou a uma redução representativa na produção de muco nos pulmões de camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA e LPS (FIGURA 27f).

Figura 26 - Inflamação em cortes histológicos de pulmões de camindongos BALB/c asmáticos após diversos tratamentos.



Animais imunizados e desafiados com OVA e OVA seguido de LPS foram sacrificados para avaliação histopatológica no pulmão. Fotomicrografia das vias aéreas com enfoque aos bronquíolos coradas por HE: tratamento com salina (A), OVA (B), OVA e LPS (C), dexametasona (D), veículo (Tween 4%) (E) e ESPJP (F). Aumento de 40x. ESPJP: extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis*. LBP: lavado broncopulmonar. LPS: lipolissacarídeo. OVA: ovalbumina.

Figura 27 - Produção de muco em cortes histológicos de pulmões de camindongos BALB/c asmáticos após diversos tratamentos.



Animais imunizados e desafiados com OVA e OVA seguido de LPS foram sacrificados para avaliação histopatológica no pulmão. Fotomicrografia das vias aéreas com enfoque aos bronquíolos coradas por PSA: tratamento com salina (A), OVA (B), OVA e LPS (C), dexametasona (D), veículo (Tween 4%) (E) e ESPJP (F). Aumento de 40x. ESPJP: extrato seco padronizado de *Justicia pectoralis*. LBP: lavado broncopulmonar. LPS: lipolissacarídeo. OVA: ovalbumina.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo envolveu a obtenção e padronização da matéria-prima vegetal a partir da parte aérea de *Justicia pectoralis* com definição de parâmetros botânicos para comprovação da autenticidade, seleção da época de coleta e pesquisa de possível variação sazonal monitorada pelos teores de marcadores bioativos. Ademais, foram realizados estudos para otimização dos métodos de produção de extratos padronizados (líquido e seco/microparticulado), bem como sua avaliação farmacológica em modelo experimental de asma alérgica exacerbada.

A transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios e multidisciplinares, relativos aos aspectos botânico, agrônomo, fitoquímico, farmacológico, toxicológico, de desenvolvimento e validação de metodologias analíticas (MIGUEL; MIGUEL, 1999). O cumprimento dessas etapas é fundamental para obtenção de um produto final com qualidade e tecnologia agregadas (STROHL, 2000; TOLEDO *et al.*, 2003), além de segurança e eficácia determinadas.

O controle de qualidade (CQ) é considerado uma das etapas de suma importância no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, propiciando a padronização do material vegetal e produtos relacionados. Diversos métodos cromatográficos que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrativo vegetal têm sido empregados tanto para o conhecimento da composição química de uma planta, moléculas com ação farmacológica ou ação tóxica, como também para a determinação de uma substância ou grupo de substâncias a ser empregada como marcador no CQ de uma espécie medicinal (DRASAR; MORAVCOVA, 2004; LIU *et al.*, 2007). Dentre os mais utilizados com essa finalidade, destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Diarrajo Diiodo – CLAE-DAD (ZHAO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005).

Uma das etapas essencial para monitorar a qualidade de matérias-primas vegetais à produtos acabados é a seleção de marcadores. Nesse sentido, estudos demonstram que quanto maior o número de marcadores empregados no CQ desses produtos, melhor o grau de controle desses (LIU *et al.*, 2007).

No presente estudo, com base em estudos anteriores realizados pelo nosso laboratório (FONSECA, 2009) foram selecionados inicialmente como marcadores ativos para o CQ de fitoprodutos de *J. pectoralis*, a cumarina (CM) e a umbeliferona (UMB). Para tanto,

o método analítico (CLAE-DAD) empregado na análise dos teores de CM e UMB em produtos derivados de *J. pectoralis* foi otimizado em relação ao estudo anteriormente desenvolvido em nosso laboratório (FONSECA, 2010), sendo direcionado para a obtenção de uma fase móvel mais simples e de menor custo, uma vez que, devido à alteração da sua composição, houve uma redução na quantidade de solventes empregados, maior facilidade no preparo, além de análises com eluição isocrática e redução do fluxo.

Diante das mudanças realizadas em relação ao método anterior empregado em nosso laboratório, o método desenvolvido passou por processo de validação conforme legislação vigente (ICH, 2005; BRASIL, 2010; BRASIL, 2015; BRASIL, 2017), conferindo maior confiabilidade e aceitação dos resultados, além de estimar sua eficiência na rotina do laboratório (BRITO *et al.*, 2003; SHABIR, 2003). Na avaliação da especificidade do método atual, foi observado que as demais substâncias presentes no extrato hidroalcoólico de *Justicia pectoralis* não interferiram na identificação e análise do teor dos marcadores (CM e UMB), comprovando assim a especificidade do método por CLAE-DAD. Esse parâmetro é essencial para viabilizar o emprego de um método analítico no CQ de extratos vegetais, que são matrizes complexas.

Prosseguindo os estudos, o método mostrou-se linear com coeficientes de correlação acima 0,99; cumprindo assim as recomendações dos órgãos regulatório nacional e internacional (BRASIL, 2015; 2017).

Quanto ao ensaio de precisão, o método demonstrou ser preciso tanto na avaliação da repetibilidade quanto na precisão intermediária, atendendo ao critério mínimo aceitável pela ANVISA que é uma DPR menor que 5% (BRASIL, 2017). A precisão de um método analítico é considerada uma das análises mais representativas do processo de validação, uma vez que pode revelar o efeito das variações relacionadas aos dias, analistas ou equipamentos distintos, implicando na garantia da reprodutibilidade do método (LA ROCA *et al.*, 2007).

A exatidão de um método analítico determina o grau de concordância entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da grandeza. Os resultados obtidos provaram que o método analítico foi exato, uma vez que o percentual de recuperação obtido se manteve entre 95,28 e 104,82%, superior aos 95% exigidos pela legislação vigente e apresentando DPR menor que 5% (BRASIL, 2017). Além disso, o método apresentou-se robusto quanto a pequenas variações nas condições de ensaios, como pH da fase móvel e temperatura da coluna. Porém, sofrendo influência da alteração do fluxo da fase móvel.

Dessa forma, o novo método para análise simultânea do teor de CM e UMB em fitoprodutos a base de *J. pectoralis* por CLAE-DAD, mostrou-se específico, linear, preciso,

exato e parcialmente robusto frente a pequenas variações nas condições analíticas à luz das regulações atuais (BRASIL, 2015; 2017). A validação do presente método tem um papel importante no controle/padronização de fitoprodutos a base de *J. pectoralis*, que é essencial desde o início do processo de desenvolvimento de um medicamento, uma vez que a matéria-prima vegetal afeta diretamente a fase inicial do ciclo de processamento tecnológico de fitoterápicos e pode comprometer a qualidade do produto acabado, refletindo também na segurança e eficácia deste (SOUZA; MACIEL, 2010).

No controle de qualidade de matérias-primas vegetais, uma das etapas envolvidas no processo é a avaliação da autenticidade da planta, a qual abrange análises macroscópicas e microscópicas do órgão vegetal (SIMÕES, 2003). O estudo da anatomia foliar de *J. pectoralis* cultivada no Horto de Plantas Medicinais da UFC, permitiu identificar características anatômicas. Dessa forma, essas informações associadas à análise química da planta (perfil cromatográfico e análise de marcadores por CLAE) certamente contribuirão para distinção de *J. pectoralis* var. *stenophylla*, das demais espécies e variedades de *Justicia* sp.

A anatomia observada corrobora a outros estudos farmacobotânicos (OLIVEIRA, ANDRADE, 2000; MALHEIROS, 2012; AOYAMA; INDRIUNAS, 2014) de plantas medicinais do nordeste brasileiro. Ressalta-se que as características anatômicas possuem maior relevância que as morfológicas na caracterização da espécie, já que estas últimas são comuns no gênero *Justicia* (KAMEYAMA, 2006).

Quanto à morfologia, Oliveira e Andrade (2000) caracterizaram duas diferentes variedades de *J. pectoralis*, *J. pectoralis* var. *stenophylla*, espécie bastante relatada na literatura, e *J. pectoralis* var. A, até então não identificada, além da *J. gendarussa*, espécie também encontrada no Nordeste brasileiro. As duas variedades de *J. pectoralis* se diferenciam pelo número e forma das folhas enquanto que *J. gendarussa* difere destas pela forma das folhas e coloração da nervura. *J. pectoralis* var. A possui menor tamanho, hábito decumbente e lâmina foliar estreitamente-ovalada com base obtusa, menor número de ramos e folhas, diferindo de *J. pectoralis* var. *stenophylla* que apresenta hábito cespitoso e laminar foliar estreitamente-lanceolada com base aguda. O hábito subarborescente é a característica que mais facilmente distingue *J. gendarussa* das outras duas variedades de *J. pectoralis*, seguido da lâmina foliar maior (8-1,5 cm) com base e ápice cuneado. Assim, análises farmacobotânicas confirmam ser *J. pectoralis* Jacq var. *stenophylla* Leonard a espécie estudada.

A necessidade de cultivo de espécies vegetais é uma realidade cada vez mais crescente devido à abundante demanda por parte da indústria farmacêutica de matéria-prima, a grande variabilidade nos teores de princípio ativo e também pelo fato de muitos espécimes

serem autorizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para a utilização em rede pública, como na Farmácia Viva. Em contrapartida, surge a necessidade de desenvolvimento de técnicas agrônômicas que se relacionem com os níveis de princípio ativo na planta, buscando o cultivo da espécie de forma comercial, bem como de tratamentos e armazenamento pós-colheita que garantam a estabilidade química da matéria-prima para a expressão de todo o seu potencial terapêutico (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRA, 2010).

O período da colheita de uma espécie vegetal pode constituir um parâmetro de grande interferência no teor de substâncias ativas, uma vez que não costumam ser constantes durante o ano. Da mesma forma, a idade e o estágio de desenvolvimento da planta também são importantes e podem intervir tanto nos níveis totais de metabólitos produzidos como nas proporções relativas dos seus componentes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Através do monitoramento da variação de CM e UMB em espécie *J. pectoralis*, no presente estudo, pode-se inferir que houve uma redução dos teores de UMB, chegando ao seu menor valor, durante os meses de janeiro a março. Quanto à cumarina, foram observadas elevações cíclicas a cada dois ou três meses, independentemente da época do ano. No semi-árido brasileiro, a vegetação está condicionada a uma deficiência hídrica relacionado tanto à seca, que decorre da irregularidade das chuvas, quanto a outros fatores característicos da região, como altas temperaturas e elevada intensidade luminosa, que provocam uma exaustiva demanda evaporativa e consequente ressecamento do solo (TROVÃO *et al.*, 2007). Diante do exposto, confirma-se que *J. pectoralis* apresenta variação sazonal nos níveis de CM e UMB.

Cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários produzida pela planta em resposta a uma condição específica, seja esta relacionada a características de solo, tipo e nível de radiação, poluição atmosféricas, ou mesmo ao ataque de pragas e a incidência de doenças. Desta forma, o local de cultivo, bem como as condições ambientais a que as plantas, incluindo as cumarínicas estão expostas, exerce grande influência em suas características químicas (SIMÕES, 2003).

Corroborando a variabilidade química sazonal observada na parte aérea de *J. pectoralis*, estudo realizado por Almeida (2015) mostrou que o cultivo de *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, plantas cumarínicas amplamente utilizadas no tratamento da bronquite e tosse sob diferentes condições de temperatura, luminosidade e danos mecânicos, apresentaram significativa influência na composição de seus metabólitos secundários como cumarina, ácido clorogênico e ácido dicafeoilquínico, todos compostos fenólicos.

Dessa forma, visando contribuir com a padronização de um produto derivado obtido a partir da parte aérea de *J. pectoralis*, realizamos a otimização do método analítico e a

validação deste para controle de qualidade da planta empregando até o momento como marcadores a CM e a UMB. Ainda, a análise botânica realizada contribuiu para a certificação e distinção botânica da planta em relação a outras espécies ou variedade, e com base nos resultados é recomendado que o tempo de cultivo da planta seja por três meses, e a coleta pode dar-se preferencialmente nos meses determinados de maior teor de CM e UMB.

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência e os custos do processo, disponibilidade dos meios para execução do mesmo, além da estabilidade das substâncias extraídas, considerando o produto final ao qual o estudo se propõe a elaborar. Como a composição química das plantas é extremamente complexa, frequentemente ocorre extração concomitante de vários compostos, farmacologicamente ativos ou não. Por isso, a importância da seleção de marcadores no processo de desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais (SIMÕES, 2003; ROCHA *et al.*, 2008; ALVES, 2013).

Para a otimização do processo extrativo em relação ao método anterior empregado em nosso laboratório (FONSECA, 2009), inicialmente foram realizadas extrações por meio de um método simples, a maceração, com avaliação da influência do tempo (6 h ou 24 h) sobre o processo, e foi verificado que, quanto maior o tempo de maceração, maior o teor de marcadores.

Na tentativa de incrementar ainda mais os níveis de CM e UMB na solução extrativa, optou-se por investigar se outros processos mais exaustivos e/ou dinâmicos como soxhlet (6 h) e turbólise (5 min) teriam influência na concentração desses marcadores ativos. Ambos os métodos propiciaram em um menor tempo de extração, concentrações equiparáveis de marcadores em relação a maceração, mas a elevação da temperatura pode levar a perda de cumarina e, embora as concentrações de marcadores bioativos possam ser considerados superiores em relação à maceração, tais processos não foram eleitos pelo fato de poderem ser dificultosos para uma extração em larga escala, devido à especificidade dos equipamentos.

Seguindo com os experimentos, foi verificada a atuação da exaustão da droga vegetal por meio da passagem excessiva do líquido extrator ao final do processo de maceração. Foi, então, observado que a maceração seguida por esgotamento da droga vegetal apresentou maior teor de CM e UMB, sendo o método escolhido para avaliação da influência do decréscimo da porcentagem de etanol no solvente extrator (de 100% para 20% em água) sobre o rendimento dos marcadores, uma vez que esse foi o método que apresentou o maior teor de marcadores. À medida que o teor de etanol no solvente extrator reduziu, as concentrações de CM e UMB aumentaram. Fonseca (2009) evidenciou que o baixo teor alcoólico no solvente extrator interfere significativamente nos níveis de CM e UMB, no qual

ele observou haver um aumento de UMB, mas não CM. Contraditoriamente aos dados obtidos em nosso estudo, há relato na literatura, que demonstra que o extrato hidroalcolico (36, 60 e 70%) preparado a partir de *Mikania laevigata* apresenta maior concentração de CM quanto maior for a proporção de etanol (BIAVATTI *et al.*, 2004).

De posse dos resultados verificados, prosseguiu-se com os experimentos para identificação da influência de outras variáveis para maior eficiência na obtenção dos teores de marcadores. Devido à facilidade e menor custo no processo, foi escolhido progredir-se utilizando a maceração como método extrativo, uma vez que a maceração seguida por esgotamento da droga vegetal produz ao final uma grande quantidade de extrato que necessita passar por etapa de concentração, podendo agregar uma etapa de perda de marcadores devido o emprego da temperatura. Assim, prosseguindo o estudo investigou-se a influência da variação na proporção entre droga vegetal e solvente extrator. De fato, foi evidenciado que em soluções extrativas com uma maior proporção entre droga e solvente extrator (1g:15mL) há um aumento significativo, sobretudo, no teor de CM, quando comparado a uma menor proporção (1g:7,5mL). Ademais, foi observado que a agitação no processo extrativo não aumentou significativamente a concentração dos marcadores.

No processo de maceração, o solvente penetra andentra na droga vegetal dissolvendo os constituintes químicos e os extraindo por difusão. Por ser um processo descontínuo, é necessária a renovação periódica do solvente, visto que após determinado intervalo de tempo, a solução torna-se saturada (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996; YRJÖNEN, 2004). Nesse contexto, foi inserida no processo a percolação fracionada após o término da maceração como um segundo método de extração agregado, onde foi observado um aumento significativo nos níveis de CM e UMB. Verificou-se também que os extratos não necessitam de evaporação do solvente, com conseqüente concentração em estufa, o que foi favorável, uma vez que essa etapa pode levar a uma perda significativa das cumarinas.

Diante dos resultados obtidos, o método extrativo indicado para a produção do extrato de *J. pectoralis* com base no maior teor de marcadores ativos e menor custo, compreende a maceração seguida por percolação, tendo uma solução hidroalcolica (EtOH 20%) como líquido extrator e proporção entre droga vegetal (g) e solvente (mL) de 1:15. Destaca-se que o atual método proporcionou um incremento no teor dos marcadores químicos em 2,5 vezes em relação ao método anterior desenvolvido no nosso laboratório (FONSECA; SILVA; LEAL, 2010).

Soluções extrativas obtidas a partir de matérias-primas vegetais, principalmente aquosas ou hidroalcolicas, apresentam, por vezes, baixa estabilidade. Assim, a obtenção de

produtos secos oriundos dessas soluções extrativas almeja, entre outras vantagens, possibilitar melhoria na estabilidade das preparações fitoterápicas (HOLZSCHUH, 2008).

A tecnologia de secagem por aspersão (*spray drying*) é um dos processos mais utilizado para produzir extratos secos a partir de extratos líquidos de plantas medicinais. Estes pós precisam satisfazer propriedades físico-químicas como teor de umidade, higroscopicidade, tamanho de partícula, densidade, concentração de ingredientes ativos, além de mecânicas como fluidez e compressibilidade a serem usadas em uma forma farmacêutica sólida. Adicionalmente, podem ser obtidos elevados rendimentos e boa qualidade do pó a partir da seleção adequada de parâmetros do processo (TUYEN, 2010; GALLO *et al.*, 2011; GALLO; BUCALA, 2018). Nesse contexto, visando agregar mais tecnologia e competitividade ao extrato de *J. pectoralis* frente ao mercado mundial de fitoterápicos, foi desenvolvido a partir do extrato hidroetanólico de *J. pectoralis* padronizado, o extrato seco microparticulado com auxílio de *spray drying*.

O extrato seco microencapsulado de *Justicia pectoralis* foi otimizado a partir da avaliação de diferentes condições de secagem que envolveu a temperatura do ar de secagem, fluxo de alimentação e diâmetro do bico atomizador como parâmetros do aparelho. O produto obtido apresentou-se macroscopicamente na forma de um pó fino de coloração castanha, com odor característico da matéria-prima vegetal de origem, sendo empregado dióxido de silício coloidal (15%) e celulose microcristalina (5%) como adjuvantes de secagem. Em estudo anterior realizado em nosso laboratório para o desenvolvimento de um extrato microparticulado de *Justicia pectoralis* (FONSECA, 2009; MOURA *et al.*, 2017), a celulose microcristalina e o dióxido de silício coloidal foram os adjuvantes de secagem que forneceram melhor características físicas ao extrato, sendo o segundo escolhido para o processo de secagem. Entretanto, o teor de dióxido de silício coloidal foi superior (50%) em relação ao percentual empregado no extrato seco atual (15%).

O dióxido de sílico é um adjuvante de secagem extensivamente empregado no desenvolvimento de extratos vegetais secos microparticulados, incluindo plantas cumarínicas, como *Mikania laevigata*. Ademais, o dióxido de silício tem conferido bom desempenho sobre rendimento e características físicas dos pós vegetais (PINTO, 2011; SOARES *et al.*, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

A celulose microcristalina também apresenta vantagens na produção de formas farmacêuticas sólidas por sua característica de não aderência, boa compressibilidade, fácil desintegração, alto potencial de diluição, além de ser inerte (TOLLER; SCHIMIDT, 2005). Portanto, a redução no percentual de dióxido de silício na produção do extrato

microparticulado de *J. pectoralis*, e a inclusão de celulose microcristalina neste, irá possivelmente conferir ao extrato seco da planta vantagens tecnológicas e possivelmente maior segurança.

A redução da quantidade de adjuvante de secagem empregado na preparação do extrato microparticulado de *J. pectoralis* de 50% para 20% pode levar a um ganho real no rendimento do processo.

A produção industrial de extratos secos estáveis e com boas propriedades de fluxo é um grande desafio para a indústria de fitomedicamentos. Portanto, em um método de secagem, devem-se evitar alterações indesejáveis e manter a qualidade do produto, sendo necessário avaliar o efeito dos parâmetros operacionais nas propriedades físicas dos pós, para auxiliar na identificação das condições ótimas de secagem e seu efeito sobre características das partículas (LEÓN-MARTÍNEZ; MÉNDEZ-LAGUNAS; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, 2010). Na avaliação dos parâmetros do processo de secagem referente ao aparelho (fluxo de alimentação, temperatura do ar de secagem e diâmetro do bico atomizador), não foi observada influência significativa entre os teores de umidade, marcadores ou rendimento obtidos.

Diante dos resultados obtidos, e no sentido de avaliar se o ESPJP desenvolvido possui características físico-químicas e morfológicas de interesse farmacêutico, este foi submetido à análise de índices reológicos, higroscopicidade, quantificação dos marcadores e MEV.

A densidade de um pó está diretamente ligada à estrutura das partículas e, conseqüentemente, ao comportamento do pó durante o processo de compressão. A densidade aparente e de compactação do ESPJP foram de 0,20 e 0,24 g/mL, respectivamente. Os valores de densidade encontrados estão próximo aos de outros extratos microparticulados (0,18 e 0,19 g/mL para valores de densidade aparente e 0,23 e 0,28 g/mL para valores de densidade compactada) desenvolvidos em nosso laboratório (FONSECA, 2009; ARARUNA, 2013) e com valor mais baixo que o observado em outras espécies vegetais, incluindo *Mikania laevigata* (0,46 g/mL), uma planta que contém cumarina (SOARES *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2017).

No estudo da reologia, fatores como o índice de Carr (IC), fator de Hausner (FH) e ângulo de repouso são parâmetros vinculados, indiretamente, à facilidade de escoamento do pó, uma vez que, quanto mais arredondada é uma partícula, menores serão os espaços de ar dentro das misturas de pós, facilitando assim o seu rolamento e conseqüentemente seu escoamento (WELLS, 2005).

Quanto ao índice de Carr, fator de Hausner e ângulo de repouso, os valores encontrados para o ESPJP foram de 17,14%, 1,17 e 28°, respectivamente. Valores no índice de Carr menores que 20%, fator de Hausner entre 1,12-1,18 são indicativos de uma boa fluidez do pó e ângulo de repouso entre 25 e 30° são indicativos de uma excelente fluidez (USP, 2012). Portanto, o ESPJP mostrou-se apropriado quanto as suas características reológicas para o desenvolvimento de formas sólidas a partir dele.

A determinação da umidade residual (UR) é um ensaio de grande relevância do ponto de vista tecnológico para produção de fitoterápicos. Baixo teor de umidade facilita a conservação dos produtos, favorecendo uma maior estabilidade química e microbiológica para armazenagem. A UR encontrada para o ESPJP foi $6,23 \pm 0,85\%$, dentro da faixa apropriada, ou seja, entre 3 e 7 % (CARDOSO, 2009; SOLLOHUB; CAL, 2010; COUTO *et al.*, 2011), muito embora a Farmacopeia Brasileira (2010) considera satisfatório um valor de 5% de umidade. O teor de umidade de um pó vegetal reflete sobre a higroscopicidade do pó obtido frente à elevada umidade relativa (75%), indicando quanto menor teor de umidade do pó, maior é sua tendência a absorver umidade (MUZAFFAR; DINKARRAO; KUMAR, 2016). Esta análise é importante por representar a estabilidade física do produto obtido, possibilitando conhecer o seu comportamento e as condições ambientais ideais para a produção, armazenamento e transporte (VASCONCELOS *et al.*, 2005; MENDEZ *et al.*, 2011). Nesse contexto, o ESPJP mostrou uma UR satisfatória em relação a algumas literaturas especializadas, e muito próxima às especificações farmacopéicas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2012). Um aspecto positivo é que o ESPJP mesmo com uma UR acima de 5%, não mostrou uma natureza higroscópica quanto avaliado em condições variadas de higroscopicidades (8; 32,5 e 75%).

ESPJP, após quantificação da concentração de marcadores químicos com emprego de metodologia validada (CLAE-DAD), apresentou teor de cumarina ($21,10 \pm 0,014$ mg/g) 2,5 vezes superior ao obtido anteriormente ($8,49 \pm 0,20$ mg/g) por nosso grupo de pesquisa (FONSECA, 2009), embora os níveis de umbeliferona ($1,74 \pm 0,20$ mg/g) tenha sido reduzido pela metade. O rendimento real do processo de secagem ($59,45 \pm 1,78\%$) foi semelhante ao obtido por Fonseca (2009).

Embora CM e UMB sejam quimicamente semelhantes, UMB se mostrou bem mais sensível às condições de secagem adotadas na microencapsulação do extrato. Os dados obtidos evidenciam a necessidade de estudo adicional, possivelmente com novo planejamento experimental, visando incrementar o teor de UMB, sem que haja a redução do teor de CM. Isso é possível diante dos resultados obtidos no planejamento fatorial empregado no presente

estudo (CM: 19,79 mg/g; UMB: 1,69 mg/g) mostrando que se pode e que há meios para se trabalhar melhor as condições de secagem.

A morfologia é uma característica determinante do comportamento de partículas sólidas, pois muitas de suas propriedades físicas e químicas dependem da sua forma e da geometria da superfície. Assim, sua caracterização morfológica é de grande importância na tecnologia farmacêutica, em formulações intermediárias ou finais, sendo sua forma considerada um fator crítico para algumas etapas de produção como a encapsulação e, especialmente, no revestimento de *peletts* (WALTON; MUMFORD, 1999; AULTON, 2002).

As microcápsulas do ESPJP observadas através de fotomicrografias obtidas por MEV apresentaram formato esférico, o que é característico das partículas produzidas pelo processo de *spray drying*, sendo suas superfícies predominantemente rugosas. Quanto mais arredondada é uma partícula, menores serão os espaços de ar dentro das misturas de pós, facilitando assim o seu rolamento e conseqüentemente seu escoamento (WELLS, 2005). Além disso, favorecem uma rápida dissolução, melhorando, assim, a atividade terapêutica do produto formulado (VITALI *et al.*, 2008; TONON; BRABET; HUBINGER, 2009).

Diante dos resultados obtidos o ESPJP mostrou forma esférica e superfície irregular, mas que não apresenta rachaduras, fissuras ou rompimentos com diâmetro de partícula de 10 μm .

O extrato padronizado microparticulado de *Justicia pectoralis* (ESPJP) foi facilmente incorporado a uma solução de xarope base, confirmando que suas boas características físico-químicas observadas contribuem para o seu emprego em fitoterápicos, obtendo uma concentração final de 0,75%.

Como CM e UMB já possuem diversas atividades farmacológicas (LEAL; SILVA; VIANA, 2017) relatadas e que corroboram os usos medicinais de *J. pectoralis*, resolveu-se investir em um terceiro marcador químico para agregar maior confiabilidade ao controle de qualidade de produtos originários dessa espécie.

Observando o perfil cromatográfico do ESPJP, este foi submetido a sucessivas análises cromatográficas (CLAE-DAD) até a elucidação da natureza química de mais um pico cromatográfico ($T_r = 3,18$ min). Esse estudo permitiu a elucidação de estrutura de um novo marcador químico, a 2''-O-ramnosil-eswertisina, um diglicosídeo flavônico descrito anteriormente em *J. pectoralis* por Joseph *et al.* (1988), que possui efeito antinociceptivo comprovado em modelos experimentais de inflamação crônica e dor neuropática em ratos (QUINTÃO *et al.*, 2012). Os dados de RMN obtidos no presente estudo foram compatíveis com os publicados anteriormente para este composto (BLOOR, 1999). Diante dos resultados

obtidos, o novo ESPJP passa a possuir três marcadores ativos para o controle de qualidade deste, a CM, UMB e 2''-O-ramnosil-eswertisina.

Estudos anteriores (LINO, 1995; LINO; VIANA; MATOS, 1997; LEAL *et al.*, 2000; RODRIGUEZ CHANFRAU *et al.*, 2008a; 2008b; FONSECA, 2009; VENÂNCIAO *et al.*, 2011; LOCKLEARA *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2017), a maior parte desses realizados pelo nosso grupo de pesquisa, determinaram várias atividades farmacológicas de *Justicia pectoralis* como ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante, analgésica, espasmolítica, anti-inflamatória e antiasmática para extratos hidroetanólicos obtidos sob diferentes métodos extrativos em relação ao atual, ou constituintes químicos da planta. No presente estudo, os resultados obtidos até o momento padronizou o desenvolvimento do extrato da planta desde o cultivo até a obtenção de um produto final. Dessa forma, é essencial avaliarmos se o novo fitoproduto, em particular o novo extrato microparticulado de *J. pectoralis* possui propriedades farmacológicas de interesse para o tratamento da asma.

Na avaliação da citotoxicidade do ESPJP em neutrófilos humanos, verificou-se que nas concentrações avaliadas (1 - 100 µg/mL) não houve aumento significativo da atividade da LDH, quando comparado ao grupo controle, sugerindo, portanto, uma ausência de citotoxicidade do produto por alteração na permeabilidade da membrana plasmática.

No teste do MTT, ESPJP nas concentrações avaliadas (1 - 50 µg/mL) não reduziu significativamente na viabilidade celular de neutrófilos humanos em relação ao grupo controle, sugerindo uma ausência de citotoxicidade sobre o metabolismo celular, particularmente relacionado à atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. O ESPJP na maior concentração (100 µg/mL) aumentou em 114% a viabilidade celular, quando comparado ao grupo controle. Devido à especificidade do teste em quantificar a ação de uma única organela, a mitocôndria, e ao fato de que as células geralmente apresentam número variável desta, sendo proporcional à atividade metabólica de cada célula, o resultado pode significar um aumento da atividade enzimática por um número menor de células (CARVALHO, 2010).

Fonseca (2009) e Alves (2010) demonstraram que outro extrato seco padronizado formulado em nosso laboratório também não foi capaz de alterar a viabilidade celular de neutrófilos humano, mensurado pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), mas que um dos seus constituintes químicos, a UMB (100 µg/mL), aumentou a atividade da LDH (ALVES, 2010).

J. pectoralis é indicada para o tratamento de patologias respiratórias como a asma por programas públicos de fitoterapia, como a Farmácia Viva, e também o Formulário de

Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que afeta cerca de 18% da população mundial, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de dispneia, sibilância, constrição torácica e tosse. É caracterizada por hiper-responsividade brônquica, aumento da secreção de muco e obstrução variável do fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com o tratamento (GINA, 2018).

Nos animais tratados com ESPJP, a quantidade de células inflamatórias totais presentes no lavado broncoalveolar em modelo experimental de asma exacerbada foi menor em relação ao grupo controle, demonstrando a capacidade do extrato em interferir no processo de migração celular. A OVA leva ao desencadeamento de vários sintomas da asma como intenso infiltrado de células inflamatórias no pulmão, liberação de mediadores inflamatórios, elevada produção de muco e citocinas do perfil T_H2 (FACINONE *et al.*, 1997; MURAKAMI *et al.*, 2007). Já o LPS é um dos mais fatores pró-inflamatórios mais potentes e pode induzir inflamação pulmonar aguda e até mesmo lesão pulmonar (COOKSON; MOFFATT, 1997).

Para avaliar se a redução das células inflamatórias no LBA de camundongos BALB/c tratados com ESPJP também se refletia sobre o parênquima pulmonar, foram investigados cortes histológicos dos pulmões desses animais corados com HE. O ESPJP foi capaz de diminuir o infiltrado de leucócitos no parênquima pulmonar, contudo, estudos adicionais para investigação do mecanismo pelo qual o extrato atua são necessários.

A administração do ESPJP foi capaz de produzir uma redução significativa da atividade da MPO em relação ao grupo controle, em um valor semelhante ao da dexametasona. Contudo, estudos mais aprofundados seriam necessários para afirmar qual o mecanismo de ação envolvido na supressão da atividade da MPO. A inibição do quadro inflamatório após a utilização de dexametasona em modelo de asma é bem descrita na literatura, sendo capaz de diminuir a migração de leucócitos para o pulmão, em especial de eosinófilos, assim como o infiltrado inflamatório no pulmão (HAMELMANN; SCHLEIMER, 2003; JUNGSUWADEE *et al.* 2004a; 2014b).

O aumento excessivo da produção de muco é uma das características mais importantes do processo inflamatório observado no epitélio brônquico de pacientes com asma, o que pode acarretar na obstrução das vias aéreas inferiores e insuficiência da capacidade respiratória, motivo comum de óbitos na asma grave (FAHY *et al.*, 2002). Dentre os mediadores inflamatórios envolvidos na hipersecreção brônquica de muco, a IL-13 desempenha um importante papel, sendo indutora da produção e secreção de muco por células caliciformes e formação de fibrose subepitelial nos pulmões. Agrava esse quadro de

hipersecreção, a presença de vários subprodutos de eosinófilos como o CysLTs, PAF e ECP (LIU *et al.*, 1998; SHIMIZU *et al.*, 2000; 2003; KELLER *et al.*, 2006).

A análise histológica do pulmão de animais sensibilizados e desafiados com OVA+LPS, revelou que o tratamento desses com ESPJP promoveu uma redução na produção de muco. Com base em estudos anteriores (SENRA, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2009), pelo menos parte desse efeito está possivelmente relacionado à presença de UMB no extrato, considerando que este derivado cumarínico mostrou habilidade para reduzir significativamente a concentração de IL-13 no LBA de camundongos Balb/c asmáticos.

Diante dos resultados obtidos, o novo ESPJP demonstrou baixa citotoxicidade em neutrófilos humano e potencial anti-inflamatório relacionado pelo menos em parte à redução do acúmulo de células inflamatórias no LBA de animais com asma exacerbada, além redução na produção e/ou secreção de muco por células caliciformes do epitélio brônquico pulmonar. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar dentre outros aspectos, a segurança *in vivo* desse insumo farmacêutico ativo, bem como melhor descrição do mecanismo de ação anti-inflamatória em modelo de asma exacerbada.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo farmacêutico e farmacológico de *Justicia pectoralis* permitiram as seguintes conclusões:

- O método analítico (CLAE-DAD) desenvolvido para a determinação quantitativa dos marcadores ativos, cumarina (CM) e umbeliferona (UMB), em produtos derivados da planta foi otimizado e validado, mostrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto para pequenas variações no pH da fase móvel e temperatura da coluna;
- A análise botânica das folhas de *J. pectoralis* confirmou a espécie em estudo, não sendo visualizadas novas estruturas em relação às já descritas na literatura. No terceiro mês de vida, a planta já possui elevados teores de marcadores, podendo ser empregada para a produção de derivados e que também possui influência sazonal;
- O método extrativo de obtenção do extrato hidroetanólico de *J. pectoralis* foi otimizado, proporcionando um produto derivado com maior teor de ativos (CM e UMB) e menor custo, quando produzido por: maceração por 24h seguida por percolação fracionada, proporção droga:solvente (p/v) de 1:15mL, empregando como solvente etanol a 20% em água;
- Foi desenvolvido e caracterizado o extrato seco microparticulado de *J. pectoralis* por *spray drying* (ESPJP), que mostrou características físicas, químicas e morfológicas de interesse para um insumo farmacêutico vegetal ativo, mostrando índices reológicos, umidade residual e grau de higroscopicidade de acordo, além de morfologia esférica, determinada por MEV;
- Foi determinada a natureza química de um novo marcador para o controle de qualidade do extrato seco microparticulado de *J. pectoralis*, o 2''-O-ramnosil-eswertisina, diglicosídeo flavônico, detectado pelo método analítico (CLAE-DAD) validado.
- O ESPJP não mostrou toxicidade em neutrófilo humano e apresentou efeito anti-inflamatório em modelo experimental de asma exacerbada em camundongos BALB/c, ao reduzir o acúmulo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais, ratificada pela redução da atividade da mieloperoxidase no LBA; além da redução na produção e/ou secreção de muco por células caliciformes do epitélio brônquico determinada por análises histológicas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo permitiu definir processos, otimizar métodos e estabelecer especificações para o controle de qualidade (CQ) da planta in natura e do produto derivado de *Justicia pectoralis* (chambá)/extrato seco microparticulado, observando desde aspectos relacionados ao cultivo da planta. Ademais, foi indicado de maneira inédita um novo marcador para o CQ do extrato seco de *J. pectoralis*, o flavonoide 2''-O-ramnosil-eswertisina, ao lado das cumarinas (CM e UMB). Por fim, o extrato microparticulado mostrou atividade anti-inflamatória em modelo experimental de asma, e foi empregado como matéria-prima ativa na formulação do novo Xarope de chambá padronizado (0,75%). Estudos adicionais são ainda necessários, visando dentre outros aspectos melhor descrição da segurança do novo insumo farmacêutico ativo e fitoterápico, bem como do mecanismo de ação anti-asmática

REFERÊNCIAS

- ABIFISA - Associação Brasileira Das Empresas do Setor Fitoterápico Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Disponível em < <http://abifisa.org.br/faq.asp#29>>. Acesso em 03 abr. 2017.
- ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L.; PERISSUTTI, B.; RODRIGUEZ, L. Effect of Aerosil® 200 on the properties of lipid controlled release microparticles. **Journal of Controlled Release**, v.100, p. 233-246, 2004.
- ALMEIDA, C.L. **Metabólitos secundários de duas espécies de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz) cultivadas sob condições variadas**. 2015. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Campinas, Campina, 2015.
- AL-RAMLI, W.; PRÉFONTAINE, D.F.; MARTIN, J.G.; OLIVENSTEIN, R.; LEMIÈRE, C.; HAMID, Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. **J. Allergy. Cilm. Immunol.**, v. 123, p. 1185-1187, 2009.
- ALVES, L.F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, n. 5, v. 3, p. 450 – 513, 2013.
- ALVES, R.S.A.; VIANNA, F.A.F.; PEREIRA, C.A.C. Clinical phenotypes of severe asthma. **J. Bras. Pneumol.**, v. 34, n. 9, p. 646-653, 2008.
- ALVES, V.C.C. **Avaliação da toxicidade e potencial antiinflamatório do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) de *Justicia pectoralis* e constituintes químicos em neutrófilos humanos**. 2010. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- AMARAL, H.H.S.; AGUIAR, M.A.; ARAÚJO, E.V.O.; SERRA AZUL, F.V.C.; LEAL, L.K.A.M. Padronização e aplicação de modelo experimental de asma exacerbada induzida por ovalbumina e Ips em camundongos BALB/c. *In: II Encontro do PPGCF-UFC e I Simpósio Norte-Nordeste de Ciências Farmacêuticas, 2017. Ceará. Resumos...* Fortaleza: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.
- AOYAMA, E.M.; INDRIUNAS, A. Micromorfologia e anatomia foliar de duas espécies de *Justicia* l. (acanthaceae) de uso medicinal. **Rev. Biol. Neotrop.**, v. 11, n. 2, p. 97-106, 2014.
- ARARUNA, S.M. **Desenvolvimento do extrato seco padronizado por *spray drying* de *Amburana cearensis* a. c. Smith (cumuru): otimização, caracterização e avaliação farmacológica**. 100 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovações Tecnológicas em Medicamentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- ARAÚJO, L.L.N.; FARIA, M.J.M.; SAFADI, G.M.V.V. Prospecção fitoquímica da espécie *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard pertencente à família Acanthaceae. **FaSeMCiências – Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 6, n. 2, 2014.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- AULTON, M.E. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. 2 ed. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 388-390, 2002.
- BARATA, L.E.S. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 57, n. 4, p. 4-5, 2005.

- BARNES, P. J. New therapies for asthma: is there any progress? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 31, n. 7, p. 335-343, 2010.
- BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.
- BARROS, R.F.M.; ANDRADE, L.H.C.; ENCARNAÇÃO, C.R.F. Estarquia em *Justicia pectoralis* var. *stenophylla* Leonard (Acanthaceae): influência da radiação solar. **Phyton**, v. 63, n. 1/2, p. 245-248, 1997.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Imprensa Universitária:Viçosa, 1991.
- BASTOS, V.P.D. **Ação broncodilatadora e anti-inflamatória do 1,8-cineol em modelo experimental de asma em cobaias**. 2009. 164f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- BHARADWAJ, A.; AGRAWAL, D.K. Immunomodulation in asthma: a distant dream or a close reality? **Int. Immunopharmacol.**, v. 4, n. 4, p. 495-511, 2004.
- BIAVATTI, M.W.; KOERICH, C.A.; HENCK, C.H.; ZUCATELLI, E.; MARTINELLI, F.H.; BRESOLIN, T.B.; LEITE, S.N. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. **Z. Naturforsch.**, v. 59, p. 197-200, 2004.
- BISSET, L.R.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 11, p. 35-42, 2005.
- BLOOR, S.J. Novel pigments and copigmentation in the blue marguerite daisy. **Phytochem.**, v. 50, p. 1395-1399, 1999.
- BLUMENTHAL, M. Systematic reviews and meta-analyses support the efficacy of numerous popular herbs and phytomedicines. **Altern. Ther. Health Med.**, v. 15, n. 2, p. 14-15, 2009.
- BOUSQUET, J.; BOUSQUET, P.J.; GODARD, P.; DAURES, J.P. The public health implications of asthma. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, p. 548-554, 2005.
- BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa [do] Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Presidência da República. Decreto nº. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 abr. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 60, de 10 de novembro de 2011. Aprova o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, primeira edição e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, nov. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS)**. 2012b. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: 28 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira** / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 18, de 3 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, maio 2014.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas (COFID). Versão V – Brasília, DF, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 84, de 17 de junho de 2016. Aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, jun. 2016.

BRAUN, A.; TSCHERNIG, T. Animal models of asthma: Innovative methods of lung research and new pharmacological targets. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 57, Supl.2, p. 3-4, 2006.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Microkosmos**, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BUSSE, W. W., A role for neutrophils in asthma exacerbations. **Nature Medicine**, v. 23, n. 6, p.658-659, 2017.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALLAHAN, J.C.; CLEARY, G.W.; ELEFANT, M.; KAPLAN, G.; KENSLER, T.; NASH, R.A. Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 8, p. 355-369, 1982.

CAMERON, C; JACOB, A.S.; THOMAS, E.A.; LEVY, A.S. Preliminary Investigations of the Anti-asthmatic Properties of the Aqueous Extract of *Justicia pectoralis* (Fresh Cut). **West Indian. Med. J.**, v. 64, n. 4, p. 321-323, 2015.

CARDOSO, C. M. Z. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral**. 1. ed. [S.l.]: Pharmabooks, 2009.

- CARDOSO, T. A., RONCADA, C., SILVA, E. R., PINTO, L. A., JONES, M. H., STEIN, R. T., PITREZ, P. M. Impacto da asma no Brasil: análise longitudinal de dados extraídos de um banco de dados governamental brasileiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.43, n. 3, p. 163-168, 2017.
- CARVALHO, S. M. **Análise do comportamento de cementoblastos de ratos em contato com o produto iônico da dissolução de vidros bioativos**. 2010. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- CHAKIR, J.; SHANNON, J.; MOLET, S.; FUKAKUSA, M.; ELIAS, J.; LAVIOLETTE, M.; BOULET, L-P.; HAMID, Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17 and type I and type III collagen expression. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 1293-1298, 2003.
- CHANFRAU, J. E. R. Estudios preliminares de extractos fluidos 30% de *Justicia pectoralis* Jacq. var. stenophylla Leonard. **Rer Cubana Plant Med**, v. 13, n. 4, 2008.
- CHARIANDY, C.M.; SEAFORTH, C.E.; PHELPS, R.H.; POLLARD, G.V.; KHAMBAY, B.P.S. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **J. Ethnopharmacol.**, v. 64, p. 265-270, 1999.
- CHECHINEL-ZANCHETT, C. C. Legislação e controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos nos países do Mercosul. **Infarma**, v. 28(3), p. 123 – 137, 2016.
- CHEN, Y.; WONG, G.W.R.; LI, J. Environmental Exposure and Genetic Predisposition as Risk Factors for Asthma in China. **Allergy Asthma Immunol. Res.**, n. 8, v. 2, p. 92-100, 2016.
- CHENG, W J. F.; CHEN M.; ALLACE D.; TITH S.; ARRHENIUS T.; KASHIWAGI H.; ONO Y.; ISHIKAWA A.; SATO H.; KOZONO T.; SATO H.; NADZAN A. M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF-alpha inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 2411 – 2415, 2004.
- CLODIUS, L.; PILLER, N.B. Conservative therapy for postmastectomy lymphedema. **Chir Plastica**, v. 4, p, 193-202, 1978.
- COMISSÃO DE ASMA DA SBPT. Grupo de Trabalho das Diretrizes para Asma da SBPT. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o manejo da Asma. **J. Bras. Pneumol.**, v. 38, Suplemento 1, p. S1-S46, 2012.
- CONEJERO, L.; et al. Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy. **Clin. Exp. Allergy**, v. 37, p. 331–338, 2007.
- COOKSON, W.O.; MOFFATT, M.F. Asthma: an epidemic in the absence of infection? **Science**, v. 275, n. 5296, p. 41-42, 1997.
- CORRÊA, G.M.; ALCÂNTARA, A.F.C. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 22, v. 1, p. 220-238, 2012.
- CORRÊA, M.F.P.; MELO, G.O. De; COSTA, S.S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18 (Supl.), p. 785-797, 2008.
- COUTO, R.O.; ARAÚJO, R.R; TACON, L.A.; CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R.; FREITAS, L.A.P. Development of a phytopharmaceutical intermediate product via spray drying. **Drying Technology**, v. 29, n. 6, p. 709-718, 2011.

- COVAR, R.A.; STRUNK, R.; ZEIGER, R.S.; WILSON, L.A.; LIU, A.H.; WEISS, S.; TONASCIA, J.; SPAHN, J.D.; SZEFLER, S.J. Predictors of remitting, periodic, and persistent childhood asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, n. 2, p. 359-366, 2010.
- D'AMATO G, SALZILLO A, PICCOLO A, D'AMATO M, LICCARDI G. A review of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) as add on therapy for severe allergic (IgE-mediated) asthma. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 3, p. 613-619, 2007.
- DE VRIES, J. X.; TAUCHER, B.; WURZEL, G. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq. 2. Gas chromatography/mass spectrometry of simple coumarins, 3-phenylpropionic acids and their hydroxyl and methoxy derivatives. **Biomed Enviromen Mass.**, v. 15, p. 413-417, 1988.
- DONG, L.; LI, H.; WANG, S.; LI, Y. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. **J. Asthma**, v. 46, n. 3, p. 229-233, 2009.
- DRASAR, P.; MARAVCOVA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 812, p. 3-21, 2004.
- DUFFIE, J.A.; MARSHALL Jr., W.R. Factors influencing the properties of spray dried materials. **Chemical Engineering Progress**, v. 49, p. 417-423, 1953.
- DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. Florida: CRC Press, 1987.
- DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol. Res.**, v. 112, p. 4-19, 2016.
- EISENBARTH, S.C.; PIGGOTT, D.A.; HULEATT, J.W.; VISINTIN, I.; HERRICK, C.A.; BOTTOMLY, K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 12, p. 1645-1651, 2002.
- FACINONE, S.; PEREIRE DE SIQUEIRA, A.L.; JANCAR, S.; RUSSO, J.M.; BARBUTO, J.A.M.; MARIANO, M.A. A novel murine modelo f late-phase reaction of immediate htpersensitivity. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 127-133, 1997.
- FAHY, J.V. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. **Chest.**, v. 122, p. 320-326, 2002.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasilia: ANVISA, 2010.
- FERNÁNDEZ, L.; MÁZ, R.; SAAD, H. P.; BISCAY, R.; GALÁN, L. Evaluación preliminar de los efectos neurofarmacológicos de *Justicia pectoralis*. **Rev. Cuba. Farm.**, v. 23 (1/2), p. 161-166, 1989.
- FERRADÁ, C.A.R.; SOSA, I.H.; FIALLO, V.R.F. Fecha y distancia de plantación en el cultivo del tilo (*Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard). **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 2003, n. 1, 2003.
- FONSECA, F. N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – chambá: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE – DAD) e avaliação farmacológica**. 2009. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- FONSECA, F.N.; SILVA, A.H.; LEAL, L.K.A.M.. *Justicia pectoralis* Jacq., Acanthaceae: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 871-877, 2010.

- FONTENELE, R.P.; DE SOUSA, D.M.P.; CARVALHO, A.L.M.; OLIVEIRA, F.A. Fitoterapia na Atenção Básica: olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 8, p. 2385-2894, 2013.
- FORTALEZA. Secretaria Municipal de Saúde. **Guia fitoterápico do Programa Farmácia Viva de Fortaleza**. 2004.
- FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.
- FURTADO, J.M.; AMORIM, A.S.; FERNANDES, M.V.M.; OLIVEIRA, M.A.S. Atividade Antimicrobiana do Extrato Aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* Frente a Bactérias de Interesse. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 17, n. 4, p. 233-237, 2015.
- GALLO, L.; BUCALA, V. A Review on Influence of Spray Drying Process Parameters on the Production of Medicinal Plant Powders. **Curr. Drug Discov. Technol.**, v. 15, n. 1. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570163815666180801152918>. Acesso em: 25 jul. 2018.
- GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. Influence of spray drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract physical properties. **Powder Technology**, v. 208, n. 1, p. 205-214, 2011.
- GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of Justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 420-422, 2003.
- GINA. Global Initiative for Asthma. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018**. Bethesda MD: National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute. Disponível em: <file:///C:/Users/Notebook/Desktop/wms-GINA-2018-report-V1.3-002.pdf>. Acesso em 23 jun. 2018.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova.**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOVÍN, L.E.S.; HERNANDEZ, F.L.L.; FIGUEREDO, D.C.; FERRADÁ, C.A.R. Estudio farmacognóstico de *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard. **Rev Cubana Plant Med**, v. 8. 2003. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962003000300005&lng=es&nrm=iso. Acesso em 21 nov. 2017.
- GUILLEMIN, F.; BOMBARDIER, C.; BEATON, D. Cross-cultural adaptation of health-related quality of life measures: literature review and proposed guidelines. **J. Clin. Epidemiol.**, v. 46, n. 12, p. 1417-32, 1993.
- GUYOT, J.C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J.P.; CHULIA, D.; DUCHENE, D.; FERRAND, D.; GOUAHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MALFROID, F.; POURCELOT Y.; RENOUX, R.; SERGOT, S.; TORE, P. Commentaires relatives aux methods generals d'analyses des forms orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. S. T. P. **Pharma Pratiques**, v. 5, n. 6, p. 482-494, 1995.
- HAMELMANN, E.; SCHLEIMER, R.P. Corticosteroid treatment in bronchial asthma: For better or for worse? **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 2, 2003.
- HAN, S.; ZHOU, V.; PAN, S.; LIU, Y.; HORNSBY, M.; MCMULLAN, D.; KLOCK, H.E.; HAUGEN, J.; LESLEY, S.A.; GRAY, N.; CALDWELL, J.; GU, X.J. Identification of

coumarin derivatives as a novel class of allosteric MEK1 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, n. 24, p. 5467-5473, 2005.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder **Int. J. Powder Metall.**, v. 3, p. 7-13, 1967.

HERING, M.G., KLEINEBUDDE P., 2007. Roll compaction/dry granulation: Effect of raw material particle size on granule and tablet properties. **Int. J. Pharm.**, v. 338, p. 110-118, 2007.

HOLGATE, S.T.; DAVIES, D.E.; PUDDICOMBE S.; RICHTER, A.; LACKIE, P.; LORDAN, J.; HOWARTH, P. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 44, p. 24-29, 2003.

HOLGATE, S.T.; WENZEL, S.; POSTMA, D.S.; WEISS, S.T.; RENZ, H.; SLY, P.D. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1-22, 2015.

HOLZSCHUH, M.H. **Estudo da estabilidade de produtos secos obtidos a partir de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Asteracea**. 2008. F. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

HOULT, J.R.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use, "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **ICH Q2(R1)**. Geneva: 2005.

JONAT, S.; ALBERS, P.; GRAY, A.; SCHMIDT, P.C. Investigation of the glidant properties of compacted colloidal silicon dioxide by angle of repose and X-ray photoelectron spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 356–359, 2006.

JOSEPH, H.; GLEYE, J.; MENSAH, L.J.; ROUSSAKIS, C.; GRATAS, C. Justicidin B, a cytotoxic principle from *Justicia pectoralis*. **J. Nat. Prod.**, v. 51, n. 3, p. 599-600, 1988.

JOSEPH, H.; GLEYE, J.; MOULIS, C.; FOURASTE, I.; STANISUS, E. *O*-methoxylated c-glycosylflavones from *Justicia pectoralis*. **J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 804-805, 1988.

JUNGSUWADEE, P., DEKAN, G., STINGL, G., EPSTEINA, M. M. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. **Clinical Immunology**, v. 110, p. 13-21, 2004a.

JUNGSUWADEE, P.; BENKOVSKY, M.; DEKAN, G.; STINGL, G.; EPSTEIN, M.M. Repeated aerosol allergen exposure suppresses inflammation in B-cell deficient mice with established allergic asthma. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 133, p. 126–134, 2004b.

JURD, L.; KING Jr. A.D.; MIHARA, K. Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. **Phytochemistry**, v. 12, n. 12, p. 2965-2970, 1971.

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

- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell. Biol.** v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.
- KELLER, A.C.; MUCIDA, D.; GOMES, E.; FAQUIM-MAURO, E.; FARIA, A.M.; RODRIGUEZ, D. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 117, p. 283–290, 2006.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rer. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
- KUMARI, A.; DASH, D.; SINGH, R. Lipopolysaccharide (LPS) exposure differently affects allergic asthma exacerbations and its amelioration by intranasal curcumin in mice. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 334-342, 2015.
- KUROKAWA, M.; BROWN, J.; KAGAWA, Y.; SHIRAKI, K. Cytokine-regulatory activity and therapeutic efficacy of cinnamyl derivatives in endotoxin shock. **Eur. J. Pharm.**, v. 474, p. 283-293, 2003.
- KUROKAWA, M.; WATANABE, W.; SHIMIZU, T.; SAWAMURA, R.; SHIRAKI, K. Modulation of cytokine production by 7-hydroxycoumarin in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 373-380, 2010.
- LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.; NUNES, L.C.C.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.
- LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A., KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, n. 4, p. 423-53, 1999.
- LAZAAR, A.L.; PANETTIERI, R.A. Pathogenesis and treatment of asthma: recent advances. **Drug Discov Today Disease Mechanisms**, v. 1, p. 111-116, 2004.
- LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, p. 151-159, 2000.
- LEAL, L.H.A.M.; SILVA, A.H.; VIANA, G.S. *Justicia pectoralis*, a coumarin medicinal plant have potential for the development of antiasthmatic drugs? **Braz. J. Pharmacog.**, v. 27, p. 794-802, 2017.
- LEÓN-MARTÍNEZ, F.M.; MÉNDEZ-LAGUNAS, L.L.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficusindica*): Effects on powder properties and characterization. **Carbohydr. Polym.**, 81, p. 864-870, 2010.
- LINHARES, J.H. **Avaliação da eficácia tereapêutica do xarope composto por *Justicia pectoralis*, *Plectranthus ambonicus* e *Mentha arvensis* na asma**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- LINO, C. S. **Efeito farmacológico de *Justicia pectoralis* Jacq. e seus princípios ativos: cumarina e umbeliferona**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

- LINO, C. S.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Res.**, v. 11, p. 211-215, 1997.
- LISANATURA. Laboratórios Lisan, 2013. Disponível em: < <http://www.lisanatura.com/>>. Acesso em: 8 mar. 2015.
- LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. London: Heyden, 1989.
- LIU, A. H.; LIN, Y. H.; YANG, M.; GUO, H.; GUAN, S. H.; GUO, D. A. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn. **J. Chromatography B**, v. 846, p. 32-41, 2007.
- LIU, Y.C.; KHAWAJA, A.M.; ROGERS, D.F. Effects of the cysteinyl leukotriene receptor antagonists pranlukast and zafirlukast on tracheal mucus secretion in ovalbumin-sensitized guinea pigs in vitro. **British J. Pharmacol.**, v. 124, p. 563-571, 1998.
- LOCKLEARA, T.D.; HUANGA, Y.; FRASOR J.; DOYLE, B.J.; PEREZ, A.; GOMEZ-LAURITO, J.; MAHADYA, G.B. Estrogenic and progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. **Maturitas**, v. 66, p. 315-322, 2010.
- LOPEZ-GONZALEZ, J.S.; PRADO-GARCIA, H.; AGUILAR-CAZARES, D.; MOLINA-GUARNEROS, J.A.; MORALES-FUENTES, J.; MANDOKI, J.J. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer**, v. 42, p. 275-283, 2004.
- LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **J. Immunol.**, v. 132, p. 2015-2020, 1984.
- MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as hallucinogenic snuff ingredient. **J. Ethnopharmacol**, v. 12, p. 93-111, 1984.
- MALHEIROS, S.G.L. **Estudo farmacobotânico de seis espécies de uso medicinal no Nordeste brasileiro**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- MÁS, R.; MENÉNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, L.; SAAD, H.P.; RIVERA, R.L.; KAMMERER, E. Posee *Justicia pectoralis* las características farmacológicas de los neurolépticos clásicos? **Estudios avanzados en neurociencias. s.l**, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, p. 273-283, 1987.
- MATOS, F.J.A. **Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Editora UFC, 2000.
- MATOS, F.J.A. O projeto farmácias-vivas e a fitoterapia no nordeste do Brasil. **Rev. Cienc. Agrovet.**, v.5, n.1, p.24-32, 2006.
- MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitaria, 2007.
- MAUAD, T.; BEL, E.H.; STERK, P.J. Asthma Therapy and Airway Remodeling. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 5, p. 997-1009, 2007.
- MELO, R.F.; ANDRADE, L.H.C. Contribuição ao estudo farmacognóstico do chambá - *Justicia pectoralis* Jacq (Acanthaceae). **Biologica Brasílica**, v. 1, p. 195-207, 1989.

- MENDEZ, A. S. L. et al. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 32, p. 105-111, 2011.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.
- MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* L. Urban (Convolvulaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, p. 105-109, 2004.
- MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.1, p.94-101, 2007.
- MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.
- MINSAP, 1992. Objetivos, propósitos e directrices para incrementar la salud de la población cubana. 1992-2000. La Habana. Cuba. MINSAP.
- MONTERO, A. C. R.; ARNÁEZ, G. P.; ESPERÓN, N. F.; BARRO, A. M. B.; PÉREZ, M. E. A.; RODRÍGUEZ, A. M. Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. **Rev. Toxicol.**, v. 18, p. 75-78, 2001.
- MORTON, J.P. Some folk-medicine plants of Central American markets. **Quat. J. Crude Drug Research**, v. 15, p. 162-165, 1977.
- MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOURA, C.T.M.; BATISTA-LIMA, F.J.; BRITO, T.S.; SILVA, A.A.V.; FERREIRA, L.C.; ROQUE, C.R.; ARAGÃO, K.S.; HAVT, A.; FONSECA, F.N.; LEAL, L.K.A.M.; MAGALHÃES, P.J.C. Inhibitory Effects of a Standardized Extract of *Justicia pectoralis* in an Experimental Rat Model of Airway Hyper-Responsiveness. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 69, n. 6, p. 722 – 732, 2017.
- MOURA, J.A.R.; CAMARGOS, P.A.M.; BLIC, J. Tratamento profilático da asma. **J. pediat.**, v. 78 (supl. 2), p. 141-150, 2002.
- MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds: a review. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 793-829, 2011.
- MURAKAMI, D.; YAMADA, H.; YAJIMA, T.; MASUDA, A.; KOMUNE, S.; YOSHIKAI, Y. Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 37, n. 3, p. 339-347, 2007.
- MURRAY R. D. H. Coumarins. **Nat. Prod. Rep.**, v. 8, p. 591-624, 1989.
- MUZAFFAR, K.; DINKARRAO, B.V.; KUMAR, P. Optimization of spray drying conditions for production of quality pomegranate juice powder. Food Science & Technology, 2016. Disponível em: <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1127583.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2018.
- NASCIMENTO, W.M.C. Xarope de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) no tratamento da tosse e sintomas respiratórios: um ensaio clínico randomizado. 2018. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2018.

- NEILL, D.; MCKENZIE, A.N.J. TH9: the latest addition to the expanding repertoire of IL-25 targets. **Immunol. Cell Bio.**, v. 88, p. 502-504, 2010.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NGUYEN LT, LIM S, OATES T, CHUNG KF. Increase in airway neutrophils after oral but not inhaled corticosteroid therapy in mild asthma. **Respiratory Medicine**. v. 99, p. 200-207, 2005.
- NOBRE, M.E.P.; LEITE, G.L.; BARBOSA, M.A. C.; PROHASKA, F.; SOUSA, L.R.; SÓLON, P.C.D.; DE BRITO, S.P.C.; VIANA, G.S.B. Avaliação da eficácia do xarope de chambá (*Justiciapectoralis* Jacq.) na função pulmonar de pacientes asmáticos. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 4, n. 1, p. 4-10, 2006.
- NOBRE, M.E.P.; LEITE, G.L.; BARBOSA, M.A.C.; SOUSA, L.R.; SÓLON, P.C.D.; DE BRITO, S.P.C.; VIANA, G.S.B. Avaliação da eficácia do xarope de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) na função pulmonar de pacientes asmáticos. **J Bras Fitomed**, v. 4, p. 4-10, 2006.
- OLIVEIRA, A.F.M.; ANDRADE, L.H. Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. gendarussa* Burm. F. (Acanthaceae). **Acta Amazônica**, v. 30, p. 569-578, 2000.
- OLIVEIRA, A.F.M.; XAVIER, H.S.; SILVA, N.H.; ANDRADE, L.H.C. Screening cromatográfico de Acanthaceae medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. geradarussa* Burm. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 3, n. 1, p. 37-41, 2000.
- OLIVEIRA, J.S.B. **Estudo comparativo entre os enantiômeros da carvona em modelos de inflamação aguda e de hipersensibilidade imediata**. 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.
- OMS – Organização Mundial de Saúde. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Geneva, 2002.
- PARRA, A.L.; YEHBRA, R.S.; SARDIÑAS, G.I.; BUELA, L.I. Comparative Study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PEIXOTO, M. P. G. **Obtenção do extrato seco das sementes de *Syzygium cumini* L. e avaliação da atividade hipoglicemiante**: 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- PETERS, S.P.; FERGUSON, G.; DENIZ, Y.; REISNER, C. Uncontrolled asthma: a review of the prevalence, disease burden and options for treatment. **Respir. Med.**, v. 100, p. 1139-1151, 2006.
- PILLER, N.B. Drug-induced proteolysis: a correlation with oedema-reducing ability. **Br. J. Exp. Path.**, v. 57, p. 266-273, 1976.
- PINTO, M.V. **Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Astraceae (Guaco)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Farmácia. Goiânia, 2011.

- PINTO, M.V.; OLIVEIRA, E.M.; MARTINS, J.R.L.; DE PAULA, J.R.; COSTA, E.A.; DA CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T. Obtaining a dry extract from the *Mikania laevigata* leaves with potential antiulcer activity. **Pharmacogn. Mag.**, v. 13, n. 49, p. 76-80, 2017.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. v. 1. 1996.
- PROFICE, S.R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A.L.A.; BRAZ, D.M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C.; EZCURRA, C.; WASSHAUSEN, D. *Acanthaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21673>>. Acesso em: 13 ago. 2016.
- QUINTÃO, N.L.; ANTONIALI, C.S.; DA SILVA, G.F.; ROCHA, L.W.; DE SOUSA, M.M.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; LUCINDA-SILVA, R.M.; BRESOLIN, T.M.; FILHO, V.C. Aleurites moluccana and its main active ingredient, the flavonoid 2''-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, n. 102, v. 2, p. 302 – 311, 2012.
- RAHMAN, S.Z.; SINGHAL, K.C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports**, v. 17, suppl., 2002.
- RAMESH, B.; PUGALENDI, K. V. Antihyperlipidemic and antidiabetic effects of umbelliferone in streptozotocin diabetic rats. **Yale J. Biol. Med.**, v. 78, n. 4, p. 189–196, 2005.
- RAMESH, B.; PUGALENDI, K. V. Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. **Life Sci.**, v. 79 (3), p. 306-310, 2006.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- RANKELL, A.S.; LIEBERMAN, H.A.; SCHIFFMAN, R.F. 2001. Secagem. In: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Vol 1. Lisboa: Calouste.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- ROCHA, L.; LUCIO, E.M.A.; FRANÇA, H.S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Rev. Bras. Farmacogn.**, n. 18 (supl.), p. 744 – 747, 2008.
- RODRÍGUEZ CHANFRAU, J.E.; LÓPEZ, O.D.; NÚÑEZ, Y.; RODRÍGUEZ, C.C.; GIL APAN, J.M.; ECHEVERRIA, C. Obtención de una Materia Prima de Calidad Farmacéutica a partir de Extractos de *Justicia pectoralis* Jacq., mediante Secado por Aspersión. Desarrollo Tecnológico a partir de Extracto Hidroalcohólico al 30%. **Lat. Am. J. Pharm.**, n.27, v. 3, p. 333-338, 2008a.
- RODRIGUEZ CHANFRAU, J.E.; ROCHE, A.; VEJA, R.; RODRIGUEZ, C.; CARBALLO, C.; GUERRA, I.; CARRILLO, C. Estudios preliminares de extractos fluidos 30% de *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 13, n. 4, 2008b.
- RODRÍGUEZ, C.J.E.; LÓPEZ, H.O.D.; NÚÑEZ, F.Y.; RODRÍGUEZ, F.C.; NOGUEIRA, M.A. Obtención de extractos secos a partir de extractos acuosos de *Justicia pectoralis* (tilo). **Rev. Cubana Plant. Med.**, 18(4), p. 443-454, 2013.

ROHINI, K.; SRIKUMAR, P.S. Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds. **J. Thermodyn. Catal.**, v. 5, n. 2, 2014. Disponível em <file:///C:/Users/aline.holanda/Downloads/therapeutic-role-of-coumarins-and-coumarinrelated-compounds-2157-7544-5-130.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2017.

SAAD, P.H.; MÁ S, R.; FERNÁNDEZ, L.; RIVERA, L. R. *Justicia pectoralis* no previne las convulsiones inducidas por PTZ y PTX. In: Centro Nacional de Investigaciones Científicas. **Estudios avanzados en neurociencias. s.l**, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, p. 265-72, 1987.

SANTANA, E.N.; ROCHA, M.M.L.; LEITE, G.L.; SOLON, P.C.D.; SANTIAGO, K.M.; DANTAS-NETO, J.S.; ALENCAR, B.E.R.; GONÇALVES, A.L.V.; MIRANDA, R.M.S.; RODRIGUES, T.A.; VIANA, G.S.B.; NOBRE, M.E.P. Avaliação da eficácia do xarope de chambá (*Justicia pectoralis*) no tratamento da asma intermitente, persistente leve ou persistente moderada em crianças de 6 à 12 anos. In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007. São Paulo. **Resumos... Águas de Lindoia: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007.** Disponível em: <http://www.fesbe.org.br/fesbe2007/cd/resumos/44.088.html>. Acesso em: 19 out. 2016.

SANTOS, L.A.; OLIVEIRA, M.A.; FARESIN, S.M.; SANTORO, I.L.; FERNANDES, A.L.G. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 40, n. 7, p. 943-948, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 371-400.

SENRA, J.F.V. **Avaliação da atividade farmacológica de substâncias purificadas a partir de plantas do semi-árido brasileiro no modelo de asma brônquica**. 2007. 55f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2007.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference on harmonization. **J. Chromatogr. A**, v. 987, p.57-66, 2003.

SHIMIZU, T.; HIRANO, H.; MAJIMA, Y.; SAKAKURA, Y.A. Mechanism of antigeninduced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats: a comparasion with lipopolysaccharide-induced muçus production. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, v. 161, p. 1648-1654, 2000.

SHIMIZU, T.; SHIMIZU, S.; HATTORI, R.; MAJIMA, Y.A. A mechanism of antigen-induced globet cell degranulation in the epithelium of sensitized rats. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 112, p. 119-125, 2003.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. A.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, n. 4, p. 447-454, 2006.

SILVA, P.T.; FRIES, L.L.M.; MENEZES, C.R.; HOLKEM, A.T.; SCHWAN, C.L.; WIGMANN, E.K.; BASTOS, J.O.; SILVA, CB. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.

- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.
- SOARES E SILVA, L.; DA SILVA, L.S.; BRUMANO, L.; STRINGHETA, P.C.; PINTO, M.A.O.; DIAS, L.O.M.; MULLER, C.S.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L.; CASTRO, H.C.; DO AMARAL, M.P.H. Preparation of Dry Extract of *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) and Determination of Its Coumarin Levels by Spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules**, n. 17, p. 10344-10354, 2012.
- SOARES, A.K.A.; CARMO, G.C.; QUENTAL, D.P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F.A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinales*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários sadios. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.
- SOARES, L.A.L.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. SCHMIDT, P.C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. **AAPSA Pharm. Sci. Tech.**, v. 6, n. 3, 2005.
Disponível em:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750380/pdf/12249_2008_Article_63359.pdf
f. Acesso em: 14 jan. 2017.
- SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray drying technique II: current applications in pharmaceutical technology. **J. Pharmaceutical Sci.**, v. 99, n. 2, p. 587-597, 2010.
- SONAGLIO, D; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos**. In: Simões CMO, (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/ UFRGS; 2007. p. 289-327.
- SOUSA, A.L.V. **Abordagem farmacoterapêutica ma asma**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro, 2011.
- SOUSA, M.P. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**, Fortaleza: Impr. Universitária, 1991.
- SOUZA, A.V; FERNADES, J.F.; TRAVALLI, J.B.; GALVÃO, P.; PEDRO, M.A.M. Aplicação da secagem por spray drying para a produção de extratos vegetais secos. III Encontro Científico da UNILAGO. 2011. (Encontro).
- SOUZA, F.S.; MACIEL, C.C.S. Produtos fitoterápicos e a necessidade de um controle de qualidade microbiológico. VEREDAS FAVIP. **Revista Eletrônica de Ciências**, v. 3, n. 2, 2010.
- SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.
- STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug. [Editorial]. **Drug Discov. Today**, v. 5, n.2, p. 39-41, 2000.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

- TAVARES, E.S.; VIANA, V.R.C. Contribuição ao estudo de *Justicia pectoralis* Jacq. – Anador. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 76, n. 3, p. 63-66, 1995.
- THORNE, P.S.; KULHANKOVA, K.; YIN, M.; COHN, R.; ARBES, S.J. JR; ZELDIN, D.C. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 172, p. 1371–1377, 2005.
- TODO-BOM, A.; PINTO, A.M. Fisiopatologia da asma grave. **Rev. Bras. Alergia Imunopat.**, v. 29, n. 3, p. 113-116, 2006.
- TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev. Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.
- TOLEDO, D.B.; JIMÉNEZ, E.M.; CÁRDENAS, M.B.; COSTA, L.E.D.; SIMEÓN, A.R.; MORGADO, E. B.; PRADO, E. A. S. Evaluación, de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 3, 2007.
- TOLLER, A. B.; SCHMIDT, C. A. Excipientes à base de celulose e lactose para compressão direta. **Disciplinarum Scientia**. Série Ciências da Saúde, v. 6, n. 1, p. 61-79, 2005.
- TONON, R.N.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 2, p. 444-450, 2009.
- TROVÃO, D.M.B.M.; FERNANDES, P.D.; DE ANDRADE, L.A.; DANTAS NETO, J. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.**, v.11, n. 3, p. 307–311, 2007.
- TRUEBA, G. P.; MARTÍNEZ, R. R.; RUIZ, Z. P.; CHANFRAU, J. R. Evaluación de la actividad antioxidante de *Justicia pectoralis* Jacq **Rev. Cubana Invest. Bioméd.**, v.20, p. 30-33, 2001.
- TSUCHIYA, K.; SIDDIQUI, S.; RISSE, P-A.; HIROTA, N.; MARTIN, J.G. The presence of LPS in OVA inhalations affects airway inflammation and AHR but not remodeling in a rodent model of asthma. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 303, p L54–L63, 2012.
- TUYEN, C. K.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidante properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 385–392, 2010.
- UNITED NATIONS. Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GSH. 2ed. Geneva, 2007. Disponível em: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html>. Acesso em: 05 ago. 2016.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 29. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.
- VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características os extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.
- VASCONCELOS, J.F.; TEIXEIRA, M.; BARBOSA FILHO, J.M.; SOARES M. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 609, p. 126-31, 2009.

- VEIGA JÚNIOR, V.F. 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.
- VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, vol. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VENÂNCIO, E.T. **Avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá): estudo de neuroproteção e mecanismo de ação.** 2015. 182 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- VENÂNCIO, E.T.; ROCHA, N.F.M., RIOS, E.R.; FEITOSA, M.L.; LINHARES, M.I.; MELO, F.H.C.; MATIAS, M.S.; FONSECA, F.N.; SOUSA, F.C.F.; LEAL, L.K.A.M.; FONTELES, M.M.F. Anxiolytic-like effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (SEJP) in mice: Involvement of GABA/benzodiazepine in receptor. **Phytoter. Res.**, v. 25, n. 3, p. 444-450, 2011.
- VIANA, G.S.B.; LEAL, L.K.A.M.; VASCONCELOS, S.M.M. **Plantas Medicinais da Caatinga: atividades biológicas e potencial terapêutico.** Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2013.
- VIANA, O.S.; JÚNIOR, J.B.; SILVA, R.M.F.; MEDEIROS, P.M.; JÚNIOR, S. G; ALBUQUERQUE, M.M.; NETO, P.J.R. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz - terapia anti-HIV. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, p. 505-511, 2006.
- VITALI, L.; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, F.T.; GONÇALVES, N.S. Microencapsulação do agente quelante sulfoxina em microesferas de quitosana preparadas por *spray drying* como novo adsorvente para íons metálicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1400 – 1404, 2008.
- VOIGT, R., BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica.** Zaragoza: Acríbia, 1982.
- WALTON, D.E.; MUMFORD, C.J. Spray dried products – characterization of particle morphology. **Chem. Eng. Res. Des.**, v. 77, n. 1, p. 21-38.
- WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: Aulton ME. **Delineamento de formas farmacêuticas.** Porto Alegre: Artmed, Cap. 8, p.124-148, 2005.
- WELLS, J.I. **Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances.** John Wiley & Sons: New York, 1988.
- WENIGER, B.; SAVARY, H.; DAGUIHL, R. Triphytochimique de plantes de la liste **TRAMIL**. Laboratoire de chimie des substances naturelles, Faculté de médecine et de pharmacie, Université d'Etat d'Haïti, Port au Prince, Haïti. **TRAMIL I**, Port au Prince, Haïti, Fac. de Médecine/enda-caribe. 1984.
- WHO, 2017. Asthma. Fact sheet Updated April 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>. Acesso em: 25 jan. 2018.
- YRJÖNEN, T. **Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in Analysis of Natural Products.** University of Helsinki: Helsinki, 2004.
- YUSOP, F.H.M.; MANAF, S.F.A.; HAMZAH, F. Preservation of bioactive compound via microencapsulation. **Chemical Engineering Research Bulletin**, v. 19, p. 50-56, 2017.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W.S.M.; FÁVERO, M.L.D.; CORREA JÚNIOR, C.; STREMEL, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.14, n.1, p. 29-39, 2004.

ZHANG, J. L.; CUI, M.; HE, Y.; YU, H. L.; GUO, D. A. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 36, p. 1029–1035, 2005.

ZHAO, L.; HUANG, C.; SHAN, C.; XIANG, B.; MAI, L. Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC–MS. **J. Chromatogr. B**, v. 821, p. 67–74, 2005.