
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE *JUSTICIA ACUMINATISSIMA* (MIQ.) BREMEK. SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

STUDY OF THE INFLUENCE OF THE *JUSTICIA ACUMINATISSIMA* (MIQ.) BREMEK. ABOUT THE PLAQUET AGGREGATION AND SANGUINE COAGULATION

VERDAM, Maria Christina dos Santos ¹; OHANA, Débora Teixeira ²; LIMA, Émerson
Silva ³; PEREIRA, Maria De Meneses ⁴; DIAS Josiane de Fátima Gaspari⁵;

1 - Mestranda do Programa de Pós Graduação em Patologia Tropical pela Universidade Federal do Amazonas
– UFAM email:christinaverdam@hotmail.com

2, 3 e 4- Professor (a) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas -
UFAM

5- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná - UFPR

REC:03/09 AC:03/09

RESUMO:

Justicia acuminatissima (Miq.) Bremek (Acanthaceae) é uma espécie vegetal amplamente utilizada pela população do estado do Amazonas devido às suas propriedades medicinais antiinflamatórias. É conhecida popularmente como “sara-tudo” e suas folhas são utilizadas em decoctos, infusões e macerações. Baseado em relatos de seu uso, o presente trabalho avaliou a interferência da preparação extrativa das folhas obtida por maceração aquosa sobre agregação plaquetária e coagulação sanguínea. Nenhuma influência significativa estatisticamente foi observada sobre as duas cascatas, não sendo possível calcular o IC 50.

Palavras-chave: Acanthaceae, agregação plaquetária e coagulação sanguínea.

ABSTRACT:

Justicia acuminatissima (Miq.) Bremek (Acanthaceae) is a vegetable species thoroughly used by the population of the state of Amazonas due to their anti-inflammatory medicinal properties. It is known popularly as “sara-tudo” and their leaves are used in decoctions, infusions and macerations. Based on reports of its use, the present paper evaluated the interference of the extractive preparation of the leaves obtained by aqueous maceration about plaquet aggregation and sanguine coagulation. No influence statistically significant was observed on the two cascades, not being possible to calculate IC 50.

Key words: Acanthaceae, plaquet aggregation and sanguine coagulation.

1. INTRODUÇÃO

Espécies vegetais são utilizadas pelas mais diversas populações como fonte de acesso aos cuidados de saúde, muitas vezes sendo este o único recurso possível e ainda uma das práticas mais antigas da humanidade. No Brasil o consumo de espécies vegetais é uma realidade, em especial das espécies amazônicas (BORRAS, 2003). A espécie *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek é um membro da família Acanthaceae utilizada no Norte do Brasil, conhecida pela população do Amazonas como sara-tudo, além de ser utilizada com finalidades ornamentais e medicinais (SANTOS; 2006). O chá de sua folha é utilizado para alívio e cura de processos inflamatórios utilizando diferentes processos extrativos. Baseado nesse uso resolveu-se investigar a atividade do macerado aquoso das folhas dessa espécie sobre duas cascatas bioquímicas importantes: a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DO MATERIAL

A coleta foi realizada no município do Careiro Castanho, no estado do Amazonas e classificada taxonomicamente pelo Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, onde uma exsicata foi depositada sob número 224414.

2.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

As folhas de *J.acuminatissima* foram secas em estufa durante 72 horas a 40 °C e trituradas em moinhos de facas até que se encontrasse sob forma de pó. A este triturado adicionou-se água destilada o qual permaneceu sob agitação em maceração por 72 horas. Em seguida, foi filtrado sob vácuo e liofilizado. O liofilizado foi ressuspenso em água no momento do uso.

As amostras de sangue foram coletadas de voluntários sadios oriundos da Fundação de Hematologia do Amazonas – HEMOAM. Todas as amostras foram coletadas em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante. O projeto de pesquisa teve aprovação emitido pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, protocolado sob número 038/2006.

Para o ensaios de agregação plaquetária as doses testadas foram de 40, 10, 5 e 2,5 mg/ml e para coagulação sanguínea as doses foram de 10, 5 e 2,5 mg/ml.

Aos resultados foi aplicado o Teste estatístico de Dunnett's (utilizado quando se pretende comparar as médias dos tratamentos apenas com a média do controle).

2.3. ESTUDO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

O estudo de agregação plaquetária foi realizado de acordo com BORN (1962). As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas duas vezes consecutivas, por cinco minutos e 1500 rpm, com o objetivo de retirar a fração sobrenadante (denominada de Plasma Rico em Plaquetas – PRP). A plaquetometria da amostra foi avaliada em Analisador Hematológico, sendo considerado adequado para análise valores $300 \times 10^3 / \mu\text{L} + \text{ou} - 20$. A amostra foi centrifugada novamente, por 5 minutos e 3000 rpm, para coleta do Plasma pobre em plaquetas – PPP, que serve como branco do teste. O PRP (385 μl) foi incubado juntamente com a amostra testada em tubo a 37 °C por 1 minuto no agregômetro. Após esse tempo, o agregante plaquetário foi adicionado (10 μL) e mediu-se a porcentagem de agregação plaquetária durante 5 minutos em agregômetro de plaquetas. Os valores foram comparados ao controle do teste, que foi realizado utilizando o PRP acrescido de água destilada e o agregante plaquetário ADP. Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados foram comparados ao controle.

2.4. ATIVIDADE SOBRE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A atividade das amostras sobre a coagulação sanguínea foi avaliada por meio dos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada

(TTPA). Para tanto utilizou-se o método de BROWN adaptado por OSONIYI e ONAJOBI (2003). Os testes foram realizados em coagulômetro tendo como critério para o término, a formação do coágulo.

2.4.1. Tempo de protrombina (TP)

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, a fração Plasma Pobre em Plaquetas- PPP foi recolhida para ser utilizada no teste. Para este ensaio utilizou-se o reagente *thromboplastin-SI* (extrato liofilizado de cérebro de coelho 2,6% e cloreto de cálcio 0,13%), o qual foi reconstituído com água destilada de acordo com o manual do fabricante, e incubado a 37 °C por 10 minutos antes do início do teste. Nesse teste, o tempo de formação do coágulo foi registrado e comparado com o controle, servindo como parâmetro de avaliação. O controle do PPP foi realizado visando avaliar a coagulabilidade do plasma. As quantidades de cada componente do teste foram colocadas como descrito na tabela 1.

TABELA 1 - QUANTIDADE DE REAGENTES PARA A DETERMINAÇÃO DE TEMPO DE PROTROMBINA

PPP (µL)	Reagente (µL)	Amostra (µL)	Tipo de amostra
50	100	-	Controle do PPP
50	96	4	Controle - H ₂ O
50	96	4	Teste (10, 5 e 2,5 mg/ml)

2.4.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

As amostras de sangue foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, o PPP foi recolhido para ser utilizado no teste. Foram utilizados no teste o reagente hemoStat aPTT-EL (extrato de cérebro de coelho cloroformizado) e Cloreto de Cálcio. A tabela 2 descreve a quantidade de cada componente utilizado no ensaio.

TABELA 2 - QUANTIDADE DE REAGENTES PARA A DETERMINAÇÃO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

PPP (µL)	Reagente (µL)	CaCl ₂ (µL)	Amostra (µL)	Tipo da amostra
30	30	40	-	Controle PPP
30	30	36	4	Controle - H ₂ O
30	30	36	4	Teste (10, 5 e 2,5 mg/ml)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos principais efeitos colaterais causados pelos antiinflamatórios utilizados na clínica advém da intervenção dessa classe terapêutica na agregação plaquetária, causada pela inibição da COX-1, interferindo na produção de PAF e TXA2. Desta maneira, desejou-se avaliar o efeito das amostras de *Justicia acuminatissima* (Miq) Bremek sobre a agregação plaquetária, baseados em suas propriedades antiinflamatórias relatadas pelo uso popular. O teste foi realizado nas concentrações de 40, 20, 10, 5 e 2,5 mg/mL, não sendo possível realizar esse teste em concentrações ainda maiores, uma vez que a detecção da avaliação da capacidade inibidora da agregação plaquetária é feita baseada na medida de formação de agregados de plaquetas, após exposição a agente agregante. Esta avaliação é realizada em aparelho agregômetro, um espectrofotômetro que mede a variação na transmissão de luz através da suspensão de plaquetas utilizada no teste (PIEADADE *et al.*, 2003). Acima dessas concentrações houve impossibilidade de realização de leitura do teste devido à coloração verde-vermelha intensa da amostra. Não foi observada inibição estatisticamente significativa da agregação plaquetária das amostras testadas, sendo o resultado igual ao do controle (Tabela 3).

A avaliação das amostras sobre a coagulação sanguínea se baseou nos metabólitos secundários encontrados em screening fitoquímico realizado com a espécie, em especial a presença de cumarinas (VERDAM, 2009). As cumarinas apresentam atividade sobre a coagulação sanguínea bem descrita na literatura (SIMÕES *et al.*, 2000). Tanto o teste de avaliação TP quanto o teste TTPA não mostraram diferenças entre os valores dos grupos testados (Tabela 3). Desta maneira, não foi possível o cálculo da Concentração Inibitória 50% (IC₅₀), uma vez que não houve significância estatística nos testes.

TABELA 3 - RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Agregação Plaquetária					
	Controle	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	40 mg/ml
Médias	83.33a	80.00a	83.33a	93.33a	80.00a
Coagulação Sanguínea					
	Controle	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	
Médias - TP	15.85a	17.55a	15.95a	15.40a	
Médias - TTPA	44.50a	43.40a	35.35a	44.80a	

LEGENDA: TP = Tempo de Protombina e TTPA = Tempo de tromboplastina parcial ativada

4. CONCLUSÕES

A utilização de macerado aquoso pode ser responsável pelos resultados apresentados nos ensaios de agregação plaquetária e coagulação sanguínea. Nesta perspectiva, novos ensaios biológicos serão realizados com o extrato etanólico e frações hexano, diclorometano e acetato de etila da referida espécie.

REFERÊNCIAS

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

BORRAS, M.R.L. **Plantas da Amazônia medicinais ou mágicas**. Plantas comercializadas no mercado municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Editora Valer, 2003.

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

PIEIDADE, P.R.; GAGLIARDI, J.; DAMIANI, I.T.; JUNIOR, A.P.N.; FUZARO, M.M.; SANVITO, W.L. Papel da curva de agregação plaquetária no controle da antiagregação na prevenção secundária do acidente vascular cerebral isquêmico. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v.61, p.763-767, 2003.

SANTOS, J.L. dos. **Uso e diversidade de espécies vegetais cultivadas na reserva de desenvolvimento sustentável do Tupé**. 2006, Manaus - AM, 86p. Dissertação de Mestrado em Agricultura no trópico úmido – Instituto de Pesquisas da Amazônia, Amazonas.

SIMÕES, C.M.O .; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. ; MENTEZ, L.A .; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis:Editora da UFSC e Porto Alegre:Editora da UFRGS, 2000.

VERDAM, M.C. dos S. **Estudo farmacognóstico e abordagem farmacológica de *Justicia acuminatissima* (Miq.) Bremek. (Acanthaceae)**. 2009, Manaus – AM, 100p. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical – Universidade Federal do Amazonas.