

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE QUÍMICA DE EXTRATOS DA ESPÉCIE *Justicia acuminatissima*.

Autores: Maria Beatriz Silva Costa ⁽¹⁾, João Ferreira Reis Neto⁽¹⁾, Márcio Tadeu Pereira⁽²⁾, Dominique Fernandes de Moura do Carmo ⁽¹⁾, Renata Takeara ⁽¹⁾, Geone Maia Corrêa⁽¹⁾.

Filiação/email/Endereço: 1. Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET/ e-mail: mbsc_14@hotmail.com /Endereço: Nossa Senhora do Rosário, Tiradentes, CEP 69100000 - Itacoatiara, AM – Brasil.

2. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte-MG, Brazil/e-mail: mtp@cdtn.br

Resumo: A espécie *Justicia acuminatissima* conhecida popularmente como “sara-tudo” é uma planta que possui flores róseas, pertencente à família Acanthaceae, é bastante utilizada na medicina popular da Amazônia para tratar diversas enfermidades. Baseado neste contexto, este trabalho procurou avaliar a integridade química dos preparos de *J. acuminatissima* após exposição a diferentes doses de radiação gama. Para esse estudo foi realizada a extração dos constituintes químicos das flores dessa espécie através do processo de maceração. As avaliações cromatográficas realizadas com as amostras obtidas permitiram detectar compostos fenólicos, triterpenos, saponinas e alcaloides. Essas análises também mostraram que doses de até 20 kGy não afetam a integridade química dos compostos presentes em *J. acuminatissima*. O extrato bruto em etanol apresentou citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Dessa forma, estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de novos fitoterápicos com possibilidades terapêuticas.

Palavras-chave: Acanthaceae, *Justicia acuminatissima*, Radiação gama.

1 INTRODUÇÃO

Acanthaceae é uma família que recebe destaque dentre as muitas famílias vegetais presentes na flora brasileira, visto que, no Brasil compreende cerca de 40 gêneros e 542 espécies (BRAZ *et al.*, 2002), apresenta grande quantidade de compostos químicos (PEREZ, 2004), sendo conhecida por apresentar espécies vegetais usadas como medicamento para a febre e para a dor (CHEN, 1996). De acordo com a literatura, muitas espécies de *Justicia* são usadas pela medicina popular, principalmente para o tratamento de problemas respiratórios (como broncodilatadores), doenças de pele, inflamações, hemorroidas, distúrbios de estômago (como digestivo), febre, reumatismo, artrite, dor de cabeça, dor de ouvido, câncer e HIV/SIDA (Corrêa, 2013). A espécie *Justicia acuminatissima*, pertencente à família Acanthaceae, tem como sinônimo *Justicia calycina*, sendo muito empregada popularmente na região amazônica no tratamento de diversas enfermidades e, por isso, é conhecida como “sara-tudo” (CORRÊA e ALCÂNTARA, 2012).

Atualmente muitas plantas medicinais são tradicionalmente usadas como medicamentos, assim, acredita-se que medicamentos fitoterápicos possuam menos efeitos colaterais e sejam mais seguros para o consumo. Porém, a contaminação microbiológica de plantas medicinais pode ocorrer durante o processamento de pré ou pós-colheita, sendo



considerado um fator importante a ser analisado e combatido durante a produção dos fitoterápicos (SORIANI *et al.*,2005). A partir desses fatos, existe uma preocupação constante com o consumidor em relação à qualidade das matérias-primas. Para isso, pesquisas envolvendo eliminação da carga microbiana presente em plantas medicinais são extremamente relevantes. A radiação gama fornece um método alternativo e efetivo para reduzir ou eliminar a contaminação microbiana de ervas medicinais e outros materiais vegetais (FARKAS,1998; ARAÚJO *et al.*, 2017).

Dessa forma, faz-se necessário a avaliação da composição química das flores e o estudo das atividades biológicas desta espécie, pois estes estudos poderão contribuir para o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do vegetal

As flores de *Justicia acuminatissima* foram coletadas de espécie localizadas nas proximidades do município de Itacoatiara, nas coordenadas (S 03° 08' 28,8" e W 58° 26' 54,3"). Parte da amostra (300 g) foi selecionada para a extração e outra parte para preparação de exsicata, que se encontra depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas, no Instituto de Ciências Biológicas, sob o número 8270.

2.2 Preparo dos extratos e fracionamento

Uma alíquota contendo 150 g de flores in natura, foram macerados em etanol absoluto. Após filtração, o material obtido foi submetido ao evaporador rotatório para concentração do extrato bruto denominado (EJetOH). Esse procedimento foi realizado durante cinco vezes até extração exaustiva dos constituintes químicos por um período de 48 h a cada extração.

Outra alíquota com 150 g de flores in natura, foram macerados com solventes em ordem crescente de polaridade, a saber: hexano (FJH), diclorometano (FJD), acetato de etila (FJA) e metanol (FJM). As amostras obtidas foram concentradas em evaporador rotatório a pressão reduzida e seus rendimentos foram finalmente calculados. Para estes procedimentos também foram realizadas extrações exaustivas por um período de 48 h a cada extração e troca de solventes. Alíquotas das amostras obtidas (FJH, FJD, FJA, FJM e EJetOH) foram submetidas à radiação gama, e posteriormente avaliadas por cromatografia de camada fina.

2.3 Avaliação em placas cromatográficas

O perfil químico foi obtido direcionando-se o protocolo para avaliar a presença de terpenos, alcaloides, fenólicos e flavonoides, usando para isso reagentes reveladores específicos, como: solução de NP/PGE, cloreto férrico, vanilina e Dragendoff. (GUIMARÃES,2005).

2.4 Radiação gama

As amostras obtidas foram irradiadas a doses variáveis de 1, 5, 10 e 20 kGy em equipamento do tipo Irradiador Panorâmico Múltipropósito de Categoria II, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, com fonte de Cobalto-60 estocada a seco em atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Ci. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Irradiação Gama (Comissão Nacional de Energia Nuclear do CDTN em Belo Horizonte - MG, sob orientação do Dr. Márcio Tadeu Teixeira. As amostras irradiadas foram avaliadas por Cromatografia de Camada Fina (CCF) com o objetivo de verificar a integridade química dos compostos de *J. acuminatissima*.



2.5 Teste de citotoxicidade em *artemia salina*

O teste de citotoxicidade em *Artemia salina* foi realizado com o extrato bruto obtido (EJetOH), que foram diluídos em DMSO nas concentrações de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, as amostras previamente diluídas foram adicionadas em alíquotas de 5,0 mL de solução salina (solução 37% de sal marinho) e, posteriormente, a solução foi acrescida de 10 larvas de *A. salina* por tubo de ensaio. Os testes foram realizados em triplicata. Após 24 h de incubação os microcrustáceos imóveis ou depositados no fundo do tubo de ensaio foram considerados como mortos (MEYER *et al.*, 1982).

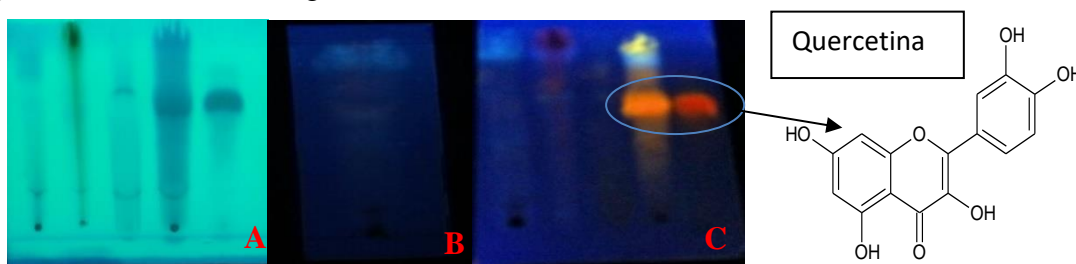
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração realizada com 150g de flores da espécie *J. acuminatíssima* com o solvente etanol 95% no processo de extração a frio, foi obtido um rendimento médio de 6,67% para (EJetOH). Os rendimentos médios das frações extraídas com solventes em ordem crescente de polaridade, foram FJH (2,3%), FJD (5,4%), FJA (5,2%) e FJM (6,1%). Este baixo rendimento pode ser justificado pelo fato de que os metabólitos secundários representam cerca de 1% de todo carbono total os vegetais (PINTO *et al.*, 2002). Tanto o método como o solvente utilizados influenciaram no rendimento e na composição dos extratos brutos obtidos, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes, pois a solubilidade de substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies do sistema em função de sua polaridade (FUMAGALI *et al.*, 2008).

3.1 Avaliação em placas cromatográficas

As **Figuras 1(A),1(B)** mostram as placas cromatográficas realizadas com a amostra EJetOH (extrato bruto) de *Justicia acuminatíssima* e a **Figura 1 (C)** representa uma comparação entre o padrão quercetina e a amostra EJeTOH, diluída em metanol e reveladas na solução de Difenilborato 1% (solução NP) e PEG.

Figura 1 - Placas Cromatográficas.



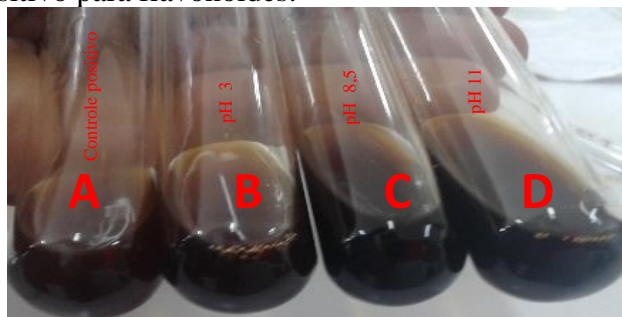
As manchas esverdeadas indicam presença de compostos fenólicos e as manchas de cor azul fluorescente indicam a presença de flavonoides. Um aspecto relevante observado nesse ensaio é a comparação do extrato bruto em etanol das flores que apresenta uma mancha semelhante e de mesmo fator de retenção quando comparado com o padrão de quercetina.

Assim, pode-se inferir que há a possibilidade de existir este constituinte no extrato bruto em etanol de *J. acuminatíssima*, visto que, há relatos da presença de quercetina em outras espécies do gênero *Justicia* (JESUS *et al.*, 2012); (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Na prospecção fitoquímica realizada com o extrato bruto da espécie *Justicia acuminatíssima* foi detectado compostos fenólicos (flavonoides), visto que, ocorreu mudança de coloração da solução estoque em cada pH. A **Figura 2** apresentou para pH 3

coloração vermelho-púrpura, pH 8,5 coloração escuro tendendo para o lilás e para pH 11 apresentou coloração vermelho-alaranjado. Espécies deste gênero são conhecidas por conter alcaloides, lignanas, compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonoides e aminas aromáticas (OLIVEIRA, 2000); (CORRÊA; ALCÂNTARA, 2012).

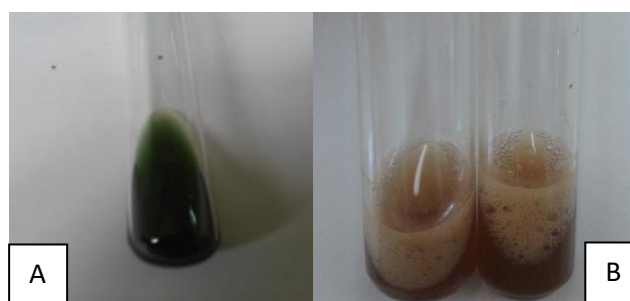
Figura 2- Teste positivo para flavonoides.



A prospecção fitoquímica dos extratos brutos e frações das flores de *J. acuminatissima* também apresentaram resultados positivos para triterpenos, visto que, apresentou coloração azulada inicialmente, seguida de coloração esverdeada (**Figura 3A**) no teste confirmativo com a adição do reagente de Liebermann-Burchard.

O teste realizado para identificar saponinas no extrato bruto da espécie *Justicia acuminatissima* apresentou resultado positivo, visto que, durante o ensaio químico foi observado formação de espuma persistente **Figura 3B**. No teste de confirmação foi observado formação de precipitado e a não formação de espumas, uma vez que com a adição do ácido ocorre a hidrólise das saponinas presentes nos extratos.

Figura 3- Teste positivo para triterpenos e saponinas



As saponinas apresentam atividades biológicas presentes em algumas plantas que se destacam a atividade hemolítica, citotóxica, molusquicida e anti-helmíntica e em relação a atividades farmacológicas realizam o aumento da excreção do colesterol, pela formação de complexo com as saponinas administradas por via oral ou por aumentar a eliminação de ácidos biliares nas fezes, sendo assim hipocolesterolemiantes (PRAJOGO *et al.*, 2007).

O teste para alcaloides mostrou resultados positivos, pois revelaram a formação de precipitado após adição do reagente de Dragendorff como observado na **Figura 4**.

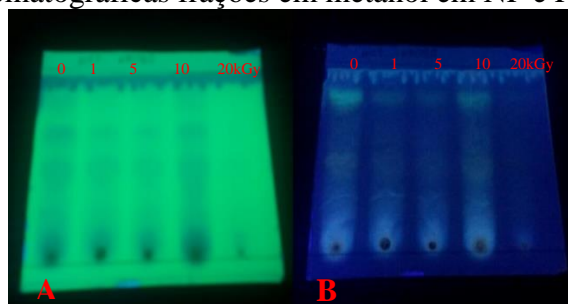
Figura 4- Teste positivo para alcaloides.



3.2 Perfil cromatográfico das amostras irradiadas e não- irradiadas

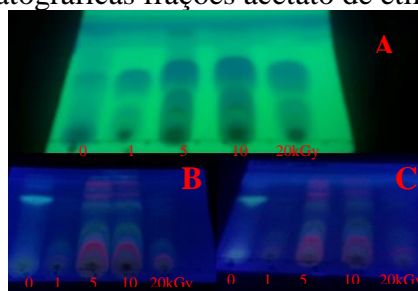
Diante da análise da placa com as frações em metanol observou-se que não houve diferenças entre os perfis químicos apresentados pelas frações de 0,1,5,10 e 20 kGy quando comparadas com a amostra que não foi irradiada. Pode-se observar também, a presença de manchas esverdeadas na **Figura 5 (A)** indicando a presença de compostos fenólicos e as manchas azul fluorescente e verdes na **Figura 5(B)** indicam a presença de flavonoides e cumarinas.

Figura 5 – Placas cromatográficas frações em metanol em NP e PGE.



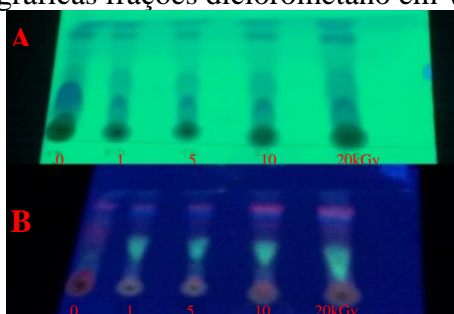
Na análise da placa das frações em acetato de etila reveladas com vanilina observa-se que há uma semelhança entre os perfis da fração não irradiada e das amostras obtidas em acetato de etila submetidas a irradiação gama. A **Figura 6 (A)** corresponde à análise da amostra FJA e pode-se observar a presença de coloração esverdeada que é característica de compostos fenólicos. A **Figura 6 (B)** corresponde à placa revelada com vanilina e pode-se observar a presença somente de manchas azul fluorescente na fração não irradiada (0 kGy) que indicam a presença de flavonoides, porém nas frações de 5 e 10 kGy observa-se uma mistura de cores (vermelho, verde, azul, amarelo e laranja) o que caracteriza à presença de um maior número de flavonoides, e esse maior número pode ser consequência das doses de 5 e 10 kGy de radiação gama incididas nessas amostras. Ainda na **Figura 6(B)**, observa-se que nos spots das frações com radiação de 1 e 20 kGy há um menor fator de retenção que é igual a 0,222. Posteriormente, ao realizar a análise no UV da placa cromatográfica revelada em solução de NP/PEG pode-se confirmar à presença de compostos fenólicos e flavonoides nas frações, **Figura 6 (C)**.

Figura 6 – Placas cromatográficas frações acetato de etila em vanilina e NP/PGE.



Na análise das placas cromatográficas das frações em diclorometano (FJD) foi observado semelhanças entre os perfis das frações irradiadas e da fração não irradiada. Na **Figura 7 (A)** pode-se observar a presença de manchas cinzas e verde-escuro que indicam a presença de compostos fenólicos e taninos. Na **Figura 7 (B)** pode-se observar que na fração 0 kGy apresenta somente coloração vermelho, já nas outras frações (1,5,10 e 20kGy) pode-se observar a presença de colorações laranja, verde, azul e vermelho, que é característico da presença de compostos fenólicos (Zuanazzi, 2004).

Figura 7- Placas cromatográficas frações diclorometano em vanilina.



3.3 Teste de citotoxicidade

Ao tratar os dados obtidos através de análise estatística pelo programa de Probitos Analysis, em limites fiduciais de 95%, a DL_{50} para EJetOH frente as larvas de *A. salina* foi de $13,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, constata-se que o extrato bruto das flores de *Justicia acuminatíssima* é tóxico para as larvas de *A. salina*, uma vez que, valores inferiores a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. São considerados tóxicos para *A. salina* (Meyer *et al.*, 1982).

4 CONCLUSÃO

As análises farmacognósticas das frações obtidas das flores indicaram similaridades em seus constituintes químicos quando comparados com os demais órgãos da espécie e demais espécies do gênero estudadas quimicamente. Os ensaios de prospecção fitoquímica das frações obtidas do extrato bruto das flores mostraram testes positivos para compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, taninos e saponinas. Nas avaliações de placas cromatográficas foram detectados compostos fenólicos e flavonoides. Nas avaliações dos cromatogramas por CCF das amostras submetidas a radiação gama em comparação com a amostra não irradiada permitem sugerir que a integridade química das amostras analisadas é mantida após exposição à radiação gama nas doses de até 20 kGy. Por conseguinte, os resultados encontrados neste trabalho são de extrema relevância, pois explicam a continuação dos estudos da espécie *Justicia acuminatíssima*, já que comprovam as atividades biológicas de extratos e/ou frações da

espécie. Com isso, podem contribuir para um maior conhecimento da flora, como também para o desenvolvimento de um novo fitoterápico com espécie da região do médio Amazonas.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Instituição de ensino Universidade Federal do Amazonas pelo suporte e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas-FAPEAM e MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C. R.R.; CORRÊA, G.M.; ABREU, V. G. C.; SILVA, T. M. S.; OSÓRIO, A. M. B.; OLIVEIRA, P.M.O.; ALCÂNTARA, F. C. **Effects of Gamma Radiation on Essential Oils: A Review**. IN: *New Insights on Gamma Rays*, Capítulo 8, P.179- 181 2017. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/new-insights-on-gamma-rays>>. Acesso em: 28 set. 2017, 16:30.

BRAZ, D. M; CARVALHO, R. M.; KAMEYAMA, Cíntia. **Acanthaceae da Reserva Florestal Mata do Paraíso**. v.25, n.4, p. 495-504, 2002.

CHEN, C. **Antiplatelet arynaphthalide lignans from *Justicia procumbens***. *Journal of Natural Products*. REVISTA BRASILEIRA DE BOTÂNICA. Viçosa, Minas Gerais, v.59, p.1149-1150, 1996

CORRÊA, G. M. **Estudo fitoquímico de *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae): caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e detecção de produtos radiolíticos**, 2013. 160 f. Tese de Doutorado em Química - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CORRÊA, G. M.; ALCÂNTARA, A.F.C. **Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review**. REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 22: 220-238, 2012.

FARKAS, J. **Irradiation as method for decontaminating food: a review**. *Int. J. Food Microbiol* 44: 189–204, 1998.

FUMAGALI, E., *et al.* **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas**, 2008.

GUIMARÃES, A.C. **Estudo químico e biológico de *Cladocolea micrantha* (Loranthaceae), uma planta medicinal da região Amazônica**, 2005. 305 f. Tese de Doutorado em Ciências. Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

JESUS, R. S., *et al.* **Teor de flavonoides totais no extrato bruto das folhas e dos galhos de *Justicia sp.*** Universidade Federal de Santa Maria, Mato Grosso do Sul, 2012.

MATOS, F.T. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.



MEYER, F.; PUTNAM, J. L. B.; NICHOLS, M.J.L.. **Brine Shrimp: a convenient general bioassay for activity plant constituents.** *Planta Med* 45: 31-34, 1982.

OLIVEIRA, A. F. M.; XAVIER, H. S.; SILVA, N. H.; ANDRADE, L. H.C. **Screening Cromatográfico de Acanthaceae Medicinais: Justicia pectoralis Jacq. E J. gendarussa Burm.** *REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS*, Botucatu, v.3, n.1, p. 37-41, 2000

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

PINTO, C.A.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas.** *QUÍMICA NOVA*, v. 25, supl. 1, p.45-61, 2002.

PRAJOGO, E.B.; GULIET, D.; QUEIROZ, E.F.; WOLFENDER, J.L.; AUCKY, H.; CHOLIES, Z.N.; HOSTETTMANN, K. **Symp. Biology, Chemistry, Pharmacology and Clinical Studies of Asian Plants**, Surabaya, Indonesia, p. 13, 2007.

SORIANI, R.R; SATOMI, L.C.; PINTO, T.J. **Effects of ionizing radiation in ginkgo and guarana.** *RAD PHYSIC CHEM*, 4: 239-242, 2005.

ZUANAZZI, J. A; MONTANHA, J. A. **Da planta ao medicamento**, REVISTA EDITORA, 5.ed., UFSC, 2004.

