

Estudo Farmacognóstico, Fitoquímico e Avaliação de Toxicidade de *Justicia secunda vahl*

Pharmacognostic Study, Phytochemical and Toxicity Assessment of *Justicia secunda vahl*

Estudio Farmacognostico, Evaluación Fitoquímica y Toxicidad de *Justicia secunda vahl*

Recebido: 20/08/2022 | Revisado: 02/09/2022 | Aceito: 05/09/2022 | Publicado: 12/09/2022

Camilla Eduarda Lima Rolim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1679-2922>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: rolimcamilla@gmail.com

Ana Carolina Sousa Quaresma

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9336-8725>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: carolinquaresma@gmail.com

Cristian Kallahan Silva Chagas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6509-7470>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: criskallahan@gmail.com

José Otávio Carrera Silva Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1691-1039>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: carrera@ufpa.br

Paulo Ricardo de Souza Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7258-9203>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: paulo.ricardof50@gmail.com

Maria Fâni Dolabela

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0804-5804>
Universidade Federal do Pará, Brasil
E-mail: fanidolabela20@gmail.com

Resumo

O estudo tem por objetivo descrever os resultados obtidos dos parâmetros de qualidade farmacognóstico, prospecção fitoquímica, toxicidade por estudos in silico e in vitro das folhas da *Justicia secunda vahl*. As folhas foram secas e pulverizadas, e os pós foram submetidos a testes farmacognóstico de pH, índice de espuma, determinação de umidade e densidade. Por meio de maceração com etanol obteve-se o extrato das folhas (EEF) e através de fracionamento por refluxo obteve-se as frações de hexano, diclorometano e metanol, seguido de prospecção fitoquímica do extrato etanólico por meio de precipitação. Para os estudos in silico selecionou-se as moléculas Luteolina 7-O- [β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -ramnosil-(1 \rightarrow 6)] β -glucopiranosídeo, Luteolina-7-O Rutinoside, β -Sitosterol, Campesterol, Friedelinol, lupeol, justiflorinol e apigenina onde utilizou-se os programas Marvin JS, PreADMETox e OSIRIS, para avaliação dos aspectos toxicológicos da espécie associado ao teste in vitro frente *Artemia Salina L.* Os pós foram classificados como moderadamente grossos, com teor de umidade dentro dos parâmetros recomendados, com presença de saponinas, pH neutro e baixa densidade. Na prospecção fitoquímica foram detectados flavonoides, cumarinas, terpenos e esteroides, taninos e depsídeos e depsonas. Dentre as moléculas avaliadas β -Sitosterol, Campesterol, Friedelinol não foram mutagênicas, apigenina e luteolina-7-O-rutinosideo não são carcinogênicas. O EEF e as frações apresentaram baixos níveis de toxicidade frente ao teste de *Artemia salina*.

Palavras-chave: Sanguinaria; Tóxico; Estudo in silico.

Abstract

The study by objective describes the results of the quality studies. The leaves were dried and pulverized, and the powders were selected for pharmacognostic tests for pH, foam index, moisture determination and density. From maceration of maceration with ethanol, the extract of the leaves obtained (E) and through the fractions of maceration, dichlorom of half hexanol, followed by prospection phytoethanolic by half-ethane and chemical reflux methane by reflux. For in silico studies, Luteolin 7-[β glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 2)- β ramnosyl-(1 \rightarrow 6) β -glucopyranoside, Luteolin-7-O Rutinoside, β -Sitosterol, Campesterol, Friedelinol, lupeol, justiflorinol and apigenin the programs Marvin JS, PreADMETox and OSIRIS were used to evaluate the toxicological aspects of the species associated with the in vitro

test against *Artemia Salina* L. of humidity within the parameters recommendations, with low density and neutral pH. In phytochemical analysis, flavonoids, coumarins, terpenes and steroids, tannins and depones were detected. Among the non-genic genetics, β -S-Campesterol, Friedelinolforam, apigenin and luteolin-7-O-carcinoside are not carcinogens. The EEF and the fractions showed levels of toxicity against the *Artemia salina* test.

Keywords: Sanguine; Toxic; In silico study.

Resumen

El estudio por objetivo describe los resultados de los estudios de calidad. Las hojas se secaron y pulverizaron, y los polvos se seleccionaron para pruebas farmacológicas de pH, índice de espuma, determinación de humedad y densidad. A partir de maceración de maceración con etanol, se obtuvo el extracto de las hojas (E) ya través de las fracciones de maceración, diclorom de mitad hexanol, seguido de prospección fitoetanolica por mitad de etano y metano de reflujo químico por reflujo. Para los estudios in silico, 7-[β -glucopiranosil]-(1 \rightarrow 2)- β ramnosil-(1 \rightarrow 6) β -glucopiranosido, Luteolin-7-O Rutinoside, β -Sitosterol, Campesterol, Friedelinol, lupeol, justiflorinol y Se utilizaron los programas apigenin Marvin JS, PreADMETox y OSIRIS para evaluar los aspectos toxicológicos de las especies asociadas al ensayo in vitro contra *Artemia Salina* L. de humedad dentro de los parámetros recomendados, con baja densidad y pH neutro. En el análisis fitoquímico se detectaron flavonoides, cumarinas, terpenos y esteroides, taninos y deponas. Entre las genéticas no génicas, el β -S-campesterol, el Friedelinolforam, la apigenina y la luteolina-7-O-carcinósido no son cancerígenos. El EEF y las fracciones mostraron niveles de toxicidad frente a la prueba de *Artemia salina*.

Palabras clave: Optimista; Tóxico; Estudio in silico.

1. Introdução

A *Justicia secunda* vahl popularmente conhecida como folha da vida, sanguinária, planta camarão, cascajera, insulina, cura tudo ou três ave marias, pertence ao filo Magnoliophyta e à família Acanthaceae. Os gêneros dessa família possuem um grande potencial de adaptação possibilitando que elas sejam encontradas em países da América Central e América do Sul, como o Brasil (Zambrano & Bustamante, 2017; Escobar & Flores, 2019; Lopes et al., 2022).

Estudos etnobotânicos demonstram que a *J. secunda* é amplamente empregada para o tratamento de distúrbios hematológicos, como anemias, para doenças respiratórias e gastrointestinais, assim como diversos episódios inflamatórios (Neba et al., 2020; Onochie, 2020; Araújo et al., 2021). Além disso, a espécie já foi submetida a estudos para a avaliação da atividade como antipirético, assim como utilização no tratamento de cálculos renais e aplicabilidade na etnoveterinária (Lopes et al., 2022; Anarado, 2021).

A atividade anti-inflamatória foi avaliada utilizando testes como, o edema de pata induzido por carragenina e atividade antinociceptiva em testes de formalina, também foi avaliado o nível de contorção abdominal induzida por ácido acético e o teste de movimento de cauda. Assim, o extrato metanólico obtido das folhas da *J. secunda* apresentou atividade anti-inflamatórias, nas doses de 0,1, 0,2 e 0,4g/kg, sendo observado um maior efeito inibitório na menor concentração. Já no teste da formalina foi avaliado apenas a fase 2, sendo observada uma redução no tempo de lambida da pata na maior dose do extrato. Também, no ensaio de contorção abdominal houve uma relação dose dependente, sendo a maior inibição na maior dose. Enquanto que no teste movimento da cauda houve um discreto aumento no tempo de retirada da pata na chapa quente, em especial, na maior dose. Também foi avaliada a capacidade antioxidante deste extrato utilizando o teste do DPPH, na concentração de 400 μ g/mL apresentou um efeito antioxidante de 54,07% (Onoja et al., 2017).

Quanto a atividade antibacteriana, sobre o *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, dos extratos etanólico, metanólico e aquoso das folhas da *J. secunda* foi avaliada através do ensaio de difusão em Agar (concentração de 150 mg/mL), sendo observados halos de inibição inferiores aos dos controles positivos (Ayodele, et al., 2020). Diante disso, estudos de prospecções fitoquímicas da espécie detectaram a presença dos seguintes metabólitos: alcaloides, ligninas, flavonoides, taninos, polifenóis, leucoantocianinas, quinonas, antocianinas e terpenos (Zambrano & Bustamante, 2017; Umoh et al., 2020).

Em relação a essas substâncias do extrato de diclorometano das folhas da *J. secunda* já foram isolados compostos como: auranamida e acetato de aurantiamida (Theiler et al., 2014). Outros compostos isolados de extratos das folhas: luteolina 7-O-[[β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -ramnosil-(1 \rightarrow 6)] β -glucopiranosídeo, luteolina 7-O-[[β -apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -xilopiranosídeo (Koffie et al., 2013), kaempferol-3-O-cumaroil glicosídeo, justiflorinol, luteolina-7-O-rutinosídeo, apigenina 6-C-glicosídeo-7-O-ramnosil-hexosídeo, quercetina-7-O-glicosídeo-3-O-rutinosídeo, apigenina-7-O-neohesperidoside, naringenina-7-O-rutinosídeo, lupeol, campesterol, β -sitosterol e friedelinol (Koffie et al., 2020).

Todavia, apesar de alguns estudos biológicos da *Justicia secunda* vahl., ainda há carência de estudos que avaliaram o potencial tóxico desta espécie. Diante disso, o estudo em questão avaliou os parâmetros farmacognósticos da droga vegetal *J. secunda*, bem como realizou prospecção fitoquímica do extrato de sua folha, seguida por avaliação preliminar da toxicidade por meio de testes *in sílico* e *in vivo* do extrato etanólico e suas frações.

2. Metodologia

2.1 Coleta e processamento do material vegetal

A planta foi coletada no município de Belém - PA e identificada por um especialista no herbário da Embrapa Amazônia Oriental, onde foi realizado depósito de exsicata no mesmo local com o número de registro IAN 200.836. Em seguida o material vegetal foi lavado e higienizado, bem como seco em estufa de ar circulante à 37-40° C por aproximadamente 7 dias, transcorrido esse período o mesmo foi pulverizado em moinho de facas, obtendo o pó das folhas.

2.2 Estudo Farmacognóstico

O pó obtido das folhas de *J. secunda* foi submetido a estudos de caracterização farmacognóstica, onde realizou-se a determinação dos parâmetros de densidade (Lachman, Lieberman e Kanig, 2001), granulometria, pH, teor de umidade relativa em balança de infravermelho e índice de espuma de acordo com a Farmacopéia Brasileira 6ª edição (2019). Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.3 Estudo Fitoquímico

Para obtenção do extrato etanólico (EEF), o pó das folhas foi submetido à extração por maceração exaustiva na proporção adequada com etanol (1:10 p/v). Posteriormente o EEF foi submetido a fracionamento por sistema de refluxo, com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e metanol onde obteve-se as frações de hexano (FrHex), de dicloro metano (FrDcm) e metanol (FrMet) (Vale et al., 2015).

O extrato foi submetido a análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e a prospecção fitoquímica através do método colorimétrico de reação de precipitação (Barbosa et al., 2004). Dessa forma, por prospecção foram pesquisadas as seguintes classes de metabólitos: flavonoides, triterpenos e esteroides, cumarinas, saponinas, polifenóis, alcaloides, taninos e antraquinonas.

Para a pesquisa de flavonoides, dissolveu-se 50mg do extrato em 10mL de metanol, seguida de filtragem e adição cinco gotas de ácido clorídrico (HCl) e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva. No caso das saponinas, foram dissolvidos 25mg do EEF em 5mL de água destilada em um tubo de ensaio o qual foi agitado vigorosamente durante 2min em tubo fechado. Avaliando a formação da espuma a qual em caso de permanência estável (1 cm de altura), mesmo após 30 minutos, serve como indicativo para a presença de saponinas (Barbosa et al., 2004).

Para a pesquisa de polifenóis e taninos, o extrato bruto (25mg) foi dissolvido em 5mL de água destilada, o qual foi filtrado e adicionado 1 a 3 gotas de solução alcoólica de FeCl₃ a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de

precipitado como indicio de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Sol. De FeCl₃). Assim, o aparecimento de coloração inicial entre o azul e o vermelho, é considerado positivo para presença de fenóis, de precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos (Barbosa et al., 2004).

Em relação aos triterpenos, 50mg do extrato seco foi diluído em 10mL de clorofórmio, filtrado sobre carvão ativado e transferido para um tubo de ensaio completamente seco. Foi adicionado 1mL de anidrido acético e agitado suavemente, em seguida, se adicionou cuidadosamente, 3 gotas de H₂SO₄ concentrados e retornado à agitação suave. O resultado esperado foi o rápido desenvolvimento de cores que vão do azul evanescente, ao verde persistente que indicam resultado positivo. Para antraquinonas 25mg do extrato seco foi diluído em 5mL de tolueno, filtrado e adicionado 2mL de solução de NH₄OH á 10%, e agitado suavemente. O resultado deveria ser aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indicando reação positiva (Barbosa et al., 2004).

Já para detecção de alcaloides, 25mg do extrato seco foi dissolvido em 5mL de solução de HCl a 5%, filtrado e separado em três porções de 1mL em tubos de ensaio, e adicionado gotas dos reativos: Reativo de Bouchardat, onde o resultado esperado era aparecimento de precipitado laranja avermelhado e Reativo de Dragendorff, onde se esperava precipitado vermelho tijolo. Para as cumarias 25mg do extrato seco foi diluído em 5mL de éter etílico, concentrado em banho Maria a 40°C até sobrar 0,5mL. Em papel filtro, foi aplicado gotas da solução etérea, de modo a formar duas manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro cada. A uma destas, foi adicionado 1 gota de solução de NaOH a 1N e um parte da mancha foi coberta com papel escuro e a outra exposta em luz ultravioleta, o resultado esperado era o aparecimento de fluorescência azul na parte exposta da mancha, indica reação positiva (Barbosa et al., 2004).

Para o FTIR foram analisadas alíquotas do extrato etanólico da folha (EEF) pela técnica Total Reflection and Internal Reflection (ATR), sobre leituras na faixa de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ em ATR bem como analisadas por espectroscopia no infravermelho usando um espectrofotômetro de infravermelho, no modelo Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR), Shimadzu ® IR Prestige-21.

2.4 Avaliação de Toxicidade

2.4.1 Bioensaio em Artemia salina

O ensaio com Artemia salina Leach foi realizado a partir de adaptação da metodologia de Meyer et al, onde para a eclosão dos cistos foi utilizada uma solução de sal marinho e água destilada (35 g/L), além de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L para ajuste de pH (9,0-10). Foram adicionados a solução 20 mg de cistos do microcrustáceo, ambientados sob controle de luz e temperatura de 27°C a 30°C, e incubados por 24h até eclosão dos metanauplios utilizados no bioensaio.

Além disso, foi realizado diluições seriadas a partir do extrato e das frações (FrMetF, FrDcmF e FrHexF), nas concentrações de: 5000; 2500, 1250, 625 e 312,5 µg/mL, tendo como controle negativo (CN) água salina contendo dimetilsulfóxido (DMSO) e como controle positivo uma solução de paracetamol na concentração de 800 mg/L. Nesse sentido, o ensaio foi realizado em quintuplicata onde se adicionou 10 crustáceos em cada tubo de ensaio, além dos grupos controle, sendo mantidos por mais 24h. Após os períodos, foi feita a contagem das artemias vivas e mortas para poder determinar a Concentração Letal de 50% (CL50) (Meyer et al., 1982).

Para o cálculo da CL50 utilizou-se a ferramenta online IC50 calculator e considerou-se atóxico quando a CL50 for acima de 1000 µg/mL, baixa toxicidade quando superior a 500 µg/mL, moderada entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxico quando a CL50 for inferior a 100 µg/mL (Amarante et al., 2011). E para o percentual de mortalidade utilizou -se a formula de Candido et al (2017).

2.4.2 Estudos In silico

Para seleção de moléculas realizou-se uma breve revisão de literatura, onde foram selecionadas moléculas detectadas nas folhas da *J. secunda* e que pertencessem as classes de metabólito detectadas neste estudo possuindo potencial biológico ou atividade biológica relatada. Diante disso, para este estudo foram utilizados os programas Marvin Js para desenhar as estruturas químicas, ADMETox (versão 2.0 Copyright© 2005; Preadmet, 2021) para as predições toxicológicas em organismos marinhos em associação com a ferramenta online OSIRIS para a predição de efeitos tóxicos, especificamente mutagenicidade tumorigenicidade, efeitos irritantes e na reprodução humana realizando as análises a partir de um algoritmo preditivo baseado em fragmentos estruturais de compostos que possuem e não possuem os efeitos mencionados, sendo os resultados expressos em negativo e positivo para todos os parâmetros analisados.

Em relação a avaliação dos critérios toxicidade de organismos marinhos, considerou-se os seguintes parâmetros: toxicidade em algas: tóxico < 1mg/L e não tóxicos > 1 mg/L (Costa et al., 2008); toxicidade em *Daphnia* sp.: tóxico < 0,22 µg/mL e não tóxico > 0,22 µg/mL (Guilhermino et al., 2000); toxicidade em peixes Medaka e Minnow: muito tóxico < 1mg/L, tóxico entre 1-10 mg/L, prejudiciais 10-100 mg/L e não tóxico > 100 mg/L (Zucker, 1985). Para a predição de carcinogenicidade dos compostos em roedores (Rodent Carcinogenicity) foi realizado a partir dos dados da National Toxicology Program (NTP) e FDA (Food and Drug Administration), sendo os resultados expressos em: carcinogênico (positivo) e não carcinogênico (negativo).

Para a predição de mutagenicidade utilizou-se do teste de ames, em que estirpes de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1525) com alteração do gene da histidina foram testadas. A variável a ser testada é a capacidade do agente mutagênico provocar reversão para o crescimento em meio sem histidina (Ames et al., 1875). Para a interpretação dos resultados deste teste considerou-se positivo quando houver reversão da mutação em uma ou mais bactérias em meio sem histidina e negativo quando não se observar reversão da mutação nas mesmas. Para falso positivo, ou seja, não houver reversão da mutação em nenhum clone da bactéria e mesmo assim o programa classificou mutagênico, o resultado foi desconsiderado.

3. Resultados e Discussão

3.1 Estudo Farmacognóstico

As análises granulométricas do pó das folhas de *J. secundam* demonstram que tal material possui um pó moderadamente grosso (Tabela 1), uma vez que houve a passagem de praticamente todo o pó pelo tamis de malha nominal de 710 µm, ficando retido mais de 40% no tamis de 250 µm de acordo com a descrição da Farmacopeia Brasileira (2019).

Tabela 1. Análise de Granulometria do pó das folhas da *J. secunda*.

Abertura nominal da malha	Média % ± desvio padrão
	Folha
1,70 mm	1,56 ± 0,14
710 µm	14,76 ± 1,20
250 µm	60,48 ± 0,99
180 µm	11,6 ± 1,48
125 µm	4,9 ± 0,26
Tubo Coletor	7,72 ± 1,23

Fonte: Autores.

Assim na Tabela 1 se deve observar que no Tamis de 250 µm houve uma retenção de 60,48% do pó, caracterizando-o como moderadamente grosso. Diante disso, sabe-se que a análise granulométrica objetiva demonstrar o tamanho das partículas

possibilitando avaliar a interação entre o material vegetal e o solvente durante o processo de extração, influenciando diretamente no mesmo. Uma vez que pós finos (que possuem partículas muito finas) não possuem tanta permeabilidade, por isso tendem a compactar e pós muito grosso diminuem a superfície de contato interferindo na eficiência do processo. Diante disso os pós moderadamente grossos, como a da *J. secunda* demonstra uma vantagem por apresentar tanto uma boa superfície de contato como menor compactação de partículas, melhorando a eficiência da extração (Cardoso, 2017; Do Nascimento, 2017).

Quanto ao padrão de densidade do pó se obteve um resultado de 0,300 g/mL (Tabela 2) considerado baixo quando comparado com o padrão para sólidos e líquidos, a água (1 g/mL). Dessa forma, é possível inferir que o pó da planta ocupa um volume maior o que influência na produção do extrato, significando que se faz necessário uma quantidade elevada de solvente durante o processo extrativo visando evitar que as partículas do pó flutuem diminuindo a superfície de contato, e conseqüentemente, o rendimento do extrato (Kakazu et al., 2020).

O teor de umidade relativa foi de 10,4% (Tabela 2), enquadrando-se nos limites preconizados pela Farmacopeia Brasileira (8-14%) para material vegetal. Assim, é possível inferir que os pós da folha da *J. secundam* possui uma estabilidade química e microbiológica considerada aceitável, o que reduz a possibilidade de desenvolvimento de fungos e bactérias assim como processos de deterioração dos compostos químicos da espécie por hidrólise e atividade enzimática (Cidade et al, 2018; Silva, 2018).

Quanto ao índice de espuma dos pós analisados, se obteve em alguns tubos uma espuma com tamanho superior a 1cm determinando um índice de espuma maior que 100 (Tabela 2), sendo considerado positivo para saponinas (Farmacopeia Brasileira, 2019). Quando se relaciona este resultado ao obtido na prospecção fitoquímica, onde também se detectou saponinas, fortalece a hipótese que este metabolito esteja presente nas folhas da *J. secunda*.

A análise do potencial hidrogeniônico (pH) demonstrou um pH neutro (pH 7,08) (Tabela 2), sugerindo que o pó das folhas dessa planta possui compostos de caráter alcalinos ou fracamente ácidos. Além disso, nesta planta foram detectados os metabolitos secundários: taninos, saponinas, flavonoides, triterpenos e cumarinas, tal complexidade de metabolitos pode ser responsável por esse pH.

A realização dos estudos farmacognósticos visam assegurar a qualidade da matéria-prima, possibilitando caracterizar os pós da espécie em questão objetivando conhecer quais as condições ideais para se trabalhar com o material vegetal para que se obtenha resultados favoráveis (Quaresma et al., 2021; Silva et al., 2022).

Tabela 2. Análise farmacognóstica do pó da folha de *J. secunda*.

Parâmetro	Média ± Desvio padrão
Perda por dessecação (%)	10,4 ± 0,3
pH	7,08 ± 0,62
Índice de espuma	>100
Densidade do pó (g/mL)	0,300 ± 0,010

Fonte: Autores.

Na Tabela 2 podemos verificar os valores obtidos em cada teste análise farmacognóstica que foram discutidos acima. Nesse sentido, os resultados obtidos demonstraram que a matéria prima possui qualidade para prosseguir para as próximas etapas.

3.2 Estudos fitoquímicos

Em relação ao rendimento do extrato etanólico e das frações das folhadas da *J. secunda* se obteve um percentual de 9,16% para o EEF; 5,26% para a FrHex; 1,62% para a FrDcm e 30,89% para a FrMet (Tabela 3). Outro estudo realizado com a espécie, utilizando um método de maceração exaustiva, obteve um rendimento 6,35% de extrato das folhas (Proventi, 2018), demonstrando que o processo extrativo deste trabalho é mais eficiente podendo estar relacionado as diferenças de granulometria dos pós e quantidade de solvente utilizada.

Tabela 3. Percentual de rendimento do extrato etanólico e frações da *J. secunda* .

Amostra	Rendimento
EEF	9,16%
FrHex	5,26%
FrDcm	1,62%
FrMet	30,89%

Legenda: EEF: extrato etanólico das folhas; FrHex: fração de hexano; FrDcm: Fração de diclorometano e FrMet: Fração de metanol.
Fonte: Autores.

Os valores obtidos na Tabela 3 demonstram o rendimento não só do extrato como de cada fração obtida através do fracionamento sobre refluxo de forma a quente com solventes de polaridade crescente, demonstrando que solventes de maior polaridade produzam um maior rendimento devido a sua similaridade com os compostos contidos na espécie.

Quanto a abordagem fitoquímica realizada com o extrato da folha permitiu detectar a presença de saponinas, taninos, flavonoides, terpenos e derivados de cumarina (Tabela 4). Outro estudo, realizado com extrato etanólico da *J. secunda*, detectou metabolitos semelhantes aos deste estudo (Do Nascimento Junior et al., 2020; Pérez & Ruiz, 2021; López et al., 2022; Ajuru, 2021). Contudo, outra pesquisa realizada com extrato obtido das folhas da *J. secunda* detectou a presença de alcaloides, antraquinonas, glicosídeos cardíacos e lignanas que não foram encontradas nessa pesquisa (Ayodele, et al., 2020). Essas diferenças entre substâncias químicas podem decorrer devido haver divergência entre os locais de coleta em relação a sazonalidade, disponibilidade hídrica e característica do solo.

Tabela 4. Propescção fitoquímica do extrato etanólico da folha da *J. secunda* Valh .

Classe Química	Prospecção Fitoquímica do EEF
Taninos	+
Flavonoides	+
Triterpenoides e esteroides	+
Derivados das cumarinas	+
Alcaloides	-
Antraquinonas	-
Saponinas	+

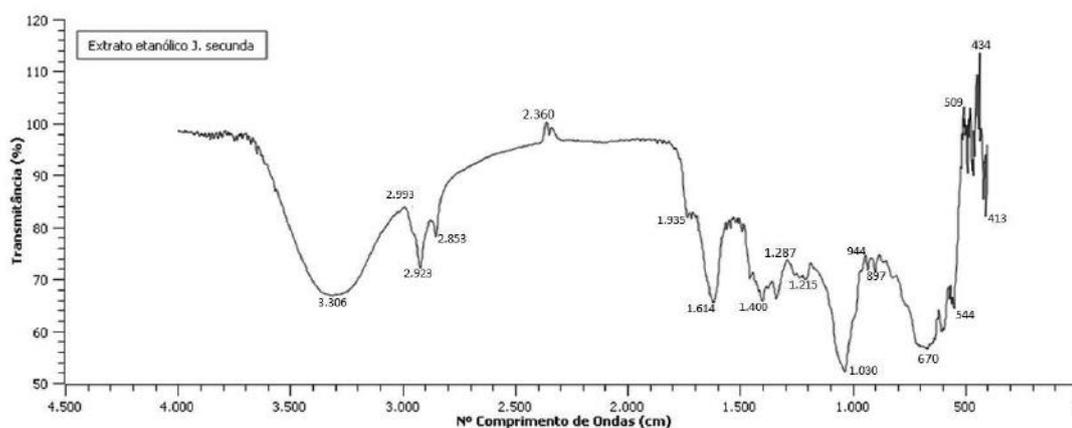
Legenda: (+) presença; (-) ausência Fonte: Autores.

As substâncias encontradas na espécie vegetal como demonstrada na Tabela 4, possuem dentre elas metabolitos com funções muito conhecidas e que provavelmente são responsáveis pelas atividades farmacológicas descritas na literatura, a exemplo dos flavonoides que são conhecidos por sua atividade oxidantes e terpenos por desenvolver atividade anti-inflamatória.

As análises por FTIR do extrato etanólico demonstraram bandas na faixa de 3.306 cm⁻¹ sugestiva da presença de

aminas secundárias ($-NH_2$), em 2.923 e 2.853 cm^{-1} onde sugerem a presença de alcanos ($-C-H$) (Tabela 5; Figura 1), na faixa de 2.360 cm^{-1} sugestivo de grupamentos alcinos e nitrilas ($-C\equiv C-$, $C\equiv N$), assim como na faixa de 1.614 cm^{-1} o que sugere a presença de grupamento carbonila ($R_2C=O$), na faixa de 1.400 cm^{-1} sugestivo de compostos aromáticos ($-C=C-$) e na faixa 1.030 cm^{-1} sugestivo de aminas alifáticas (estiramento C-N) (Thirumagal & Jeyakumari, 2020). Nesse sentido, a presença de grupos funcionais como anéis aromáticos e compostos hidroxilados são comuns em compostos fenólicos como flavonoides e cumarinas bem como terpenos e esteroides, o que sugere a presença desses compostos no extrato e nas frações (Shamili e Santhi 2019). As demais funções sugerem a presença de metabolitos da classe das saponinas e taninos corroborando com os achados na triagem fitoquímica supracitada (Figura 1; Tabela 5).

Figura 1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier do EEF de *J. secunda* Valh.



Fonte: Autores.

O extrato da folha da *J. secunda* apresentou uma diversidade de bandas quando passados no FTIR o que pode ser de grande auxílio para identificação da presença dos metabolitos contidos na espécie facilitando tal identificação.

Tabela 5. Regiões de absorção de ligação das moléculas do pó

Bandas (cm^{-1})	Tipo de ligação
3.306	$-NH_2$
2.923	$-C-H$
2.853	$-C-H$
2.360	$-C\equiv C-$, $C\equiv N$
1.614	$R_2C=O$
1.400	$-C=C-$
1.030	C-N

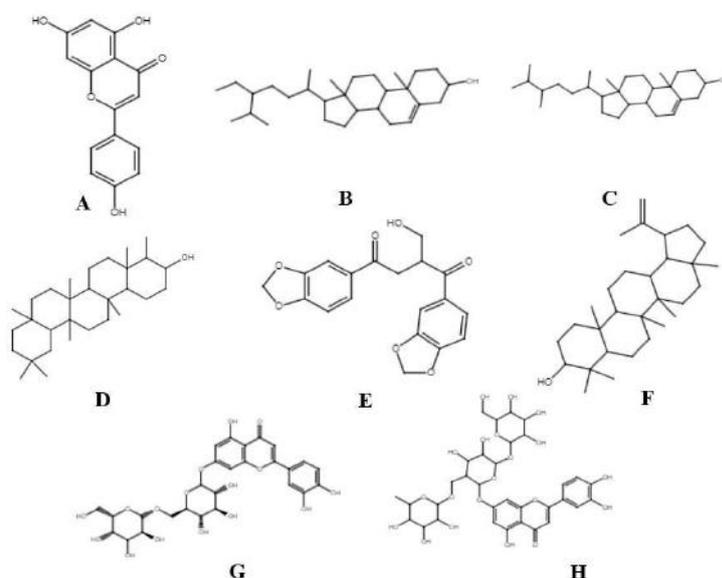
Fonte: Autores.

As bandas selecionadas foram para maior esclarecimento do estudo foram aquelas que se encontravam mais fortes

culminando na descoberta da presença de funções orgânicas possibilitando realizar um comparativo com a análise de prospecção e assim afirmar com mais convicção a presença dos metabolitos que foram encontrados na espécie e anteriormente citados.

Assim, a partir das análises químicas (prospecção por precipitação e FTIR) observou-se nas folhas da *J. secunda* pode-se sugerir que este extrato deva conter flavonoides, lignanas, terpenos e esteroides. Outros estudos químicos isolaram compostos pertencentes a estas classes, sendo as substâncias relatadas com maior frequência: β . Sitosterol, campesterol, Friedelinol, Lupeol no estudo Provensi, (2018) e Aragón (2020), Justiflorinol, luteolina-7-O rutinosídeo no estudo de Koffie et al. (2020); apigenina Luteolina 7-O-[-glucopiranosil-(1'-2)-ramnosil-(1'-6)]-glucopiranosídeo (Koffie et al, 2013). Desta forma, foram selecionadas as seguintes moléculas (Figura 2).

Figura 2. Metabólitos isolados de *J. secunda vahl.*



Legenda: (A) apigenina; (B) β . Sitosterol; (C) Campesterol; (D) Friedelinol; (E) Justiflorinol; (F) Lupeol; (G) luteolin-7-O rutinoside; (H) Luteolin 7-O-[-glucopyranosyl-(1'2) - -ramnosyl-(1'6)] -glucopyranoside. Fonte: Autores.

A Figura 2 demonstra os metabólitos selecionados dentre se tem compostos das classes que foram encontradas em prospecção fitoquímica tendo substâncias das classes: flavonoides, esteroides e terpenos.

3.3 Avaliação de Toxicidade

3.3.1 Bioensaio por *Artemia salina*

No que diz respeito ao teste de toxicidade em *Artemia salina* dos extratos e frações das folhas da *J. secunda* se obteve uma CL₅₀ entre as concentrações de 5000 e 2500 $\mu\text{g/mL}$ para o EEF e para a FrMet. Enquanto que, para as FrHex e FrDcm se obteve uma CL₅₀ entre as concentrações de 2500 a 1250 $\mu\text{g/mL}$. Diante disso, considerando a CL₅₀ pode-se sugerir que o extrato e suas frações são considerados atóxicos (CL₅₀ > 1000 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 6). Um estudo realizado com o extrato aquoso das folhas da *J. secunda* frente a *Artemia salina* identificou níveis semelhantes de toxicidade, onde tanto o extrato quanto a fração metanólica apresentaram níveis de toxicidade menores do que a fração de diclorometano (Lópes et al, 2022). Além disso, a mortalidade dos extratos de plantas pode estar diretamente ligada a dois fatores: a presença de metabólitos prejudiciais

as artemias como, taninos, saponinas, terpenos e cumarinas, presentes na *J. secunda* e também as concentrações testadas (Cantillo et al., 2007; Salgueiro et al., 2018).

Tabela 6. Avaliação da toxicidade de EEF e frações das folhas de *J. secunda* frente a *A. salina* .

Concentrações do extrato	($\mu\text{g/mL}$)	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Mortos%	Intervalo de confiança (95%)
EEF	5000	2939	64,6 ± 11,7	36,7	67,2 - 61,9
	2500		21,3 ± 10,2	7,4	23,6 - 18,9
	1250		20,6 ± 9,0	8,16	22,6 - 18,5
	625		8,6 ± 8,3	20,4	10,4 - 6,7
	312,5		10 ± 7,2	18,9	11,6 - 8,3
Frmet	5000	2866	58 ± 19,2	36,7	62,3 - 53,6
	2500		20 ± 2	2,6	20,4 - 19,5
	1250		15,3 ± 1,1	7,4	15,5 - 15
	625		15,3 ± 5	7,4	16,4 - 14,1
	312,5		21,3 ± 1,1	1,3	21,5 - 20,2
FrHex	5000	2577	90,6 ± 7	86,3	92,1 - 89
	2500		56,6 ± 20	51,6	61,1 - 52
	1250		33,3 ± 16,2	27,8	37 - 30
	625		28,6 ± 13,3	23 z23,7	31,6 - 25,5
	312,5		29,3 ± 14		32,4 - 26,1
FrDcm	5000	1503	91,3 ± 7	87	92,8 - 89,7
	2500		70 ± 14,4	65,3	73,2 - 66,7
	1250		44,6 ± 16,1	39,3	48,2 - 41
	625		31,3 ± 15,5	25,8	34,8 - 27,7
	312,5		16,6 ± 10	10,8	18,8 - 14,3

Parâmetros: >1000 $\mu\text{g/mL}$ atóxico; >500 $\mu\text{g/mL}$ baixa toxicidade; de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ toxicidade moderada; muito tóxico <100 $\mu\text{g/mL}$ (Amarante et al., 2011)

Legenda: EEF: extrato etanólico das folhas; FrHex: fração de hexano; FrAct: fração de acetato de etila; FrDcm: Fração de diclorometano e FrMet: Fração de metanol. DL50: Dose letal de 50%. Fonte: Autores

A Tabela 6 demonstra as concentrações letais encontradas no bioensaio de *Artemia salina* onde foram encontrados valores acima do considerado tóxico para esse teste demonstrando que a espécie vegetal em estudo possui um caráter não tóxico para os metanauplios em questão.

3.3.2 Predição de toxicidade

Apesar do extrato e frações não terem demonstrado efeito tóxico em *A. salina*, é importante verificar se os compostos presentes nesta espécie possuem potenciais tóxicos. Uma estratégia inicial para realizar esta avaliação é a utilização de estudos *in silico*, que permitem prever a toxicidade em diferentes modelos.

Mediante avaliação de toxicidade em organismos marinhos, todas as moléculas apresentaram toxicidade para algas, quase todas foram tóxicas para crustáceos *Daphnia*, com exceção das moléculas Luteolina 7-O- [β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -ramnosil-(1 \rightarrow 6)] β -glucopiranosídeo e luteolina-7-O rutinosídeo. Quanto a análise de toxicidade em peixes todas as moléculas apresentaram resultados similares para ambas as espécies de peixes (*Medaka* e *Minnnow*), as moléculas apigenina e justiflorinol foram muito tóxicas (< 1mg/L), enquanto que β -sitosterol, campesterol, friedelinol e lupeol se mostraram tóxicas (1-10 mg/L tóxico). A luteolina-7-O rutinosídeo se apresentou tóxica para a espécie *Minnnow* e prejudicial para espécie *Medaka*, já a molécula luteolina 7-O- [β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -ramnosil-(1 \rightarrow 6)] β -glucopiranosídeo foi a única que apresentou valores considerados não tóxicos (> 100mg/L) (Tabela 7). Nesse sentido, em relação a toxicidade encontrada nas espécies de peixes a causa mais provável deve estar na dupla exposição às substâncias, pelo contato branquial direto pela respiração e a pela ingestão de algas contaminadas, culminando em níveis de toxicidade variável (Silva Chagas et al., 2021).

Estes resultados, apesar de preliminares, permitem sugerir que as substâncias apigenina, justiflorinol, β -sitosterol, campesterol, friedelinol e lupeol podem ocasionar efeitos tóxicos subcrônicos e crônicos. Os testes em organismos marinhos visam avaliar parâmetros iniciais de intoxicação aguda, subcrônica e crônica possibilitando prever o possível comportamento dos compostos (Venturi, 2018).

Em relação a carcinogenicidade em camundongos os seguintes compostos apresentaram potencial: β -sitosterol, campesterol e o luteolina 7-O- [β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -ramnosil-(1 \rightarrow 6)] β -glucopiranosídeo. Também houve predição de carcinogenicidade em rato onde foi observada este efeito para apigenina, friedelinol e lupeol. Apenas os compostos justiflorinol e luteolina-7-O-rutinosídeo não apresentaram potencial carcinogênico. Além disso, a luteolina-7-O-rutinosídeo mostrou-se não mutagênico, bem como o β -sitosterol, campesterol e friedelinol (Tabela 7). Baseado nos resultados da carcinogenicidade e mutagenicidade, pode-se sugerir que o composto mais promissor para futuras avaliações de atividades biológicas é o luteolina-7-O-rutinosídeo.

Tabela 7. Predição de toxicidade de compostos presentes em *J. secunda* .

	Algas	Daphnia	Minnow	Medaka	Carcinogenicidade		Mutagenicidade
					Camundongos	Ratos	Teste de Ames
Apigenina	Tóxico	Tóxico	MT	MT	Negativa	Positiva	Mutagênico
β- Sitosterol	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Positiva	Negativa	Não mutagênico
Campesterol	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Positiva	Negativa	Não mutagênico
Friedelinol	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Negativa	Positiva	Não mutagênico
Justiflorinol	Tóxico	Tóxico	MT	MT	Negativa	Negativa	Mutagênico
Lupeol	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Negativa	Positiva	Mutagênico
Luteolina 7-O- [β-glucopiranosil-(1→2)-β-ramnosil-(1→6)]β-glucopiranosídeo	Tóxico	NT	NT	NT	Positiva	Negativa	Mutagênico
Luteolina-7-O Rutinósido	Tóxico	NT	Tóxico	Prejudicial	Negativa	Negativa	Não mutagênico

Parâmetros: Teste Algas: < 1mg/L tóxico, > 1mg/L não tóxico (Costa et al., 2008); Teste Daphnia: <0,22 µg/mL tóxico, > 0,22 µg/mL não tóxico (Guilhermino et al., 2000); Teste em peixes Medaka e Minnow: < 1mg/L muito tóxico, 1-10 mg/L tóxico, 10-100 mg/L prejudicial e > 100mg/L não tóxico (Zuncker, 1985). Estas análises foram realizadas no PREAMMET.

Legenda: MT: Muito tóxico; NT: Não tóxico Fonte: Autores.

A Tabela 7 traz a caracterização das moléculas testadas e seus níveis de toxicidade, demonstrando que todas as moléculas possuem algum grau de toxicidade frente pelo menos um modelo testado, isso mostra que toda molécula possui um potencial tóxico que deve ser conhecido e estudado para no futuro assegurar quais são seus efeitos tóxicos e níveis de segurança.

Diferente do ocorrido na análise utilizando o PREADMET, quando se avaliou a toxicidade no Osiris, observou-se que β -sitosterol, campesterol, friedelina, lupeol e luteolina-7-O- rutinoside não foram mutagênicos, tumorigênicos, irritante e nem possuem efeito sobre a reprodução. Entretanto, a apigenina e justiflorinol mostraram potencial mutagênico somente (Tabela 8). Quando se correlaciona os resultados obtidos, realmente, parece que o composto luteolin-7-O-rutinoside é o mais promissor para futuras avaliações de atividades biológicas.

Tabela 8. Predição de toxicidade de compostos presentes *J.secunda* através do programa OSIRIS .

	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Efeito Reprodutivo
Apigenina	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
β -Sitosterol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Campesterol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Friedelinol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Justiflorinol	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Lupeol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Luteolina-7-O Rutinosideo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fonte: Autores.

Tabela 8 demonstra que as moléculas isoladas apesar de tóxicas frente a modelos de organismos marinhos quando testadas em relação a fragmentos estruturais de seus compostos apresentaram-se não tóxicas e em sua maioria negativa para todos os modelos de teste o que sugere o potencial da espécie para estudos futuros.

4. Conclusão

Em síntese, a droga vegetal se encontra dentro dos parâmetros preconizados pela 6ª edição da Farmacopéia brasileira e tanto o extrato etanólico obtido das folhas de *J. secunda* quanto suas frações apresentaram baixo potencial tóxico para a *A. salina*, apesar da complexidade química deste extrato, onde se detectou a presença de saponinas, taninos, flavonoides, terpenos e derivados de cumarinas.

Em relação aos compostos já isolados da espécie, pode-se sugerir que são tóxicos para algas e crustáceos *Daphnia*, sendo que alguns ainda apresentam um grau de toxicidade maior para espécies de peixes, *Medaka e Minnow*. Dois parâmetros importantes que precisam ser observados são carcinogenicidade e mutagenicidade, sendo o composto com menor potencial a luteolina-7-O-rutinoside. Baseado nesta predição, pode sugerir que este composto pode ser priorizado para estudos de avaliação de atividades biológicas.

Assim, de acordo com os resultados encontrados a espécie parece ser promissora para testes futuros in vitro para avaliar sua capacidade tóxica visando avaliar sua capacidade citotóxica, genotóxica e mutagênica.

Referências

Ajuru, M. G., Kpekot, A. K., Omubo, J., & Morrison, I. (2021). Comparative Study of Proximate and Phytochemical Analysis of the Roots of *Justicia carnea* Lindl. and *Justicia secunda* Vahl. *Nigerian Annals Of Pure And Applied Sciences*, 4 (1), 22-33. <https://doi.org/10.46912/napas.217>. Doi: <https://doi.org/10.46912/napas.217>.

Amarante, C. B., Müller, A. H., Póvoa, M. M., & Dolabela, M. F. (2011). Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazônica*, 41(3), 431-4.

- Ames, B. N., Mccann, J. E., & Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*. *Mutation Research*, 31, 347-64. [10.1016/0165-1161\(65\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(65)90046-1).
- Anarado, C., Ajiwe, V. I. E., Anarado, C. J. O., Obumselu, T. U., & Okafor, S. E. (2021). Phytochemical, Proximate, In-vitro Antimalarial and Antimicrobial screening of leaf Extracts of *Justicia carnea* Lindl. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*, 10.9734/IRJPAC/2021/v22i830428
- Aragón, I. M. D. (2020). *Justicia secunda* Vahl, especie utilizada e la Medicina Indígena colombiana. Trabajo de Conclusão de Curso (TCC). Graduação em Farmácia. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/103953/DOMINGUEZ%20ARAGON%20ISABEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Araújo, F. A. De S., Rocha, R. G. De A., Campos, L. A. De A., Moura, D. F., Pereira, M. A., Martins, R. D., & Cavalcanti, I. M. F. (2021). Action of *Justicia pectoralis* Jacq. (Acanthaceae) in the treatment of respiratory tract infections: a literature review. *Research, Society and Development*, [S. 1.], 10 (16), e26101623152. [10.33448/rsd-v10i16.23152](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23152).
- Ayodele, A. E., Odusole, O. I., & Adekanmbi, A. O. (2020). Phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Justicia secunda* Vahl on selected clinical pathogens. *MicroMedicine*, 8 (2), 46-54. <http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/mmed/article/view/275>
- Barbosa, W. L. R. (2004). Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Revista Científica da UFPA*. Belém-PA. Vol.4.
- Brasil. (2019) *Farmacopeia Brasileira*, volume 1 e 2 (6º Ed.), Anvisa..
- Cantillo, J., Guette, J., Baldiris, R., Jaramillo, B., & Olivero, J. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda (CL50) frente a *Artemia franciscana* y la actividad hemolítica de los extractos acuosos, en diclorometano y metanólico parcial de *Justicia secunda* (Vahl.). *Scientia et Technica*, 13 (33), 257-8. <https://doi.org/10.22517/23447214.6093>
- Cardoso, I. C., Pereira, H. M.G., & Tappin, M. R. R. (2017). Influence of extraction technique and particle size of the plant material in the content of total phenolic compounds of tincture of *Alpinia zerumbet* leaves *Rev. Fitos*. 11 (1), 62-8. [10.5935/2446-4775.20170016](https://doi.org/10.5935/2446-4775.20170016)
- Cidade, A. F., Rodrigues, D., Santos, E. B. S., Rocha, E. P. S., Oliveira, G. C., Macedo, J. M., De Oliveira, J. V. S., De Mesquita, J. S., Pereira, M. V. D., Da Silva, M. A., De Araújo, N. F., Taborda, R. L. M., & Rodrigues, R. C. (2018). Caracterização Físico-Química E Microbiológica De *Peperomia quadrangulares*. http://www.sbpnet.org.br/livro/70ra/trabalhos/resumos/2340_138e010be804de69531c4063b5846dd1a.pdf
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., & Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química nova*, 31(7), 1820-30. <https://www.scielo.br/j/qn/a/X6sRQb5cdDnHxgPJvZR33PN/?lang=pt>
- Do Nascimento Júnior, C. S., Cavalcante, E. B. V. S., de Sousa, A. P., Silva, D. F., & Ferreira, M. D. L. (2020). Análise qualitativa do perfil químico de plantas medicinais do horto das Faculdades Nova Esperança. *Research, Society and Development*, 9 (9), e816998033. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.8033>.
- Escobar. M. S. P., & Flores. J. C. T. (2019). *Estudio preclínico normo-glucemiante de los extractos de las hojas de insulina (justicia secunda Vahl) en ratones*. Tese de Doutorado. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/43595>.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., & Soares, A. M. V. M. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3), 357-62. [10.1006/eesa.2000.1916](https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1916).
- Koffie, E. N., Guernevé, L. C., Lozano, P. R., & Lozano, Y. F. (2013). Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda*Vahl leaves for traditional medicinal uses. *Science Direct*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.001>.
- Koffie, E. N., Kassi, A. B. B., Adje, F. A., Lozano, Y. F., & Bekro, Y. A. (2020). Effect of freeze-drying and spray-drying on total phenolics content and antioxidant activity from aqueous extract of *Justicia secunda* leaves. *Trends in Phytochemical Research*, 4 (2), 69-76. https://tpr.iau-shahrood.ac.ir/article_672456.html.
- López, T., Morillo, M., Visbal, T., & Carmona, J. (2022). Estudio fitoquímico, actividad antioxidante y toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las hojas de *Justicia secunda* Vahl.(Acanthaceae), recolectada en Mérida-Venezuela. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 51 (1). <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/95333>.
- Herrera-Mata, H., Rosas-Romero, A., & Crescente, O. V. (2002). Biological activity of "Sanguinaria"(*Justicia secunda*) extracts. *Pharmaceutical biology*, 40 (3), 206-12. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.3.206.5826>.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & Mclaughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of medicinal plant research planta medica*. 45, 31-4. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
- Neba, N., Ngwa, M., Anuanwen, C., & Bup, D. N. (2020). Extração simultânea e Pasteurização (SEPA) de uma bebida de "raiz sanguínea" (*Justicia secunda*) deixa a parte I: estudos cinéticos. *Heliyon*, 6(2), e03297. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03297>.
- Onochie, A. U., Oli, A. H., Oli, A. N., Ezeigwe, O. C., Nwaka, A. C., Okani, C. O., Okam, P. C., Ihekwereme, C. P., & Okyoe, J. N. (2020). The pharmacobiochemical effects of ethanol extract of *justicia secunda vahl* leaves in *rattus norvegicus*. *Journal of Experimental Pharmacology*, 12, 423. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267443>.
- Onoja, O. S., Ezeja, M. I., Omeh, Y. N., & Onwukwe, B. C. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract of *Justicia secunda*Vahl leaf. *Alexandria Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2016.06.001>.
- Pérez, J. P. L., & Ruiz. E. R. C. (2021). *Estudio etnobotánico, químico y antioxidante de Justicia secunda Vahl*. Tese de Doutorado em Química e Farmácia. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas. Guayaquil-Ecuador. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/53660>.

Proventi, L. R. (2018). *Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de justicia thumbergioides(lindau) Leonard. (acanthaceae)*. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Centro Universitário de Anapólis, Goiás. <http://repositorio.aee.edu.br/jspui/handle/aee/1856>.

Quaresma, A. C. S., Melo, P. R. de S., Brandão, D. L. dos N., & Dolabela, M. F.(2021). Farmacognóstico, caracterização fitoquímica e na avaliação silico da atividade de monoterpenos isolados da espécie *Dispania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Research, Society and Development*, 10(8), e9210816715. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.16715>

Salgueiro, A. C. F., Goulart, da S. A., Viçosa, D. L., Viçosa, C. S. C. L., & Folmer, V. (2018). Resolução de problemas no ensino de Ciências: utilização de *Artemia salina* como modelo experimental para o estudo de plantas medicinais na escola básica. *Revista de Ensino de Bioquímica*, 16 (2), 31-47. <https://scholar.archive.org/work/t6xx6n7hivdavin2qr4hmsgecu/access/wayback/http://bioquimica.org.br/revista/ojs/index.php/REB/article/download/814/654>.

Shamili, G., & Santhi, G. (2019). Identification and characterization of bioactive compounds of leaves of *Justicia gendarussa* Burm. *F. Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences* 6, 1. <https://doi.org/10.26438/ijrbs/v6i1.145153>

Silva, M. C. M. da. (2018). *Estudo farmacognóstico, fitoquímico e atividade antiplasmódica de Aspidosperma eteanum Markgr.* Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará, Belém .<http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/10548>

Silva Chagas, C. K., Rolim, C. E. L., Martins, H. P. Dos S., & Dolabela, M. F.(2022) . In silico study of phenolic compounds isolated from *Inga laurina*. *Research, Society and Development*, [S. 1.], 11 (2), 24511225592. 10.33448/rsdv11i2.25592.

Silva, I. P. Da., Lins, F. A., Costa, L. Dos S., Sobreira, A. L. De C., & Souza, J. B. P. De .(2022). Jatoba tincture (*Hymenaea* sp.): physico-chemical aspects of quality and assessment of antimicrobial activity. *Research, Society and Development*, [S. 1.], 11 (6), 11111628865. 10.33448/rsd-v11i6.28865.

Theiler, B. A., Revoltella, S., Zehl, M., Dangl, C., Caisa, L. O. E., König, J., & Glasl, S. (2014). Secundarellone A, B e C das folhas de *Justicia secunda* Vahl. *Phytochemistry letters*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.05.007>.

Thirumagal, N., & Jeyakumari, A. P.(2020). Propriedades estruturais, ópticas e antibacterianas de nanopartículas de prata sintetizadas verdes (AgNPs) utilizando extrato de folha *justicia adhatoda* L. *Journal of Cluster Science*, 31 (2), 487-97. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10876-019-01663-z>.

Umoh Romanus, A., Imoh, J., Umoh Omodot, T., Udoh Anwanabasi, E., Anah Victor, U., & Obah-Eni Love, C. (2020). Pharmacognostic Evaluation Of The Leaves And Stems Of *Justicia Secunda* Vahl.(Acanthaceae). *World Journal of Pharmaceutical Research*. ISSN 2277– 7105.

Venturi, I. *Estudo Fitoquímico e Avaliação Biológica de Flores e Frutos de Solanum dipolconos (Mart) Bohs.* (2018). Tese de doutorado. Universidade Vale do Rio Doce, Itajai, Santa Catarina. <http://siaibib01.univali.br/pdf/Ivonilce%20Venturi.pdf>

Vale, V. V., Vilhena, T. C., Trindade, R. C. S., Ferreira, M. R. C., Percário, S., Soares, L. F., Pereira, W. L. A., Brandão, G. C., Oliveira, A. B., Donabela, M. F., & De Vasconcelos, F. (2015). Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Malaria journal*, 14(1), 1-10. <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-015-0643-1>.

Kakazu, C. S., de Jesus, B. C., Tito, E. R. G., Luciano, L. A., & Silva, E. S. (2020). Identification of physical-chemical and microbiological parameters from obtaining the alcoholic extract (92°) of the walnut leaf (*Juglans regia* L.). *Brazilian Journal of Development*, 6 (10), 81185-95. <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/18702>.

Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. M. (1984). *Plant drug analysis*. Berlin:Springer.

Zambrano, M. P., & Bustamante, K. E. (2017). Caracterización y estudio Fitoquímico de *Justicia secunda* Valh (Sanguinaria, singamochilla, insulina). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1 (22), 4-6. <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/494>

Zucker, E. (1985). Hazard Evaluation Division Standard Evaluation Procedure: Acute toxicity test for freshwater Fish. Washington, USA: USEPA. <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/PB86129277.xhtml>.