

Otimização do processo extrativo assistido por ultrassom de 1,2-benzopirona e umbeliferona em *Justicia pectoralis* Jacq. (Acanthaceae)

Luan A. C. Lôbo¹ (IC)*, Alessandra R. S. Lima² (PG), Ana E. G. Morais¹ (IC), Thaisa L. C. Costa¹ (IC), Josana de C. Peixoto¹ (PQ), Joelma A. M. Paula² (PQ)

¹Curso de Graduação em Farmácia, Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, Anápolis, GO.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (Mestrado), UEG, Anápolis, GO.

* luanaugustoclobo@hotmail.com

Resumo: *Justicia pectoralis* Jacq. (Acanthaceae) é uma erva de interesse medicinal utilizada como analgésico, anti-inflamatório, broncodilatador e sedativo na medicina popular devido atividades farmacológicas comprovadas de seus marcadores químicos, 1,2-benzopirona e umbeliferona. O presente trabalho teve por objetivo otimizar a extração assistida por ultrassom (EAU) de cumarinas das partes aéreas da *J. pectoralis*. Um planejamento experimental Box-Behnken ³, com avaliação por metodologia de superfície de resposta (MSR) foram utilizados para investigar o efeito das variáveis de processo sobre a concentração de cumarinas. Três variáveis independentes foram avaliadas em três níveis: teor alcoólico (% p/p), proporção droga:solvente (g/mL) e tempo de extração (min). Os teores de cumarinas foram determinados por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Com base na análise dos dados da MSR e na função geral de otimização, os parâmetros ótimos obtidos foram: teor alcoólico de 15% (p/p), tempo de extração de 34 minutos e proporção droga: solvente de 1:10 g/mL. Os valores experimentais do teor de cumarinas obtidos apresentaram concordância com os valores previstos pela MSR e os resultados demonstram que a EAU é um processo de extração eficiente, com preservação dos compostos, além de ser simples, rápido e de baixo custo.

Palavras-chave: Metodologia de Superfície de Resposta, Box-Behnken, Extração Assistida por Ultrassom, cumarinas, CLAE – UV – Visível.

Introdução

Justicia pectoralis Jacq. (Acanthaceae), conhecida popularmente como chambá, é uma planta medicinal que possui atividades analgésica, anti-inflamatória, broncodilatadora e sedativa comprovadas (LEAL et al., 2000). Dentre os processos tecnológicos de extração de princípios ativos em materiais vegetais, a Extração Assistida por Ultrassom é considerado vantajoso, se comparado a outros métodos, devido à sua simplicidade, baixas temperaturas de trabalho (de 40 a 60 °C), alta taxa

de recuperação, baixa perda por oxidação, baixo consumo de solvente e elevado rendimento de extração (LINGZHU et al., 2015; PAN et al., 2012; WANG et al., 2013).

O presente estudo visou otimizar a EAU de cumarinas presentes nas partes aéreas de *J. pectoralis* com o intuito de aumentar a eficácia do processo de extração em relação ao tempo e ao consumo de solventes, como também obter maior concentração de substâncias ativas.

Material e Métodos

As partes aéreas de *J. pectoralis* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia, Goiás. As exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Goiás (registro HUEG10764). As amostras foram dessecadas à 40°C em estufa com circulação e renovação de ar e pulverizadas em moinho de facas.

Para a otimização da EAU foi utilizada a metodologia de superfície de resposta (MSR) em um modelo Box Behnken 3³. Com base em dados da literatura (ILBAY, SAHIN, KIRBASLAR, 2013; SAHIN, AYBASTIER, ISIK, 2013; WANG et al., 2013) foram selecionadas três variáveis independentes em três diferentes níveis: teor alcoólico de 15, 30 e 45 % (p/p), proporção droga:solvente de 1:10, 1:15 e 1:20 (g/mL) e tempo de extração de 20, 40 e 60 minutos.

Com o auxílio do software Statistica® (versão 12.0) foi planejada uma sequência aleatória das análises de acordo com o modelo estatístico, contendo 15 experimentos com três repetições do ponto central para a avaliação do erro puro.

Os teores de cumarinas dos 15 experimentos foram determinados por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE – UV – Visível), com coluna C18 de fase reversa (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), fase móvel metanol:água (40:60), fluxo isocrático de 1.0 mL/min, comprimento de onda de 323 nm. Para isso foi realizada em CLAE uma curva de calibração com os padrões 1,2-benzopirona e umbeliferona (Sigma-Aldrich). As curvas foram preparadas em triplicata, com 6 soluções volumétricas diluídas na fase móvel metanol:água (40:60) grau CLAE nas concentrações: 512; 409,6; 286,7; 172,0; 103,2 e 41,3 µg/mL para 1,2-benzopirona e 29,7; 23,7; 16,6; 9,9; 5,9; 2,4 µg/mL para umbeliferona. As soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,45 µm e transferidas para os vials apropriados. A partir do

cálculo de regressão linear foi obtida a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2) entre os diferentes níveis.

Os resultados para cada um dos 15 experimentos foram enquadrados em uma equação polinomial de segundo grau pela técnica de regressão múltipla. Os dados foram analisados utilizando o software Statistica® (versão 12.0). Três principais ferramentas utilizadas na análise de dados foram: análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta. Foram considerados efeitos significativos aqueles com valor de $p < 0,05$. As melhores condições de extração foram determinadas de acordo com a equação definida pelo método dos mínimos quadrados.

As condições consideradas ótimas foram validadas em triplicata avaliando a recuperação dos ativos estudados em comparação com o valor predito pelo modelo.

Resultados e Discussão

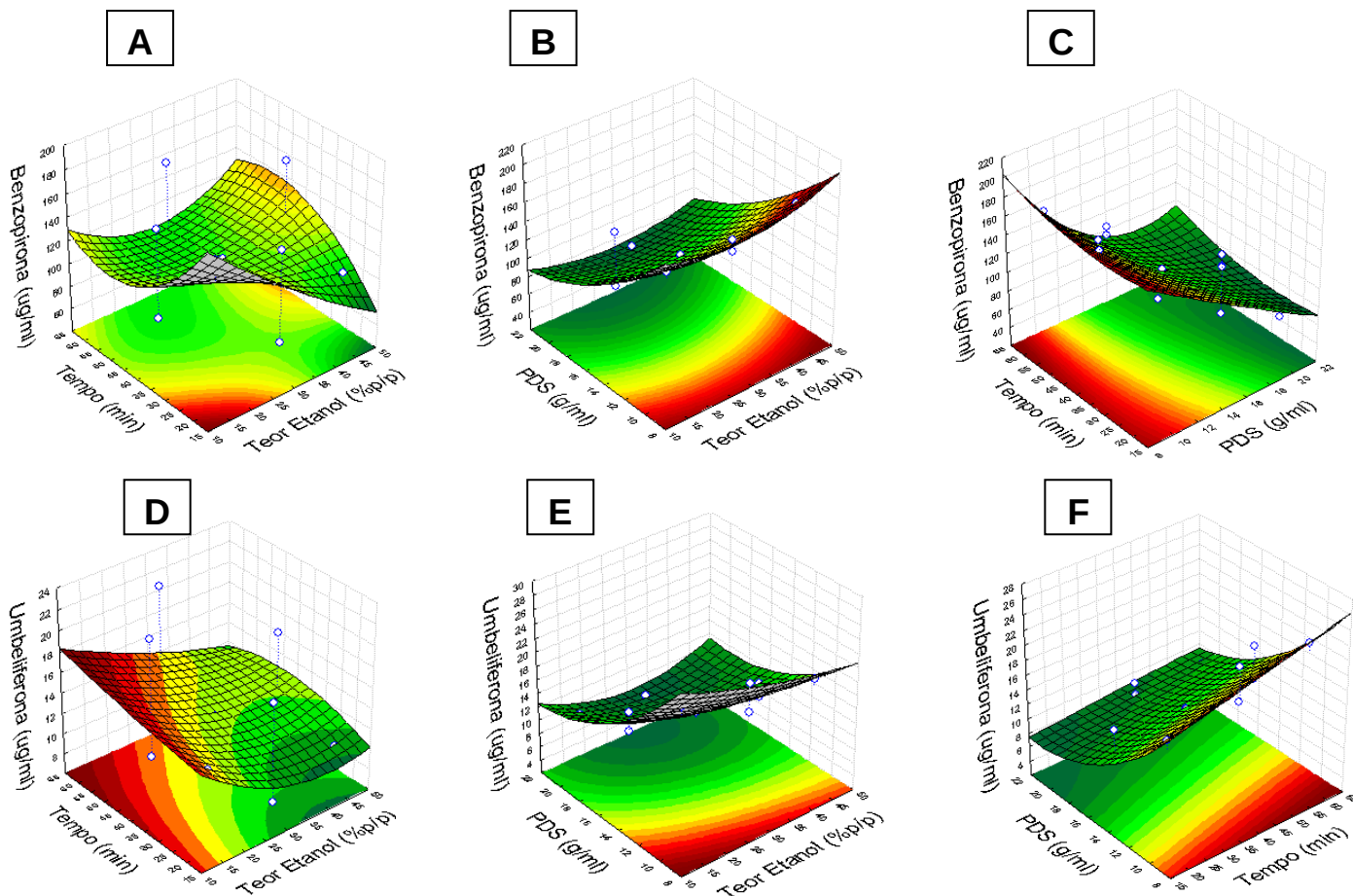
A partir da metodologia de CLAE validada para quantificação dos marcadores químicos nas amostras do extrato líquido foram obtidas as seguintes equações da reta: $y = 22473x - 133760$ com $R^2 = 0,9999$ para a 1,2-benzopirona; $y = 36778x - 14097$ com $R^2 = 0,9999$ para a umbeliferona. A partir da matriz experimental do modelo Box Behnken (3^3) utilizada na otimização da metodologia de EAU constatou-se que a concentração dos marcadores variou para a 1,2-benzopirona entre 71,26 e 171,47 $\mu\text{g/mL}$ e para umbeliferona entre 7,81e 22,58 $\mu\text{g/mL}$.

A ANOVA e a regressão linear/quadrática múltipla empregando a MSR mostraram que o modelo empregado foi significativo ($p=0,000011$), não demonstrando falta de ajuste ($p=0,072124$) e o coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,99916 e o r^2 ajustado de 0,99 para umbeliferona. Para a 1,2-benzopirona o modelo foi significativo ($p=0,000084$), não demonstrando falta de ajuste ($p = 0,426266$) e o coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,9978 e o r^2 ajustado de 0,99.

Os gráficos de superfície de resposta, ilustrados na Figura 1, destacam os efeitos das variáveis independentes sobre os teores de cumarinas. A Figura 1A mostra que a extração máxima de 1,2-benzopirona foi obtida em baixa concentração de etanol e em pequenos intervalos de tempo de extração, evidenciando o efeito quadrático identificado pelo modelo, uma menor concentração de etanol diminuiu a extração de 1,2-benzopirona quando o tempo de extração foi superior a 35 min.

A Figura 1B-C mostra que os maiores teores de 1,2-benzopirona foram observados em baixos valores de PDS independente das concentrações de etanol e tempo. O parâmetro PDS analisado nos gráficos da superfície de resposta (Figura 1B-C e 1E-F), indica que seu ponto máximo está fora da área experimental. Nestes casos, quantidades menores de solvente na extração deveriam ser testadas em novos planejamentos experimentais para obter o valor ótimo. No entanto, isso não é viável experimentalmente devido à alta intumescência do material vegetal.

Figura 1: Gráficos de superfície de resposta representando a concentração de 1,2-benzopirona (A – C) e umbeliferona (D – F) ($\mu\text{g/mL}$) em função das variáveis independentes para a extração assistida por ultrassom (EAU) de *J. pectoralis*.



Legenda: (A e D) tempo de extração (min) e teor alcoólico (% v/v); (B e E) proporção droga:solvente (g/mL) e teor alcoólico (% v/v); (C e F) proporção droga: solvente (g/mL) e tempo de extração (min); Nota: concentração de umbeliferona e 1,2-benzopirona expressa em $\mu\text{g/mL}$ da solução final injetada em CLAE.

Baseado na análise dos dados de superfície de resposta e na função geral de otimização foram determinadas as condições de EAU para a otimização das respostas. O objetivo era obter as maiores concentrações de 1,2-benzopirona e umbeliferona por meio da metodologia de extração. Desta forma foram sugeridos os

seguintes parâmetros de extração: teor alcoólico de 15% (p/p), tempo de extração de 34 (min.) e proporção droga:solvente de 1:10 (g/mL), para obter as concentrações de 22,16 µg/mL de umbeliferona e 163,86 µg/mL de 1,2-benzopirona previstas pelo modelo estatístico, com desejabilidade de 0,981851. Essas condições foram validadas em experimentos independentes realizados em triplicada, resultando uma média de 169,36 µg/ml de 1,2-benzopirona e 19,77 µg/ml de umbeliferona. Esses valores correspondem a 103,3% do valor previsto para 1,2-benzopirona e 89,2% para umbeliferona, demonstrando a validade do modelo na predição do fenômeno estudado.

Considerações Finais

O estudo de otimização da EAU de cumarinas de *J. pectoralis* mostrou que todos os parâmetros estudados exercem influência sobre o teor destes marcadores, sendo a EAU um processo rápido, eficiente e com baixo consumo de solventes.

Agradecimentos

Ao CNPQ, à FAPEG, ao Programa de Bolsas da Universidade Estadual de Goiás, ao Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia-GO, pelo cultivo e fornecimento de *J. Pectoralis*.

Referências

CHANFRAU, R. J. E.; RODRÍGUEZ, C. Harvest time influences on coumarin and umbelliferone contents in extracts of *Justicia pectoralis* Jacq.(tilo). **Revista Cubana de Farmácia**, v.48, p.477-485; 2014.

FONSECA, F. N. **Desenvolvimento Tecnológico de Fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – Chambá: obtenção do extrato do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica**. 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ILBAY, Z.; SAHIN, S.; KIRBASLAR, S. I. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p. 2804-2809, 2013.

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. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 151–159, 2000.

LINGZHU, L.; et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from maize filaments by response surface methodology and its identification. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.88, p.152 – 163, 2015.

SAHIN, S.; AYBASTIER, ONDER; ISIK, ESRA. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1361-1368, 2013.

WANG, X.; et al. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganiirrhizoma* with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.846–854, 2013.