

Estudo da atividade antioxidante das folhas de *Justicia thunbergioides* (Lindau) Leonard (Acanthaceae)

Guilherme Canedo Mesquita¹ (IC)*, Geralda de Fátima Lemes¹ (PQ), Josana de Castro Peixoto¹ (PQ), guilherme.memim@hotmail.com.

¹Universidade Estadual de Goiás - Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo. BR 153, Nº 3105, Anápolis. Caixa Postal 459, CEP 75132400.

Resumo: O gênero *Justicia* se destaca tanto pelo uso medicinal de suas espécies, como pelo potencial biológico dos metabólitos secundários isolados, como flavonoides, alcaloides, lignanas e terpenos. Sendo que os mesmos possuem alto potencial biológico, como antileishmaniose, antibacteriana, ação inseticida, antiangiogênico, anti-inflamatório, antineoplásico, antiviral, analgésico, antiplaquetário. A espécie *Justicia thunbergioides* é um subarbusto com ampla distribuição geográfica, com ocorrência confirmada em Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo. O presente trabalho relata o potencial antioxidante das folhas de *J. thunbergioides*. As folhas secas e pulverizadas foram submetidas a remaceração com metanol. O solvente foi eliminado em rotaevaporador, obtendo o extrato bruto seco. Parte do extrato foi submetido a partições líquido-líquido, obtendo as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila, as quais foram submetidas a bioensaios com o radical livre DPPH. O extrato bruto mostrou moderada ação antioxidante, enquanto a fração acetato de etila apresentou forte atividade com $CE_{50} < 17 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: *Justicia*. Flavonoide. Cumarina.

Introdução

Várias espécies de *Justicia* são usadas na medicina popular a exemplo de *Justicia spicigera* Schltdl, utilizada pela população mexicana no tratamento de câncer de colo do útero e como imunoestimulante. Enquanto a *J. adhatoda* Linn. é usada na Índia no tratamento de diarreia, tuberculose, asma, bronquite, tosse, como expectorante, antimicrobiano e antitumoral. A parte aérea de *J. betonica* Linn. é muito usada na Índia e em Uganda para tratar diarreia, inflamações e até mesmo da AIDS (CORRÊA; ALCANTARA et al., 2012).

Estudos farmacológicos com os extratos brutos metanólicos das folhas e dos caules de *J. gendarussa* mostraram significativa atividade *anti-helmíntico* (SAHA et al., 2012). O extrato das folhas mostrou também atividade citotóxica a células de câncer de pulmão (AYOB et al., 2014) e cervical (AYOB et al., 2013). Já a fração

acetato de etila da raiz apresentou ação anti-inflamatória *in vivo* com inibição da expressão de ambos, COX-2 e iNOS (óxido nítrico-síntase induzida) (KUMAR et al., 2012).

O extrato aquoso de *J. spicigera* mostrou também ser citotóxico a células leucêmicas, na concentração de 100 mg/mL, sem afetar a proliferação de células precursoras normais (CÁCERES et al, 2001). Enquanto que o extrato etanólico apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais de mama T47D) e cervical (HeLa), com valores de ED₅₀ de 0,43 e 5,59 µg/mL, respectivamente (VEGA et al, 2009). Recentemente, Awad e colaboradores (2015), demonstraram que a fração acetato de etila das partes aéreas dessa espécie possui potencial antioxidante e hepatoprotetor.

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes, principalmente, devido às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo humano. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, estimulou a busca por produtos naturais (compostos puros, frações e/ou extratos), capazes de minimizar ou prevenir os danos oxidativos às células vivas (LEONG et al., 2008).

Os antioxidantes naturais como no caso dos compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, principalmente, por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. Nesta classe, destacam-se os fenóis simples, os ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Além disso, a capacidade antioxidante de um produto natural pode servir como indício de outras atividades biológicas, tais como, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, dentre outras.

Os resultados anteriores demonstram a importância das espécies do gênero *Justicia* e evidenciam a relevância de estudos químicos e farmacológicos de espécies desse gênero, pouco explorado.

A espécie *Justicia thunbergioides* (Lindau) Leonard é um subarbusto de 0,3 a 1,2 m de altura, caule ascendente pubescente, possui distribuição geográfica ampla,

ocorrendo no Paraguai, Argentina, Bolívia e Brasil. A espécie é encontrada, preferencialmente, nas matas secas, em áreas com afloramento de calcário. A espécie floresce de janeiro a abril, com ocorrência confirmada em Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo (GBIF, 2016). A fotografia e a classificação taxonômica da espécie estão na Figura 1.

Figura 1- Fotografia de um exemplar de *J. thunbergioides* e classificação botânica da espécie.



Classe: Equisetopsida C. Agardh
Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.
Superordem: Asteranae Takht.
Ordem: Lamiales Bromhead
Família: Acanthaceae Juss.
Gênero: *Justicia* L:

Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/50107348>, acessada em 23/03/2016.

Material e Métodos

Coleta e identificação do material botânico

Foram coletadas amostras de folhas adultas, completamente expandidas abaixo do terceiro nó, contadas a partir do ápice, de 5-10 indivíduos das populações da espécie *J. thunbergioides*, ocorrente na BR 060, próximo ao município de Alexânia, estado de Goiás. As folhas frescas não apresentaram sintomas de necrose, clorose ou contaminação por fungos. Para uma maior uniformidade das amostras, as coletas foram realizadas sempre nos mesmos indivíduos, na mesma data e nos mesmos horários (por volta das 10 horas da manhã).

A exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Campus Anápolis, sob o número 7.130. A espécie foi descrita pela Profa. Dra Josana de Castro Peixoto.

Preparação do extrato bruto e obtenção das frações

As folhas foram dessecadas em estufa com ventilação forçada à 40 °C, pulverizadas em moinho elétrico de facas WILLYE TECNAL, modelo TE 650, em granulometria adequada à análise. O pó obtido (10 g) foi submetido à remaceração com metanol P.A. Após a extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, obtendo o extrato bruto metanólico (2,2 g). Parte do extrato (2,1 g) foi dissolvido em 200 mL de MeOH:H₂O (8:2) e, em seguida, submetido a partições líquido-líquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila em um funil de separação de 500 mL e 200 mL de cada solvente (4 X 50 mL). As fases orgânicas foram secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas em rotaevaporador, obtendo frações de diferentes polaridades.

Análise qualitativa da atividade antioxidante

As frações, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica, oriundas da partição do extrato bruto foram aplicadas com capilar de vidro em placas de alumínio impregnadas com sílica de gel 60 F₂₅₄ e eluídas com fases moveis adequadas. Para visualizar as manchas, usou-se radiação no ultravioleta em 254 e 365 nm, reagente anisaldeído sulfúrico e solução metanólica de DPPH à 0,4 mmol.L⁻¹. O aparecimento de manchas amareladas sob fundo de coloração púrpura na CCD, com o DPPH, indica a presença de compostos com atividade antioxidante na amostra.

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O método utilizado para a avaliação da atividade antioxidante das amostras foi à reação desses com o radical livre DPPH (2,2-di-(4-terc-octilfenil)-1-picril-hidrazil), conforme metodologia adaptada de Oliveira e colaboradores (2014).

Em um tubo de ensaio, misturou-se 2,7 mL de solução metanólica DPPH à 40 µg.mL⁻¹ a 0,3 mL de solução metanólica da amostra (extrato bruto e frações). A mistura reacional ficou incubada ao abrigo da luz por 30 minutos, em seguida, realizou-se a leitura das absorvâncias a 515 nm em um espectrofotômetro Biospectro SP-220, utilizando-se cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico. A mistura de 2,7 mL da solução de DPPH (40 µg.mL⁻¹) com 0,3 mL de metanol, que corresponde à absorbância inicial da solução de DPPH foi utilizada como controle. O branco foi feito misturando-se 2,7 mL de metanol a 0,3 mL de amostra. Os valores

das absorbâncias foram transformados em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) de acordo com a equação a seguir:

$$\%AA = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle}$$

O valor de concentração efetiva, CE_{50} foi determinada através da regressão linear da porcentagem de atividade antioxidante (% AA) em função da concentração da amostra. Utilizou-se o programa OriginPro 2015.

Resultados e Discussão

RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

Em estudos químicos e/ou farmacológicos de plantas medicinais, a primeira etapa, após a coleta do material botânico, é a preparação do extrato. Dentre as diversas técnicas usadas para este fim, destacam-se a maceração, a percolação, a extração por Soxhlet e a ácido-base, quando se quer direcionar a busca de alcaloides. Neste trabalho optou-se pelo uso da remaceração, por ser uma extração a frio, com o menor risco de reações química e formação de artefatos decorrentes ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas, além disso, a renovação constante do solvente possibilita um maior rendimento do extrato (YUNES, 2001).

Para a obtenção do extrato bruto foi usado o metanol, que consegue extrair compostos de baixa polaridade à polares. O rendimento do extrato foi de 22 %. Parte do extrato foi fracionado por partição líquido-líquido, obtendo cinco frações de diferentes polaridades. A massa da fração hidrometanólica ainda não foi determinada devido a impossibilidade de secá-la completamente no rotaevaporador a 40 °C. As massas e os rendimentos das frações encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Rendimento das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto.

Amostras	Massa (mg)	% rendimento ^{a,b}
Fr. hexânica	98	4,7
Fr. clorofórmica	286	13,6
Fr. acetato de etila	50	2,4
Fr. hidrometanólica	ND	-

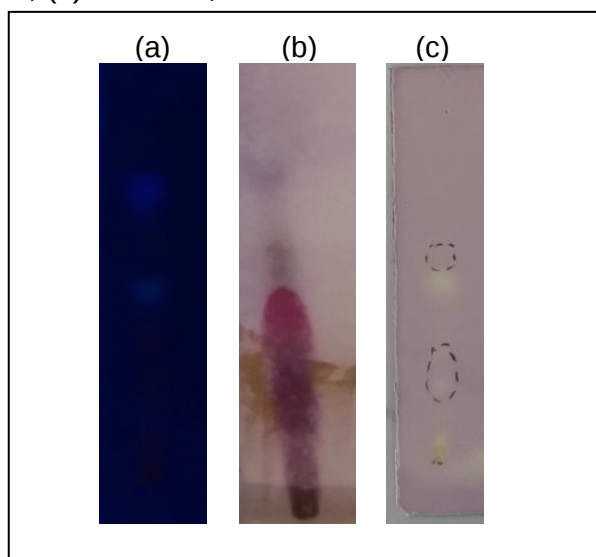
^aRendimento=(massa da fração/massa do extrato bruto) x 100. ND, Não determinado.

Análise qualitativa da atividade antioxidante

A fração hexânica oriunda da partição do extrato bruto foi analisada por CCD em sílica gel usando como fase móvel hexano:AcOEt (8:2). Observa-se no cromatograma (Figura 2a) manchas com fluorescência azul em 365 nm, sugerindo a presença de cumarinas na amostra. Quando a cromatoplaça foi revelada com anisaldeído sulfúrico, foram observadas manchas roxa e lilás (Figura 2b), permitido inferir a presença de terpenos e esteroides, respectivamente na amostra. Como se observa no cromatograma apresentado na Figura 2c, a fração hexânica não apresentou compostos com potencial oxidante.

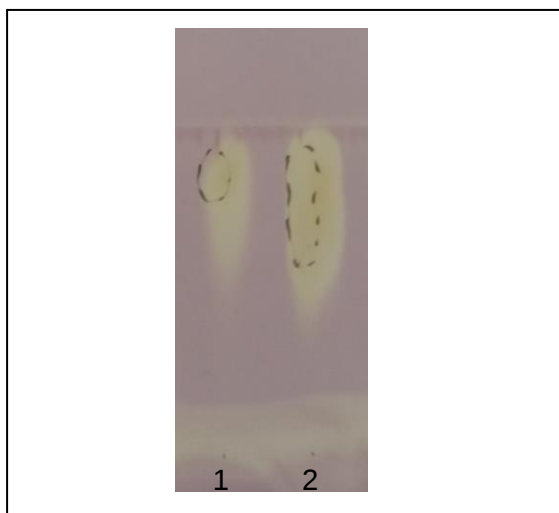
Segundo Lino e colaboradores (1997), as cumarinas são os principais constituintes químicos nas folhas de *J. pectoralis*, e são responsáveis pelas atividades analgésica e anti-inflamatória atribuídas a planta.

Figura 2- Cromatogramas da fração hexânica, revelador (a) UV 365 nm, (b) anisaldeído sulfúrico, (c) DPPH 0,4 mmol.L⁻¹.



As frações clorofórmica e acetato de etila foram submetidas a análise por CCD em sílica gel e fase móvel *n*-butanol:ácido acético:água (6:1:2). Observa-se no cromatograma apresentado na Figura 3, manchas amareladas sob fundo roxo, referentes a redução do radical DPPH, sugerindo a presença de compostos antioxidantes nas frações estudadas.

Figura 3- Cromatogramas das frações clorofórmica (1) e acetato de etila (2), revelador DPPH à 0,4 mmol.L⁻¹.



Esses resultados condizem com a prospecção fitoquímica realizado por Silva e Peixoto (2013), em que detectaram a presença terpenos, esteroides, flavonoides, entre outros, nas folhas de *J. thunbergioides*.

Os flavonoides são importantes metabólitos secundários encontrados em plantas superiores, com poder antirradicalar. Em plantas do gênero *Justicia* já foram relatados nas folhas de *J. spicigera* (VAZQUEZ et al., 2013) e de *J. gendarussa* (CORRÊA; ALCANTARA, 2012).

Análise quantitativa da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato metanólico e suas respectivas frações de partição das folhas *J. thunbergioides* foi avaliada pelo método espectrofotométrico utilizando-se o radical livre DPPH. A atividade antioxidante foi expressa pelo valor da CE₅₀ (concentração eficiente), que corresponde à concentração da amostra necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH. Assim quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o valor da CE₅₀, e maior

será a eficiência da amostra como antioxidante. Os valores da CE_{50} foram obtidos a partir da análise de regressão linear e mostraram boa correlação ($r > 0,999$).

O extrato bruto metanólico apresentou moderada atividade antioxidante com CE_{50} de $110,94 \pm 0,43 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Das frações provenientes do extrato bruto, a fração acetato de etila mostrou-se a mais promissora como antioxidante com $CE_{50} < 17 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto, a fração clorofórmica mostrou-se inativa com $CE_{50} > 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Considerações Finais

No estudo da atividade antioxidante do extrato metanólico e frações obtidas das folhas de *J. thunbergioides*, a fração acetato de etila apresentou-se como uma promissora fonte de compostos antioxidantes, com $CE_{50} < 17 \mu\text{g.mL}^{-1}$, no teste com o radical livre DPPH.

Agradecimentos

Agradecimentos a UEG-CCET e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação por possibilitar o desenvolvimento do projeto.

Referências

AWAD, N. E.; RAMADAN, N. S.; HAMED, M. A.; SOULEMAN, A. M. A.; ABDELKAWY, M. A.; ABDELRAHMAN, E. H. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Justicia spicigera* ethyl acetate fraction and characterization of its anthocyanin content International. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, n. 8, p. 91-96, 2015.

AYOB, Z.; MOHD, S. P. B.; ABD, A. S.; JAMIL, S. Cytotoxic Activities against Breast Cancer Cells of Local *Justicia gendarussa* Crude Extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

AYOB, Z.; SAMAD, A. A.; BOHARI, S. P. M. Cytotoxicity activities in local *Justicia gendarussa* crude extracts against human cancer cell lines. **Jurnal Teknologi**, v. 64, n. 2, 2013.

CÁCERES, J. R. C.; CANTÚ, F. A. G.; MENDOZA, M. T. M.; CHAVEZ, M. A. G.; RAMOS, G. M.; ZAMBRANO, I. R. R. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 691-697, 2001.

CORRÊA, G. M.; ALCÂNTARA, A. F. C. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 220-238, 2012.

GBIF, disponível em <http://www.gbif.org/species/3780196>. Acesso em 23/03/2016.

KUMAR, K. S.; VIJAYAN, V.; BHASKAR, S.; KRISHNAN, K.; SHALINI, V.; HELEN, A. Anti-inflammatory potential of an ethyl acetate fraction isolated from *Justicia gendarussa* roots through inhibition of iNOS and COX-2 expression via NF-kappa B pathway. **Cellular Immunology**, v. 272, n. 2, p. 283-289, 2012.

LEONG, C. N. A.; TAKO, M.; HANASHIRO, I.; TAMAKI, H. Antioxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 415-420, 2008.

LINO, C. S.; TAVEIRA, M. L.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p. 211-215, 1997.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95, 2004.

OLIVEIRA, G. L. S.; GOMES JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; FREITAS, R. M. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v. 35, n. 2, p. 293-300, 2014.

SAHA, M. R.; DEBNATH, P. C.; RAHMAN, M. A.; ISLAM, M. A. U. Evaluation of in vitro anthelmintic activities of leaf and stem extracts of *Justicia gendarussa*. **Journal of Pharmacology**, v. 7, n 1, p. 50-53, 2012.

VÁZQUEZ, M. C. J.; CASTRO, ANGEL, J. A.; CARRANCÁ, A. G. Kaempferitrin induces immunostimulatory effects *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, n. 1, p.337-340, 2013.

VEGA, E. A.; ESPEJO, A. S., ALARCÓN, F. A.; VELASCO, R. L. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 52, p. 78-82, 2009.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.