

1 **Perfil químico das folhas, ensaio tripanocida e avaliação sazonal do óleo essencial**
2 **de *Vitex agnus castus* L.**

3 Anderson Gonçalves de Oliveira COSTA^{1*} e Geone Maia CORRÊA¹

4

5 ^{1*}Autor correspondente: Graduando em Química Industrial: Anderson Gonçalves de
6 Oliveira Costa, Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e
7 Tecnologia - ICET. Nossa Senhora do Rosário, Tiradentes, CEP 69100000 - Itacoatiara,
8 AM – Brasil. E-mail: anderson.mcoliveira25@gmail.com

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20 **Perfil químico das folhas, ensaio tripanocida e avaliação sazonal do óleo essencial**
21 **de *Vitex agnus castus* L.**

22 **Resumo**

23 A espécie *Vitex agnus castus*, pertencente à família Verbenaceae, é uma planta
24 aromática bastante utilizada na medicina popular da Amazônia que possui flores
25 violáceas e sementes de coloração marrom, é popularmente conhecida como alecrim-de-
26 angola e alecrim do norte. O presente trabalho tem como objetivo estudar a composição
27 química do óleo essencial que será analisado por CG-MS, avaliar o rendimento do óleo
28 através de extrações sazonais e realizar ensaios fitoquímicos para detecção de classes
29 químicas presentes no extrato bruto de seco e nas frações de *Vitex agnus castus*. A extração
30 do óleo essencial foi feita a partir de suas folhas, ramos e flores através do processo de
31 hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho de Clevenger em circuito fechado. O
32 extrato bruto foi obtido através da técnica de extração pelo método de maceração a
33 quente e em seguida fracionado com solventes em ordem crescente de polaridade
34 (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). O extrato bruto seco e as frações
35 foram submetidas a testes fitoquímicos conforme a metodologia descrita por MATTOS
36 (2001) e SIMÕES (2007). Observou-se coloração amarelo claro para todas as amostras
37 de óleo essencial obtidas de *Vitex agnus castus*, e rendimentos de 0,088, 0,093, 0,060,
38 0,155, 0,192 e 0,192% referente as coletas realizadas bimestralmente a partir de agosto
39 de 2014 a junho de 2015, respectivamente. Para análise de CG-EM o 1,8-Cineol foi
40 detectado como constituinte majoritário. Para os testes fitoquímicos observou-se
41 indicativo positivo para as classes de taninos, esteroides, triterpenoides, saponinas,
42 flavonoides e alcaloides.

43 **Palavras-chave:** Alecrim do norte, óleo essencial, Verbenaceae,

44 hidrodestilação, teste fitoquímico.

45

46 Abstract

47 The species *Vitex agnus castus* (Verbenaceae), is an aromatic plant with violet flowers
48 and seeds of brown, it is known popularly as Alecrim-de-angola and Alecrim-do-norte
49 and it is quite used in the popular medicine of the Amazonian. The present works aims
50 to study the chemical composition of the essential oil that will be analyzed by CG-MS,
51 to evaluate the income of the oil through seasonal extractions and to accomplish
52 rehearsals phytochemical for detection of present chemical classes in the crude extract
53 of dry and in the fractions of *Vitex agnus castus*. The extraction of the essential oil was
54 made starting from their leaves, branches and flowers through the hidrodestilação
55 process for it drags to steam in apparel of Clevenger in a closed circuit. The crude
56 extract was obtained through the extraction technique by the maceration method the hot
57 and soon afterwards fractional with solvents in growing order of polarity (hexane,
58 dichloromethane, ethyl acetate and butanol). The dry crude extract and the fractions
59 were submitted to tests phytochemical as the methodology described by MATTOS
60 (2001) and SIMÕES (2007). coloration clear yellow was observed for all of the
61 obtained samples of essential oil of *Vitex agnus castus*, and incomes of 0,088, 0,093,
62 0,060, 0,155, 0,192 and 0,192% referring the collections accomplished bimonthly
63 starting from August 2014 to June of 2015, respectively. For analysis of CG-MS it was
64 had the 1,8-Cineole as majority constituent. For the tests phytochemical it was observed
65 indicative positive for the classes of tannins, esteroids, triterpenoids, saponins,
66 flavonoids and alkaloids.

67 **Keywords:** Alecrim-do-norte, essential oil, Verbenaceae, hydrodistillation, test
68 phytochemical.

69

70 **Abreviaturas:**

71 CG-EM: Cromatografia Gasosa Acoplado a Espectrometria de Massas

72 VT: Extrato bruto seco

73 VT-01: Fração Hexânica

74 VT-02: Fração Diclorometano

75 VT-03: Fração Acetato de Etila

76 VT-04: Fração Butanólica

77 VT-05: Fração Hidroalcolólica

78

79

80

81 **Introdução**

82 O conhecimento sobre plantas medicinais é um dos maiores recursos
83 terapêuticos de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002). No Brasil,
84 a utilização da medicina tradicional não é diferente, uma vez que o país é detentor de
85 cerca de 20% da biodiversidade mundial, com destaque para Floresta Amazônica, a
86 maior do planeta, que se apresenta como uma fonte inestimável de matérias-primas para
87 fins econômicos, sociais, científicos e de saúde (SOUZA *et al.*, 2004). Mediante essas
88 informações e objetivando contribuir com estudos químicos e biológicos de espécies
89 medicinais utilizadas na flora da Região Amazônica, este projeto teve como foco
90 principal o estudo de *Vitex Agnus castus*.

91 *Vitex agnus castus* é um arbusto bastante ramificado (Figura 1) com folhas
92 fortemente aromáticas, digitadas, opostas e flores labiadas, violáceas (Figura 2), em
93 cachos terminais, das quais se extrai seu óleo essencial. São naturais da região do
94 Mediterrâneo, sendo encontradas também em regiões quentes da Ásia, África e
95 Américas (MAIA *et al.*, 2001).

96 A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos das
97 espécies vegetais ou avaliar sua presença nos mesmos. Quando não se dispõe de estudos
98 químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode identificar os grupos
99 de metabólitos secundários relevantes. Atualmente os estudos fotoquímicos abrangem a
100 utilização de vegetais, e não apenas a plantas medicinais, para obtenção ou
101 desenvolvimento de medicamentos (SILVA *et al.*, 2010).

102 Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e
103 com baixo peso molecular, que podem ser extraídos de folhas e ápices com
104 inflorescências, através de hidrodestilação. (MORAIS, 2009). São constituídos por duas
105 classes bem distintas, que são os terpenoides, que representam a maioria dos
106 componentes e ocorrem com muito mais frequência e abundância; e os fenilpropanoides
107 que são responsáveis pelo sabor e/ou odor indispensáveis ao óleo (BELTRAME *et al.*,
108 2010).

109 *Vitex agnus castus* L. pertence à família Verbenaceae. Tal família constitui-se de
110 aproximadamente 100 gêneros e 2600 espécies (CRONQUIST, 1981 apud BRAGA et
111 al., 2009), ocorrendo em regiões temperadas, tropicais e subtropicais dos hemisférios
112 norte e sul (BONZANI et al., 2003 apud BRAGA et al., 2009). Espécies da família
113 Verbenaceae tem seu potencial econômico amplamente explorado, como por exemplo,
114 ornamentais (LORENZI & SOUZA, 2001 apud SANTOS et al., 2009) e terapêutico,
115 devido à presença de óleos essenciais.

116 Dessa forma, além de se avaliar quimicamente os óleos essenciais e o extrato das
117 folhas de *Vitex agnus castus* L. este projeto tem como objetivo verificar a variação do
118 rendimento dos óleos essenciais em coletas distintas, analisar os cromatogramas de CG-
119 EM obtidos das amostras de óleo de *Vitex agnus castus* e realizar ensaios fitoquímico para
120 detecção das classes químicas presentes nos extratos brutos.

121 **Metodologia (MATERIAL E MÉTODOS)**

122 **Coleta do Vegetal e Extração de óleo essencial**

123 As coletas dos materiais vegetais (folhas, ramos e flores) de *Vitex agnus castus*
124 L. (alecrim do note) foram feitas bimestralmente na região urbana de Itacoatiara, tendo
125 início no mês de agosto de 2014, com posteriores coletas nos meses de outubro e
126 dezembro. As demais coletas foram feitas de acordo com a proposta do projeto, ou seja,
127 bimestralmente. Dessa forma, foram realizadas coletas nos meses de fevereiro, abril e
128 junho 2015, conforme o cronograma de atividades.

129 **Extração dos óleos essenciais**

130 Os óleos essenciais de *Vitex agnus castus* L. foram obtidos por hidrodestilação
131 (Figura 3) das folhas, ramos e flores frescas, em aparelho de Clevenger durante seis
132 horas de extração. Em seguida, o óleo obtido foi centrifugado por 10 minutos a 3500
133 rpm para separação e retirada da água. Manteve-se os óleos obtidos de *Vitex agnus*
134 *castus* L. em frasco âmbar tampado sob refrigeração para análises químicas.

135 **Análise em CG-EM**

136 Os óleos extraídos foram submetidos à análise em CG-EM em equipamento
137 SHIMADZU acoplado a espectrômetro de massas SHIMADZU QP2010. Para
138 cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30 m x 0,25mm,
139 espessura do filme interno de 0,25 μ m. A identificação dos constituintes foi feita por
140 interpretação de seus respectivos espectros de massas e índice de retenção linear (Índice
141 de Kovat's), além de comparação com dados da literatura. Essas análises foram
142 realizadas em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-
143 USP.

144 **Coleta do Vegetal- Preparação do Extrato**

145 As folhas de *Vitex agnus castus* L. foram coletadas na região urbana de
146 Itacoatiara. Após a coleta colocou-se o material vegetal para secagem na estufa com
147 circulação de ar a 60 °C. Após total secagem o material foi triturado em moinho de
148 facas e os armazenou em sacolas de papel. Em seguida realizou-se a extração através do
149 método de maceração.

150 **Preparo e fracionamento do extrato**

151 Foram transferidos aproximadamente 593 gramas do material seco e triturado
152 para um balão de 12 L seguido de adição de 2,5 L de etanol (70%), posteriormente fez-
153 se a extração por um período de 24 horas. A mistura foi aquecida, após esfriar, a fase
154 alcóolica foi filtrada para um erlenmeyer. Este processo foi repetido até que se tivesse
155 extraído o máximo possível das substâncias. Para retirada do solvente, o material
156 extraído foi concentrado em evaporador rotatório. Ao final do processo de retirada do
157 solvente, dividiu-se o extrato em duas porções. Uma porção (600 mL) para obtenção do
158 extrato bruto seco e outra para fracionamento através da técnica de partição líquido-
159 líquido com solventes em ordem crescente de polaridade, tais como: Hexano (VT-01),
160 diclorometano (VT-02), acetato de etila (VT-03) e butanol (VT-04). Finalmente,
161 calculou-se o rendimento do extrato bruto seco e das frações.

162 **Prospecção fitoquímica**

163 **Caracterização de constituintes fenólicos**

164 Para preparo da solução estoque pesou-se aproximadamente 30mg do extrato
165 bruto seco e das frações acetato de etila, butanol e hidroalcóolica. Em seguida cada
166 fração foi extraída com diclorometano para retirada de clorofila. A fração diclorometano
167 foi filtrada e armazenada para testes posteriores. Ao material não solúvel foram

168 adicionados 30 mL de metanol (70%), em seguida o material obtido foi transferido para
169 um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com metanol (70%) com
170 ajuste de pH das solução estoque para 4. Alíquotas de cada fração obtida, foram
171 separadas em seis tubos de ensaio contendo 5 mL para realizar os seguintes testes:

172 Teste para fenóis e taninos: ao tubo número 1, foram adicionados 3 gotas de
173 solução alcóolica de cloreto férrico, seguido de agitação, observou-se qualquer mudança
174 de coloração e formação de precipitado. Comparou-se com um teste branco (água e
175 solução de cloreto férrico).

176 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides: aos tubos de número 2,3,4
177 foram feitos ajustes de pH. O tubo dois a pH 3, tubo três a pH 8,5 e o tubo quatro a pH
178 11. Observou-se qualquer mudança de coloração.

179 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas: aos tubos 5 e 6 foram
180 feitos ajustes de pH. O tubo cinco a pH 3 e o tubo seis a pH11. Com auxílio de um bico
181 de Bunsen aqueceu-se, cuidadosamente, cada tubo por aproximadamente 3 minutos.
182 Observou-se qualquer mudança na coloração, por comparação aos tubos
183 correspondentes utilizados no teste anterior (MATTOS,2001).

184 **Caracterização de terpenos (LIEBERMAN-BURCHARD)**

185 Em um bécker foram pesados 30mg de cada fração seguido de extração com
186 diclorometano. Filtrou-se a solução para um tubo de ensaio com auxílio de um funil
187 contendo alguns decigramas de Sulfato de Sódio Anidro sob algodão. Foi adicionado 1
188 mL de anidrido acético, e acrescentou-se, cuidadosamente, 3 gotas de ácido sulfúrico
189 concentrado. Após agitar o tubo observou-se o desenvolvimento de cores
190 (MATTOS,2001).

191 Teste para saponinas

192 O material insolúvel no teste anterior foi solubilizado em 15 mL de água
193 destilada, em seguida foi feita a filtração para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com
194 a solução por aproximadamente 3 minutos e observou-se a formação de espuma
195 (MATTOS,2001).

196 Teste confirmatório para saponinas

197 Foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico concentrado ao conteúdo do tubo
198 preparado no teste anterior, foi deixado em repouso por aproximadamente uma hora
199 aquecendo em banho-maria. Após esfriar, a solução foi neutralizada e agitada
200 novamente. Observou-se a formação de precipitado (MATTOS,2001).

201 Teste para alcaloides

202 Pesou-se 1 g do extrato bruto seco (VT) e 300 mg das frações VT-02, VT-03,
203 VT-04 e VT-0,5. Em seguida a adicionou-se 50 mL de água destilada e filtrou-se para
204 um tubo de ensaio. Acidificou-se o material filtrado a pH 4-5 com ácido clorídrico
205 0,1N. Em seguida extraiu-se as bases orgânicas adicionando NaOH 0,1N até alcançar
206 pH 11 (SIMÕES, 2007).

207 Posteriormente, realizou-se a extração líquido-líquido adicionando-se
208 aproximadamente 7 mL de diclorometano, formando assim duas fases: fase aquosa e
209 fase orgânica. A fase orgânica foi retirada do tubo de ensaio, adicionando-a em outro
210 tubo de ensaio com ajuste de pH a 2. A fase aquosa foi dividida em duas porções. Na
211 primeira porção foram adicionados 3 gotas de Dragendorff e na segunda porção 3 gotas
212 de reagente de Meyer (SIMÕES, 2007).

213 **Avaliação em placas cromatográficas**

214 Para realização de ensaio em placas cromatográficas primeiramente foi
215 preparado as soluções estoque, solubilizando 10 mg do extrato bruto seco (VT) e das
216 frações em Hexano (VT01), em Clorofórmio (VT02), em Acetato (VT03), em Butanol
217 (VT04) e Hidroalcolólica (VT05)) em 1 mL de metanol, respectivamente. As placas
218 utilizadas possuem uma corrida cromatográfica de 4,5 cm. Para eluição das substâncias
219 foram utilizados os seguintes gradientes: Butanol, Água e Ácido acético(BAW) na
220 proporção (4:5:1), Clorofórmio:Metanol (9,5: 0,5) e Hexano:Acetato de etila (7:3). Os
221 reveladores utilizados foram NP/PEG, Valinina e Dragendorff.

222 **Teste qualitativo para substâncias antioxidantes**

223 10 mg de extrato e frações foram dissolvidos em 1 mL de metanol, em seguida
224 foi aplicado em forma de banda em placas cromatográficas de sílica Gel, eluindo-se em
225 BAW (4: 5: 1), utilizando-se DPPH como revelador.

226 **Teste de Atividade contra o *Trypanosoma cruzi***

227 Os extratos foram testados através de ensaio colorimétrico (BUCKNER et al,
228 1996), com algumas modificações (OLIVEIRA et al, 2006). Para este ensaio foi
229 utilizado cepa de *T. cruzi* (*Tulahuen*) transformada para expressar β -galactosidase,
230 enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o vermelho de cloro-
231 fenol- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) for utilizado como substrato.

232 No ensaio com formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* provenientes de
233 cultura de tecido, cerca de 4.000 células L929 por poço foram semeadas em placas de
234 96 poços, seguindo incubação durante a noite em estufa, a 37 °C, para a adesão da
235 célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 tripomastigotas

236 provenientes de cultura de tecidos/célula, durante 2 h. Após esse período, o meio
237 contendo os parasitas extracelulares foram substituído por meio novo e a placa
238 novamente incubada a 37 °C durante 48 h. As amostras diluídas nas concentrações de
239 **20 e 10 µg/ mL** foram incubadas, e após incubação a 37 °C por 96 h foi adicionado o
240 substrato CPRG aos poços. A placa foi novamente incubada a 37 °C e a leitura realizada
241 após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando-se um filtro de 570 nm.
242 Simultaneamente, os seguintes controles foram utilizados: células não infectadas,
243 células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1 µg/mL (controle positivo) e DMSO
244 diluído em meio a uma concentração final de 1% (controle negativo). Os resultados
245 foram expressos por porcentagem de redução da absorvância dos poços experimentais
246 em comparação com a absorvância dos poços contendo células infectadas não tratadas.
247 Este ensaio foi realizado em parceria com o Centro de Pesquisas René Rachou,
248 FIOCRUZ-MG.

249 **Resultados e Discussões**

250 **Rendimento e análise CG-EM do óleo essencial de *Vitex agnus castus***

251 O óleo essencial obtido apresentou-se com uma cor amarelo claro (Figura 4), e
252 um odor característico da espécie. Conforme descrito por Gobbo - Neto & Lopes (2007)
253 a época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a
254 quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante
255 durante o ano. De acordo com a (Tabela 1), a diferença de rendimento entre os meses de
256 extração do segundo semestre de 2014 e primeiro semestre de 2015 são explicados por
257 estes estarem em épocas de seca e cheia, respectivamente. Dessa forma com um índice
258 pluviométrico maior entre os meses de fevereiro, abril e junho obteve-se um rendimento
259 relativamente maior quando comparados aos meses de extração feita nos meses de

260 agosto, outubro e dezembro. Entretanto, como observado na (Tabela 1) no mês de
261 outubro obteve-se um rendimento ainda menor quando comparados aos demais meses
262 de extração, tal diminuição pode ser explicada pelo fato de a planta estar em seu período
263 de inflorescência, e contendo folhas novas. De acordo FONSECA *et al*, (2007), o
264 rendimento de óleo essencial diminui quando a planta está emitindo folhas novas, e o
265 número de ductos foliares que armazenam óleo essencial aumenta à medida que a folha se
266 desenvolve.

267 Após análise do óleo essencial obtido de *Vitex agnus castus* observou-se que o
268 mesmo apresentou como constituinte majoritário o 1,8-Cineol (45,67%). Outros vinte e
269 dois compostos foram detectados na análise, dentre estes, quatro compostos
270 encontraram-se em maior concentração, como: Sabineno (15,15%); Biciclo [3.1.1] hept-
271 2-ene, 2,6,6-trimetil (9,66%); alfa-Terpinil acetato (5,27%); Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-
272 (1-metiletil) (4,65%). A identificação dos constituintes foi feita através da interpretação
273 de seus respectivos espectros e calculando-se o índice de retenção linear (índice de
274 Kovat's) (Tabela 2), comparando-os com a literatura.

275 **Rendimento de extrato bruto seco e frações**

276 Calculou-se o rendimento do extrato bruto seco (VT) e as frações VT-01, VT-
277 02, VT-03, VT-04 e VT-05 através da relação m/v, no qual se obteve os seguintes
278 resultados: 8,559%, 0,103%, 0,638%, 2,428%, 2,1953% e 0,2999%, respectivamente.

279 **Prospecção fitoquímica para constituintes fenólicos**

280 Para os testes de constituintes fenólicos, no extrato bruto seco e nas frações
281 submetidas aos testes fitoquímicos, observou-se, no tubo número 1, uma mudança de
282 coloração e formação de precipitado e nos tubos 3, 4 e 6 notou-se uma mudança de
283 coloração. Segundo MATTOS (2001), tais resultados são indicativos da presença das

284 classes de taninos condensados, flavonas, flavonóis e xantonas, respectivamente. Para
285 os demais tubos observou-se um resultado negativo para as classes analisadas. No
286 entanto, o resultado não implica necessariamente que não há presença dessas classes de
287 metabólitos secundários, sendo possível que a quantidade dos mesmos esteja em baixa
288 concentração não sendo o suficiente para serem detectadas.

289 Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel
290 aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais.
291 Esses metabólitos secundários presentes nas plantas estão relacionados, principalmente,
292 com a proteção, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas. Nos alimentos,
293 estes compostos podem influenciar o valor nutricional e a qualidade sensorial,
294 conferindo atributos como cor, textura, amargor e adstringência. Na maioria dos
295 vegetais, os compostos fenólicos constituem os antioxidantes mais abundantes,
296 desempenhando um papel importante nos processos de inibição do risco de doenças
297 cardiovasculares. Porém, quando em concentrações muito elevadas, ou em composição
298 inadequada, estes compostos podem conferir características indesejáveis, como o
299 escurecimento enzimático de frutas e a interação com proteínas, carboidratos e minerais
300 (ROCHA *et al*, 2011).

301 Na literatura é descrito compostos isolados de *Vitex agnus castus*, como por
302 exemplo, as substâncias Casticina (KARTNIG, 1986 apud BARRETO, 2004),
303 Cinarosídeo (LI, 2001 apud BARRETO, 2014) e Crisosplenetina (HIROBE, 1997 apud
304 BARRETO, 2004), estas pertencentes às classes de flavonóis e flavonas, o que explica o
305 indicativo da presença dessas classes de constituintes na espécie estudada.

306 Conforme descrito por DAS & KANODIA (2013) as folhas de espécies do
307 gênero *Vitex* são ricas em flavonoides, substâncias estas que tem propriedade
308 antioxidante e ação protetora contra o estresse oxidativo.

309 **Caracterização de terpenos**

310 Observou-se uma coloração azul para os tubos das frações VT-01 e VT-02. Este
311 resultado é indicativo para classe de esteroides livres (MATTOS, 2001). Nas demais
312 frações não foram identificadas tal classe metabólitos, isto pode ser explicado pelo fato
313 de as moléculas de terpenos serem de polaridade não coincidente com os solventes
314 utilizados nestas frações.

315 Segundo CHEN e colaboradores (2011), uma investigação fitoquímica do
316 extrato metanólico desengordurado de *Vitex agnus castus* foi realizada a fim de detectar
317 e isolar constituintes químicos utilizando diferentes técnicas cromatográficas, como:
318 cromatografia líquida sob vácuo, cromatografia de permeação em gel e cromatografia
319 em contracorrente de alta velocidade. Como resultado, 24 compostos foram
320 identificados e isolados através de métodos espectroscópicos. Dentre tais compostos,
321 obteve-se um diterpeno tipo labdano chamado viteagnusina e outros nove constituintes
322 isolados pela primeira vez a partir do gênero *Vitex*.

323 Através de um estudo farmacognóstico em espécie do gênero *Vitex*, BARRETO
324 (2004) constatou em testes fitoquímicos a predominância de monoterpenóides,
325 sesquiterpenoides, diterpenoides, e fenilpropanoides nas partes a aéreas de *Vitex*
326 *Gardneriana Shauer*. Sustentando assim, a hipótese da presença dessas classe de
327 substituintes na espécie estudada.

328 **Teste para saponinas**

329 No primeiro passo, observou-se uma espuma persistente em todas as frações. No
330 entanto, após acidificar e aquecer as soluções observou-se precipitado e não formação
331 de espuma nas frações VT-03, VT-04 e VT-05, o que indica a presença de saponinas
332 (MATTOS, 2001).

333 Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. É uma
334 estrutura com caráter anfifílico, parte da estrutura com característica lipofílica
335 (triterpeno ou esteroide) e outra hidrofílica (açúcares). Essa característica determina a
336 propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e
337 emulsificante. São classificadas de acordo com o número fundamental da aglicona, e
338 também, pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. O caráter ácido ocorre pela presença
339 de grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares. O caráter básico decorre
340 da presença de nitrogênio, em geral sob forma de uma amina secundária ou terciária,
341 como nos glicosídeos nitrogenados esteroidais (SCHENKEL et al., 2001).

342 BARRETO e colaboradores (2007) através de estudo fitoquímico da espécie
343 *Vitex gardneriana shauer* obtiveram resultado positivo para o teste de saponinas. Da
344 mesma forma, BRUM e colaboradores (2011) obtiveram tal resultado ao se analisar o
345 extrato hidroalcolólico de *Vitex megapotamica*.

346

347

348 **Teste para alcaloides**

349 Após adicção do reagente de Dragendorff no extrato bruto seco observou-se a
350 formação de precipitado escuro, o que segundo SIMÕES (2007) é indicativo de
351 alcaloides. Porém o mesmo não aconteceu ao se adicionar o reagente de Meyer. Em
352 relação às frações, não foi observado formação de precipitação ao se adicionar os

353 reagentes. A não detecção nas frações pode ser explicada pelo fato de a concentração
354 utilizada para estas frações serem menores, uma vez que, tal classe de constituintes foi
355 detectada no extrato bruto seco utilizando-se maior quantidade de massa para o
356 procedimento.

357 Na literatura é descrito que o alcaloide vitricina já foi isolado a partir do gênero
358 *Vitex* (DOPKE, 1962 apud BARRETO, 2004), sustentando a hipótese da possível
359 presença dessa classe de substituintes para a espécie estudada.

360 **Análise em placas cromatográficas**

361 Para as placas em que se utilizaram vanilina como revelador, ao aquecê-las por
362 aproximadamente 5 minutos, observou-se nas frações VT-01 e VT-02 manchas com
363 colorações que variaram entre rosa escuro a avermelhado e roxo. Tais colorações são
364 indicativos das classes de esteroides/triterpenoides e iridoides, respectivamente
365 (BARRETO, 2004).

366 Utilizando-se NP/PEG como revelador, observou-se a mesma em câmara
367 Ultravioleta a 365 nm (Figura 5). Manchas de fluorescência alaranjada, amarela ou
368 verde foram usadas como critério da evidência da presença de flavonoides (BARRETO,
369 2004).

370 Para a placa revelada com Dragendorff esperava-se uma mancha alaranjada
371 escuro como indicativo da presença de alcaloides, porém não apareceu nenhuma
372 mancha na placa. Todavia, como no teste fitoquímico houve um indicativo positivo para
373 esta classe de constituinte, o fato de a mancha não aparecer na placa pode ser explicada
374 pelo fato de a quantidade de extrato aplicado não ter sido suficiente para detecção.

375

376 **Teste qualitativo para substâncias antioxidantes**

377 Ao se utilizar DPPH como revelador, observaram-se manchas entre as frações
378 VT-02, VT-03 e VT-04. A atividade antioxidante (AA) é positiva quando manchas
379 amarelas são formadas a partir de branqueamento da cor púrpura do reagente DPPH
380 (Tepe *et al*, 2005).

381 Para o gênero *Vitex*, na literatura é descrito a presença de determinadas classes
382 de constituintes fenólicos e terpenos, como flavonoides, flavonas, flavonóis e esteróides
383 (BARRETO, 2004). Tais classes de substâncias tem poder oxidativo, sendo assim tais
384 manchas encontradas nas placas evidenciam o indicativo da presença dessas classes de
385 constituintes já constatadas nos testes preliminares de prospecção fitoquímica e
386 Lieberman-Burchard.

387 **Teste para atividade contra *Tripanossona cruzi***

388 As amostras de *Vitex agnus castus*, sendo óleo essencial, extrato bruto seco e
389 frações (VT-01, VT-02, VT-03, VT-04 e VT-05), foram enviadas a instituição parceira
390 para este ensaio. No entanto, devido há um atraso no cronograma, os ensaios ainda estão
391 sendo realizados e até o presente momento não nos foram enviados para análise dos
392 dados. Porém, na literatura é descrito que o óleo essencial desta espécie, mesmo em
393 altas concentrações, não é capaz de inibir o crescimento de formas tripomastigotas
394 (BORGES, 2012).

395 **Conclusão**

396 Através das análises de CG-EM do óleo essencial de *Vitex agnus castus* e após
397 comparar com a literatura, constatou-se que o 1,8-Cineol é o constituinte majoritário do
398 óleo essencial obtido. Além disso, observou-se que a época em que uma droga é coletada é
399 um fator importante que influencia em seus rendimentos, uma vez que, foi observado
400 maior rendimento de óleo essencial em época com maior índice pluviométrico.

401 A partir do estudo fitoquímico proposto segundo a metodologia descrita por
402 MATTOS (2001), observou-se para o extrato bruto seco e frações de *Vitex agnus castus*
403 o indicativo das classes de taninos, flavonoides, esteroides/triterpenoides, saponinas e
404 alcaloides. Tais classes de metabólitos também puderam ser evidenciadas através das
405 manchas com suas respectivas colorações indicativas nas placas cromatográficas.

406 Diante dessas informações, o presente trabalho, através das informações
407 indicativas para as classes de substituintes descritas, pode direcionar a pesquisas mais
408 específicas buscando isolar compostos presentes nesta espécie com aplicações
409 medicinais dentre elas para atividade antioxidante.

410

411

412

413

414

415 **Agradecimentos**

416 Os autores agradecem a Instituição de ensino Universidade Federal do
417 Amazonas pelo suporte e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas-
418 FAPEAM pelo apoio financeiro.

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434 **Bibliografia Citada**

- 435 • ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas
436 chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing
437 Corporation. (2007).
- 438 • BARRETO, L.C.L.S. 2004. Estudo farmacognóstico e determinação da
439 atividade biológica de *Vitex gardneriana shauer* (Verbenaceae). Dissertação de
440 Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal de
441 Pernambuco, Recife. 114 p.
- 442 • BARRETO, L.C.L.S. et al, 2007. Atividade moluscicida de extratos de aucubina
443 de *Vitex gardneriana shauer* (Verbenaceae) em embriões de *biomphalaria*
444 *glabrata*. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 26, 339:43.
- 445 • BELTRAME, J. M. F. *et al*, 2010 . Estudo de obtenção de Óleos Essenciais e
446 fatores de influência em sua composição. In: Encontro de Divulgação Científica
447 e Tecnológica, 2, 2010, Paraná. Anais... Paraná: Universidade Tecnológica
448 Federal do Paraná.
- 449 • BRAGA, J.M.F. *et al*, 2009. Morfoanatomia, histoquímica e perfil fitoquímico
450 de *Privalappulacea*(L.) Pers. (Verbenaceae). Acta Farma Bonaerense. **Revista**
451 **Brasileira de Farmacognosia**. Recife-PE, Vol. 19, nº 2B.
- 452 • BRUM, T. F. et al. 2011. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex*
453 *megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Ahead of print**. v. 37, n.2, p. 57-62.
- 454 • Buckner, F. S. et al, 1996. Efficient technique for screening drugs for activity
455 against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase.
456 **Antimicrob Agents Chemother** 40: 2592-2597.

- 457 • CHEN, S.-N. *et al.* 2011. Phytoconstituents from *Vitex agnus castus* fruits.
458 **Fitoterapia**. Elsevier. Vol. 82, p. 528-533.
- 459 • COSTA, V. C. O. *et al.* 2008. Composição química e modulação da resistência
460 bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E.
461 Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brazilian Journal of
462 pharmacognosy.
- 463 • DAS, Swarnamoni; KANODIA, Lalit. 2013. Effect of ethanolic extract of
464 leaves of *Vitex negundo* L. on acetic acid induced colitis in albino rats. **Asian**
465 **Journal of pharmaceutical and Clinical Research**. v. 6.
- 466 • FONSECA, M.C.M. *et al.*, 2007. Influência da época e do horário de colheita nos
467 teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*)
468 (Jacq.) Cassini. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.2, p.75-79.
- 469 • GOBBO – NETO, L; LOPES, N. P., 2007. Plantas Medicinais: Fatores de
470 Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, Vol.30.
- 471 • MACIEL, M.A.M. *et al* 2002. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos
472 multidisciplinares. **Química Nova** 25: 429-438.
- 473 • MAIA, A.C.C.M. *et al* 2001. *Vitex agnus castus* L: Um Estudo Etnobotânico e
474 Etnofarmacológico, **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**.
475 Paraná, Vol. 1, nº 2, p. 1-15.
- 476 • MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas
477 usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Imprensa
478 Universitária, 2001. 346p.

- 479 • MORAIS, L.A.S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química
480 dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. São Paulo. Vol. 27, nº 2, p.
481 S4050-S4063.
- 482 • Oliveira RB, Vaz ABM, Alves RO, Liarte DB, Donnici C, Romanha AJ, Zani
483 CL 2006. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase
484 inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101: 169-173.
- 485 • ROCHA, W. S. *et al.* 2011. Compostos fenólicos totais e taninos condensados
486 em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Fruct.** São Paulo. Vol. 33, nº 4, p.
487 1215-1221.
- 488 • SANTOS, J. S. *et al* 2009. Verbenaceae Sensu Stricto na Região de Xingó:
489 Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**. Campina Grande, PB. 60 (4), p. 985-
490 998.
- 491 • SCHENKEL, E.P. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento** .3 ed. Porto
492 Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap.27, p.597-619.
- 493 • SILVA, N.L.A. *et al.* 2010. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área
494 de proteção ambiental municipal do Inhanhum, Caxias, Maranhão. **Scientia
495 plena**. Vol. 6, nº 2.
- 496 • SIMIONATTO, E. *et al.* Composition and Antimicrobial Activity of the
497 Essential Oil from *Aloysia sellowii*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 16, nº 6B, 458-
498 1462, 2005. Sociedade Brasileira de Química.
- 499 • SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º ed.
500 Editora Universidade/UFRGS. Porto Alegre. 2010.

- 501 • SOUZA, A.Q.L. *et al* 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos
502 isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e
503 *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, 2: 185 – 195.
- 504 • TELASCREA, M. *et al.* 2008. Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp
505 from the atlantic rain forest. **Química Nova**, Vol. 31, nº 3, 503-507.
- 506 • TEPE, B. *et al.* 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil
507 and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chem** 90:
508 333-340.
- 509 • TORRES, R. N. S. 2008. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química**
510 **Nova**, Vol. 31, nº 3, 479-485, 2008.

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522 Figuras



523

Figura 1. Arbusto de *Vitex agnus castus* L.

524



Figura 2. Folhas e Flores de *Vitex agnus castus* L.

525

526



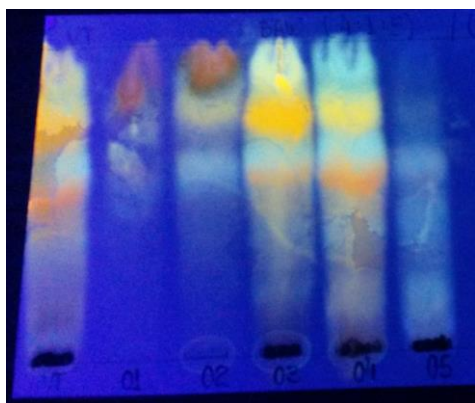
527

Figura 3. Material vegetal submetido a hidrodestilação.

528



Figura 4. Óleo essencial extraído da planta em estudo.



529

530

531

Figura 5. Placa Cromatográfica revelada com NP/PEG exposta a câmara UV (365 nm).



Figura 6. Placa Cromatográfica revelada com DPPH.

532 Tabelas

533 Tabela 1: Rendimento do óleo

Mês	Massa do Material	Volume de óleo	Rendimento (%)
	Vegetal (g)	extraído (µL)	
Agosto	680	600	0,088
Outubro	770,39	718	0,093
Dezembro	1500,37	906	0,060
Fevereiro	846,66	1312	0,155
Abril	900	1730	0,192
Junho	650	1250	0,192

534

535

536

Tabela 2. Constituintes detectados em análise CG-MS do óleo essencial de *Vitex agnus castus*

Componentes	IR _{tab}	IR _{calc}	Área (%)

Alpha Phellandrene	-	923,07	0,49
Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl		930,42	9,66
Sabinene	969 ^A	969,77	15,15
beta.-Pinene	980 ^B	975,54	1,51
beta.-Myrcene	991 ^C	987,16	2,39
alpha. -Phellandrene	1003 ^C	1006,10	0,54
alpha. -Terpinene	1018 ^D	1015,54	1,26
Benzene, 1-methyl-2-(1- methylethyl)	1026 ^A	1022,96	0,34
Cyclohexene, 1-methyl-4-(1- methylethenyl)		1027,05	3,23
1,8-Cineole	1031 ^A	1029,30	45,67
gamma.-Terpinene	1062 ^D	1055,16	1,86
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl- 1-(1-methylethyl		1178,05	4,65
3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4		1193,66	1,21

Terpinyl acetate <alpha->	1346 ^A	1343,55	5,27
1-Octyne (CAS) Hexylacetylene		1350,04	0,10
trans-Caryophyllene	1419 ^C	1413,0	1,40
1,6,10-Dodecatriene, 7,11- dimethyl-3-methylene		1450,91	1,34
3,9-Dodecadiyne		1453,60	0,31
Bicyclo.germacrene	1487 ^E	1488,83	2,18
Spathulenol (CAS) 1H- Cycloprop[e]azulen-7		1569,90	0,22
1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4		1596,86	0,24
Iso E Super <gamma->		1534,38	0,61
Elemol		1972,91	0,28

537 A= ADAMS 2007; B= Simionatto et al 2005; C= Torres et. al 2008;

538 D= Telascrea et al 2008; E= Costa *et al* 2008;

539 Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
		2014					2015						

1	Levantamento bibliográfico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	Preparação de exsicata	X											
3	Coleta do material	x		x		x		x		x		x	
4	Extração de óleos	x		x		x		x		x		x	
5	Tratamento dos dados				x		x		x		x		x
6	Preparação do extrato bruto				x	x							
7	Fracionamento do extrato bruto					x	x	x	x				
8	Ensaio químicos						x	x	x	x	x		
9	Teste de atividade tripanocida								x	x	x		
10	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) - Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)						x						x